

# เชื้อฮีโมฟิลัสพารากาลลินารัม ที่พบจากโรคหวัดติดต่อในไก่

*HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM* FROM INFECTIOUS CORYZA CHICKENS

วันทนี เนรมิตมานสุข

ประกาศ เนรมิตมานสุข

Wantanee Neramitmansook

Prapahd Neramitmansook

แผนกแบคทีเรีย กองวิชาการ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพฯ 10400

Bacteria Section, Research Division, Department of Livestock Development, Bangkok 10400

## Abstract

Five flocks of broilers and layings were clinical manifestation as infectious coryza. They were observed from December 1982-June 1983. The isolated organisms, *Haemophilus* spp., were cultured from infraorbital sinuses. They were identified as *Haemophilus paragallinarum* according to the following characteristics: the organisms required only "V factor" for growth, converted delta aminolaevulinic acid to protoporphyrin, negative to catalase test, pathogenic to 6 days old chicken embryo.

## บทคัดย่อ

ไก่กระທงและไก่ไข่ที่แสดงอาการของโรคติดต่อจำนวน 5 ฟอง ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2525 ถึงต้นเดือนมิถุนายน 2526 ได้ทำการเพาะแยกเชื้อ ฮีโมฟิลัส จากบริเวณอินฟราออบิทิทอลไซนัส พบเชื้อฮีโมฟิลัสที่ไม่ต้องการ "X แฟกเตอร์" แต่ต้องการ "V แฟกเตอร์" ให้ผลบวกต่อปฏิกิริยาการเปลี่ยน delta-aminolaevulinic acid เป็น protoporphyrin ให้ผลลบต่อปฏิกิริยากะตะเลส เป็นอันตรายต่อคัพพะไข่อายุ 6 วัน จึงสรุปได้ว่าเชื้อฮีโมฟิลัสที่พบจากโรคหวัดติดต่อในไก่เป็น ฮีโมฟิลัสพารากาลลินารัม



บทนำ

โรคหวัดติดคอในไก่ เป็นปัญหาสำหรับผู้เลี้ยงไก่มาเป็นเวลานาน ทำความเสียหายทั้งในไก่เนื้อและไข่ มีรายงานการพบโรคนี้ โดย De Blicck (1932), Eliot และ Lewis (1934) ว่า เชื้อแบคทีเรีย ชื่อ *Haemophilus gallinarum* เป็นสาเหตุของโรคหวัดในไก่ Beach และ Schalm (1936) เชื่อว่าโรคนี้เป็นโรคระบาดโรคหนึ่ง Zinneman และ Biberstein (1975) สรุปว่าเชื้อ *Haemophilus gallinarum* ที่แท้จริงควรเป็น *Haemophilus paragallinarum* เนื่องจากเชื้อทุกตัวมีคุณสมบัติที่ต้องการ "X-factor"

การระบาดของโรคหวัดติดคอในไก่มีอยู่ทั่วโลก (Yamamoto, 1972) สำหรับในประเทศไทย มีการระบาดที่สงสัยว่าน่าจะเป็นโรคนี้อยู่เสมอ แต่ไม่มีการศึกษาและพิสูจน์จากทางห้องปฏิบัติการ แล้วรายงานให้เป็นหลักฐาน ดังนั้น รายงานนี้จึงได้ทำการศึกษาหาเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* จากไก่ 5 ฟาร์ม ที่มีลักษณะป่วยคล้ายโรคหวัดติดคอระบาด คือมีอาการน้ำมูกไหล น้ำตาไหล จาม ทาบวม หน้ำบวม

อุปกรณ์และวิธีการ

ประวัติการเกิดโรค :

