รายงานทางเทคนิค

การแยกเชื้อ avian reovirus จากไก่ป่วยในภาคใต้ของประเทศไทย

ช้องมาศ อันตรเสน[1] พรทิพย์ พรมเมือง[2] นฤพล พร้อมขุนทด[1] ลัดดา ตรงวงศา[3]
ไพรสน พรมเมือง[4] และ สมจิตร รุจิขวัญ[5]

Abstract

Antarasena, C.[1], Prommuang, P.[1], Promkuntod, P.[1], Trongwongsa, L.[2], Prommuang, P.[1], and Rujikwan, S.[2]

Isolation of avian reoviruses associated with diseases of chickens in southern Thailand

Songklanakarin J Sci Technol., 2002, 24(2) : 329-340

During 1994-1999, infectious agents associated with different disease conditions were investigated in three separate outbreaks of disease in southern Thailand. The first outbreak was in native chickens from Nakhon Si Thammarat province resulting in sudden death with liver and kidney congestions. The second was in 38-day-old broilers from Krabi province. The lame birds showed signs of depression and bilateral hock joints swelling. The last case was in 19-week-old laying chickens from Phang-nga province manifested by depression, paleness and greenish-diarrhea. The causative agents were isolated in embryonating chicken eggs

---

[1]Southern Veterinary Research and Diagnostic Center, Thung Song, Nakhon Si Thammarat 80110 [2]National Institute of Animal Health, Kasetklang, Bang Khen, Bangkok 10900 Thailand.

---

[1]สพ.บ. [2]วท.บ. (ชีววิทยา) [4]วท.บ. (สัตวศาสตร์) ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110
[3]สพ.บ. [5]ปกศ. พนักงานวิทยาศาสตร์การแพทย์ สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง บางเขน กรุงเทพฯ 10900
Corresponding e-mail : a_chongmas@yahoo.com
รับต้นฉบับ 29 สิงหาคม 2544 รับลงพิมพ์ 7 มกราคม 2545

and chick embryo liver (CELi) cells. A characteristic cytopathic effect (CPE) of multinucleated syncytial cells and progressive detachment of cells from the monolayer into culture fluid was apparent in the first passage in CELi cells within 24 hours postinoculation (PI). The isolates were adapted to replicate in Vero cells and the CPE characterized by focal areas of cell fusion occurred 48 hours PI. The indirect fluorescent antibody test demonstrated viral antigens characterized by granular fluorescent masses in the cytoplasm of large multinucleated syncytial cells in both cell types. Cross-virus neutralization test revealed an antigenic relationship between the three separate isolates and avian reovirus strain S1133. Transmission electron microscopic study of 3 agents showed the nonenveloped, icosahedral particles, 60-80 nm in diameter with a double-capsid shell and it formed crystalline arrays in the cytoplasm of infected Vero cells. The viruses designated NK 917/37, Kb 538/40 and Pn 1212/42 were classified in the family Reoviridae. Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* were also recovered from the lame bird of the second outbreak and considered as a secondary invader. These findings confirmed a variety of clinical signs caused by avian reovirus infection in three species of chicken in southern Thailand.

Key words : chicken, avian reovirus, CELi cells, indirect fluorescent antibody test, southern Thailand

บทคัดย่อ

ช้องมาศ อันตรเสน พรทิพย์ พรมเมือง นฤพล พร้อมขุนทด ลัดดา ตรงวงศา ไพรสน พรมเมือง และ สมจิตร รุจิขวัญ

