

ความคุ้มครองและระดับของแอนติบอดีในเลือด หลังฉีดด้วยวัคซีนอหิวาต์เป็ด  
ที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์: การศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์ชนิดต่างๆ

นาง สุขใจ ผลอำไพสภิตย์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-901-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014482

147450306

**Protective Immunity and Serum Agglutinin Level  
in Ducks Vaccinated with Duck Cholera Vaccines :  
A Comparative Study of Various Adjuvant Vaccines**

**Mrs. Sukjai Pholampaisathit**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the degree of Master of Science  
Inter-Department of Medical Microbiology  
Graduate School  
Chulalongkorn University**

**1988**

**ISBN 974-568-901-7**



สุขใจ ผลอำไพสถิตย์ : ความคุ้มโรคและระดับของแอนติบอดีในเป็ด หลังฉีดด้วยวัคซีน  
อติवाद เป็ดที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์: การศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์ชนิดต่าง ๆ  
(PROTECTIVE IMMUNITY AND SERUM AGGLUTININ LEVEL IN DUCKS VACCINATED  
WITH DUCK CHOLERA VACCINES : A COMPARATIVE STUDY OF VARIOUS ADJUVANT  
VACCINES) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สันติ อึ้งสุวรรณ, 108 หน้า.

การศึกษาเปรียบเทียบวัคซีนอติवादเป็ด-ไก่ที่ผสมด้วยแอดจูแวนท์ชนิดต่าง ๆ คือ Mineral-oil-  
adjuvanted (MDC) vaccine, Corn-oil adjuvanted (CDC) vaccine และ Aluminium-  
hydroxide-absorbed (ADC) vaccine และวัคซีนที่ไม่มีแอดจูแวนท์ วัคซีนทั้งหมดเป็นวัคซีน เชื้อตายฆ่า  
ด้วยฟอร์มาลิน เปรียบเทียบกับวัคซีนของกรมปศุสัตว์ เป็ดแต่ละกลุ่มได้รับการฉีดวัคซีนแต่ละชนิด โดยทำการ  
ฉีดวัคซีน 1 และ 2 ครั้ง ตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี Tube agglutination (TA) test และ  
Indirect hemagglutination (IHA) test

ทำการเปรียบเทียบแอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ กัน โดยวิธี tube agglutination test  
จากผลการทดลอง พบว่า Autoclaved antigen มีความสามารถในการตรวจหาระดับแอนติบอดีได้ดีที่สุด  
ในขณะที่ HCl-treated antigen, Formalinized antigen และ Living antigen ไม่สามารถ  
ตรวจหาระดับแอนติบอดีได้เลย

วิธี Indirect hemagglutination test สามารถตรวจหาระดับแอนติบอดีได้ค่าสูงกว่าวิธี  
tube agglutination test คือวัดได้สูงสุด 1:268 ในวันที่ 15 หลังจากฉีดวัคซีนครั้งแรก ในขณะที่  
วิธี Tube agglutination test วัดได้สูงสุด 1:125 ในกลุ่มที่ได้รับวัคซีน MDC แต่ในกลุ่มที่ได้วัคซีน  
FDC และ DCL ซึ่งไม่มี adjuvant ผสมพบว่า ระดับแอนติบอดีที่วัดด้วยวิธี IHA จะต่ำกว่า TA

เมื่อตรวจระดับแอนติบอดีโดยวิธี TA พบว่ากลุ่ม MDC มีระดับแอนติบอดีสูงสุดในวันที่ 15 หลัง  
ฉีดวัคซีนครั้งแรก ในขณะที่กลุ่ม ADC มี ไตเตอร์ 1:48 และกลุ่ม CDC จะให้ไตเตอร์ต่ำสุดคือ 1:44 เมื่อ  
ตรวจด้วยวิธี Indirect hemagglutination test พบว่ากลุ่ม MDC ให้ไตเตอร์สูงสุดเท่ากัน  
(1:268) ในวันที่ 15 หลังจากฉีดวัคซีนครั้งแรก รองลงมาคือ กลุ่ม ADC (1:161) และกลุ่ม CDC ให้  
ไตเตอร์ 1:80 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

เพศไม่มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

ระดับแอนติบอดีซึ่งวัดด้วยวิธี TA test หลังฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 จะต่ำกว่าระดับแอนติบอดีหลังจาก  
ฉีดวัคซีนครั้งแรก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่เมื่อวัดระดับแอนติบอดีหลังจากฉีดวัคซีนครั้งที่  
2 ด้วยวิธี IHA test พบว่า มีระดับแอนติบอดีสูง เฉพาะในกลุ่มที่มีแอดจูแวนท์ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่าง  
มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ศึกษาความคุ้มโรคโดยฉีดเชื้อพิษหทัยในช่วงเวลาต่าง ๆ จากผลการทดลองพบว่า วัคซีนกลุ่ม MDC,  
ADC, FDC และ DCL ซึ่งได้รับวัคซีนเพียงครั้งเดียว มีค่า Potency 85.8, 85.8, 85.8 และ 52.4  
เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 60 หลังจากฉีดวัคซีนครั้งแรก