ตารางที่ 1 สรุปโรคหวัดติดคอในไก่ จากฟาร์มไก่ 5 ฟาร์ม

ข้อมูล	คลองเปรม	ปากช่อง	ฉะเชิงเทรา	ปราจีนบุรี	นครราชสีมา
	กทม.				
Size of flock	4,000	7,000	20,000	13,341	4,000
Morbidity (%)	10-20	66	5	40	50-60
Mortality (%)	1	-	2	-	1-2
Age (weeks)	6	75	30	29	4
Date	ธ.ค. 25	ก.พ. 26	ก.พ. 26	พ.ค. 26	มิ.ย. 26
Treatment	-	C*	C*	-	-

\* = Chloramphenical

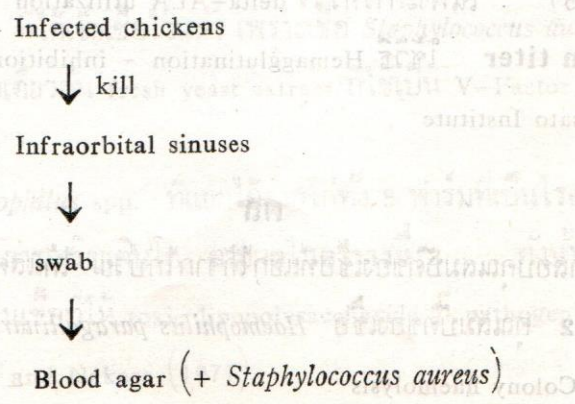


การแยกเชื้อ :

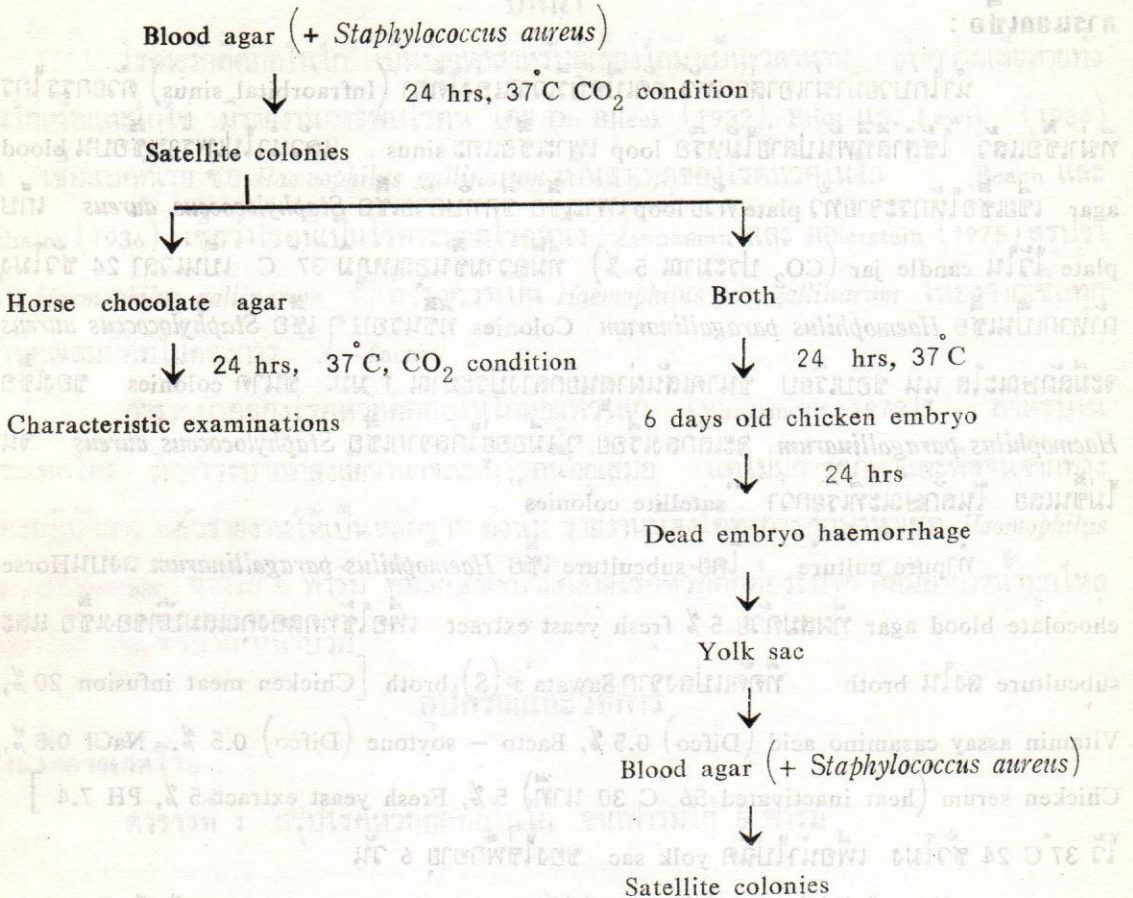
นำไก่ป่วยมาฆ่าเอาส่วนหัว ตัดเปิดบริเวณแอ่งใต้ตา (Infraorbital sinus) ด้วยกรรไกร  
 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้สำลีที่พันปลายไม้หรือ loop เพาะเชื้อและ sinus แล้วนำไปเพาะเชื้อบน blood  
 agar เชื้อเชื้อให้กระจายทั่ว plate ด้วย loop เพาะเชื้อ ซีดทับด้วยเชื้อ *Staphylococcus aureus* เก็บ  
 plate ไว้ใน candle jar (CO<sub>2</sub> ประมาณ 5 %) ที่มีความชื้นอุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง  
 ถ้าหากเป็นเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* Colonies ที่ขึ้นรอบๆ เชื้อ *Staphylococcus aureus*  
 จะมีลักษณะใส นูน ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มม. ขนาด colonies ของเชื้อ  
*Haemophilus paragallinarum* จะเล็กลงเรื่อย ๆ เมื่ออยู่ไกลจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* จน  
 ไม่ขึ้นเลย ในลักษณะที่เรียกว่า "satellite colonies"

ทำ pure culture โดย subculture เชื้อ *Haemophilus paragallinarum* ลงบน Horse  
 chocolate blood agar ที่ผสมด้วย 5 % fresh yeast extract เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ และ  
 subculture ลงใน broth ที่ดัดแปลงจาก Sawata's (S) broth [Chicken meat infusion 20%,  
 Vitamin assay casamino acid (Difco) 0.5 %, Bacto - soytone (Difco) 0.5 %, NaCl 0.5 %,   
 Chicken serum (heat inactivated 56° C 30 นาที) 5 %, Fresh yeast extract 5 %, PH 7.4 ]  
 ไว้ 37° C 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปฉีด yolk sac ของไข่ฟักอายุ 6 วัน

หลังจากฉีดไข่ฟัก 24 ชั่วโมง ไข่ฟักตาย นำ yolk sac มา culture อีกที่ บน blood  
 agar ซีดทับด้วย *Staphylococcus aureus* เพื่อตรวจหาเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* อีก  
 ครั้งเป็นการยืนยัน ดังวิธีการที่ได้สรุปไว้ข้างล่างนี้







**การทดสอบคุณสมบัติเพื่อ :**  
 เชื้อที่แยกได้นำไปทดสอบคุณสมบัติของเชื้อตามวิธีของ Carter (1979) และ Zinneman and Biberstein (1975) เฉพาะการตรวจ delta-ALA utilization ใช้วิธีของ Kilian (1974)  
 การตรวจหา Serum titer ใช้วิธี Hemagglutination - inhibition test โดยใช้ antigen ของบริษัท The Kitasato Institute  
 ผล  
 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อที่แยกได้จากไก่ป่วย ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2  
 ตารางที่ 2 คุณสมบัติของเชื้อ *Haemophilus paragallinarum*  
 Colony haemolysis



Morphology	gram negative rod
Catalase test	-
Nitrate reduced	+
Indole	-
CO <sub>2</sub> requirement	+
Growth improve by serum	+
X - Factor requirement	-
V - Factor requirement	+
delta - ALA utilization	+

เชื้อที่แยกได้จากไก่ป่วยทั้ง 5 ฟาร์ม เป็นเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* ส่วนการทดสอบ serum ไก่ด้วยวิธี HI test ในฟาร์มไก่คลองเปรมและฟาร์มไก่ปากช่อง ผลปรากฏว่าฟาร์มไก่คลองเปรมมี titer เท่ากับ 1 : 8 ถึง 1 : 16 สำหรับฟาร์มไก่ปากช่องได้ผลลบ ส่วนของฟาร์มไก่อื่น ๆ ไม่ได้ทำการตรวจ

### วิจารณ์และสรุป

การแยกเชื้อจากไก่ป่วยที่ infraorbital sinus เพราะเป็นบริเวณที่สามารถแยกเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* ได้มาก และการ contaminate จากเชื้ออื่นน้อย (Yamamoto, 1972) และการแยกเชื้อ *Haemophilus* spp. ที่ต้องการ V-Factor นั้น ใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ขีดทับลงบน blood agar ที่ได้เชื้อเชื้อไว้แล้ว เพราะเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นตัวที่สามารถให้ V-Factor ได้ ทำนองเดียวกัน fresh yeast extract ก็ใช้เป็น V-Factor ได้เช่นกัน (Carter, 1979)

เชื้อ *Haemophilus* spp. ที่แยกได้จากไก่ทั้ง 5 ฟาร์มที่เป็นโรคหวัดติดต่อกันนี้ ไม่ต้องการ X - Factor ในการเจริญเติบโต ตามผลในตารางที่ 2 ดังนั้น จึงเป็น *Haemophilus paragallinarum* และเป็นเชื้อที่ให้ toxic lipopolysaccharide ที่ pathogenic ต่อไข่ฟัก เช่นเดียวกับที่รายงานโดย Konno and Nakase (1977)



ไก่ที่เป็นโรคหวัดติดต่อกัน อัตรากาตายค่อนข้างต่ำ ดังผลในตารางที่ 1 แต่อาจมีโรคอื่นแทรกซ้อน เช่น fowl pox (Beach and Schalm, 1936), infectious bronchitis (Yoshimura et al., 1966) การสูญเสียส่วนใหญ่ของโรคหวัดติดต่อกันอยู่ที่ทำให้การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ ไก่ไข่ปริมาณไข่ลดลง การระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในฟาร์มที่มีการเลี้ยงดูอย่างแออัด การป้องกันทางหนึ่งขงโรคนี้ คือ ย้ายเลี้ยงไก่ให้แน่นจนเกินไป การใช้ยาในการป้องกันโรคในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงของอากาศ อาจช่วยได้บ้างในกรณีที่ไม่ค่อย

การใช้วัคซีนสำหรับป้องกันโรคหวัดติดต่อกันในไก่ ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ได้ผล แต่วัคซีนที่ใช้ต้องเป็นชนิดเดียวกันกับเชื้อที่ระบาด ทั้งนี้ เพราะเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* มี 3 serotypes (Page, 1962 ; Page et al., 1963 ; Rimler et al., 1977) แต่ละ serotype ให้ cross protective immunity ต่อกันน้อย หรือไม่ให้เลย (Rimler et al., 1977, Kume et al., 1978, 1980 a, b และ c)

จากการตรวจ HI titer ของฟาร์มคลองเปรมด้วย antigen ของบริษัท The Kitasato Institute ซึ่งเป็น serotype A, strain no. 221 ได้ผล positive 1 : 8 - 1 : 16 และแยกเชื้อได้ *Haemophilus paragallinarum* ได้ ดังนั้น การระบาดของโรคหวัดติดต่อกันในฟาร์มคลองเปรม น่าจะเกิดจากการติดเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* serotype A (Sawata et al., 1978)

