สัตวแพทย์มหานครสาร

JOURNAL OF MAHANAKORN VETERINARY MEDICINE

Available online: www.tci-thaijo.org/index.php/jmvm/

การตรวจและจำแนกเชื้อ *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) จากไก่ไข่ที่เลี้ยงในเขตจังหวัดเชียงใหม่

สุรีรัตน์ หนูมี[1,#] สุรชัย พิกุลแก้ว[1] ธีรยา รินอุตย์[2] และนิวัตร จันทร์ศิริพรชัย[3]

[1]ภาควิชาคลินิกสัตว์บริโภค, [2]ห้องปฏิบัติการกลาง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50100

[3]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330

บทคัดย่อ: โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ นับว่าเป็นปัญหาที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของระบบการผลิตสัตว์ปีก โรคออร์นิโธแบคเทอริโอซิส (Ornithobacteriosis) เป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในสัตว์ปีก และถูกรายงานการตรวจพบเชื้อนี้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในหลายๆประเทศ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยฉบับนี้เพื่อตรวจและวินิจฉัยการติดเชื้อออร์นิโธแบคเทอริโอซิส ในฝูงไก่ไข่ที่เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ของประเทศไทย โดยการเก็บตัวอย่างซีรั่มจากฝูงไก่ที่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจ จำนวน 30 ฟาร์ม แล้วนำมาตรวจหาระดับแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จากตัวอย่างทั้งหมด 600 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างจากไก่อายุระหว่าง 18-63 สัปดาห์ พบว่ามีร้อยละของซีรั่มที่ให้ผลลบ สงสัย และผลบวก คือ ร้อยละ 78 7 และ 15 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าในไก่ไข่ที่มีอายุน้อย (18-38 สัปดาห์) จะมีแอนติบอดีต่อ ORT น้อยกว่าไก่ที่มีอายุมาก (41-63 สัปดาห์) ในขณะที่ผลการทดสอบทางแบคทีเรียวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อได้ทั้งสิ้น 11 ตัวอย่าง จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี ELISA และจากจำนวนดังกล่าวนี้ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจำนวน 8 ตัวอย่าง งานวิจัยฉบับนี้มีประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นการรายงานสถานการณ์การเกิดโรค ORT ครั้งแรกในฝูงไก่ไข่ที่เลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ยังไม่มีการให้วัคซีนป้องกันโรคนี้ในไก่กลุ่มอายุดังกล่าว อีกทั้งยังสามารถพิสูจน์พบเชื้อได้จริงทั้งด้วยวิธีทางแบคทีเรียวิทยา และอณูชีววิทยา

คำสำคัญ: การตรวจและจำแนก *Ornithobacterium rhinotracheale* อีไลซ่า ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

[#]ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทย์มหานครสาร. 2561. 13(2): 147-160.

E-mail address: numee.sureerat@gmail.com

Submitted date **2018-09-09** Revised date 2018-10-17 Accepted date 2018-10-24

Detection and Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Layer Flocks in Chiang Mai, Thailand

Sureerat Numee[1,#], Surachai Pikulkeaw[1], Theeraya Rinut[2], and Niwat Chansiripornchai[3]

[1]Department of food animal clinic, [2]Central laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50100 THAILAND, [3]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 THAILAND

Abstract: Respiratory disease conditions are causing heavy economic losses in the poultry industry. Ornithobacteriosis is one of the infectious diseases of avian species that has been observed in the poultry flocks of many different countries and is continuing to emerge as a growing concern in the economic viability of the poultry industry. The objectives of this study were to detect and identify the ORT from layer flocks in Chiang Mai, Thailand. Layer antibodies were determined in the serum samples of 30 clinically infected layer flocks of different ages (18-63 weeks) by ELISA. The serum analysis showed that the antibody responses were 78% negative, 7% suspect, and 15% positive. Older layers (41-63 weeks) revealed higher positive results than the younger aged layers (18-38 weeks). The bacteria were isolated and identified by polymerase chain reaction (PCR). Bacterial isolation and identification revealed that out of the eleven isolates tested, 8 showed positive results to PCR analysis. This study is very useful and is the first report about ORT found in layer flocks in Chiang Mai where the ORT vaccines are not available. Most importantly, this research has found that both bacteriological and molecular techniques can be used to detect ORT.

Keywords: Detection and identification, *Ornithobacterium rhinotracheale*, ELISA, Polymerase chain reaction

[#]Corresponding author
E-mail address: numee.sureerat@gmail.com

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(2): 147-160.

บทนำ

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจจากเชื้อแบคทีเรีย นับเป็นปัญหาสำคัญที่ซ่อนอยู่ในระบบการเลี้ยงและการผลิตสัตว์ปีก ปัญหาดังกล่าวส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น การไม่สามารถวินิจฉัยสาเหตุของ

ปัญหาได้อย่างถูกต้องแม่นยำ นำมาซึ่งการเพิ่มต้นทุนค่ายารักษาโรค สูญเสียด้านผลผลิต และอัตราการตายของสัตว์ โดยความสูญเสียดังกล่าวอาจมีสาเหตุโดยตรงจากเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย หรืออาจเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อนตามมาหลังจากมีการติดเชื้อโรคใดเชื้อโรคหนึ่งไปแล้ว (van Empel and Hafez, 1999; El-Sukhon et al., 2002; Pan et al., 2012; De Boeck et al., 2015; Chu et al., 2017) การพัฒนาวิธีในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ จะช่วยลดปัญหาและภาระต่างๆแก่เกษตรกรในการเลี้ยงสัตว์ปีกรวมไปถึงประโยชน์ในการควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในสัตว์ปีก (Roepke et al., 1998; van Veen et al., 2000; Chansiripornchai et al., 2002) โดยระยะเวลาการติดเชื้อ ความรุนแรง อัตราการป่วย อัตราการตายจะมีความผันผวนอย่างมาก และมักพบว่าอาการและความรุนแรงจะสามารถถูกทำให้รุนแรงมากขึ้นได้ด้วยปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น การเลี้ยงการจัดการที่ไม่ถูกต้อง การสุขาภิบาลระหว่างการเลี้ยงไม่เหมาะสม ระบบการระบายอากาศไม่ดี จำนวนการเลี้ยงสัตว์ที่หนาแน่นเกินไป สภาพสิ่งแวดล้อมในโรงเรือนไม่ถูกสุขลักษณะ และ/หรือ มีการติดเชื้อร่วมจากเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ปัจจุบันการติดเชื้อ ORT นับว่าเป็นปัญหาสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก และมักพบความผิดพลาดในการแยกและพิสูจน์เชื้อ ORT จากสัตว์ปีกที่ได้รับเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้ต้องการสภาพแวดล้อมจำเพาะในการเจริญเติบโต ปัจจุบันมีรายงานการสำรวจระดับภูมิคุ้มกันและการแยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ทางภาคตะวันออก โดยการเก็บตัวอย่างซีรั่มและเชื้อแบคทีเรียจากหลอดลมของไก่ที่แสดงอาการระบบทางเดินหายใจแบบอ่อน และตัวอย่างป้ายเชื้อแบคทีเรียจากการผ่าซากไก่ที่มีอาการระบบทางเดินหายใจแบบรุนแรง โดยเก็บตัวอย่างดังกล่าวจากฝูงไก่เนื้อ และไก่เนื้อพ่อแม่พันธุ์ (Chansiripornchai et al., 2007)

เชื้อ ORT สามารถแยกเชื้อได้ครั้งแรกในประเทศเยอรมัน ในปี พ.ศ.2524 จากไก่งวงอายุ 5 สัปดาห์ ที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ (Hinz et al., 1994) ในปี พ.ศ.2529 สามารถแยกเชื้อจากไก่งวงที่มีอาการหลอดลมอักเสบ ในสหราชอาณาจักร โดยในขณะนั้นเรียกเชื้อที่แยกได้ชนิดนี้ว่า สิ่งมีชีวิตที่คล้ายเชื้อพาสจูเรลล่า (Pasteurella-like organism) พบว่าฝูงไก่ที่ติดเชื้อ จะมีอัตราการตายสูงขึ้นและพบลักษณะรอยโรคที่ปอดแบบอักเสบข้างเดียว ในปี พ.ศ.2529 สามารถแยกแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในประเทศอิสราเอล จากไก่งวงอายุต่างๆกัน โดยพบรอยโรคของถุงลมอักเสบ และปอดอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute exudative pneumonia) (Chin and Droual, 1997) van Empel and Hafez (1999) ได้รายงาน พบแบคทีเรีย ลักษณะคล้ายพาสจูเรลล่าที่แยกได้จากเป็ดที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในประเทศฮังการีในปี พ.ศ.2530 และแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้าย *Riemerella anatipestifer* ซึ่งแยกได้จากไก่งวงที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเยอรมันในปี พ.ศ.2534 และในปีเดียวกันพบว่าเชื้อชนิดเดียวกันดังกล่าวเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจในไก่กระทงในประเทศสาธารณรัฐแอฟริกาใต้โดย van Beek et al. (1994) ระบุว่าแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตช้า แกรมลบ รูปแท่ง มีลักษณะคล้ายเชื้อพาสจูเรลล่าที่ก่อโรคในสัตว์ปีก สามารถติดเชื้อระหว่างตัวสัตว์ (horizontal transmission) เช่น ทางเดินหายใจ

(aerosol) และติดเชื้อผ่านไข่ (vertical transmission) มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อาจพบมานานแล้วในฝูงสัตว์ปีก แต่อาจพบในรูปแบบของเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนกับโรคอื่น หรือเป็นแบคทีเรียชนิดฉวยโอกาส ในเนเธอร์แลนด์พบการติดเชื้อในสัตว์ปีกอายุน้อย ซึ่งมีลักษณะเหมือนการติดเชื้อ *Pasteurella multocida* โดยสามารถแยกแบคทีเรียได้จากเนื้อเยื่อสัตว์ป่วย นอกจากนี้ยังมีการแยกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะแท่งที่ไม่แน่นอน ได้ในไก่ป่วยด้วยโรคระบบทางเดินหายใจในอิสราเอล เบลเยี่ยม ฝรั่งเศส อังกฤษ (van Empel and Hafez, 1999) ซึ่งโดยสรุปสามารถเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อ ORT ในไก่เริ่มเกิดขึ้นก่อนปี พ.ศ.2536 ซึ่งลักษณะที่พบมีความคล้ายคลึงกับโรคไวรัส หรือแบคทีเรียชนิดอื่น เช่น Pasteurella, Riemeriella, Flavobacteria หรือ *Hemophilus paragallinarum* (Bragg et al., 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อนี้ในสัตว์ปีกได้อีกหลายชนิด เช่น นกกระทา นกยูง นกพิราบ กา ยุโรป เป็ด และไก่งวง (Charlton et al., 1993; Vandamme et al., 1994; Devriese et al., 1995; van Empel et al., 1997)

ORT สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายซับไทป์ (subtype) หรือซีโรไทป์ (serotype) โดยการทดสอบด้วยวิธีทางซีรั่มวิทยา และ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) (Hafez and Beyer, 1997) การจัดกลุ่มของซีโรไทป์ สามารถทำได้โดยการตรวจหาแอนติซีรั่มจำเพาะ ด้วยวิธี agar gel precipitation (AGP) ELISA และrapid slide agglutination (Bock et al., 1997; van Empel et al., 1997; Back et al., 1998; Hafez and Sting, 1999; Hafez, 2002) ในปัจจุบันสามารถแบ่ง ORT ออกได้เป็น 18 ซีโรไทป์ เรียงลำดับจากซีโรไทป์ A ถึง R โดยพบว่าในสัตว์ปีก จำพวกไก่มักพบซีโรไทป์ A ในขณะที่ในไก่งวง สามารถพบได้ทั้งซีโรไทป์ A, B และ D (van Empel and Hafez, 1999) ในปัจจุบันสามารถตรวจพบเชื้อ ORT ได้ทั่วโลก ไม่เฉพาะแค่การตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ แต่เป็นการตรวจเพาะเชื้อได้โดยตรงจากระบบทางเดินหายใจของสัตว์ปีก และสามารถพบการแพร่กระจายของเชื้อดังกล่าวได้อย่างกว้างขวางทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย โดย Chansiripornchai et al. (2007) สามารถพบและแยกเชื้อ ORT ได้จากไก่พันธุ์เนื้อและไก่เนื้อที่เลี้ยงในเขตภาคตะวันออก อย่างไรก็ดี การสำรวจและการศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อ ORT ในประเทศไทย ยังคงมีข้อมูลจำนวนน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตภาคเหนือที่เป็นพื้นที่การเลี้ยงสัตว์ปีกจำพวกไก่อย่างหนาแน่น งานวิจัยฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อสำรวจและพิสูจน์เชื้อ ORT ในไก่ไข่ที่เลี้ยงในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อประโยชน์ในการวางแผนป้องกันและแก้ปัญหาการเกิดโรคนี้ในฝูงไก่ไข่ที่มีปัญหาระบบทางเดินหายใจต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดไก่ไข่ จากฟาร์มที่อยู่ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 30 ฟาร์มๆละ 20 ตัวอย่าง พร้อมบันทึกประวัติ โดยเป็นการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาระหว่างเดือนพฤษภาคม 2558 ถึงเดือนเมษายน 2559 ตัวอย่างเลือดที่ได้ นำมาปั่นแยกซีรั่มที่ความเร็ว 1000 x g เวลา 10 นาที แล้วแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงเวลาทดสอบ

การทดสอบทางซีรั่มวิทยา ด้วย Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

นำซีรั่มที่ได้ มาทดสอบหาระดับแอนติบอดีต่อ ORT ด้วยวิธี indirect ELISA ด้วยชุดทดสอบทางการค้า (Biochek®, The Netherlands) ซึ่งใช้ในการตรวจระดับแอนติบอดี ต่อ ORT ซีโรไทป์ A ถึง M ด้วยโปรแกรมซอฟท์แวร์ของบริษัท และจำแนกผลการทดสอบออกเป็นสามรูปแบบ คือ ผลลบ ให้ค่าไตเตอร์ ≤ 424 ผลสงสัย ให้ค่าไตเตอร์อยู่ระหว่าง 425–1431 และผลบวกจะให้ค่าไตเตอร์ ≥1432

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย จะเลือกเก็บจากไก่ที่แสดงอาการรของระบบทางเดินหายใจ ร่วมกับให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA โดยในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างนั้นจะใช้ไม้พันสำลี ป้ายจากร่องเพดานปากหรือหลอดลมของไก่ จากนั้นนำไม้พันสำลีดังกล่าวบรรจุในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำการขนส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการแบคทีเรียเพื่อการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อ ORT โดยนำตัวอย่างที่ได้ป้ายเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของ Columbia agar base (Oxoid®, England) + 5% sheep blood และ Columbia agar base + 5% sheep blood + 5 µg/ml gentamicin (Oxoid®, England) จากนั้นเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 – 72 ชม. เลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะจำเพาะที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มาเขี่ยเชื้ออีกครั้งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เพื่อให้ได้ลักษณะโคโลนีที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำโคโลนีแบคทีเรียที่บริสุทธิ์นั้นมาทดสอบเบื้องต้นด้วยการย้อมสี gram ซึ่งเป็นการทดสอบปฏิกิริยา catalase และ oxidase โดยแบคทีเรียที่ให้ผลทดสอบ catalase เป็นลบ และผลทดสอบ oxidase เป็นบวก จะนำมาทำการพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

การพิสูจน์เชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)

- **การสกัดสารพันธุกรรม (DNA extraction)**

สกัดสารพันธุกรรม โดยนำโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย ORT ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง (eppendorf®, Germany) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการ snap shot ด้วยไนโตรเจนเหลว สกัดสารพันธุกรรมด้วยด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Fermentas®, Germany) โดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (Beckman DU-64 Spectrophoto meter, Canada) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร

- **ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR)**

ทำปฏิกิริยา PCR (van Empel et al., 1999) โดยใช้ลำดับไพร์เมอร์ดังนี้ OR16S-F คือ GAGAATTAA TTTACGGATTAAG และ OR16S-R คือ TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ *Taq* DNA Polymerases (RBC bioscience) ส่วนประกอบของสารเคมี แสดงดังนี้ *Taq* (5 Units/µL) ปริมาตร 0.2 µL, Buffer (10X PCR buffer) ปริมาตร 2.5 µL, $MgCl_2$ (25 mM) ปริมาตร 1.5 µL, dNTPs (10 mM) ปริมาตร 0.5 µL, Forward Primer (10 µM) ปริมาตร 0.5 µL, Reverse Primer (10 µM) ปริมาตร 0.5 µL, Template ปริมาตร 1 µL และ H_2O ปริมาตร 18.3 µL ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 µL จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PTC-200; MJ Research) ดังนี้ โปรแกรมที่ 1 (initial denaturation) ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้น

ผ่านอุณหภูมิหมุนเวียน 40 รอบ ดังนี้ ขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้นตอน annealing 52 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที และขั้นตอน final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกใน 1.7% Agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยสังเกตแถบสารพันธุกรรมผ่านแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet) เทียบกับกลุ่มควบคุมบวก และ สารที่ใช้เทียบน้ำหนักของผลผลิต PCR ด้วย Ladder marker (100 bp Plus DNA ladder; Thermo Scientific, USA) โดยผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (PCR product) ที่สนใจเท่ากับ 784 bp