กลุ่ม MDC, CDC, FDC และกรมปศุสัตว์ซึ่งให้วัคซีน 2 ครั้ง มีความคุ้มโรคตลอดระยะเวลาการ  
ศึกษา  $5\frac{1}{2}$  เดือน โดยมี Potency 60.8, 65.8, 65.8 และ 85.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ภาควิชา..... สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา..... 2530

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

SUKJAI PHOLAMPAISATHIT : PROTECTIVE IMMUNITY AND SERUM AGGLUTININ LEVEL IN DUCKS VACCINATED WITH DUCK CHOLERA VACCINES : A COMPARATIVE STUDY OF VARIOUS ADJUVANT VACCINES. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SANTI THOONGSUWAN, Ph.D. 108 PP.

The immune response in ducks against formalin-killed Pasteurella multocida serotype 8:A, a duck strain, was studied. The vaccines, three with adjuvants and one without, were prepared. The vaccines were administered once and twice. The tube agglutination (TA) titer, the indirect hemagglutination (IHA) titer and the extent of protection afford in terms of a percentage determined. A comparison of various antigens for the detection of TA titer was carried out. The autoclaved antigen was found to be the best while no antibody titer was detected when using an HCl-treated, formalinized, or living antigen.

An IHA test was developed for the purpose of detecting antibody. From this it was found that IHA titer (1:268) was higher than the TA titer (1:125) at 15 days postvaccination in the MDC group. The other adjuvanted vaccines yielded the same results. However, in non adjuvanted vaccines, the titer, as detected by IHA test, was lower than that detected by the TA test.

Mineral-oil-adjuvanted (MDC) vaccine induced the highest geometric mean titer (GMT), viz 1:125, at 15 days postvaccination, while aluminium hydroxide-absorbed (ADC) vaccine produced a lower titer, viz 1:48 and corn-oil-adjuvanted (CDC) vaccine the lowest, viz 1:44 -as measured by the TA test.

As measured by the IHA test, MDC vaccine also induced the highest GMT at 15 days postvaccination, 1:268, followed by the ADC vaccine, 1:161, and the CDC vaccine, 1:80. The difference between these titers was not statistically significant ( $P > 0.05$ ).

In male and female ducks, there seems to be no effect interms of immune response.

Antibody titer after the 2<sup>nd</sup> vaccination measured by the TA test were lower than that after the first one in all of the vaccine groups and were statistically significant ( $P < 0.05$ ). High titers were obtained after the 2<sup>nd</sup> vaccination as measured by the IHA test in all adjuvanted vaccine groups, but there was no statistically difference ( $P > 0.05$ ).

One injection of MDC, ADC, and FDC vaccines, as measured by the percentage of servival and the calculations relating to potency at 60 days postvaccination was 85.8%, 85.8%, 85.8%, and 52.4% respectively.

Two injections of MDC, CDC, FDC, and DCL vaccine produce a level of immunity lasting for upto  $5\frac{1}{2}$  months. The percentage of potency afforded by MDC, CDC, FDC, and DCL vaccine was 60.8%, 65.8%, 65.8%, and 85.8%, respectively.

ภาควิชา ..... สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์  
สาขาวิชา ..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์  
ปีการศึกษา ..... 2530

ลายมือชื่อนิสิต ..... *Ph. Chm*  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... *Ph.D. B. J. ...*



Thesis Title            Protective Immunity and Serum Agglutinin  
                                  Level in Ducks Vaccinated with Duck Cholera  
                                  Vaccines : A Comparative Study of Various  
                                  Adjuvant Vaccines

By                            Mrs. Sukjai Pholampaisathit

Inter-Department        Medical Microbiology

Thesis Advisor           Associate Professor Santi Thoongsuwan,  
                                  Ph.D.

Thesis Co-Advisor      Instructor. Kriengsag Saitanu, D.V.M., Ph.D.  
                                  Associate Professor Somatat Wongsawang,  
                                  D.V.M., Dr.med vet.

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

*Thavorn Vajrabhaya* ..... Dean of the Graduate School  
 (Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee :

*Somjai Reinprayoon* ..... Chairman  
 (Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

*Santi Thoongsuwan* ..... Member  
 (Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

*Kriengsag Saitanu* ..... Member  
 (Instructor Kriengsag Saitanu, D.V.M., Ph.D.)

*Somatat Wongsawang* ..... Member  
 (Associate Professor Somatat Wongsawang, D.V.M., Dr.med vet.)

*Prapahd Neramitmansook* ..... Member  
 (Instructor Prapahd Neramitmansook, D.V.M.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

## ACKNOWLEDGEMENTS

I am deeply indebted and grateful to my advisor, Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D., Instructor Kriengsak Saitanu, D.V.M., Ph.D. and Associate Professor Somatat Wongsawang, D.V.M., Dr.medvet. for their guidance, constant interest, criticism and encouragement throughout the course of this study

Some parts of this work would have been impossible without the assistance of Associate Professor Kriengsak Poonsuk, D.V.M., Associate Professor Nikom Chaisiri, B.Sc., M.S., Ph.D., Assistant Professor Reutai Sakulramrung M.D., Ph.D.

