การเตรียมวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์ จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในเซลล์ของไตหมู

นางมาลินี ตุงคะสามน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2520

002383

I 17031424

THE PREPARATION OF MODIFIED LIVE VIRUS RABIES VACCINE IN PORCINE TISSUE CULTURE

Mrs. Malinee Tungkasamon

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirement

For the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Chulalongkorn University

1977

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.วิศิษฐ์ ประจวบเหมาะ)
คณบดี

คณะกรรมการตรวจวิทยานิพนธ์ ..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร จีรวงส์)

..... กรรมการ
(แพทย์หญิง นงลักษณ์ อัศวจินดา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พิสวาท ทุติยะโพธิ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุมนา วรรธนะภูติ)

อาจารย์ผู้ควบคุมการวิจัย : แพทย์หญิง นงลักษณ์ อัศวจินดา

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์เรื่อง การเตรียมวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในเซลล์ของไตหมู

โดย นางมาลินี ตุงคะสามน

แผนกวิชา จุลชีววิทยา

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเตรียมวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้าสำหรับสัตว์จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในเซลล์ของไตหมู

ชื่อ นางมาลินี ตุงคะสามน แผนกวิชาจุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2519

บทคัดย่อ

การทดลองผลิตวัคซีนโรคพิษสุนัขบ้าจากเซลล์ไตหมู โดยเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสพันธ์ ERA ในเซลล์ ปรากฏว่า น้ำเลี้ยงเชื้อมีไวรัสไตเตอร์สูงสุดในวันที่ 9 ถึง $10^{-4.63}$ LD_{50}/0.03 ลบ.ซม. โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ รวมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ให้ไวรัสไตเตอร์สูงกว่า $10^{-4.0}$ LD_{50}/0.03 ลบ.ซม. ทุกครั้งเข้าด้วยกันเป็นวัคซีน แล้วทดสอบความปราศจากเชื้อของวัคซีนก่อนนำไปทำให้แห้ง การใส่ Stabilizer ลงในวัคซีนก่อนทำให้แห้ง จะช่วยให้ไวรัสไม่ถูกทำลายง่าย วัคซีนที่ทำแห้งแล้ว จะมีไวรัสไตเตอร์ลดลงเล็กน้อย จาก $10^{-4.38}$ เป็น $10^{-4.16}$ LD_{50}/0.03 ลบ.ซม. เมื่อนำไปทดสอบความปราศจากเชื้อ ความปลอดภัย คุณภาพ และความเป็นแอนติเจน ปรากฏว่า วัคซีนที่ผลิตได้นี้ มีคุณภาพดี และสามารถทำให้เกิดแอนติบอดีย์สูงในสัตว์ทดลอง

Thesis Title The Preparation of Modified Live Virus Rabies Vaccine, Porcine Tissue Culture Origin, ERA strain.

Name Mrs. Malinee Tungkasamon

Department Microbiology

Academic Year 1976

ABSTRACT

Primary pig kidney cell cultures were infected with ERA strain of rabies virus. The virus yield in the fluids was profoundly avail with no cytopathic changes in the infected pig kidney tissue cultures. The virus titer increased, reaching a maximum titer of $10^{-4.63}$ LD_{50}/0.03 ml. on the 9th day. The harvested tissue culture fluids having a high titer were pooled and tested for sterility and then were freeze-dried. The titer of the vaccine adding the stabilizer, after freezed drying, dropped from $10^{-4.38}$ to $10^{-4.16}$ LD_{50}/0.03 ml. The freezed-dried vaccines were tested for sterility, safety, potency and antigenicity tests. The results showed that the producing vaccine is high in quality and antibody response.

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my appreciation to Professor Dr. Prakob Tuchinda, Under-secretary of State Ministry of Public Health, who took part and encouraged me for the study, and a deep appreciation to Assistant Professor Miss Pisawat Dutiyabodhi, Head of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for her interest, guidance, and encouragement throughout the course of this work.

I am indebted and grateful to Dr. Nadhirat Sangkawibha, Director of Virus Research Institute, Department of Medical Sciences, for granting me this opportunity to carry out this work.

I also wish to express my deep sincere gratitude to Dr. Nonglak Asavachinda, Chief of Rabies Virus Section, Virus Research Institute, Department of Medical Sciences, for her guidance, and whose kind advice, instruction, and counsel have helped towards the successfulness of this study.

I also want to record my sincere thanks to the staffs of the Virus Research Institute, Department of Medical Sciences, for their cooperation, their helpful assistance on the experimental animals, and for their general assistance.

Finally, I would like to express my deep appreciation to Dr. M.K. Abelseth, for providing the References, and for his helpful advices.

