ความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีย์ของวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายในเป็ด

นายทวีศักดิ์ อุดตมะธนากร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-632-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014479

PROTECTIVE IMMUNITY AND SERUM ANTIBODY TITER IN DUCKS VACCINATED WITH ATTENUATED AND INACTIVATED DUCK PLAGUE VACCINE

Mr. Taveesak Utamathanakorn

ศูนย์วิทยทรัพยากร

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 974-568-632-8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title Protective Immunity and Serum Antibody Titer in Ducks Vaccinated with Attenuated and Inactivated Duck Plague Vaccine

By Mr. Taveesak Utamathanakorn

Inter-Department Medical Microbiology

Thesis Advisor Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr.med.vet.

Thesis Co-Advisor Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.

Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean of Groduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)

..... Member

(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)

..... Member

(Instructor Kriengsag Saitanu, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

..... Member

(Dr. Urasri Tantaswasdi, Ph.D.)

Copyright of Graduate school, Chulalongkorn University

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทวีศักดิ์ อุตตมะธนากร : ความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีย์ของวัคซีนกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายในเป็ด (PROTECTIVE IMMUNITY AND SERUM ANTIBODY TITER IN DUCKS VACCINATED WITH ATTENUATED AND INACTIVATED DUCK PLAGUE VACCINE) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นสพ.คร.โสมทัต วงศ์สว่าง, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.นสพ.คร.เกรียงศักดิ์ สายธนู, รศ.คร.สันติ ถุงสุวรรณ, 82 หน้า.

วัคซีนป้องกันโรคกาฬโรคเป็ดชนิดเชื้อตายที่ผสมและไม่ผสมน้ำมันแร่ได้เตรียมขึ้นเพื่อศึกษาความคุ้มโรคและระดับแอนติบอดีย์ โดยเปรียบเทียบกับวัคซีนชนิดเชื้อเป็นซึ่งใช้อยู่ในปัจจุบัน การทำให้ไวรัสหมดฤทธิ์ลงจะใช้ 2 Bromoethylamoniumbromide (BEI) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C.

การศึกษาครั้งนี้พบว่า หลังจากการฉีดวัคซีนครั้งแรก 2 เดือน ระดับแอนติบอดีย์ของกลุ่มวัคซีนเชื้อเป็นและเชื้อตายที่ไม่ผสมน้ำมันแร่ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่ระดับแอนติบอดีย์ของกลุ่มวัคซีนเชื้อตายที่ผสมน้ำมันแร่จะสูงขึ้น โดยมีค่าสูงสุดภายใน 1 เดือนหลังฉีด สำหรับภูมิคุ้มโรคพบว่าวัคซีนเชื้อเป็นมีค่า 85-100% ในขณะที่วัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมและผสมน้ำมันแร่มีค่า 42-71% และ 42-75% ภายใน 2 เดือน ตามลำดับ ได้พบการระบาดของโรคกาฬโรคเป็ดขึ้นภายหลังการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2 ซึ่งเป็นผลมาจากการทำลายเชื้อไม่สมบูรณ์ ระดับแอนติบอดีย์ (NI) ของกลุ่มวัคซีนทั้ง 3 ในเป็ดที่ฉีดวัคซีนครั้งเดียว มีค่ามากกว่า 3 ทั้งสิ้น อย่างไรก็ตาม พบว่าความคุ้มโรคจากกลุ่มเป็ดดังกล่าวในเดือนที่ 3 หลังการฉีดวัคซีนครั้งแรก (1 เดือนแรกหลังการระบาด) ไม่ได้เกิดขึ้น 100% ในทุกกรณี สำหรับระดับแอนติบอดีย์ของเป็ดที่ฉีดวัคซีน 2 ครั้งในเป็ดทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าจะสูงขึ้นกว่าเดิม แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับแอนติบอดีย์ตลอด 6 เดือนหลังฉีด ความคุ้มโรคหลังฉีดวัคซีน 2 ครั้งนั้น พบว่าวัคซีนเชื้อเป็นมีค่า 75-100% ในขณะที่วัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมและผสมน้ำมันแร่มีค่า 50-100% และ 50-87% ภายใน 6 เดือนตามลำดับ ในกลุ่มเป็ดที่ได้รับวัคซีนครั้งที่ 3 พบว่าระดับแอนติบอดีย์ของกลุ่มวัคซีนเชื้อเป็นมีค่าต่ำกว่าวัคซีนเชื้อตายทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่ความคุ้มโรคของการฉีดวัคซีน 3 ครั้งค่อนข้างต่ำโดยพบว่าวัคซีนเชื้อเป็นมีค่า 33-66% วัคซีนเชื้อตายที่ไม่ผสมและผสมน้ำมันแร่มีค่า 40-100% และ 33-100% ภายใน 3 เดือน ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าระดับแอนติบอดีย์จะไม่สัมพันธ์กับความคุ้มโรค ดังนั้นภูมิคุ้มกันระบบเซลอาจมีบทบาทในการป้องกันโรคนี้