การแยกเชื้อ avian reovirus จากไก่ป่วยในภาคใต้ของประเทศไทย

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(2) : 329-340

ศึกษาการแยกเชื้อ avian reovirus จากไก่ป่วยที่ส่งมาชันสูตรที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ในระหว่างปี พ.ศ. 2537-2542 จำนวน 3 รายจาก 3 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย ไก่ป่วยรายที่ 1 เป็นไก่พื้นเมืองไม่ทราบอายุ จากจังหวัดนครศรีธรรมราช แสดงอาการตายกระทันหัน ตรวจพบรอยโรคที่ตับและไตมีเลือดคั่ง ไก่ป่วยรายที่ 2 เป็นไก่กระทงอายุ 38 วัน จากจังหวัดกระบี่ แสดงอาการข้อขาส่วน hock joint บวมทั้งสองข้าง ส่วนรายสุดท้ายเป็นไก่ไข่อายุ 19 สัปดาห์จากจังหวัดพังงา แสดงอาการซึม หน้าซีด อุจจาระเหลวสีเขียว ทำการแยกเชื้อไวรัสจากอวัยวะภายในและอุจจาระของไก่ป่วยทั้ง 3 รายโดยใช้ไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยงจากตับเอ็มบริโอไก่ ตรวจพบพยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) เป็นแบบ syncytium formation ใน passage แรก ภายใน 24 ชั่วโมง หลังหยอดเชื้อ ในไก่ป่วยทุกราย เชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถเพิ่มจำนวนใน Vero cells ให้ CPE แบบ syncytium formation โดยพบกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่บน monolayer ตรวจยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect fluorescent antibody test พบการเรืองแสงใน cytoplasm ของ multinucleated syncytial cells ทั้งสองชนิด เชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ป่วยทั้ง 3 รายนิวทราไลซ์อิมมูนซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อ avian reovirus อ้างอิงสเตรน S1133 จากการนำ infected Vero cells ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบอนุภาคไวรัสในกลุ่ม Reoviridae ใน cytoplasm ของเซลล์มีรูปร่าง icosahedral ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80 nm. และมี capsid 2 ชั้น เรียกเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไก่ป่วยรายที่ 1, 2 และ 3 ว่า เชื้อ NK917/37, Kb538/40 และ Pn1212/42 ตามลำดับ จากการแยกเชื้อแบคทีเรีย พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ชนิดที่ให้ผลบวกกับ coagulase เป็นเชื้อแทรกซ้อนในไก่ป่วยรายที่สอง รายงานนี้ยืนยันการเกิดโรครีโอไวรัสในไก่ในภาคใต้ของประเทศไทย

เชื้อ avian reovirus (ARV) ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีกหลายชนิด ได้แก่ ไก่ ไก่งวง เป็ด ห่าน และนกหลายพันธุ์ เช่น นกในสกุล psittacine (McNulty, 1993; Rosenberger and Olson,1997 ; Conzo *et al*., 2001)

เชื้อนี้เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคข้อและเยื่อบุข้ออักเสบในไก่ (viral arthritis/tenosynovitis) (Glass *et al*., 1973 ; van der Heide, 1977 ; Rosenberger and Olson, 1997) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดกลุ่มอาการของโรคในหลายระบบของร่างกาย ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร (Dutta and Pomeroy , 1967 ; Lenz *et al*.,1998) ทางเดินหายใจ (McNulty,1993 ; Rosenberger and Olson,1997) เป็นสาเหตุการตายเฉียบพลันในลูกไก่กระทง (Bagust and Westbury, 1975) และพบเป็นสาเหตุหรือสาเหตุร่วมของภาวะการดูดซึมอาหารผิดปกติและกระดูกพรุนในไก่กระทง (runting, malabsorption and osteoporosis) (van der Heide *et al*., 1981 ; Rosenberger *et al*., 1998)

