

## ABSTRACT

---

**Project Code:** BGJ4680021

**Project Title:** Immunogenicity of Outer Membrane proteins of Pasteurella multocida using Reconstituted Newcastle Disease Viral Envelope as Vaccine Delivery System

**Investigator:** Prof.Dr.SOMPOL PRAKONGPAN, and Mr.ATTACHAI HOMHUAN  
Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

**E-mail Address:** [pyspk@mahidol.ac.th](mailto:pyspk@mahidol.ac.th)

**Project Period:** 1 year (Since July 1, 2003 until June 30, 2004)

Fowl cholera is an infectious disease affecting poultry and is caused by *Pasteurella multocida*. The search for vaccine candidates against fowl cholera, most attention has been focused on outer membrane proteins, which are considered as immunodominant antigens. The objective of the work described in this report was to develop a subunit vaccine against *P. multocida* based on OMPs that are incorporated in lipid-based multimeric vehicles. OMPs from *P. multocida* serotype A:1 strain NIAH DU1551/97 were isolated and then characterized by using SDS-PAGE analysis. The OMPs were solubilized in non-ionic detergent or associated in virosomes made from Newcastle disease (ND) virus, and immunostimulating complexes (ISCOMs). A detailed study of physicochemical characteristics of ND-virosomes and ISCOMs containing OMPs were described. To evaluate the formulations as possible vaccine, their potency was evaluated in ICR mice. SDS-PAGE analysis revealed that OMP fraction contained eleven proteins that range in size from 30 to 80 kDa. The most prominent bands were 30, 33, and 45 kDa. ND-virosomes and ISCOMs, which are associated by OMP fraction, showed an average diameter of 180 and 30 nm, respectively. OMPs incorporated in the ND-virosomal membrane inhibited the capability of virosomes to agglutinate chicken red blood cells. Animals were challenged after two immunizations. All vaccines fully protected mice against a low dose challenge. In the case of a high dose challenge, micellar OMPs provided 80% protection, whereas OMPs incorporated in virosomes or ISCOMs gave 100% protection, which is comparable to that of inactivated whole cell vaccines. In conclusion, antigen loaded virosomes and ISCOMs are potential pasteurella subunit vaccines.

**KEYWORDS:** ISCOMs; Newcastle disease-virosomes; Outer membrane proteins; *Pasteurella multocida*; subunit vaccine

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: BGJ4680021

ชื่อโครงการ: คุณสมบัติการเป็นแอนติเจนของโปรตีนผิวนอกของเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา โดยใช้เปลือกหุ้มไวรัสนิวคาสเซิลเป็นระบบนำส่งวัคซีน

ชื่อนักวิจัย: ศ.ดร.สมพล ประคองพันธ์ และ นายอรรถชัย หอมหวล  
ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: [pyspk@mahidol.ac.th](mailto:pyspk@mahidol.ac.th)

ระยะเวลาโครงการ: 1 ปี (ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม 2546 ถึง วันที่ 30 มิถุนายน 2547)

อหิวาต์สัตว์ปีกเป็นโรคติดเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา การวิจัยค้นหาวัคซีนเพื่อต่อต้านโรคอหิวาต์สัตว์ปีก โดยมากมุ่งเน้นไปที่โปรตีนผิวนอกของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าเป็นแอนติเจนกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่สำคัญของโรคนี้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้ คือเพื่อพัฒนาวัคซีนหน่วยย่อยต่อต้านเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา โดยใช้โปรตีนผิวนอกของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาผสมรวมอยู่ในระบบนำส่งแอนติเจนหลายหน่วยแอนติเจนพร้อมกันในสารสื่อขนส่งไขมัน โปรตีนผิวนอกของเชื้อ พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา ซีโรทัยป์ เอ:หนึ่ง สเตรน NIAH DU1551/97 ถูกนำมาสกัดแยก และศึกษาแถบโปรตีนองค์ประกอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส สูตรตำรับวัคซีนที่ศึกษาได้แก่ โปรตีนผิวนอกที่ถูกละลายในสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ โปรตีนผิวนอกที่สกัดแทรกตัวอยู่ในไวโรโซมที่เตรียมจากไวรัสก่อโรคนิวคาสเซิล และ โปรตีนผิวนอกที่ผสมอยู่ในอนุภาคสารประกอบเชิงซ้อนที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (อิสคอม) ในรายงานการศึกษาฉบับนี้ได้อธิบายคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของสูตรตำรับวัคซีนที่เตรียมขึ้น และ ประเมินประสิทธิภาพของสูตรวัคซีนในหนูสายพันธุ์ ICR การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าส่วนสกัดโปรตีนผิวนอกมีแถบโปรตีนรวม 11 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 30 ถึง 80 กิโลดัลตัน เป็นองค์ประกอบอยู่ โดยแถบโปรตีนเข้มอยู่ที่น้ำหนักโมเลกุล 30, 33 และ 45 กิโลดัลตัน ไวโรโซมและอิสคอมที่มีโปรตีนผิวนอกสอดผสมอยู่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 180 และ 30 นาโนเมตร ตามลำดับ การสอดผสมโปรตีนผิวนอกกับไวโรโซมมีผลยับยั้งการตกกลุ่มเม็ดเลือดแดงของไวโรโซม หนูทดลองจะได้รับพิษทับลหลังการให้วัคซีนซ้ำสองครั้ง ในกรณีการให้พิษทับลในขนาดต่ำพบว่าวัคซีนทุกสูตรตำรับให้ผลการคุ้มครองโรคได้ 100% ในกรณีการให้พิษทับลในขนาดสูงพบว่าสูตรโปรตีนผิวนอกในรูปไมเซลล์ให้ผลคุ้มครองโรค 80% ในขณะที่สูตรตำรับไวโรโซม และ อิสคอม ซึ่งมีโปรตีนผิวนอกผสมรวมอยู่ให้ความคุ้มครองโรค 100% เช่นเดียวกันกับวัคซีนชนิดเชื้อตายทั้งตัว สรุปได้ว่าโปรตีนแอนติเจนที่บรรจุในไวโรโซม และ อิสคอม มีศักยภาพต่อการพัฒนาวัคซีนหน่วยย่อยป้องกันโรคพาสเจอร์ลล่า

คำหลัก: อิสคอม; ไวโรโซม; โปรตีนผิวนอก; พาสเจอร์ลล่า มัลโตซิดา; วัคซีนหน่วยย่อย