การทดสอบระดับแอนติบอดีย์โดยวิธี neutralization ทั้งแบบแอลฟาและเบต้า พบว่าทั้ง 2 วิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก (r=0.9556) เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างวิธี neutralization แบบแอลฟา และวิธี indirect hemagglutination (r=0.7263) ดังนั้นวิธี neutralization แบบเบต้า และวิธี indirect hemagglutination ยังสามารถนำมาใช้ในการตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ต่อไวรัสกาฬโรคเป็ดได้เช่นกัน

ภาควิชา สหสาขา ลายมือชื่อนิสิต ทวีศักดิ์ อุตตมะธนากร

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somatat Wongsawang

TAVEESAK UTAMATHANAKORN : PROTECTIVE IMMUNITY AND SERUM ANTIBODY TITER IN DUCKS VACCINATED WITH ATTENUATED AND INACTIVATED DUCK PLAGUE VACCINE, THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SOMATAT WONGSAWANG, Dr.med.vet., THESIS CO-ADVISOR : INSTRUCTOR KRIENGSAG SAITANU, Ph.D., ASSO. PROF. SANTI THOONGSUWAN, Ph.D., 82 PP.

Inactivated duck plague vaccines with and without mineral oil (BEI-DPM and BEI-DP, respectively) are administered in order to study the level of protective immunity and the antibody titer and in order to compare the results with those obtained with attenuated vaccine (DP-L) which is commonly used nowadays. Duck plague virus is inactivated by 2 Bromoethylamoniumbromide (BEI) at 37°C for 6 hours.

It was found that 2 months after the first vaccination, DP-L and BEI-DP did not induce any development of antibody titer, but BEI-DPM raised the antibody titer, reaching its highest level within 1 month after vaccination. The protective immunity of DP-L was 85-100%, whereas, with BEI-DP and BEI-DPM, it was 42-71% and 42-75%, respectively, over a period of 2 months. One week after the second vaccination, an outbreak of duck plague occurred due to the incomplete inactivation of the duck plague virus. The antibody level (NI) of these 3 groups, all of which had been vaccinated once, was over 3. However, the level of protective immunity of these ducks at the third month after the first vaccination (the first month after the outbreak) was not always 100%. The antibody titer of those groups which had been vaccinated twice increased, but the difference in NI among the 3 vaccinated groups were not statistically significant over a period of 6 months. The level of protective immunity of DP-L after the second vaccination was 75-100% whereas BEI-DP and BEI-DPM afforded 50-100% and 50-87% protection, respectively, over a period of 6 months. As for the third vaccination, the average NI of DP-L was lower than with BEI-DP and BEI-DPM; the level of protective immunity of ducks vaccinated three times was quite low; DP-L afforded 33-66% protection, whereas BEI-DP and BEI-DPM gave 40-100% and 33-100% protection, respectively, over a period of 3 months.

It can be concluded from the correlation between the protective immunity and the antibody titer that the antibody level does not correspond with the level of protective immunity. Cellular-mediated-immunity may well play an important role with regard to protection.

The antibody titers determined by the α and β neutralization methods were compared; and the results found to be closely related ($r=0.9556$). The same results were also obtained when α neutralization and indirect hemagglutination tests were compared ($r=0.7263$). Therefore, the β neutralization and the indirect hemagglutination methods may be used to evaluate the antibody titer to the duck plague virus.