เชื้อ ARV เป็น double-stranded RNA virus ในกลุ่ม Reoviridae อนุภาคไวรัสประกอบด้วย core อยู่ตรงกลางและมี capsid 2 ชั้น (double capsid shell) ไม่มี envelope มีรูปร่างแบบ icosahedral มีขนาด 60-80 nm. (Nibert *et al*., 1996 ; Rosenberger and Olson, 1997) เชื้อนี้ทนต่อความร้อนเช่นที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C ได้นาน 8-10 ชั่วโมง และที่ 56 ^{o}C นาน 22-24 ชั่วโมง ตัวเชื้อยังมีความทนทานต่อสารเคมีพวก lipid solvent เช่น อีเธอร์ และคลอโรฟอร์ม และที่ pH 3 แต่เชื้อจะถูกทำลายด้วยเอทธานอลความเข้มข้น 70% และสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 0.5% (Rosenberger and Olson,1997) เชื้อ ARV ไม่มีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงของไก่ ไก่งวง เป็ด โค หนู และเลือดมนุษย์กลุ่มโอเกาะกลุ่มกัน (Robertson and Wilcox, 1986) พบเชื้อนี้ในหลายประเทศที่มีการเลี้ยงไก่และไก่งวง ทั้งในทวีปยุโรป เอเชีย อเมริกา และออสเตรเลีย นอกจากแยกเชื้อ ARV ได้จากไก่ป่วยในหลายกลุ่มอาการแล้ว ยังพบเชื้อในไก่ป่วยแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) และในอุจจาระไก่ปกติอีกด้วย (Rosenberger and Olson, 1997) ในการแยกเชื้อ ARV สามารถเพาะแยกเชื้อได้จากต่อมเบอร์ซ่า ตับ และลำไส้เล็กของไก่ป่วย (Jones *et al*., 1989; Czekaj *et al*.,1999) นอกจากนี้อาจแยกได้จากม้าม ไต หลอดลม และอุจจาระของไก่ป่วย ส่วนในรายที่แสดงอาการข้ออักเสบ สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากของเหลวภายในข้อ เส้นเอ็น และเยื่อบุข้อ (McNulty, 1993; Rosenberger *et al*., 1998) โดยทำการเพาะแยกเชื้อในไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยงที่เตรียมจากไตไก่หรือตับของเอ็มบริโอไข่ไก่ฟัก (Guneratne *et al*., 1982; McNulty, 1993; Rosenberger *et al*., 1998) Wood *et al*. (1980) จำแนกเชื้อ ARV ที่แยกได้จากไก่ในประเทศสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร เยอรมนีและญี่ปุ่น โดยวิธีนิวทราไลเซชั่นเทสต์พบว่ามีอย่างน้อย 11 ซีโรไทป์ Conzo *et al*., (2001) ศึกษาเชื้อ ARV ที่แยกได้จากนกแก้ว 2 สายพันธุ์ ที่ประเทศอิตาลี พบว่ามี antigenicity แตกต่างกับเชื้อ ARV ที่แยกได้จากไก่ อาการและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับอายุและความไวของสัตว์ป่วย ความรุนแรงของเชื้อไวรัสและทางที่เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย (Montgomery *et al*., 1985 ; Rosenberger and Olson, 1997) ในประเทศไทย จิโรจและราตรี (2531) ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ ARV โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ไก่กระทง ไก่ไข่และไก่กระทงซึ่งมีประวัติไก่ขาพิการ กระดูกพรุน มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและไม่สม่ำเสมอ หรือไม่มีประวัติการแสดงอาการดังกล่าว โดยพบอัตราการติดเชื้อตั้งแต่ 10-85% ส่วนในภาคใต้ของประเทศไทย ช้องมาศ และคณะ (2544) รายงานการแยกเชื้อ Avian reovirus จากเยื่อบุข้อส่วน hock joint ร่วมกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไก่กระทงที่แสดงอาการข้ออักเสบ โดยทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักและเซลล์ตับของเอ็มบริโอ

รายงานนี้กล่าวถึงลักษณะของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อ ARV ที่พบในไก่ใน 3 จังหวัดภาคใต้ของประเทศไทย รวมทั้งการแยกเชื้อและพิสูจน์เชื้อในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคในท้องที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ประวัติสัตว์ป่วย

ทำการศึกษาไก่ป่วย 3 ราย จาก 3 จังหวัดภาคใต้ที่ส่งมาชันสูตรหาสาเหตุของโรคที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ในระหว่างปี พ.ศ. 2537-2542 ไก่ป่วยแสดงอาการแตกต่างกันดังนี้ ไก่ป่วยรายที่ 1 ส่งตรวจในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2537 เป็นไก่พันธุ์พื้นเมืองไม่ระบุอายุจากจังหวัดนครศรีธรรมราช ไม่เคยทำวัคซีนป้องกันโรคใดๆ ไก่ป่วยตายกระทันหัน มีอัตราการป่วยและตาย 8/30 (26.67%) รายที่ 2 ส่งตรวจในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2540 เป็นไก่กระทงอายุ 38 วัน จากจังหวัดกระบี่ ไก่ป่วยแสดง

อาการ ข้อขาส่วน hock joint อักเสบบวมทั้ง 2 ข้าง เดินไม่ได้และนั่งบนข้อขา ไม่ระบุอัตราการป่วยและตาย ส่วนรายสุดท้ายส่งตรวจในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2542 เป็นไก่ไข่อายุ 19 สัปดาห์ จากจังหวัดพังงา ไก่ป่วยแสดงอาการซึม ถ่ายเหลวสีเขียว ผอม ไม่กินอาหาร มีอัตราการป่วยและตาย 16/1850 (0.85%)

อุปกรณ์และวิธีการ

ไก่ทดลองและไข่ไก่ฟัก

ได้จากพ่อ-แม่ไก่พันธุ์ไวท์เลคฮอร์นที่เลี้ยงในโรงเรือนสัตว์ทดลองของศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ ไม่เคยทำวัคซีนป้องกันโรคทุกชนิด นำมาฟักในตู้ฟักอุณหภูมิ 37 ºC ใช้ฉีดเพื่อแยกเชื้อไวรัสเมื่ออายุ 10-11 วัน และใช้เตรียม chick embryo liver (CELi) cells เมื่ออายุ 14 วัน อีกส่วนฟักเป็นตัวและเลี้ยงจนถึงอายุ 1 เดือนเพื่อใช้เตรียมไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มต่อเชื้อ ARV สเตรน S1133 เพื่อใช้ในการทดสอบ cross-neutralization test

เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ที่ใช้ในการแยกเชื้อไวรัสมี 2 ชนิด คือ

1. Chick embryo liver (CELi) cells ทำการเตรียมเซลล์ตามวิธีการของ ช้องมาศ และคณะ (2536) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (MEM) มี tryptose phosphate broth 0.3%, fetal calf serum 10%, เพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ยูนิตและ 100 มก./มล. ตามลำดับและ $NaHCO_3$ 1.125 มก./มล. เลี้ยงใน 6-well tissue culture plate มี coverglass อยู่ภายในตู้อบ (5% CO_2, 90% humidity, 37 ºC) นำมาใช้แยกเชื้อเมื่อเซลล์มีอายุ 3 วัน

2. Vero cell line (African green monkey kidney cells) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบเหมือน CELi cells แต่มี L-glutamine 0.03% เป็นส่วนประกอบร่วม เลี้ยงใน 6-well tissue culture plate อบในตู้อบ (5% CO_2, 90% humidity, 37 ºC) นำมาใช้แยกเชื้อเมื่อเซลล์มีอายุ 1 วัน

อิมมูนซีรั่มและคอนจูเกตโกลบุลิน

แอนติซีรั่มไก่จำเพาะต่อเชื้อ ARV สเตรน S1133 และ rabbit anti-chick IgG FITC (Sigma®) เพื่อใช้พิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี indirect fluorescent antibody (IFA) test

เชื้อไวรัส

เชื้อ ARV สเตรน S1133 เป็นเชื้อไวรัสอ้างอิง เชื้อนี้เพาะเลี้ยงใน chicken kidney (CK) cells มาแล้ว 15 ครั้ง จาก Veterinary Research Institute (VRI) ประเทศมาเลเซีย นำมาเพาะเลี้ยงใน Vero cells ที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้อีก 7 ครั้ง จึงนำมาใช้เป็นอิมมูโนเจนหยอดไก่ทดลองเพื่อเตรียมไฮเปอร์อิมมูนซีรั่ม

การเตรียมไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133

หยอดเชื้อ ARV สเตรน S1133 เข้าปากและตาไก่ทดลอง ตัวละ 0.5 มล. หลังจากนั้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ฉีดเชื้อไวรัสชนิดเดียวกันเข้ากระแสเลือดไก่ทดลอง ตัวละ 1 มล. ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อครั้งสุดท้าย ฆ่าไก่ทดลองเก็บอิมมูนซีรั่มที่ได้ ที่ -20 ºC และนำมาอุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56 ºC นาน 30 นาที ก่อนใช้ทดสอบ cross-neutralization test

การผ่าซากและการเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อ

ทำการผ่าซากไก่ป่วยแต่ละรายๆ ละ 2 ตัว พบรอยโรคดังนี้ คือ ไก่ป่วยรายที่ 1 พบตับและไตมีเลือดคั่ง (congestion) ลำไส้บวม (swollen) และมีเลือดคั่ง ถุงลมอักเสบ (airsacculitis) มีลักษณะขุ่นมัว ไก่ป่วยรายที่ 2 พบหนองในข้อส่วน hock joint เยื่อบุข้ออักเสบ (synovitis) อวัยวะภายในพบตับ ม้าม ไต และต่อมเบอร์ซ่าบวมและมีเลือดคั่ง ที่ปอดพบเลือดคั่ง ไก่ป่วยรายที่ 3 ตรวจพบตับมีขนาดใหญ่และมีเลือดคั่ง ไตมีเลือดคั่ง ทำการเก็บอวัยวะภายในไก่ป่วยทุกราย ได้แก่ หลอดลม ม้าม ไต และลำไส้ส่วนปลาย ในรายที่ 2 เก็บเยื่อบุข้อและของเหลวภายในร่วมด้วย นำมาบดแยก ทำเป็น 10% organ suspension ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ปั่นแยกน้ำใสส่วนบน (supernatant) ออก นำมากรองผ่านกระดาษกรอง

ขนาด 0.45 μm เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะใช้แยกเชื้อไวรัส ส่วนการแยกเชื้อแบคทีเรีย เก็บอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ไต และในไก่ป่วยรายที่ 2 ใช้สำลีป้ายเชื้อจากของเหลวในข้อขา

การตรวจทางไวรัสวิทยา

1. การแยกเชื้อไวรัส (Virus isolation)

ทำการแยกเชื้อไวรัสดังวิธีการต่อไปนี้

1.1 การแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก

นำตัวอย่างที่เตรียมขึ้น ฉีดเข้า allantoic cavity (AC) ของไข่ไก่ฟักอายุ 10-11 วัน ปริมาณ 0.2 มล./ฟอง ตัวอย่างละ 7 ฟอง ตรวจการเปลี่ยนแปลงของเอ็มบริโอ และ chorioallantoic membrane (CAM) ไข่ฟักที่ตายหลังฉีดเชื้อ 48 ชั่วโมง นำ allantoic fluid ทดสอบหาเชื้อนิวคาสเซิลไวรัส (NDV) โดยวิธี haemagglutination (HA) test กับ 0.5% เม็ดเลือดแดงไก่ เก็บเอ็มบริโอ, CAM และ allantoic fluid บดรวมกันปั่นแยกน้ำใสออก ฉีดเข้า AC ไข่ไก่ฟักชุดใหม่ ทำต่ออีก 2 passages เก็บเชื้อไวรัสที่แยกได้ใน passage ที่ 3 ที่ -80 °C เพื่อใช้แยกเชื้อใน CELi cells

1.2 การแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง

1.2.1 การแยกเชื้อใน CELi cells

นำตัวอย่างเชื้อไวรัสที่แยกได้จากไข่ไก่ฟัก ใน passage ที่ 3 เพาะเชื้อใน CELi cells หลุมละ 0.2 มล. ตัวอย่างละ 3 หลุม อบในตู้อบ (5% CO_2, 90% humidity, 37 °C) นาน 1 ชั่วโมง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fetal calf serum 1% อบต่อในตู้อบ ตรวจพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวันนาน 7 วัน เมื่อตรวจพบ CPE ประมาณ 50-80% เก็บ culture fluid โดย freeze and thaw 1 ครั้ง นำมาเพาะเลี้ยงต่อใน CELi cells ชุดใหม่อีก 2-6 ครั้ง ก่อนเพาะเลี้ยงใน Vero cells นำ culture fluid อีกส่วนมาทดสอบการเกาะกลุ่มกัน (Haemagglutination) กับเม็ดเลือดแดงของ ไก่ ม้า วัว แกะ กระต่าย และหนูขาว ที่มีความเข้มข้น 0.5%