ผลการทดลอง

การทดสอบทางซีรั่มวิทยา

ผลตรวจด้วยวิธี ELISA ของซีรั่มไก่จากฟาร์มไก่ไข่ที่ตั้งอยู่ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 30 ฟาร์ม อายุระหว่าง 18-63 สัปดาห์ (ตารางที่ 1) พบว่ามีร้อยละของซีรั่มที่ให้ผลลบ สงสัย และผลบวก คือ ร้อยละ 78 7 และ 15 ตามลำดับ (รูปที่ 1) นอกจากนี้จากผลการสำรวจดังกล่าวยังพบว่าในไก่ไข่ที่มีอายุน้อย (18-38 สัปดาห์) จะพบไก่ที่มีแอนติบอดีต่อ ORT ได้น้อยกว่าไก่ที่มีอายุมาก (41-63 สัปดาห์) ดังแสดงในรูปที่ 2

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ ORT มีการเจริญเติบโตได้ดีใน 5% sheep blood agar บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาพที่มีก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่า เชื้อที่ขึ้นมีลักษณะโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีเทาถึงขาวเทา มีกลิ่นเฉพาะคล้ายกลิ่นของกรดบิวเทอร์ริก ย้อมสีแกรมให้ผลแบคทีเรียแกรมลบ ผลการทดสอบทางชีวเคมีและปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่าให้ผลบวกในการทดสอบ oxidase test และเมื่อทดสอบโดยใช้ API-20NE strip (BioMerieux®, France) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบผล p-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside test (เพื่อดูผล b-galactosidase) และให้ผลบวกภายใน 3 ชั่วโมง ทุกตัวอย่างผล Urease test ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 80 ของตัวอย่างที่พบทั้งหมด และ ผล Arginine dihydrolase (ADH) test ให้ผลบวกจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและสงสัยต่อการทดสอบทางซีรั่มวิทยา จำนวน 132 ตัวอย่าง พบผลบวกต่อการทดสอบทางแบคทีเรียวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีตรงกัน แบ่งออกได้เป็น 11 ตัวอย่าง และนำไปพิสูจน์เชื้อแบคทีเรียอีกครั้งด้วยวิธีทดสอบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

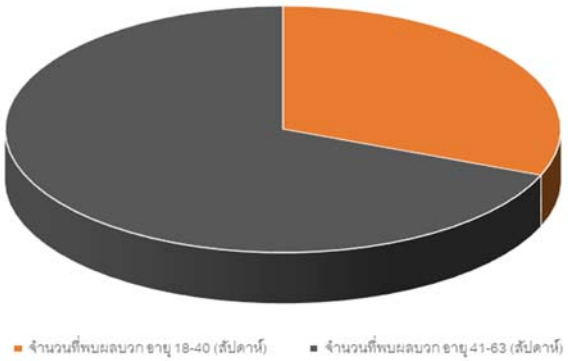
การพิสูจน์เชื้อด้วยเทคนิค PCR

ในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและสงสัยต่อการทดสอบทางซีรั่มวิทยา พบผลบวกต่อการทดสอบทางแบคทีเรียวิทยา จำนวนทั้งหมด 11 ตัวอย่าง นำตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมาสกัดสารพันธุกรรม จากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาทดสอบด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพอลีเมอเรส โดยใช้ลำดับไพรเมอร์ OR16S-F และ OR16S-R จาก 16S rRNA gene ของ ORT ผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีขนาดเท่ากับ 784 bp

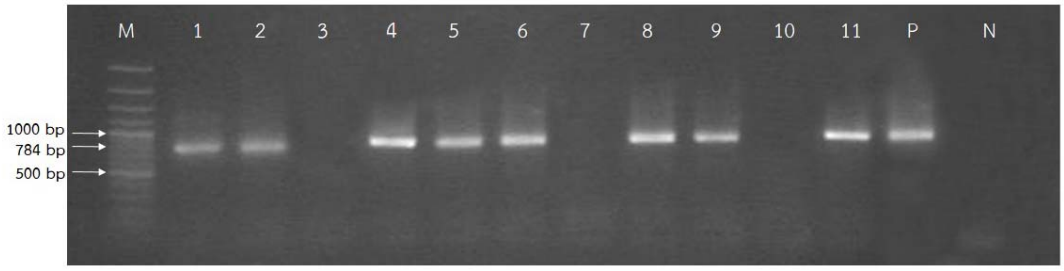
ผลที่ได้พบว่า ในจำนวน 11 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบทางแบคทีเรียวิทยานั้น มี 8 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 1 ผลตรวจด้วยวิธี ELISA ของซีรั่มไก่จากฟาร์มไก่ไข่ที่ตั้งอยู่ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 30 ฟาร์ม อายุระหว่าง 18-63 สัปดาห์

รหัสฟาร์ม	**อายุ (สัปดาห์)**	**จำนวนตัวอย่าง**	**ผล ELISA**		
			ผลลบ	**สงสัย**	**ผลบวก**
CMU-A16	18	20	19	1	0
CMU-A17	18	20	17	1	2
CMU-A18	21	20	16	1	3
CMU-A19	23	20	19	1	0
CMU-A20	25	20	17	2	1
CMU-A21	28	20	17	0	3
CMU-A22	28	20	18	0	2
CMU-A23	29	20	18	2	0
CMU-A24	31	20	18	2	0
CMU-A25	31	20	17	1	2
CMU-A26	33	20	17	0	3
CMU-A27	34	20	15	1	4
CMU-A28	36	20	16	2	2
CMU-A29	37	20	15	2	3
CMU-A30	38	20	15	2	3
CMU-B50	41	20	13	2	5
CMU-B51	44	20	13	1	6
CMU-B52	50	20	15	1	4
CMU-B53	51	20	14	0	6
CMU-B54	52	20	19	1	0
CMU-B55	55	20	15	2	3
CMU-B56	55	20	12	2	6
CMU-B57	56	20	13	3	4
CMU-B58	56	20	15	1	4
CMU-B59	58	20	14	1	5
CMU-B60	58	20	15	1	4
CMU-B61	59	20	13	2	5
CMU-B62	60	20	14	3	3
CMU-B63	61	20	14	2	4
CMU-B64	63	20	15	2	3
	ตัวอย่างทั้งหมด	600	468	42	90
	ร้อยละ	100%	78	7	15