ภาควิชา .....สัตวบาล..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somatat Wongsawang

ACKNOWLEDGEMENTS

The present investigator wishes to express his deep gratitute to the following individuals who helped in making this thesis possible.

Dr. Somatat Wongsawang, Assoc. Prof. of the Devision of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful guidances, suggestions, criticisms and encouragement throughout the course of this study.

Dr. Kriengsag Saitanu, the instructor of the Devision of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences and Dr. Santi Thoongsuwan, Asso. Prof. of the Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their invaluable suggestions.

Dr. Thien Chuesiri, Laboratory Manager of Animal Health and Technical Service Operation (AHTSO), Charoen Pokapan Group of Companies for his kind cooperation in granting me to use all of the equipments in the laboratory, his advice, and helping me to carry out almost all parts of this work.

Dr. Kriengsak Poonsuk, Assoc. Prof. of the Devision of Microbiology, Department of Pathology and Dr. Nicom Chaisiri, Assoc. Prof of the Devision of Biochemistry, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University for their helping in collecting specimens.

Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperative for chemical agent and vaccine in this work.

Sincere thanks are due to all persons in the Devision of Microbiology, Department of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University and in all of the Devision in the Laboratooy of AHTSO for providing facilities needed.

Finally, I am deeply indebted to my family for their help, encouragement and understanding.

This thesis were partially supported by a grant of Graduate School, Chulalongkorn University and by Research Unit Cell "Animal Vaccines" of Research Division, Chulalongkorn University which were gratefully acknowledged.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	viii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xi
ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II REVIEW OF RELEVANT LITERATURE	3
III MATERIALS AND METHODS	15
IV RESULTS	27
V DISCUSSION	58
REFERENCES	67
APPENDIX I	77
APPENDIX II	79
BIOGRAPHY	82

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table | Page

1. Neutralization index of duck serums after the first vaccination 30
2. Protective Immunity of ducks to duck plague virus after the first vaccination 30
3. NI and % survival of groups of various vaccinated ducks at the 3rd month after the first vaccination (1 month after the outbreak occurred) 33
4. Neutralization index of duck serums after the second vaccination 36
5. Protective immunity of ducks to duck plague virus after second vaccination 38
6. Neutralization index of duck serums after the third vaccination 41
7. Protective immunity of ducks to duck plague virus after the third vaccination 42
8. Neutralization index before and after challenge with virulent duck plague virus ; relationship to protective immunity after the first vaccination 47
9. Neutralization index before and after challenge with virulent duck plague virus ; relationship to protective immunity after the second vaccination 48
10. Neutralization index before and after challenge with virulent duck plague virus ; relationship to protective immunity after the third vaccination 50

Table | Page

11. Effect of concentration of duck plague antigen on Sensitization 54
12. Effect of exposure time on duck plague virus sensitizing 54
13. Variation in duck plague antibody with concentration of sensitized sheep cells 55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure | Page

1. Inactivation of duck plague virus with 0.05 % BEI at 37 °C for 6 hours 28
2. Comparison between NI and % survival of groups of various vaccinated ducks from the first vaccination throughout the postvaccination period 31
3. Comparison between NI and % survival of groups of various vaccinated ducks from the first vaccination throughout the postvaccination period (including the outbreak) 34
4. Comparison between NI and % survival of groups of various, vaccinated ducks from the second vaccination throughout the postvaccination period 39
5. Comparison between NI and % survival of groups of various, vaccinated ducks from the third vaccination throughout the postvaccination period 43
6. Comparison at the same point in time, with regard to NI and % survival between ducks vaccinated twice and three times with various vaccines 45
7. Scatter diagram and regression line for titer of duck serums tested by α and β neutralization test 52
8. Scatter diagram and regression line for titer of duck serums tested α by neutralization and indirect hemagglutination test..... 57

ABBREVIATIONS

CPE	Cytopathic effect
^{o}C	Degree Celcius
ed., eds.	editor, edited by
et al	et alii
g	Gram
ug	Microgram
um	Micrometer
ul	Microliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
NI	Neutralization index
PBS	Phosphate buffered saline
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย