The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 23
Issue 3 *September, 1993*

Article 3

9-1-1993

โรคติดเชื้อ อีเซอร์ริเชีย โคลัย ในระบบหายใจไก่กระทง : ตอนที่ 4 ภูมิคุ้มกันโรคของวัคซีนเชื้อตาย อีเซอร์ริเชีย โคลัย

เกรียงศักดิ์ สายธนู

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

สายธนู, เกรียงศักดิ์ (1993) "โรคติดเชื้อ อีเซอร์ริเชีย โคลัย ในระบบหายใจไก่กระทง : ตอนที่ 4 ภูมิคุ้มกันโรคของวัคซีนเชื้อตาย อีเซอร์ริเชีย โคลัย," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 23: Iss. 3, Article 3.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1619
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol23/iss3/3

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

โรคติดเชื้อ *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* ในระบบหายใจของไก่กระทง : ตอนที่ 4 ภูมิคุ้มกันโรคของวัคซีนเชื้อตาย *อีเชอร์ริเชีย โคลัย*

*เกรียงศักดิ์ สายธนู**

บทคัดย่อ

ทดลองฉีดวัคซีนซึ่งเตรียมจากเชื้อ *E. coli* ให้ไก่เนื้ออายุ 27 วัน ครั้งเดียวโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เตรียมวัคซีนจากเชื้อ *E. coli* ซีโรทัยป์ O2, O8 และ O78 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่ที่เป็นโรคถุงลมอักเสบ โดยวัคซีนเป็นชนิดเชื้อตายฆ่าด้วยฟอร์มาลิน เตรียมเป็นวัคซีน 4 ชนิด คือ วัคซีนเดี่ยว (monovalent bacterin) เป็นวัคซีนที่เตรียมจาก O2, O8 และ O78 และวัคซีนชนิดรวม (trivalent bacterin) ซึ่งประกอบด้วย O2 รวมกับ O8 และ O78 หลังจากไก่ได้รับวัคซีนแล้ว 6, 13, 20, 26 และ 39 วัน ทำการตรวจหาระดับแอนติบอดีโดยวิธี microagglutination และความคุ้มโรค พบว่าระดับแอนติบอดีในไก่ที่ได้รับวัคซีนจะไม่เปลี่ยนแปลงและมีค่าไม่แตกต่างจากไก่กลุ่มเปรียบเทียบ วัคซีนทั้ง 4 ชนิดสามารถป้องกันโรคหลังจากฉีดเชื้อพิษทับด้วยเชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับที่ใช้เตรียมวัคซีน โดยความคุ้มโรคนี้จะพบอยู่นานประมาณ 2 สัปดาห์ในวัคซีนเดี่ยว และ 1-2 สัปดาห์ในวัคซีนรวม ความคุ้มโรคที่เกิดขึ้นไม่มีความสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดี

คำสำคัญ : *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* ไก่ วัคซีน

---

* ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทนำ

โรคในระบบหายใจของไก่กระทงจะทำความสูญเสียแก่ผู้เลี้ยงไก่มาก การสูญเสียอาจเกิดจากไก่โตช้า ตาย ค่ายารักษาตลอดจนซากไก่ที่ไม่ผ่านการตรวจและถูกขจัดทิ้งไป เนื่องจากมีรอยโรคในอวัยวะต่างๆ หรือซากไก่ที่ผอม โรคติดเชื้อที่สำคัญในระบบนี้คือ colisepticemia ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* เป็นสาเหตุ โรคนี้อาจเป็นโรคแทรกซ้อนหลังจากที่ไก่ติดเชื้อหรือเกิดโรคจากไวรัส เช่น โรคนิวคาสเซิล โรคกล่องเสียงอักเสบหรือจากเชื้อมัยโคพลาสม่า (Gross 1956 ; 1961) เชื้อ *E. coli* อาจพบเป็นปฐมเหตุของโรค colisepticemia (Carlson and Whenham, 1968) ซึ่งโรคดังกล่าวพบได้บ่อยมากในประเทศไทย (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2529; เกรียงศักดิ์, 2533)

การรักษาไก่ที่เป็นโรค colisepticemia โดยใช้ยาปฏิชีวนะมักจะไม่ได้ผลทั้งนี้เพราะเชื้อจะดื้อต่อยามาก (เกรียงศักดิ์และนิทัศน์, 1993; Cloud *et al.*, 1985; Filali *et al.*, 1988; Erganis *et al.*, 1989) ดังนั้นการป้องกันโรคโดยใช้วัคซีนจึงน่าจะเป็นวิธีที่จะลดความสูญเสียเนื่องจากโรคนี้ได้ Dep และ Harry (1976 ; 1978) พบว่าวัคซีนเชื้อตายของ *E. coli* O78 และ O2 ซึ่งผสมแอ๊ดจูแวนท์สามารถกระตุ้นให้ไก่สร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อนี้ได้ จากรายงานของ Rosenberger และคณะ (1985) ซึ่งทดลองฉีดวัคซีนรวมของเชื้อ *E. coli* O2, O78 และ O35 ชนิดผสมน้ำมันให้แม่ไก่ปรากฏว่าแอนติบอดีต่อ O78 จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่านั้นและลูกไก่ที่ได้จากแม่ไก่ที่ได้รับวัคซีนจะป้องกันเชื้อทั้ง 3 ซีโรทัยป์ได้จนอายุ 2 สัปดาห์