รูปที่ 1 สัดส่วนของจำนวนไก่ที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT แยกตามช่วงอายุ คือ 18-40 สัปดาห์ และช่วงอายุ 41-63 สัปดาห์



รูปที่ 2. ผลการพิสูจน์เชื้อด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีมอเรส
M = DNA Marker Lane ที่ 1-11 = ตัวอย่างที่ทำการตรวจ P = ตัวควบคุมบวก N = ตัวควบคุมลบ

วิจารณ์

จากผลทดลอง สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT ในไก่ไข่ที่เลี้ยงในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีการสุ่มเก็บซีรั่มจากฝูงไก่ที่มีการแสดงอาการในระบบทางเดินหายใจ พบว่าในไก่ไข่ที่มีอายุน้อย (18-38 สัปดาห์) จะพบไก่ที่มีแอนติบอดีต่อ ORT ได้น้อยกว่าไก่ที่มีอายุมาก (41-63 สัปดาห์) และในฝูงไก่ไข่ที่พบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT มีระดับแอนติบอดีอยู่ในเกณฑ์สงสัยและให้ผลบวกรวมร้อยละ 22 การพบผลบวกต่อการตรวจสอบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT ในระดับสูงนี้เป็นเหตุการณ์ที่อาจบ่งชี้ได้ประการหนึ่งว่ามีการติดเชื้อ ORT อยู่ในฟาร์มสัตว์ปีกในพื้นที่ ซึ่งการตรวจพบระดับแอนติบอดีดังกล่าวเกิดขึ้นในฝูงไก่ไข่ที่ไม่เคยมีรายงานการตรวจพบโรคนี้มาก่อน อีกทั้งยังไม่เคยมีการทำวัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อ ORT ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ การตรวจพบระดับแอนติบอดีในฝูงไก่ที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อนนั้น สอดคล้องกับการสำรวจของ Chansiripornchai et al. (2007) ที่เก็บตัวอย่างซีรั่มจากฝูงไก่ทางเขตภาคตะวันออกของไทย พบว่าสามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT ในไก่พันธุ์เนื้อและไก่เนื้อ โดยพบว่า ไก่พันธุ์ สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดี ร้อยละ 87.8 และในฝูงไก่เนื้อ พบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT อยู่ในเกณฑ์สงสัยและให้ผลบวกร้อยละ 34.2 ซึ่งในขณะนั้นมีเพียงรายงานการเกิดปัญหาทางเดินหายใจโดยยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด การตรวจพบระดับแอนติบอดีของ ORT ในฝูงไก่ไข่ที่มีการแสดงอาการทางระบบ

ทางเดินหายใจ ยังสอดคล้องกับ Zuo et al. (2018) ที่เก็บตัวอย่างจากฝูงไก่พ่อแม่พันธุ์ในประเทศจีน จำนวน 673 ตัว ซึ่งเป็นการเก็บตัวอย่างซีรั่มจากฝูงไก่ที่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจและในบางรายสามารถตรวจพบภาวะถุงลมอักเสบร่วมด้วย Pan et al. (2012) ตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อ ORT สูงถึงร้อยละ 65.2-100 จากฝูงไก่ไข่ และไก่ไข่พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในประเทศจีน โดยเป็นฝูงไก่ที่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจร่วมกับการติดเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล การตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อ ORT พบได้อย่างกว้างขวางทั่วโลกในฝูงไก่ที่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจ รวมไปถึงการพบระดับแอนติบอดีในฝูงไก่พ่อแม่พันธุ์ในประเทศบราซิล ที่ยืนยันการตรวจพบเชื้อ ORT ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Canal et al., 2003; Canal et al., 2003a)

การตรวจวัดระดับแอนติบอดีต่อ ORT ในการศึกษานี้ ใช้ชุดทดสอบ ELISA ที่มีการพัฒนาเป็นเชิงพาณิชย์ (Biocheck®, The Netherlands) สามารถตรวจความจำเพาะต่อแอนติบอดีได้ถึง 9 ซีโรไทป์ จากทั้งหมด 13 ซีโรไทป์ พบว่า ระดับแอนติบอดีจะสูงสุดในช่วง 1-4 สัปดาห์ หลังจากไก่ติดเชื้อตามธรรมชาติ แต่ก็ลดลงอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าการเก็บตัวอย่างซีรั่มในไก่ควรเก็บที่อายุต่างๆ กัน เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อได้มากขึ้น (van Empel and Hafez, 1999) นอกจากนี้จากการสำรวจทางซีรั่มวิทยาในสัตว์ปีกต่างชนิดกันยังพบว่าแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT ให้ผลต่างกัน โดย พบแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT ในไก่พันธุ์เนื้อร้อยละ 79 ในไก่เนื้อร้อยละ 26 และไก่งวงเนื้อร้อยละ 53 (Hafez and Sting, 1996) จากการทดลองการแพร่กระจายของเชื้อและการตอบสนองต่อระดับแอนติบอดีในร่างกายสัตว์ปีก พบว่าหลังการให้เชื้อพิษ ORT โดยการสูดดม สามารถตรวจพบระดับแอนติบอดีได้ในวันที่ 5 และพบว่าระดับแอนติบอดีที่ตรวจวัดด้วยวิธี ELISA ในไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อพิษจะมีระดับสูงและคงอยู่เป็นระยะเวลานาน อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการติดเชื้อตามธรรมชาติ (van Empel et al., 1999) จึงอาจกล่าวสรุปได้ว่า การติดเชื้อในธรรมชาติมักพบระดับแอนติบอดีที่ต่ำ การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดในช่วงที่สัตว์แสดงอาการจึงสำคัญมาก

