

การศึกษาเชื้อ *Pasteurella multocida* : CU strain เพื่อเป็นวัคซีนอหิวาต์เป็ด



นางสาว สุนีย์ เตชะอาภรณ์กุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เกษตรศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-730-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015327

10301768

STUDY OF CU STRAIN PASTEURELLA MULTOCIDA
FOR DUCK CHOLERA VACCINE

Miss Sunee Teacharpornkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN 974-576-730-1



Thesis Title Study of CU Strain Pasteurella multocida for
Duck Cholera Vaccine
By Miss. Sunee Teachaarpornkul
Department Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.
Co-Advisor Kriengsak Saitanu, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya
.....Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D. Thesis Committee)

Saree Virunhaphol
.....Chairman
(Associate Professor Saree Virunhaphol, M.Sc. in Pharm)

Santi Thoongsuwan
.....Thesis Advisor
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Kriengsak Saitanu
.....Member
(Kriengsak Saitanu, Ph.D.)

Vimolmas Lipipun
.....Member
(Assistant Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D.)



ศูนย์ เตชะอาภรณ์กุล : การศึกษาเชื้อ Pasteurella multocida : CU strain เพื่อ
เป็นวัคซีนอหิวาต์เป็ด (STUDY OF CU STRAIN PASTEURELLA MULTOCIDA FOR DUCK
CHOLERA VACCINE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สันติ ฤงสุวรรณ, อ.นสพ.ดร.เกรียงศักดิ์ สายธนู

76 หน้า

เชื้อ Pasteurella multocida, CU strain เมื่อนำมาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหาร 3
ชนิด พบว่า เชื้อเจริญได้ดีที่สุดใน brain heart infusion broth รองลงไป คือ tryptose
broth with thiamine และเชื้อตายใน flesh-liver-duck broth การศึกษาการเจริญของเชื้อ
ใน brain heart infusion broth เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพต่างๆ พบว่า เชื้อจะเจริญได้ดีที่สุดใน
สภาพเขย่า 200 rpm และบ่มที่ 37°C เชื้อเจริญได้น้อยลงในสภาพหยุดนิ่งที่ 37°C, สภาพหยุดนิ่งที่
41.5°C และสภาพเขย่า 200 rpm. ที่ 41.5°C เรียงตามลำดับ ปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 10^6 CFU/
มล. เมื่อบ่มที่ 37°C ในสภาพเขย่าหรือหยุดนิ่งจะให้ปริมาณเชื้อสูงสุด อยู่ในช่วง 6-9 ชั่วโมง ความขุ่น
สูงสุดที่ 12 ซม. หลังจากการเจริญสูงสุดแล้วปริมาณเชื้อและความขุ่นจะค่อนข้างคงที่ตลอด การเพาะ -
เลี้ยงที่ 37°C ในสภาพหยุดนิ่ง ปริมาณเชื้อในชั่วโมงที่ 6 และ 9 จะไม่แตกต่างกันมากเหมือนการเพาะ -
เลี้ยงที่ 37°C ในสภาพเขย่า

การศึกษาความรุนแรงของเชื้อชนิดนี้ เมื่อฉีดเชื้อขนาดต่างๆ เข้าได้ผิวหนังในเป็ดอายุ 1, 2,
3 และ 4 สัปดาห์ พบว่า เป็ดอายุ 1 สัปดาห์จะตายหมดเมื่อได้รับเชื้อขนาด 1.6×10^9 CFU และเป็ดอายุ
2, 3 และ 4 สัปดาห์ ตาย 16 ตัว, 12 ตัว และ 1 ตัว จากเป็ดกลุ่มละ 20 ตัว เมื่อได้รับเชื้อในขนาด
 3.77×10^9 , 1.8×10^9 และ 1.6×10^9 CFU ตามลำดับ

ผลการศึกษากุมโรค เมื่อให้วัคซีนครั้งเดียวจะคุมโรคได้ต่ำมากโดยที่ % protection เมื่อ
1, 2, 4 และ 8 สัปดาห์ หลังรับวัคซีน จะมีค่า -15, 56, 88 และ 60 ในกลุ่มที่รับวัคซีนโดยฉีดเข้าใต้
ผิวหนัง มีค่า 35, 46, 32 และ 10 ในกลุ่มที่รับวัคซีนโดยกรอกปาก และมีค่า 25, 26, -12 และ 20 ในกลุ่ม
ที่รับวัคซีน โดยผสมน้ำดื่ม การให้วัคซีน 2 ครั้ง ห่างจากครั้งแรก 1 เดือน กุมโรคจะสูงตลอด 8
สัปดาห์ (% protection ไม่น้อยกว่า 80) หลังจากรับวัคซีนครั้งที่สอง ยกเว้นกลุ่มที่รับวัคซีนโดยผสมน้ำ
ดื่ม % protection 89, 68, 50 และ 48 เมื่อ 1, 2, 4 และ 8 สัปดาห์หลังรับวัคซีนครั้งที่สอง การ
ให้วัคซีน 2 ครั้ง ห่างจากครั้งแรก 2 เดือน % protection ในสัปดาห์ที่ 4 หลังรับวัคซีนครั้งที่สอง จะ
มีค่า 71, 65 และ 83 ในเป็ดกลุ่มที่รับวัคซีนโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง กรอกปากและผสมน้ำดื่ม ตามลำดับ

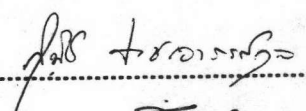
อย่างไรก็ดี เป็ดที่รับวัคซีน โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ตาย 30% และ 20% หลังจากรับวัคซีนครั้งแรก
และครั้งที่สอง และเป็ดที่รับวัคซีนโดยกรอกปากตาย 2% หลังรับวัคซีนครั้งแรก

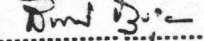
การตรวจระดับแอนติบอดี โดยวิธี TA และ PHA ปรากฏว่ากลุ่มที่รับวัคซีนโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง
จะมีระดับแอนติบอดีสูงกว่าอีก 2 กลุ่ม และการตรวจหาโดยใช้แอนติเจนที่เตรียมจากเชื้อ 8:A, TA
titers จะปรากฏค่าสูงต่ำสลับไปตลอดช่วง ส่วน PHA titers ของกลุ่มที่รับวัคซีนโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง
จะสูงสุดในสัปดาห์แรกและลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนในเป็ดอีก 2 กลุ่ม ค่าโตเตอร์จะต่ำกว่ามากโดยเฉพาะ
PHA titers ที่ตรวจสอบโดยใช้ CU sonicated antigen จะให้ค่า GMT ต่ำกว่า 2.00 เกือบทั้งหมด

ภาควิชา จุลชีววิทยา

สาขาวิชา

ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 



SUNEE TEACHARPORNKUL : STUDY OF CU STRAIN PASTEURELLA MULTOCIDA FOR DUCK CHOLERA VACCINE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANTI THOONGSUWAN, Ph.D., KRIENGSACK SAITANU, Ph.D., Ed.D. 76 PP.

The growth study of Pasteurella multocida : CU strain in 3 media showed that the organism grew in brain heart infusion (BHI) broth better than in tryptose broth with thiamine and it died in flesh-liver duck broth. The growth study of this bacteria in BHI broth when it was incubated in various conditions appeared that the growth at 37°C shaking 200 rpm was the best and the growth decreased at 41.5°C static and 41.5°C shaking 200 rpm respectively. The starting bacteria of about 10⁶ CFU/ml incubated in static or shaken condition reach maximal viable cells during 6-9 hr and maximal turbidity in 12 hr after that both of them were constant throughout the incubation period of 48 hr. The number of viable cells in 6 hr and 9 hr was so different in the incubation at 37°C static condition unlikely to that in shaken condition.

The virulence study of P. multocida : CU strain in ducks which were subcutaneously (S/C) inoculated at the age of 1, 2, 3 and 4 wk revealed that all 1-wk-old ducks of each inoculated with 1.6x10⁹ CFU died and 2-wk-old, 3-wk old, 4-wk old ducks, 16 of 20 ducks, 12 of 20 ducks and 1 of 20 ducks died following the inoculation of 3.77x10⁹, 1.8x10⁹ and 1.6x10⁹ CFU per duck, respectively.

The degree of protection in 1,2,4 and 8 wk after the first vaccination was -15, 56, 88 and 60 in S/C vaccinated group ; 35, 46, 32 and 10 in oral vaccinated group and 25,26,-12, and 20 in drinking water vaccinated group. For double vaccination of 1 month interval high level of protection (not less than 80%) was observed through 8 wk except the drinking water vaccinated group which the percentage of protection was 89,68,50 and 48 in 1,2,4 and 8 wk after the second vaccination. The percentage of protection in 4 wk after the second vaccination of double vaccination of 2 months interval was 71,65 and 83% respectively, in S/C, oral and drinking water vaccinated group.

However 30% and 20% death occurred in S/C vaccinated group after the first vaccination and the second vaccination in 1 month interval whereas only 2 % death occurred in oral vaccinated group after the first vaccination

TA titers and PHA titers of S/C vaccinated group were higher than the other two groups. The antibody levels against antigen of the 8:A strain was higher than those against antigen of the CU strain. The PHA titers of S/C vaccinated group peaked in 1 wk after each vaccination. However those of oral and drinking water vaccinated group were very low especially the GMT detected by the CU sonicated antigen was mostly lower than 2.00.

ภาควิชา จุลชีววิทยา
 สาขาวิชา
 ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต สุนีย์ เตชะปอญกุล
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา สันติ ทองสุวาน
 สันติ ทองสุวาน



ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep gratitude to my kind advisors Associate Professor Santi Thoongsuwan and Dr. Kriengsak Saitanu, for their supervision and encouragement throughout the course of these studies.

I would like to express my sincere appreciation to Associate Professor Saree Virunhaphol and Assistant Professor Dr. Vimolmas Lipipun, my supervisory committee, for their suggestions, criticism and corrections of this thesis.

I am grateful to Mrs. Sukjai Pholampaisathit, Mr. Taveesak Utamathanakorn, Miss. Wanna Vorrapiboonsak and Miss. Somrat Chanrit for their suggestion and help in some experiments.

As well, my thanks are extended to all the staff of this department and Division of Microbiology, the Faculty of Veterinary Science, for their wonderful companionship and cooperation.

Finally, I wish to express my infinite thanks to my parents for their love and consolation and encouragement throughout my study.



CONTENT

	Page
ABSTRACT (Thai).....	III
ABSTRACT (English).....	IV
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
TABLES.....	VIII
FIGURES.....	IX
ABBREVIATIONS.....	XI
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II REVIEW OF THE RELEVANT LITERATURES.....	3
III MATERIALS AND METHODS.....	20
IV RESULTS.....	32
V DISCUSSION.....	48
REFERENCES.....	58
APPENDIX.....	74
CURRICULUM VITAE.....	76



TABLE

Table	Page
1 Differential characteristics of the species of the genus <i>Pasteurella</i>	5
2 Some characteristic of principle variants of <i>Pasteurella multocida</i>	5
3 Biochemical characteristics of species of <i>Pasteurella</i>	8
4 Characteristics of the biotypes of <i>Pasteurella multocida</i>	8
5 Viable counts (CFU/ml) of <i>Pasteurella multocida</i> : CU strain at 6 and 9 hour of brain heart infusion broth cultures incubated in static and shaking condition at 37 °c.....	35
6 Virulence of <i>Pasteurella multocida</i> : CU strain in various age of ducks.....	35
7 Antibody titers and protective immunity of ducks after the first vaccination.....	41
8 Antibody titers and protective immunity of ducks after the second vaccination of one month interval.....	42
9 Antibody titers and protective immunity of ducks after the second vaccination of 2 months interval....	43



FIGURES

FIGURE	Page
1 Vaccination programme and sample collection.....	28
2 Turbidity and log number of viable cell per ml of <u>Pasteurella multocida</u> : CU strain incubated static at 37 °c in brain heart infusion , tryptose broth with thiamine and flesh-liver-duck broth.....	34
3 Turbidity (of 5 times diluted broth culture) and log number of viable cell per ml of <u>Pasteurella multocida</u> : CU strain incubated in brain heart infusion broth, static at 37 °c, shaking 200 rpm at 37 °c, static at 41.5 °c and shaking 200 rpm at 41.5 °c.....	35
4 Antibody titers against the autoclaved antigen of <u>Pasteurella multocida</u> strain 8:A and CU as measured by tube agglutination test and the percentage of survival of ducks after the first vaccination.....	44
5 Antibody titers against the autoclaved antigen of <u>Pasteurella multocida</u> strain 8:A and CU as measured by tube agglutination test and the percentage of survival of ducks vaccinated twice in 1 month interval.....	45
6 Antibody titers against the autoclaved antigen of <u>Pasteurella multocida</u> strain 8:A and CU measured by tube agglutination test and the percentage of survival of ducks vaccinated twice in 2 months interval.....	46

FIGURE

Page

- 7 Antibody titers against the sonicated antigen of Pasteurella multocida stain 8:A and CU measured by passive hemagglutination test and the percentage of survival of unvaccinated ducks and subcutaneously vaccinated ducks..... 47

ABBREVIATIONS

Ag	:	antigen
BHI	:	brain heart infusion
BSA-PBS	:	0.25% bovine serum albumin in phosphate buffer saline
CMI	:	cell-mediated immunity
CFU/ml	:	colonies forming units per ml millitre
°C	:	degree(s) celsius
ed.	:	editor ; edited by
et al.	:	et alii, and other
Fig .	:	figure
1 st	:	first
GMT	:	geometric mean titer(s)
g	:	gravity
gm	:	gram(s)
hr	:	hour(s)
HMI	:	humoral-mediated immunity
i.e.	:	id est ; that is
I.M	:	intramuscular(ly)
μl	:	microlitre(s)
μm	:	micrometre(s)
ml	:	millilitre(s)
mm	:	millimetre(s)
nm	:	nanometre(s)
NSS	:	normal saline solution
NO	:	number(s)
O.D.	:	optical density

pp.	:	page
PHA	:	passive hemagglutination
%	:	percent
PBS	:	phosphate buffer saline
rpm	:	revolution per minute
2 nd	:	second
SRBC	:	sheep red blood cell
SD	:	standard deviation
S/C	:	subcutaneous(ly)
TA	:	tube agglutination
U.S.A.	:	The United State of America
vol	:	volume
wk	:	week(s)