เนื่องจากว่าเชื้อแต่ละซีโรทัยป์ของ *E. coli* ไม่สามารถป้องกันเชื้อซีโรทัยป์ที่ต่างกันได้ จากรายงานของเกรียงศักดิ์ (1993) ซึ่งได้จำแนกซีโรทัยป์ของเชื้อ *E. coli* จากไก่เป็นโรค colisepticemia, ไก่เป็นโรคอื่นๆ และจากไก่ปกติพบว่าเชื้อจะเป็น O78, O2 และ O8 มากที่สุด ดังนั้นจุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาว่าเชื้อ *E. coli* O2, O8 และ O78 ที่แยกได้จากไก่ป่วยเมื่อนำมาเตรียมเป็นวัคซีน จะสามารถป้องกันโรคติดเชื้อนี้ได้หรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกเชื้อที่นำมาเตรียมเป็นวัคซีน

เชื้อที่จะนำมาเตรียมเป็นวัคซีนจะเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงมากที่สุด ในการก่อโรคในไก่ โดยปฏิบัติดังนี้ สุ่มตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ซีโรทัยป์ O2, O8 และ O78 มาชนิดละ 2-3

สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เบอร์ VE1, VE-16 และ VE-20 เป็น O2 สายพันธุ์ VE-437 และ VE-449 เป็น O8 สายพันธุ์ VE-3, VE-44 และ VE-55 เป็น O78 เชื้อทั้งหมดแยกได้จากไก่ที่เป็นโรคถุงลมอักเสบ

นำเชื้อทั้งหมดมาเพาะบน nutrient agar (NA) อบที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 18 ชม. เก็บเชื้อโดยเทน้ำเกลือปราศจากเชื้อประมาณ 5 มล. ลงบนจานเพาะเชื้อแล้วใช้ Pasteur pipette ที่ดัดงอด้านปลายเป็นสามเหลี่ยมเขี่ยเชื้อออกจาก NA เก็บเชื้อในหลอดแก้วและนำไปปั่นด้วย Vortex mixer เพื่อให้เซลล์กระจาย นำเชื้อส่วนหนึ่งไปนับหาจำนวนเชื้อโดยวิธี Pour plate technique นับหาปริมาณเชื้อโดยแสดงเป็นจำนวนโคโลนี (colony forming unit, CFU) ต่อมิลลิลิตร และนำเชื้อส่วนที่เหลือไปฉีดไก่อายุ 27 วัน โดยปริมาณเชื้อที่ฉีดให้แก่ไก่จะแตกต่างกันคือต่ำสุด 5.5×10^9 CFU/มล. (VE-3) และสูงสุดคือ 1.5×10^{11} CFU/มล. (VE-55) หลังฉีดเชื้อแล้วบันทึกอัตราการตายและตรวจผ่าซากไก่ที่ไม่ตายจะทำการฆ่าหลังจากฉีดเชื้อ 8 วัน และตรวจผ่าซากเช่นกัน เปรียบเทียบอัตราการตายและรอยโรคที่พบ เพื่อดูว่าเชื้อสายพันธุ์ใดจะมีความรุนแรงมากที่สุด

ไก่ที่ใช้เป็นไก่พันธุ์เนื้ออายุ 1 วัน จำนวน 250 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป เมื่อไก่อายุได้ 27 วัน แบ่งไก่ออกเป็น 27 กลุ่ม โดย 24 กลุ่มแรก (กลุ่มละ 8 ตัว) จะฉีดด้วยเชื้อ *E. coli* ซีโรทัยป์ต่างๆ และตำแหน่งการให้เชื้อ คือ ทางหลอดลม ทางถุงลม และเข้าใต้ผิวหนัง สำหรับกลุ่มที่ 25 26 และ 27 กลุ่มละ 6 ตัว ฉีดด้วยน้ำเกลือ เพื่อเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ

การเตรียมวัคซีน

นำเชื้อสายพันธุ์ VE-3, VE-16 และ VE-449 ซึ่งเป็น *E. coli* ซีโรทัยป์ O78, O2 และ O8 ตามลำดับและเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดลอง เพาะเชื้อบน blood agar ตรวจดูความบริสุทธิ์ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลิน 0.5% ปรับวัคซีนแต่ละชนิดให้มีปริมาณเชื้อ 5×10^9 CFU/มล. ส่วนหนึ่งของวัคซีนแต่ละชนิดจะนำมาผสมกันโดยใช้ปริมาณต่างๆกันเพื่อเตรียมเป็นวัคซีนรวม ทดสอบความปลอดภัยของวัคซีน โดยฉีดวัคซีนแต่ละชนิดแก่ลูกไก่ 5 ตัว อายุ 7 วันทางใต้ผิวหนังตัวละ 1 มล. สังเกตอาการและผ่าซากไก่หลังฉีด 8 วัน ถ้าไก่ปกติไม่มีรอยโรคแสดงว่าวัคซีนมีความปลอดภัย วัคซีนทั้งหมดเก็บไว้ในขวดจุ 100 มล. ปิดด้วยจุกยางและฝาอลูมิเนียม แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น (4 °ซ)

การเตรียมไก่ทดลอง การฉีดวัคซีน และการทดสอบความคุ้มโรค

ใช้ไก่พันธุ์เนื้ออายุ 1 วัน จำนวน 500 ตัว นำมาเลี้ยงจนอายุ 27 วัน แบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ประกอบด้วยไก่กลุ่มละ 50 ตัวและฉีดด้วยวัคซีนชนิดเดี่ยว O2, O8 และ O78 ตามลำดับ โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังด้านหลังของหัวตัวละ 0.2 มล. (คิดเป็นปริมาณเชื้อ 1 x 10^9 CFU/ตัว) ไก่กลุ่มที่ 4 และ 5 ประกอบด้วยไก่กลุ่มละ 150 ตัว โดยกลุ่มที่ 4 ฉีดด้วยวัคซีนรวมของทั้ง 3 ซีโรทัยป์ ตัวละ 0.6 มล. เข้าใต้ผิวหนังเช่นกัน ไก่กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบฉีดด้วยน้ำเกลือและปฏิบัติเช่นเดียวกันกับไก่ฉีดวัคซีน หลังจากฉีดวัคซีน 6, 13, 20, 26 และ 39 วัน จะสุ่มไก่กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มากลุ่มละ 10 ตัว เลือกเจาะเลือดที่เส้นเลือดดำปีกของไก่ 5 ตัว เสร็จแล้วจะฉีดเชื้อพิษทับ โดยจะใช้เชื้อสายพันธุ์เดียวกันกับที่นำมาเตรียมวัคซีน สำหรับกลุ่มที่ 4 และ 5 จะสุ่มไก่มากลุ่มละ 30 ตัว เจาะเลือดกลุ่มละ 18 ตัว หลังจากนั้นจะแบ่งไก่ออกเป็น 3 กลุ่มย่อยกลุ่มละเท่าๆ กัน แต่ละกลุ่มจะฉีดด้วยเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ VE-3, VE-16 และ VE-449

แยกซีรั่มจากเลือดไก่และเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (-15 ° ซ) เพื่อนำไปตรวจหาระดับแอนติบอดี บันทึกจำนวนไก่ตายและตรวจผ่าซาก ไก่ที่ไม่ตายจะฆ่าในวันที่ 10 หลังฉีดเชื้อพิษทับ ตรวจผ่าซาก บันทึกรอยโรค ได้แก่ การอักเสบที่หัวใจ ตับ และถุงลม

วิธีการคำนวณค่าความคุ้มโรค

ในการหาค่าความคุ้มครองของวัคซีน *E. coli* ครั้งนี้จะคำนวณหาค่าความคุ้มโรค 2 วิธี คือ

1. หาค่า percent protection (PP) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Heddleston (1978) โดยนำจำนวนไก่ที่ตายและไก่ที่ไม่ตายแต่มีรอยโรคมาคำนวณหาค่า PP

PP = % การรอดชีวิตและไม่มีรอยโรคในไก่ที่ได้รับการฉีดวัคซีน -% การรอดชีวิตและไม่มีรอยโรคในไก่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน

วัคซีนที่ให้ค่า PP สูงกว่า 60% แสดงว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพป้องกันโรคได้ดีและถ้าต่ำกว่า 60% แสดงว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพไม่ดีพอ (unsatisfactory)

2. หาค่า Index of efficacy (IE) (Deb and Harry, 1976) การคำนวณหาค่า IE นี้จะนำจำนวนไก่ที่ตายรวมทั้งไก่ที่ไม่ตายแต่มีรอยโรคของโรคติดเชื้อ *E. coli* (colisepticemia) มาคำนวณด้วย

$$IE = \frac{\text{จำนวนไก่ตายและไก่ที่มีรอยโรคในไก่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน - จำนวนไก่ตายและไก่ที่มีรอยโรคในไก่ที่ได้รับวัคซีน}}{\text{จำนวนไก่ตายและไก่ที่มีรอยโรคในไก่ที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน}} \times 100$$

ถ้าค่า IE สูงกว่า 70% แสดงว่าวัคซีนนั้นมีความคุ้มโรคดี แต่ถ้าค่าต่ำกว่า 70% แต่สูงกว่า 50% แสดงว่าวัคซีนนั้นมีความคุ้มโรคปานกลาง และถ้าค่า IE ต่ำกว่า 50% แสดงว่าวัคซีนนั้นไม่มีความคุ้มโรค

การเตรียม แอ๊คกลูติโนเจน (Agglutinogen)

ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมวัคซีนแต่จะใช้ phosphate-buffer saline (PBS) pH 7.0 เป็นตัวละลายเชื้อ หลังจากที่เพาะเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์บน nutrient agar และรวบรวมเชื้อแล้วจะแบ่งเชื้อออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะนำไปต้มนาน 2 ชั่วโมงครึ่ง เพื่อเตรียมเป็นแอนติเจนชนิดต้มและส่วนที่สองจะเติมด้วยฟอร์มาลิน 0.5% เพื่อเตรียมเป็นแอนติเจนชนิดเติมฟอร์มาลิน เก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน หลังจากนั้นจะปรับความขุ่นของแอนติเจนทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วย PBS วัดโดยใช้เครื่อง Spectronic 20* ให้ได้ความขุ่นเท่ากับ OD 0.6 ที่ความยาวคลื่น 540 nm. แอนติเจนที่ปรับความขุ่นเรียบร้อยแล้ว จะเก็บไว้ในตู้เย็นตลอดการศึกษา

การตรวจหาระดับแอนติบอดี

การตรวจหาระดับแอนติบอดีของกลุ่มไก่ตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดต่าง ๆ และกลุ่มเปรียบเทียบ จะตรวจโดยวิธี microagglutination method ปฏิบัติตามรายงานของ Rosenberger *et al.* (1985) และใช้แอนติเจน 2 ชนิด คือ แอนติเจนชนิดเติมฟอร์มาลินและแอนติเจนชนิดต้ม ก่อนการทดสอบนำซีรั่มไก่ไปอุ่นที่ 56 °ซ นาน 30 นาที เจือจางซีรั่มด้วย PBS, pH 7.0 โดยเริ่มจาก 1:2, 1:4 จนถึง 1:2048 ใน microwell (Nung) ชนิดก้นเป็นรูปตัว U โดยใช้ multidiluter** ซีรั่มที่เจือจางแล้วในแต่ละหลุมจะทำให้มีปริมาณ 0.05 มล. หลังจากนั้นจะเติมแอนติเจนลงไปหลุมละ 0.05 มล. รวมทั้งหลุมสุดท้ายที่เป็นหลุมเปรียบเทียบที่มีเฉพาะ PBS เขย่าให้เข้ากันดี ปิดฝา แล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติกปิดฝาและใช้ plastic tape ปิดทับระหว่างรอยของฝาปิดกล่อง ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ไอน้ำระเหยออก เสร็จแล้วนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 50 °ซ นาน 6 ชม. อ่านค่าระดับแอนติบอดีโดยเป็นค่าของซีรั่มที่เจือจางสูงสุด ที่ทำให้แอนติเจนจับตัวกันอย่างสมบูรณ์

---

* Arthur H. Thomas Co.

** Titertek^{R}

ผล

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ เพื่อเลือกเชื้อที่จะนำมาเตรียมวัคซีนซึ่งปรากฏว่าเชื้อซีโรทัยป์ O2 สายพันธุ์ VE-16 จะมีความรุนแรงกว่า VE-1 และ VE-20 เชื้อซีโรทัยป์ O8 สายพันธุ์ VE-449 และ VE-437 สามารถทำให้เกิดโรคไม่แตกต่างกัน และเชื้อในซีโรทัยป์ O78 สายพันธุ์ VE-3 จะมีความรุนแรงกว่า VE-44 และ VE-55 ส่วนไก่ในกลุ่มเปรียบเทียบจะไม่มีรอยโรค ดังนั้นจึงเลือกเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ VE-16, VE-449 และ VE-3 มาเตรียมเป็นวัคซีน

ตารางที่ 2 และ 3 แสดงจำนวนไก่ที่ตายหรือมีรอยโรค หลังจากไก่ได้รับเชื้อพิษทับในไก่ได้รับวัคซีนเดี่ยวคือวัคซีนที่เตรียมจาก *E. coli* ซีโรทัยป์ O2 หรือ O8 หรือ O78 และวัคซีนรวมของทั้ง 3 ซีโรทัยป์ โดยแสดงค่าเป็นอัตราการตายรวมทั้งไก่ที่มีรอยโรคเนื่องจาก *E. coli*

รูปที่ 1 และ 2 แสดงความคุ้มโรคของวัคซีนโดยแสดงเป็นค่า percent protection (PP) และ index of efficacy (IE) ซึ่งปรากฏว่าวัคซีน O2 มีผลทำให้ความคุ้มโรคลดลงใน 6 วันแรกหลังฉีดวัคซีนและจะมีประสิทธิภาพป้องกันโรคได้จนถึงวันที่ 26 หลังฉีดวัคซีน วัคซีน O8 จะมีค่า IE ต่ำจนถึงวันที่ 13 หลังฉีดวัคซีนและค่านี้จะสูงในวันที่ 20 หลังฉีดวัคซีน และจะลดลง สำหรับวัคซีน O78 พบว่าวัคซีนจะไม่มีความคุ้มโรคหลังฉีด 6 วัน และไก่จะมีความคุ้มโรคในวันที่ 13 หลังฉีดวัคซีน หลังจากนั้นค่า PP และ IE จะลดลง สำหรับวัคซีนรวม (O2+O8+O78) ปรากฏว่าวัคซีนจะมีความคุ้มโรคได้เช่นกันแต่จะใช้เวลานานกว่าวัคซีนเดี่ยว กล่าวคือวัคซีนจะป้องกันเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ VE-3 (O78) และ VE-449 (O8) ได้ หลังจากฉีดวัคซีน 26 วัน และป้องกัน VE-16 (O2) ได้ ระหว่าง 13-26 วันหลังฉีดวัคซีน

ตารางที่ 4, 5 และ 6 แสดงระดับแอนติบอดีในไก่ที่ฉีดด้วยวัคซีนชนิดต่าง ๆ ซึ่งปรากฏว่าวิธีการตรวจสอบ microagglutination method โดยใช้แอนติเจนที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลินและแอนติเจนที่ต้มสามารถตรวจหาค่าแอนติบอดีได้ต่ำมาก ส่วนใหญ่ระดับแอนติบอดีที่ตรวจพบมีค่าไม่แตกต่างกับไก่กลุ่มเปรียบเทียบ และมีจำนวนมากที่ไม่สามารถตรวจพบแอนติบอดี อย่างไรก็ตามระดับแอนติบอดีที่ตรวจโดยใช้แอนติเจนที่ต้มจะสูงกว่าระดับแอนติบอดีที่ตรวจโดยใช้แอนติเจนที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลิน

Table 1 Virulence of *E. coli* serotypes O2, O8 and O78 in 27 days-old chickens.

Serotype	Strain No.	Dose[b]	Route[a]					
			Intra-trachea		Air sac		Subcutaneous	
			D*	DL**	D	DL	D	DL
O2	VE-1	1×10^{11}	1	8	6	8	1	3
	VE-16	4.45×10^{10}	0	8	3	7	1	3
	VE-20	2.1×10^{10}	1	6	2	8	0	1
O8	VE-437	2.45×10^{10}	0	2	0	3	0	0
	VE-449	7.0×10^{10}	0	4	1	2	0	0
O78	VE-3	5.5×10^{9}	1	6	1	5	0	1
	VE-44	2.45×10^{10}	0	5	1	8	0	2
	VE-55	1.5×10^{11}	0	8	1	7	0	0
Control[c]	-	-	0	0	0	0	0	0

* No. dead, most chickens died within 24 h, the longest servival time was 3 days.

** No. dead or with lesion, lesions were pericarditis, perihepatitis, airsacculitis and peritonitis.

a Eight chickens were used for each route.

b Colony forming unit/chick.

c 6 birds per group, inoculated with 1 ml normal saline.

Table 2 Immunity in chicken vaccinated with monovalent and trivalent *E. coli* serotypes O2, O8 and O78 vaccines. Birds were vaccinated subcutaneously at 27 days of age.

Vaccine	Challenged with strain no.*	Days postvaccination 6 A	6 B	13 A	13 B	20 A	20 B	26 A	26 B	39 A	39 B
Monovalent											
O2	VE-16	1/10☆	8/10★	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10
		3/10□	5/10✦	1/10	9/10	0/10	9/10	0/10	5/10	1/10	3/10
O8	VE-449	0/10	5/10	0/10	3/10	0/10	1/10	0/10	2/10	0/10	1/10
		0/10	7/10	0/10	4/10	0/10	4/10	0/10	4/10	0/10	1/10
O78	VE-3	0/10	5/10	0/10	3/10	0/10	3/10	0/10	3/10	0/10	2/10
		2/10	7/10	1/10	10/10	0/10	7/10	0/10	6/10	0/10	4/13
Trivalent	VE-16	3/10	7/10	1/10	4/10	0/10	3/10	0/10	2/10	1/10	3/10
O2+O8+O78		3/10	5/10	1/10	9/10	0/10	9/10	0/10	5/10	0/10	3/10
	VE-449	0/10	5/10	0/10	3/10	0/10	3/10	0/10	1/10	0/10	1/13
		0/10	7/10	0/10	4/10	0/10	4/10	0/10	4/10	0/10	1/10
	VE-3	2/10	7/10	0/10	9/10	0/10	5/10	0/10	0/10	0/0	5/14
		2/10	7/10	1/10	10/10	0/10	7/10	0/10	6/10	0/10	4/13

* Strain VE-16, VE-449 and VE-3 were serotypes O2,O8 and O78, respectively.

A,☆ No. dead/total vaccinated chickens

□ No. dead/total unvaccinated chickens

B,★ No. dead+no.chick with pericarditis, perihepatitis, airsacculitis peritonitis/total vaccinated chickens

✦ No. dead+no.chick with lesions/total unvaccinated chickens.

Table 3 Immunity in chicken vaccinated with monovalent and trivalent *E. coli* serotypes O2, O8 and O78 vaccines. Birds were vaccinated subcutaneously at 27 days of age.

Vaccine	Challenged with strain no.*	Days postvaccination									
		6		13		20		26		39	
		A☆	B☆	A	B	A	B	A	B	A	B
Monovalent											
O2	VE-16	1/3	8/5	0/1	0/9	0/0	1/9	0/0	0/5	0/1	2/3
O8	VE-449	0/0	5/7	0/0	3/4	0/0	1/4	0/0	2/4	0/0	1/1
O78	VE-3	0/2	5/7	0/1	3/10	0/0	3/7	0/0	3/6	0/0	2/4○
Trivalent	VE-16	3/3	7/5	1/1	4/9	0/0	3/9	0/0	2/5	1/1	3/3
O2+O8+O78	VE-449	0/0	5/7	0/0	3/4	0/0	3/4	0/0	1/4	0/0	1/1✧
	VE-3	2/2	7/7	0/1	9/10	0/0	5/7	0/0	0/6	0/0	5/4✦

A No. dead in vaccinated chick/No. dead in control chick.

B No. dead + no. chick with lesion of vaccinated chick/no. dead + no. chick with lesion of control chick.

* Strain VE-16,VE-449 and VE-3 were serotype O2,O8 and O78, respectively.

☆ No. of challenged chick in each group were 10, except where noted.

○ No. of challenged in vaccinated and control group were 10 and 13 chicks, respectively.

✧ No. of challenged in vaccinated and control group were 13 and 10 chicks, respectively.

✦ No. of challenged in vaccinated and control group were 14 and 13 chicks, respectively.

Table 4 Arithmetic mean agglutinating antibody titer in chicken vaccinated at 27 days-old with monovalent (O2) and trivalent O2+O8+O78 *E. coli* vaccines using O-antigen prepared from *E. coli* VE-16 (O2).

Age (days)	Antigen	Vaccinated birds*		Control birds*
		O2	O2+O8+O78	
27	B	2 ± 0**	2.33 ± 1.50	2.33 ± 1.50
	F	1.67 ± 1.03	0.67 ± 1.03	1.67 ± 1.51
33	B	1.33 ± 1.58	1.33 ± 1.63	4 ± 0
	F	0	0	1 ± 1.41
40	B	2.33 ± 1.50	2.33 ± 11.51	3.33 ± 0.94
	F	0.66 ± 1.03	0	1.67 ± 1.51
47	B	11.33±10.25	9.33 ± 11.43	6.67 ± 4.84
	F	0	0.67 ± 1.63	0.67 ± 1.03
53	B	15.67±13.53	4.4 ± 3.58	9.33 ± 5.47[T]
	F	2.33 ± 1.51	2.4 ± 1.67	1.67 ± 1.51[T]
66	B	8 ± 4.38	9.33 ± 11.2	3.67 ± 2.33
	F	2.33 ± 1.51	1.67 ± 1.97	0.67 ± 1.03

B = Boiling antigen, F = Formalinized antigen

* = Six samples of sera were tested from each group except where noted.

** = Arithmetic mean agglutinating antibody titer±Standard deviation.

T = Five samples of sera were tested.

Table 5 Arithmetic mean agglutinating antibody titer in chicken vaccinated at 27 days-old with monovalent (O8) and trivalent (O2+O8+O78) *E.coli* vaccine using O-antigen prepared from *E. coli* VE-449 (O8).

Age (days)	Antigen	Vaccinated birds*		Control birds*
		O8	O2+O8+O78	
27	B	1.67 ± 0.82**	2 ± 0	1.67 ± 0.82
	F	1 ± 1.10	1 ± 1.10	0.33 ± 0.82
33	B	2.33 ± 0.82	2.33 ± 1.51	4 ± 2.53
	F	0.33 ± 0.82	0.33 ± 0.82	1.33 ± 1.03
40	B	4.33 ± 2.94	3.33 ± 2.73	3 ± 1.10
	F	2 ± 0	1 ± 1.10	0.33 ± 0.82
47	B	3 ± 1.10	5.33 ± 2.07	8 ± 4.38
	F	1 ± 1.10	1 ± 1.10	1.67 ± 1.51
53	B	3.67 ± 2.34	4.67 ± 1.63	6.33 ± 5.13
	F	1.67 ± 1.51	2.67 ± 1.03	1.67 ± 0.82
66	B	8.67 ± 6.41	5.67 ± 2.66	4 ± 0
	F	1.67 ± 0.82	2.33 ± 0.82	1.33 ± 1.63

B = Boiling antigen, F = Formalinized antigen

* = Six samples of sera were tested from each group except where noted.