กล่าวโดยสรุป การตรวจโดยวิธี ELISA จะแสดงผลของแอนติบอดีต่อเชื้อ ORT ที่ก่อปัญหาระบบทางเดินหายใจ โดยนิยมใช้เป็น screening test อันเนื่องมาจากในการทดสอบ ELISA สามารถพบ cross reaction ระหว่างสายพันธุ์ของ serotypes A B D และ E ได้ (โดยเฉพาะ serotype A และ B) นอกจากนี้การทดสอบด้วยวิธี ELISA มีข้อจำกัดคือมักจะให้ผลบวกต่อการตรวจในการเก็บตัวอย่างเฉพาะจากสัตว์ปีกที่มีการแสดงอาการแล้ว โดยพบว่าบางครั้งผลของการทดสอบมีค่าไตเตอร์ต่ำและมักไม่สามารถตรวจพบได้ในช่วงหลังการติดเชื้อมาแล้วหลายสัปดาห์ (Chansiripornchai et al., 2007) ซึ่งโดยทั่วไปผลการทดสอบสายพันธุ์ของเชื้อจะอ้างอิงกับสถาบัน American Type Culture Collection

จากการเก็บตัวอย่างโดยการป้ายเชื้อจากร่องเพดานปากจากฝูงไก่ที่แสดงอาการของระบบทางเดินหายใจและตรวจพบแอนติบอดีต่อ ORT ทำการเพาะแยกเชื้อให้ได้โคโลนีบริสุทธิ์ที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อ ORT ย้อมสีแกรมและทดสอบปฏิกิริยา catalase และ oxidase ได้แบคทีเรียจำนวน 11 isolates ที่ให้ผลการย้อมสีเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ และ

ให้ผลการทดสอบปฏิกิริยา catalase เป็นลบและ oxidase เป็นบวก และเมื่อทดสอบโดยใช้ API-20NE strip (BioMerieux®, France) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบผล p-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside test (เพื่อดูผล b-galactosidase) และให้ผลบวกภายใน 3 ชั่วโมง ทุกตัวอย่างผล urease test ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 80 ของตัวอย่างที่พบทั้งหมด และ ผล Arginine dihydrolase (ADH) test ให้ผลบวกจำนวน 4 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกและสงสัยต่อการทดสอบทางซีรั่มวิทยา จำนวน 132 ตัวอย่าง แม้ว่าผลการทดสอบปฏิกิริยา catalase และ oxidase จะให้ผลตรงกันในหลายงานวิจัย แต่เนื่องจากความไม่คงที่ของผลการทดสอบทางชีวเคมี สามารถพบผลทางชีวเคมีอื่นที่แตกต่างกันเล็กน้อยได้จากระยะเวลาในการตรวจพบผล (van Empel and Hafez, 1999; Canal et al., 2005; Chansiripornchai et al., 2007; Numee et al., 2012; Szabó et al., 2017) ดังเช่น ในงานวิจัยของ van Empel and Hafez (1999) ที่ทำการทดสอบแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว พบว่าจากการทดสอบเชื้อจำนวน 6 สเตรน จากเชื้อที่มีแหล่งกำเนิดและซีโรไทป์ต่างกัน ผลที่ได้นั้นคือ คุณสมบัติส่วนใหญ่ของเชื้อ ORT เมื่อทำการทดสอบภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะให้ผลบวกต่อ oxidase, urease, β-galactosidase, arginine dehydrolase, alkaline phosphatase, esterase lipase (C8), leucine arylamidase, cystine arylamidase, acid phosphatase, phosphohydrolase, α-glucosidase, N-acetyl-β -Glucosaminidase สร้างกรดแต่ไม่เกิดก๊าซจาก glucose, fructose, lactose และ galactose โดยทุกปฏิกิริยา สามารถแสดงผลภายในระยะเวลาหนึ่งชั่วโมงของการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ ที่พบผลในระยะเวลาที่แตกต่างกันออกไป ดังกล่าวไปแล้วข้างต้น เหตุจากความไม่คงที่ของผลการทดสอบทางชีวเคมีนี้เอง วิธีในการพิสูจน์เชื้อที่เชื่อถือได้จึงมีความสำคัญต่อการชันสูตรโรคในห้องปฏิบัติการ และการพิสูจน์เชื้อ ORT ควรใช้ร่วมกันระหว่างวิธีการทดสอบตกตะกอนบนอาหารวุ้น (agar gel precipitation) และการทดสอบทางชีวเคมี โดยใช้ชุดทดสอบ API-20NE อย่างไรก็ตาม แม้ว่าผลการทดสอบทางชีวเคมีของ ORT จะไม่รวมอยู่ในข้อมูลการอ่านผลของเอพีไอ และพบว่าผลลัพธ์ในการทดสอบไม่เหมือนกันทุกครั้งจากการทดสอบของ van Empel et al. (1997) ทำการทดสอบแบคทีเรียจำนวน 443 สเตรน ที่ให้ผล positive ต่อ oxidase test พบว่าร้อยละ 99 ให้ผลรหัส เอพีไอ คือ 0-2-2-0-0-0-4 (ร้อยละ 65) หรือ 0-0-2-0-0-0-4 (ร้อยละ 34) และหากรวมความเป็นไปได้ในการให้ผลบวกต่อการทดสอบเอดีเอช (ADH test) และรหัสเอพีไอ (0-3-2-0-0-0-4 หรือ 0-1-2-0-0-0-4) จะพบว่า ผลในการพิสูจน์เชื้อโดยใช้ชุดทดสอบเอพีไอรวมเป็นร้อยละ 100