TABLE OF CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
TABLE OF CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
1. INTRODUCTION	
Characteristic of Rabies Virus	1
Pathogenesis	9
Vaccines for Immunization of Animals	11
Virus Strains	27
Rabies in Thailand	34
2. MATERIALS AND METHODS	
MATERIALS	40
METHODS	45
Preparation of primary pig kidney cell culture	45
Infection and incubation of pig kidney cells	47
Vaccine preparation	48
Preparation of seed virus	48
Virus titration	48
Sterility test	50

Page

Final preparation of vaccine 51

Storage of finished product 52

Test for Lyophilized product 52

Sterility test 52

Physical appearance of vaccine 54

Virus titration 54

Antigenicity test 55

Safety test in animals 56

3. RESULTS

Pig kidney cells in balanced salt solution 57

Yield of ERA strain rabies virus & vaccine from various different conditions 57

Vaccine Testing 74

4. DISCUSSION 77

5. CONCLUSION 81

REFERENCES 83

VITA 88

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Types of Vaccines for use in animals	13
2.	Summary of Dog Trials, Vaccination, Challenge and S - N Results	18
3.	Vaccine Dilution Trial in Dogs Challenge and S - N Results	19
4.	Summary of Cat Trials, Vaccination, Challenge and S - N Results	20
5.	Vaccine Dilution Trial in Cats Challenge and S - N Results	20
6.	Summary of Cattle Trials, Vaccination, Challenge and S - N Results	21
7.	Vaccine Dilution Trial in Cattle Challenge and S - N Results	22
8.	Vaccine Dilution Trial in Sheep Challenge and S - N Results	23
9.	Summary of Trial in Goats, Vaccination Challenge and S - N Results	24
10.	Summary of Horse Trials, Vaccination Challenge and S - N Results	25
11.	Growth of rabies virus strain SAD in hamster kidney tissue cultures ..... (dialysis tube method)	29

Table Page

12. Rabies virus strain SAD maintained by serial transfers in cultures of hamster kidney cells grown in dialysis tubes 30

13. Rabies Virus Titers in Pig kidney Cell Cultures 33

14. Number of dog's brain examined at the Queen Saovabha Memorial Institute 1970-1975 35

15. Number of dog's brain examined at the SMRL 36

16. Number of Dogs caught destroyed and Vaccinated against rabies at the dog - pound by the Health Authorities of Bangkok Municipality 37

17. Growth of Rabies Virus in Pig Kidney Culture at 34°C and 36°C. 60

18. Rabies Virus Titers in Pig Kidney Cultures using LE medium and LH medium 62

19. Growth of Rabies Virus in Pig Kidney Culture at 34°C and 36°C. 64

20. Rabies Virus Titers in Pig Kidney Cultures using LE medium and LH medium 66

21. Rabies Virus Titers in Primary Pig Kidney Tissue Culture from Different Days Harvested 69

22. Virus Titers of Fluid Vaccine kept at 4°C. 71

23. Virus Titers of Fluid Vaccine kept at room temperature .. 71

Table Page

24. Virus Titers of Lyophilized MLV, ERA strain 74

25. Challenge Results in Guinea Pig Vaccinated with ERA vaccine 76

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Normal Pig Kidney Tissue Culture 59
2. Pig Kidney Tissue Culture two weeks after infection with rabies virus 59
3. The Comparison of Rabies Virus Titers in Pig Kidney Culture at 34°C and 36°C. 61
4. The Comparison of Rabies Virus titers in Pig Kidney Culture using LE medium and LH medium 63
5. The Comparison of Rabies Virus Titers in Pig Kidney Culture at 34°C and 36°C. 65
6. The Comparison of Rabies Virus titers in Pig Kidney Culture using LE medium and LH medium 67
7. The Comparison of Rabies Virus Titers of Harvested Fluids changed every 7 days and 9 days. 70
8. Rabies Virus Titers of Fluid Vaccine kept at 4°C 72
9. Rabies Virus Titers of Fluid Vaccine kept at room temperature. 73

LIST OF ABBREVIATIONS

amu	Atomic mass unit
CVS	Challenge Virus Standard
ERA	Miss Evelyn Gayner (E), Mr. Alec Rockitnicki (R) and Dr. M.K. Abelseth (A).
HEP	High Egg Passage
IgG	Immunoglobulin G
LEP	Low Egg Passage
LEP-CEO	Low Egg Passage-Chicken Embryo Origin
LE	Earle's Balanced Salt Solution with 0.5% Lactalbumin hydrolysate.
LH	Hank's Balanced Salt Solution with 0.5% Lactalbumin hydrolysate.
MLV	Modified Live Virus
nm	nanometer
PBS	Phosphate Buffer Saline
S	Sedimentation coefficient
SAD	Street Alabama Dufferin.
SAD_4	The four passages of Street Alabama Dufferin made in mice.
SAD_4HK_{25}	The twentyfive passages of Street Alabama Dufferin adapted to a hamster kidney tissue culture
SMB	Suckling Mouse Brain
SMRL	SEATO (South East Asia Treaty Organization) Medical Research Laboratory
WHO	World Health Organization