** = Arithmetic mean agglutinating antibody titer±Standard deviation.

Table 6 Arithmetic mean agglutinating antibody titer in chicken vaccinated at 27 days-old with monovalent (O78) and trivalent (O2+O8+O78) *E.coli* vaccines using O-antigen prepared from *E. coli* VE-3 (O78).

Age (days)	Antigen	Vaccinated birds*		Control birds*
		O78	O2+O8+O78	
27	B	1.33 ± 1.63**	1 ± 0	1.67 ± 1.51
	F	0.33 ± 0.82	1 ± 0	1 ± 1.10
33	B	2.67 ± 1.03	1.67 ± 0.82	2 ± 0
	F	2.67 ± 1.03	1.33 ± 1.63	1.67 ± 0.82
40	B	1.33 ± 1.03	1.67 ± 0.82	1 ± 1.10
	F	1 ± 1.10	1.33 ± 1.63	0
47	B	2 ± 0	1.33 ± 1.03	1.67 ± 0.82
	F	1.67 ± 0.82	0.67 ± 1.03	0
53	B	0	0.33 ± 0.82	0
	F	0	0.33 ± 0.82	0
66	B	0	1.67 ± 0.82	1 ± 1.10[T]
	F	0	1.67 ± 0.82	1 ± 1.10[T]

B = Boiling antigen, F = Formalinized antigen

* = Six samples of sera were tested from each group except where noted.

** = Arithmetic mean agglutinating antibody titer±Standard deviation.

T = Five samples of sera were tested.

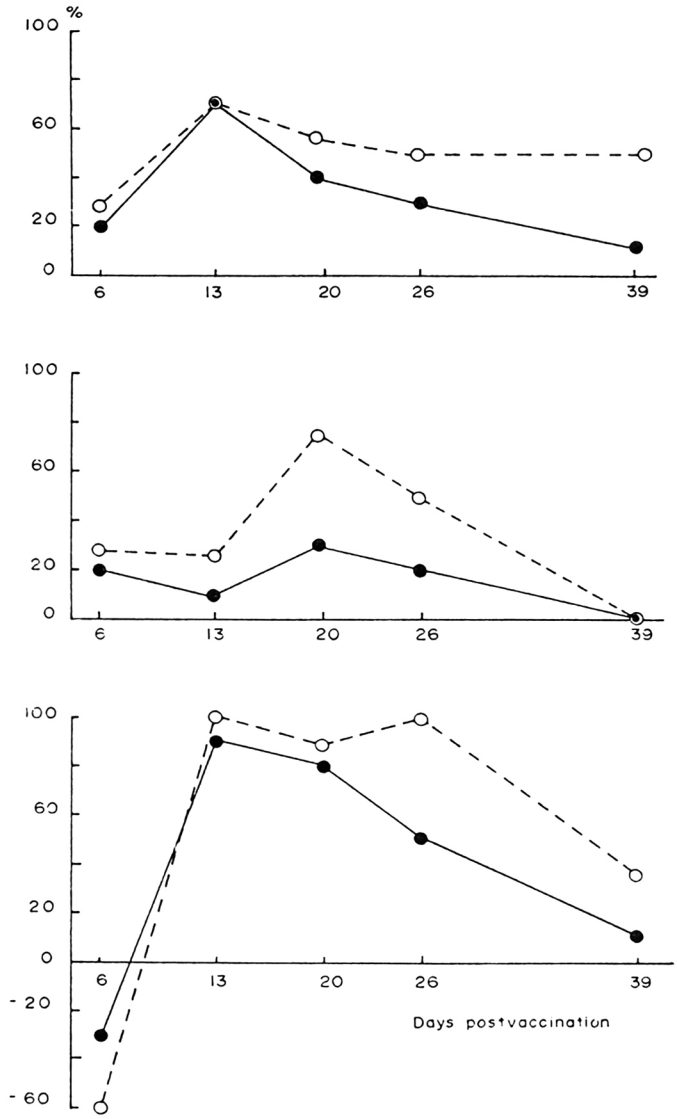

Fig 1 Effectiveness of monovalent *E. coli* vaccine serotypes O2 (bottom), O8 (middle) and O78 (top) in chickens challenged with homologous strain. The results were presented as index of efficacy (o---o) and percent of protection. (●___●).