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมีประโยชน์มากในการพิสูจน์เชื้อ ORT โดยใช้ไพรเมอร์ OR16S-F และ OR16S-R พบว่ามีความจำเพาะอย่างมากในการเพิ่มจำนวน (amplify) ชิ้น 784 bp ของ 16S rRNA gene ของ ORT (van Empel et al., 1991; van Empel et al., 1999; Chansiripornchai et al., 2007; Szabó et al., 2017) และ นอกจากไพรเมอร์ชนิดนี้แล้ว Hafez and Beyer (1997) ได้เคยรายงานการใช้ไพรเมอร์ M13 (5′-TATGTAAAACGACGGCCAGT-3′) และ ERIC1R (5′-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′) หากแต่ผลที่ได้พบความไม่คงที่

ของลายพิมพ์ยีน (fingerprint) ระหว่างซีโรไทป์ที่นำมาทดสอบ ประโยชน์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสยังสามารถตรวจหาเชื้อ ORT จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไก่ และสิ่งแวดล้อมด้วย เช่น เปลือกไข่ มูลไก่ ตัวอย่างชิ้นเนื้อ ฝุ่นละออง ซึ่งจะมีประโยชน์ในการศึกษาระบาดวิทยา (Chansiripornchai et al., 2007) งานวิจัยฉบับนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการทราบสถานการณ์การเกิดโรคและการตรวจพบเชื้อ ORT ในฝูงไก่ไข่ที่เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ยังไม่มีการให้วัคซีนป้องกันโรคนี้ ในไก่ไข่ที่เลี้ยงช่วงอายุ ระหว่าง 18-76 สัปดาห์ และยังพบว่าโอกาสในการตรวจพบระดับแอนติบอดีในไก่ที่อายุมาก คือช่วงอายุตั้งแต่ 41-63 สัปดาห์ มีมากกว่าในไก่ไข่ช่วงอายุน้อยกว่านี้ การตรวจยืนยันด้วยวิธีทางแบคทีเรีย และ อณูชีววิทยา (ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส) ช่วยทำให้การตรวจพบระดับแอนติบอดีต่อเชื้อมีความสำคัญและชัดเจนมากยิ่งขึ้น เนื่องจากพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสมากถึง 8 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อการตรวจแอนติบอดีด้วยวิธี ELISA จำนวน 132 ตัวอย่าง นั่นแสดงถึงภาวะการมีเชื้อ ORT ในฝูงไก่ไข่ที่แท้จริง ดังจะแสดงให้เห็นชัดเจนมากขึ้นจากสถานการณ์ไก่ไข่ที่ป่วยจากโรคทางเดินหายใจและบางครั้งในการวางแผนการรักษาไม่ได้คำนึงสาเหตุของการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ ทำให้ที่ผ่านมาไม่สามารถใช้ยารักษาและวางแผนแก้ปัญหาที่ถูกต้องนัก อย่างไรก็ตามทุกครั้งที่จะมีการวางแผนการรักษาหรือให้ยา ควรมีการทดสอบและพิสูจน์เชื้อสาเหตุที่แน่นอน รวมไปถึงยังคงต้องศึกษาต่อไปเกี่ยวกับห่วงโซ่ของการส่งถ่ายเชื้อในพื้นที่ อันเนื่องมาจากปกติแล้ว เชื้อชนิดนี้ พบได้มากในไก่พ่อแม่พันธุ์ที่มีอายุมากและมีวงจรการเลี้ยงยาวนาน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ ยืนยันประการหนึ่งได้ว่าในฝูงไก่ไข่ที่เลี้ยงในจังหวัดเชียงใหม่มีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ ORT ซึ่งควรจะต้องมีการเฝ้าระวัง หรือวางแผนการป้องกันรักษาที่รัดกุมมากขึ้น รวมไปถึงทำการศึกษาเพิ่มเติมในไก่พ่อแม่พันธุ์และไก่เนื้อ เพื่อทราบสถานการณ์ของโรคและเพื่อที่จะสามารถวางแผนการรักษาและแก้ไขปัญหาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่พบเป็นปัญหาอย่างมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ และประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Back, A., D. Halvorson, G. Rajashekara and K. Nagaraja. 1998. Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to Ornithobacterium rhinotracheale. J. Vet. Diagnostic Invest. 10: 84-86.

Bock, R., P. Freidlin, M. Manoim, A. Inbar, A. Frommer, P. Vandamme and P. Wilding. 1997. Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) associated with a new turkey respiratory tract infectious agent in Israel. Proceedings of the 11th International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest. 120 p.

Bragg, R., J. Greyling and J. Verschoor. 1997. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. Avian Path. 26:595-606.

Canal, C.W., J.A. Leão, D.J. Ferreira, M. Macagnan, C.T.P. Salle and A. Back. 2003. Prevalence of antibodies against Ornithobacterium rhinotracheale in broilers and breeders in Southern Brazil. Avian Dis. 47:163-169.

Canal, C.W., S.L.S. Rocha, J.A. Leão, L.C.B. Fallavena, S.D. Oliveira and N. Beltrão. 2003a. Polymerase Chain Reaction (PCR) detection of Ornithobacterium rhinotracheale (ORT). Cienc. Rural. 33:371-373.

Canal, C.W., J, A. Leão, S.L.S. Rocha, M. Macagnan, C.A.V. Lima-Rosa, S.D. Oliveira and A. Back. 2005. Isolation and characterization of Ornithobacterium rhinotracheale from chickens in Brazil. Res. Vet. Sci. 78(3):225-230.