ส่วน HI titer ของฟาร์มปากช่องได้ผลลบ แต่แยกเชื้อ *Haemophilus paragallinarum* ได้ นั่น อาจเป็นเพราะ เชื้อที่แยกได้ไม่ใช่ serotype A แต่เป็น serotype อื่น (Sawata et al., 1978) หรืออาจเนื่องจากเป็นระยะต้นของการติดเชื้อ จึงยังตรวจ HI titer ไม่พบ

อย่างไรก็ตามการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับ serotypes ของเชื้อตัวนี้ เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อจะได้นำมาพิจารณาประกอบกับการใช้วัคซีนโรคหวัดติดต่อกันให้มีความคุ้มกันอย่างเหมาะสม

### เอกสารอ้างอิง

- Beach, J. R. and O.W. Schalm. 1936. Studies of the clinical manifestations and transmissibility of infectious coryza of chicken. Poultry Sci 15 : 466-470.
- Carter, G.R. 1979. *Haemophilus*, In Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology.



- and Mycology, 3<sup>rd</sup> ed. Charles C. Thomas publisher, Springfield, Illinois, U.S.A. Chapter 13. 113-117
- De Bleeck, L. 1932. A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl. *Vet. J.* 88 : 9
- Eliot, C.P. and M.R. Lewis, 1934. A haemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in fowl. *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 37 : 878-888
- Kilian, M. 1974. A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. *Acta Path. Microbial Scand. Sect. B*, 82 : 835-842
- Konno, Y. and Y. Nakase, 1977. Purification of endotoxin of *Haemophilus gallinarum* and their biological activity. *Jpn. J. Bacterial* 32 : 212
- Kume, K., A. Sawata and Y. Nakase, 1978. *Haemophilus* infections in chickens. 1. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens affected with coryza. *Jpn. J. Vet. Sci* 40 : 65-73
- Kume, K., A. Sawata and Y. Nakase, 1980 a. Relationship between protective activity and antigen structure of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 and 2. *Am. J. Vet. Res.*, Vol 41 (1) 97-100
- Kume, K., A. Sawata and Y. Nakase, 1980 b. Immunologic relationship between Page's and Sawata's Serotype Strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.*, 41 (5) : 757-760
- Kume, K., A. Sawata and Y. Nakase, 1980 c. *Haemophilus* infectious in Chicken. 3. Immunogenicity of Serotype 1 and 2 strains of *Haemophilus paragallinarum* *Jpn. J. Vet. Sci.* 42 : 673-680.
- Page, LA. 1962. *Haemophilus* infections in chickens. 1. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 23 : 85-95



- Page, LA., A.S. Rosenwald and F. C. Price. 1963. *Haemophilus* infections in chickens. IV. Results of laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis. 19 : 318-322
- Rimler, R.B., R B. Davis, and R.K. Page, 1977. Infectious Coryza : cross protection studies, using seven strain of *Haemophilus gallinarum*. Am. J. Vet. Res., Vol. 38 (10) : 1587-1593
- Sawata, A., K. Kume and Y. Nakase. 1978. *Haemophilus* infections in chickens. 2. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chicken with Infectious coryza in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No 221. Jap. J. Vet. Sci. 40 : 645-652.
- Yamamoto, R. 1972. Infectious coryza. In Diseases of Poultry, Sixth edition, edited by M.S. Hofstad, B.W. Calnek, C.F. Helmboldt, W.M. Reid, H.W. Yoder, Jr. The Iowa State University Press, Ames. 272-281
- Yoshimura, S., Y.Odagiri, and Y. Tomo. 1966. Aetiological studies on the respiratory disease complex of chicken in Osaka prefecture and its neighborhood. J. Japan. Vet, Med. Ass. 19 : 111-115
- Zinneman, K., and G.L. Biberstein. 1975. *Haemophilus*. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>th</sup> ed. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons, editors, Williams and Wilkins, Baltimore, 364-370
- 
- Kume, K., A. Sawata and Y. Nakase. 1980. Immunogenicity of serotype O:12 strains of *Haemophilus paragallinarum*
- Page, L.A. 1962. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am. J. Vet. Res., 23 : 85-92