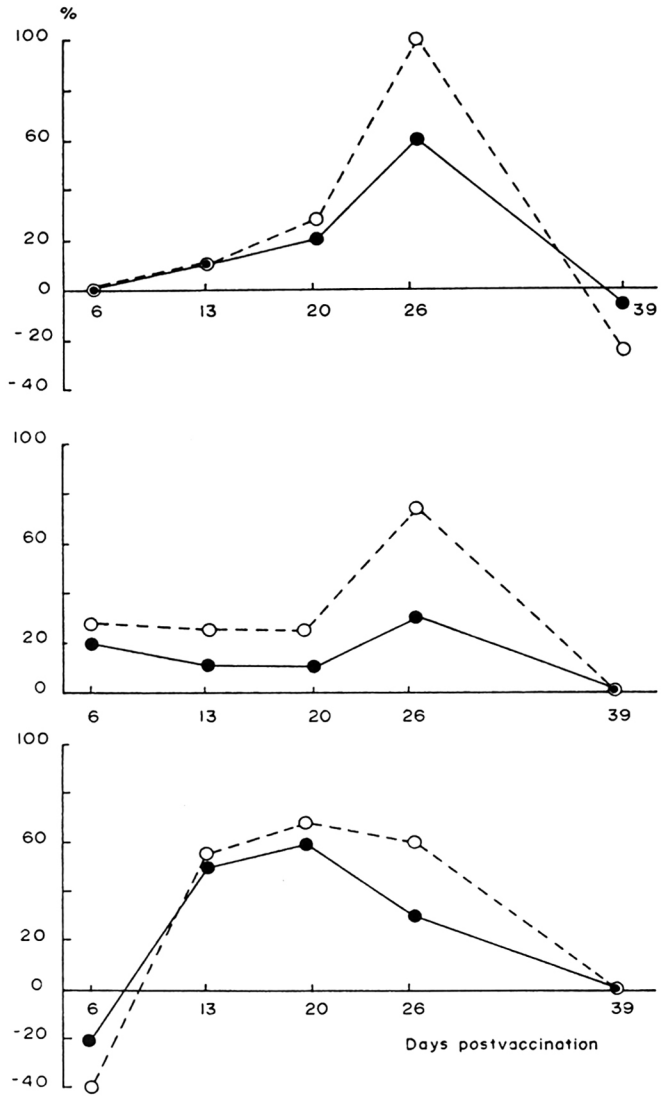

Fig 2 Effectiveness of trivalent *E.coli* vaccine (O2+O8+O78) in chickens challenged with homologous strain, serotype O2 (bottom), O8 (middle) and O78 (top). The results were presented as index of efficacy (o---o) and percent of protection. (●___●)

วิจารณ์

ประสิทธิภาพของวัคซีนที่ใช้ทดลองครั้งนี้จะสามารถป้องกันโรคได้แตกต่างกัน วัคซีน O2 จะป้องกันโรคได้ดีที่สุดโดยพบว่าความคุ้มโรคหลังฉีดวัคซีน 6 วันจะลดลง และจะมีความคุ้มโรคดีหลังจากฉีด 13 วัน ความคุ้มโรคนี้จะอยู่ได้นานประมาณ 2 สัปดาห์ วัคซีน O8 จะทำให้ไก่มีความคุ้มโรคปานกลางหลังจากฉีดวัคซีนไป 20 วัน หลังจากนั้นความคุ้มโรคจะลดลงอย่างรวดเร็ว สำหรับวัคซีน O78 ความคุ้มโรคจะเกิดขึ้นหลังฉีดวัคซีน 6 วันและคุ้มโรคได้ดีหลังฉีด 13 วัน สำหรับ วัคซีนรวมของเชื้อทั้ง 3 ซีโรทัยป์พบว่าระดับความคุ้มโรคต่อซีโรทัยป์ O2 และ O8 จะต่ำกว่าวัคซีนชนิดเดี่ยว แต่วัคซีนนี้จะคุ้มโรคต่อเชื้อซีโรทัยป์ O78 ได้ดีเช่นเดียวกับวัคซีนชนิดเดี่ยวแต่ความคุ้มโรคจะเกิดขึ้นช้ากว่า โดยพบว่าวัคซีนจะคุ้มโรคได้ดีหลังฉีดวัคซีน 26 วัน ความคุ้มโรคที่เกิดขึ้นจากวัคซีนที่ทดลองทั้งหมดจะไม่มีความสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดี ซึ่งสนับสนุนรายงานของ Deb และ Harry (1976) แต่จะแย้งกับการศึกษาของ Melamed *et al.* (1991) และ Heller *et al.* (1990) ที่พบว่าความคุ้มโรคจะสัมพันธ์กับระดับแอนติบอดี ไก่ที่มีระดับแอนติบอดีสูงจะป้องกันโรคได้ดีกว่าไก่ที่มีแอนติบอดีต่ำ วัคซีนที่เตรียมจาก *E. coli* ส่วนใหญ่จะเป็น inactivated-bacterin วัคซีนรวมที่เตรียมจากหลายซีโรทัยป์ก็จะให้ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคเช่นเดียวกันกับวัคซีนที่เตรียมจากซีโรทัยป์เดียว นอกจากวัคซีนที่เตรียมโดยวิธีฆ่าเชื้อทั้งเซลล์แล้วยังมีผู้ทดลอง sub-unit vaccine โดยการแยกเอา pili ของ *E. coli* มาเตรียมวัคซีน Gyimah และ Panigrahy (1984), Gyimah *et al.* (1986) พบว่า multivalent pilus vaccine ที่เตรียมจาก *E. coli* ซีโรทัยป์ O1, O2 และ O78 สามารถป้องกันโรคได้และ Arp (1980) พบว่าไก่งวงที่ฉีดด้วยวัคซีนเชื้อเป็นของ *E. coli* O78 จะป้องกันโรคได้ดีกว่าวัคซีนเชื้อตาย วัคซีนส่วนใหญ่จะป้องกันโรคได้เฉพาะซีโรทัยป์ที่เป็นชนิดเดียวกันกับสายพันธุ์ที่เตรียมวัคซีนเท่านั้น Ron (1987) ได้เตรียมวัคซีนเชื้อเป็นของ *E.coli* สายพันธุ์ LR-2 ซึ่งสามารถป้องกันเชื้อได้หลายซีโรทัยป์ การป้องกันโรคเกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันระบบเซลล์ (CMI) และ IgA มากกว่าระบบ humoral ดังนั้นการตรวจจะไม่พบแอนติบอดีในไก่ที่ป้องกันโรคได้ ในการศึกษาครั้งนี้อาจเกิดเนื่องจาก วิธีการตรวจไม่ไวพอหรือความคุ้มโรคอาจเกิดจากระบบ CMI สำหรับความคุ้มโรคที่เกิดขึ้นจากวัคซีนครั้งนี้อาจจะต่ำกว่ารายงานอื่น ๆ ทั้งนี้เพราะปริมาณแอนติเจนที่ใช้จะน้อยกว่าและวัคซีนที่ทดลองไม่ผสมแอ๊ดจูแวนซ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้จัดสรรเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปีงบประมาณ 2534 เพื่อสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ งานวิจัยสำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี เพราะความร่วมมือและช่วยเหลือจากบุคลากรของหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู 1990 (2533) โรคติดเชื้อ *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* ในระบบหายใจของไก่กระทง : ตอนที่ 1 ความชุกของโรค เวชชสารสัตวแพทย์ 20 : 313-320