Chansiripornchai, N. and J. Sasipreeyajan. 2002. Efficacy of sarafloxacin in broliers after experimental infection with Escherichia coli. Vet. Res. Comm. 26(4): 255-262.

Chansiripornchai, N., W. Wanasawaeng and J. Sasipreeyajan. 2007. Seroprevalence and identification of Ornithobacterium rhinotracheale from broiler and broiler breeder flocks in Thailand. Avian Dis. 51:777-780.

Charlton, B.R., S.E. Channing-Santiago, A.A. Bickford, C.J. Cardona, R.P. Chin, G.L. Cooper, R. Droual, J.S. Jeffrey, C.U. Meteyer, H.L. Shivaprasad and R. Walker. 1993. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative-rod associated with avian respiratory disease. J. Vet. Diagn. Invest. 5:47-51.

Chin, R. and R. Droual. 1997. Ornithobacterium rhinotracheale infection. In: Disease of Poultry 10th ed., B.W.Calnek (ed.) Ames: Iowa State University Press. 1012-1015.

Chu, J., Q. Zhang, Z. Zuo, S. El-Ashram, Y. Guo, P. Zhao, S. Huang, C. He and A. Khan. 2017. Co-infection of Chlamydia psittaci with H9N2, ORT and Aspergillus fumigatus contributes to severe pneumonia and high mortality in SPF chickens. Sci. Rep. 7(1):13997.

De Boeck, C., I. Kalmar, A. Dumont and D. Vanrompay. 2015. Longitudinal monitoring for respiratory pathogens in broiler chickens reveals co-infection of Chlamydia psittaci and Ornitho bacterium rhinotracheale. J. Med. Microbiol. 64(5):565-74.

Devruese, L.A., J. Hommez, P. Vandamme, K. Kersters and F. Haesebrouck. 1995. In vitro antibiotic sensitivity of Ornithobacterium rhinotracheale strains from poultry and zild birds. Vet. Rec. 137:435-436.

El-Sukhon, S.N., A. Musa, M. Al-Attar. 2002. Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in northern and middle Jordan with special reference to Escherichea coli, Ornithobacterium rhinotracheale and Bordetella avium. Avian Dis. 46: 605–612.

Hafez, H.M. 2002. Diagnosis of Ornitho bacterium rhinotracheale. Int. J. Poult. Sci. 1(5):114-118.

Hafez, H.M. and W. Beyer. 1997. Preliminary investigation on Ornithobacterium rhinotracheale “ORT” isolates using PCR fingerprints. In: Proceedings XIth International Conference of World Veterinary Poultry Association. Budapest. 51 p.

Hafez, H.M. and R. Sting. 1996. Serological surveillance on Ornithobacterium rhinotracheale in poultry flock using self/made ELISA. In: Proceedings of the 24th Western Poultry Disease Conference, Cancun. 163-164 p.

Hafez, H.M. and R. Sting. 1999. Investigations on different Ornithobacterium rhinotracheale “ORT” isolates. Avian Dis. 34:1–7.

Hinz, K.H., C. Blome and M. Ryll. 1994. Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys. Vet. Rec. 135:233-234.

Numee, S., R. Hauck and H.M. Hafez. 2012. Detection and typing of Ornithobacterium rhinotracheale from German poultry flocks. Avian Dis. 56(4):654-658.

Pan, Q., A. Liu, F. Zhang, Y. Ling, C. Ou, N. Hou and C. He. 2012. Co-infection of broilers with Ornithobacterium rhinotracheale and H9N2 avian influenza virus. BMC Vet Res 8:104.

Roepke, D. C., A. Back, D.P. Shaw, K.V. Nagaraja, S.J. Sprenger, and D.A. Halvorson. 1998. Isolation and identification of Ornithobacterium rhinotracheale from commercial turkey flocks in the upper midwest. Avian Dis. 42:219-221.

Szabó, R., E. Wehmann, L. Makrai, C. Nemes, É. Gyuris, Á. Thuma and T. Magyar. 2017. Characterization of Ornithobacterium rhinotracheale field isolates from Hungary. Avian Pathol. 46(5):506-514.

Vandamme, P., P. Segers, M. Vancanneyt, K. van Hove, R. Mutters, and J. Hommez, F. Dewhirst, B. Paster, K. Kersters and E. Falsen. 1994. Ornithobacterium rhinotracheale gen. nov., sp. Nov., isolation from the avian respiratory tract. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:24-37.

van Beek, P., P. van Empel, G. van den Bosch, P. K. Storm, J. H. Bongers and J. H. du Preez. 1994. Respiratory problems,

growth retardation and arthritis in turkeys and broilers caused by a Pasteurella-like organism: Ornitho bacterium rhinotracheale or Taxon 28. Tijdschr. Diergeneeskd. 119:99–101.

van Empel, P., H. van den Bosch, P. Loeffen and P. Storm. 1997. Identification and Serotyping of Ornithobacterium rhinotracheale. J. Clin. Microbiol. 35:418-421.

van Empel, P. and H.M. Hafez. 1999. Ornithobacterium rhinotracheale: a review. Avian Path. 28:217-222.

van Empel, P., M. Vrijenhoek, D. Goovaerts and H. van den Bosch. 1999. Immunohistochemical and serological investigation of experimental Ornitho bacterium rhinotracheale infection in chickens. Avian Path. 25:187-193.

van Veen, L., P. van Empel and T. Fabri. 2000. Ornithobacterium rhinotracheale, a primary pathogen in broilers. Avian Dis. 44:896-900.

Zuo Z., T.Y. Zhang, Y.X. Guo, J. Chu, G.G. Qu, L.Z. Miao, Z.Q. Shen and C. He. 2018. Serosurvey of avian metapneumovirus, Orithobacterium rhinotracheale, and Chlamydia psittaci and their potential association with avian airsacculitis. Biomed. Environ. Sci. 31(5):403-406.