Particular thank are due to Lecturer Wongcare Jivatadavirute, B.Sc., M.S. in Pharm. for her valuable suggestions during the writing of this thesis.

I am grateful too, to Miss Somrat Chanrit B.Sc., M.S. for her kind suggestions and criticism in putting together Statistic section of this work.

I also wish to extend my sincere thanks to Miss Navarutana Charuchinda B.Sc., Miss Wanna Vorrapiboonsak, B.Sc. and Mr. Supachai Arluyjit, B.A.

In addition, I would like to acknowledge my debt to all the staff of the Department of Microbiology, the

Department of Pharmaceutical Botany and the Department of Pharmacy, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, the Division of Microbiology, the Faculty of Veterinary Sciences, the Department of Biochemistry, the Faculty of Sciences and the Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University, for their cooperation and assistance

My sincere thanks also to all of those whose names have not been mentioned, for helping me whether directly or indirectly to make this work a reality

This study was also made possible due to the support of the Graduate School and Department of Microbiology, the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University.

Last but not least, I would also like to extend a sincere vote of thanks to the Unit Cell, Animal Vaccine Research Unit, Chulalongkorn University for their financial support during this research undertaking.

## CONTENT

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLES.....	ix
FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER	
1. Introduction.....	1
2. Review of the Relevant Literature.....	4
3. Materials and Methods.....	33
4. Results.....	54
5. Discussion.....	65
REFERENCES.....	94
APPENDIX .....	106
BIOGRAPHY.....	108



## TABLES

Tables	Page
1. Differential characteristics of the species of the genus <u>Pasteurella</u> .....	5
2. Some characteristics of the principal Variants of <u>Pasteurella multocida</u> .....	8
3. Biochemical characteristics of the species of the genus <u>Pasteurella</u> .....	9
4. Early Serologic Studies on <u>Pasteurella multocida</u> .....	11
5. Relation between serological type of <u>P.multocida</u> and animal host.....	14
6. Relation between Carter's capsule and O group.....	16
7. Avian Serotypes of <u>P.multocida</u> identified by Namioka and Bruner.....	18
8. Relation between <u>Pasteurella</u> serotypes of capsule and somatic and host animals.....	19
9. Comparison of various antigens for the detection of agglutinating antibody in ducks vaccinated with mineral-oil and corn-oil adjuvanted vaccine.....	73
10. Antibody titers against <u>P.multocida</u> in vaccinated and unvaccinated ducks as measured by the tube agglutination method and microtitration method.....	74
11. Comparison of antibody titers of ducks, given one injection of the vaccine with protection against challenge with virulent <u>P.multocida</u> .....	75
12. Comparison of antibody titers of ducks, given two	

injections of the vaccine with protection against  
challenge with virulent P.multocida..... 76

13. Comparison of the efficacy of one injection of  
vaccine in ducks when challenged with a virulent  
P.multocida..... 77

14. Comparison of the efficacy of two injections of vaccines  
in ducks when challenge with virulent P.multocida...78

15. Antibody titer measured by tube agglutination test  
before and after challenge with P.multocida in ducks  
vaccinated once with various vaccines..... 79

16. Antibody titer measured by tube agglutination test  
before and after challenge with P.multocida in ducks  
vaccinated twice with various vaccines..... 80

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. The antibody level of ducks, vaccinated twice with Livestock Department vaccine as detected by the tube agglutination and microtitration method.....	81
2. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated once with mineral oil adjuvanted vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests.....	82
3. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated twice with mineral-oil-adjuvanted vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests.....	83
4. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated once with corn-oil-adjuvanted vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests.....	84
5. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated twice with corn-oil-adjuvanted vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests.....	85
6. The antibody titer and percentage of survival	

- of ducks vaccinated once with aluminium-hydroxide-absorbed vaccine as measured by the Tube agglutination and indirect hemagglutination tests..... 86
7. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated twice with aluminium-hydroxide-absorbed vaccine as measured by the Tube agglutination and indirect hemagglutination tests..... 87
8. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated once with formalin-killed whole-cell vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests..... 88
9. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated twice with formalin-killed whole-cell vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests..... 89
10. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated once with Livestock Department vaccine as measured by the tube agglutination and indirect hemagglutination tests..... 90
11. The antibody titer and percentage of survival of ducks vaccinated twice with Livestock Department vaccine as measured by the tube

agglutination and indirect hemagglutination tests.....	91
12. Comparison of the agglutinating antibody level of male and female ducks vaccinated twice with mineral-oil-adjuvanted vaccine.....	92
13. Comparison of the agglutinating antibody level of male and female ducks vaccinated twice with corn-oil-adjuvanted vaccine.....	93



## ABBREVIATIONS

°C	=	degree celsius
ed.	=	editor, edited by
et al.	=	et alii; and other
gm	=	gram
i.e.	=	id est
lb	=	pound
min	=	minute
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
N	=	normal
ul	=	microlitre
um	=	micrometre
ug/ml	=	microgramme per millilitre