เกรียงศักดิ์ สายธนู และ นิทัศน์ เพราแก้ว 1993 (2536) โรคติดเชื้อ *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* ในระบบหายใจของไก่กระทง : ตอนที่ 2 อัตราการต้านยาของเชื้อ *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* เวชชสาร สัตวแพทย์ 23 : 53-70

เกรียงศักดิ์ สายธนู 1993 (2536) โรคติดเชื้อ *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* ในระบบหายใจของไก่กระทง : ตอนที่ 3 การจำแนกชนิดซีโรทัยป์ของเชื้อ *อีเชอร์ริเชีย โคลัย* เวชชสารสัตวแพทย์ 23 : 123-132.

เกรียงศักดิ์ สายธนู โสมทัต วงศ์สว่าง และ สุรศักดิ์ ศิริโชคชัชวาล 1986 (2529) โรค ซี อาร์ ดี ในไก่ 1. สาเหตุของโรค : *มัยโคพลาสม่า กัลลิเซพติคุ่ม* หรือ *อี. โคลัย* เวชชสารสัตวแพทย์ 16 : 131-144

Arp, L.H. 1980. Consequences of active or passive immunization of turkeys against *Escherichia coli* O78. Avian Dis. 24 : 808-815.

Carlson, H.C. and Whenham, G.R. 1968. Coliform bacteria in chicken broiler house dust and their possible relationship to colisepticemia. Avian Dis. 12 : 297-302.

Cloud, S.S., Rosenberger, J.K., Fries, P.A., Wilson, R.A. and Odor, E.M. 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity and antibiotic sensitivity. Avian Dis. 26 : 1084-1093.

Deb, J.R. and Harry, E.G. 1976. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O78: K80) infection in fowls. Res. Vet. Sci. 20 : 131-138.

Deb, J.R. and Harry, E.G. 1978. Laboratory trials with inactivated vaccines against *Escherichia coli* (O2 :K1) infection in fowls. Res. Vet. Sci. 24 : 308-313.

Erganis, O., Kayo, O.,Corlu, M. and Istanhylluogler, E. 1989. Hemaagglutination, hydrophobility, enterotoxigenicity and drug-resistance characteristics of avian *Escherichia coli.* Avian Dis. 33 : 631-635.

Filali, E., Bell, J.G., Houadfi, M., Huggins, M.B. and Cook, J. K. A. 1988. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Morocco. Comp. Immun. Microbial. Infect. Dis. 11 : 121-124.

Gross, W.B. 1956. *Escherichia coli* as a complicating factor in chronic respiratory disease of chickens and infectious sinusitis of turkeys. Poultry Sci. 35 : 765-771.

Gross, W.B. 1961. The development of "Air Sac Disease". Avian Dis. 5 : 431-439.

Gyimah, J.E. and Panigrahy, B. 1985. Immunogenicity of an oil-emulsified *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. Avian Dis. 29 : 1078-1085.

Gyimah, J.E., Panigrahy, B. and Williams, J.D. 1986. Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. Avian Dis. 30 : 687-689.

Heddleston, K.L. 1978. Pasteurellosis. In : Isolation and identification of avian pathogen. Hitcher,S.B., Domermuth, C.H., Purchase, H.G. and Williams, J.E. (eds.). Arnold Printing Corporation, Ithaca, New York, USA. 38-51.

Heller, E.D. 1975. The immune response of hens to multi *Escherichia coli* infection and transfer of immunoglobulins to the egg and hatch chick. Res. Vet. Sci. 18 : 117-120.

Heller, E.D., Leitner, G., Drabkin, N. and Melamed, D. 1990. Passive immunisation of chicks against *Escherichia coli.* Av. Pathol. 19 : 345-354.

Melamed, D., Leitner,G. and Heller, E.D. 1991. A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli.* Avian Dis. 35 : 17-22.

Panigrahy, B., Gyimah, J.E., Hall, C.F. and Williams,J.D. 1984. Immunogenic potency of an oil-emulsified *Escherichia coli* bacterin. Avian Dis. 28 : 475-481.

Ron, E.Z. 1987. Pathogenicity and potential control programs for *E. coli.* Poultry Digest. February, 90-94.

Rosenberger, J.K., Fries, P.A. and Cloud, S.S. 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli.* III. Immunization. Avian Dis. 29 : 1108-1117.

Escherichia coli infection in the respiratory system of broiler: Part IV. Immune response to *Escherichia coli* bacterin

*Kriengsag Saitanu**

Abstract

Broilers were vaccinated subcutaneously once at 27 days of age with *E. coli* bacterin. Four different formalinize-killed-bacterins were prepared from local strains of *E. coli* isolated from airsacculitis. Three monovalent vaccines serotype O2 or O8 or O78 of *E. coli* and one trivalent vaccine were used. Antibody and protection immunity were determined at 6,13,20,26 and 39 days post vaccination. Though the antibody titer assessed by microagglutination method was not changed but all tested vaccines produced protection against the challenge with homologous organism. Duration of the protective immunity were 2 weeks for monovalent vaccines and 1-2 weeks for trivalent vaccine. There was no correlation between the antibody titer and the protective immunity.

Key words : *Escherichia coli*, chicken, vaccine.

---

* Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.