1.2.2 การแยกเชื้อใน Vero cells

นำ culture fluid ที่เพาะเลี้ยงใน CELi cells 3-7 ครั้ง เพาะเลี้ยงใน Vero cells อายุ 1 วัน วิธีการเหมือนการแยกเชื้อใน CELi cells ตรวจ CPE ทุกวัน เมื่อตรวจพบ CPE ประมาณ 80% นำเซลล์ไป freeze and thaw 1 ครั้ง แล้วนำ culture fluid ไปเพาะเชื้อใน Vero cells ชุดใหม่ ทำ serial passage ใน Vero cells อีก 6 ครั้ง ครั้งสุดท้ายเก็บเชื้อไวรัสไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

2. การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ (Immunofluorescent test)

ทำการตรวจยืนยันการติดเชื้อ ARV ใน infected CELi cells และ Vero cells หลังเพาะเลี้ยงเชื้อท้องที่ไวรัสที่แยกได้ใน CELi cells 2 ครั้ง และ Vero cells 1 ครั้ง เมื่อตรวจพบ CPE นำเซลล์ที่เลี้ยงบน coverglass ภายหลังหยอดเชื้อใน CELi cells 24 ชั่วโมง และ Vero cells 48 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แช่ใน acetone 10 นาที เพื่อ fix เซลล์ จากนั้นนำ coverglass มาตรวจโดยวิธี indirect FA test โดยย้อมตัวอย่างด้วยแอนติซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อ ARV สเตรน S1133 และ rabbit anti-chick IgG FITC ตามวิธีการของ Kawamura(1977) ตรวจด้วยกล้องฟลูออเรสเซนท์

การทำ Cross - neutralization test

ใช้วิธี alpha neutralization test ตามวิธีการของ Thayer และ Beard (1998) โดยนำเชื้อท้องที่ไวรัสที่แยกได้ทั้ง 3 การระบาดของโรค และเชื้อ ARV สเตรน S1133 ที่เพาะเลี้ยงใน Vero cells มาแล้ว 7-8 ครั้ง ทดสอบ cross-neutralization test กับไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อ ARV สเตรน S1133 ที่เจือจาง 5 เท่า ในวันที่ 8 อ่านผลการเกิด neutralization test ของเชื้อไวรัสทั้ง 4 สเตรน นำมาคำนวณหาค่า neutralizing index (NI)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (Light and transmission electron microscopy)

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง นำ infected CELi cells และ infected Vero cells ที่เลี้ยงบน coverglass และ inoculate เชื้อท้องที่ที่แยกได้ทั้ง 3 การระบาด เมื่อตรวจพบการเกิด CPE ประมาณ 50-80% ล้าง coverglass ด้วย PBS 1 ครั้ง แช่ในเมทธานอลนาน 5 นาที นำมาย้อมสี Giemsa นาน 10 นาที แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (TEM) เตรียมตัวอย่าง infected Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสท้องที่แต่ละสเตรนใน passage ที่ 6-7 เพาะเลี้ยงนานประมาณ 18 ชั่วโมง ตรวจพบการเกิด CPE 50% ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer (pH7.4) 3 ครั้ง ขูดผิว monolayer นำเซลล์มาปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที fix ตะกอนเซลล์ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4 °C ตามลำดับ ผ่านกระบวนการ ดึงน้ำออก (dehydration) ด้วย alcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อค ตัดตัวอย่างให้ได้ขนาด 700°A ย้อมสีด้วย uranyl acetate และ lead citrate ศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสแต่ละสเตรนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (JEOL model TEM-1200)

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด, ตับ, หัวใจ และไตไก่ป่วยทุกราย และสำลีป้ายเชื้อจากของเหลวภายในข้อขาไก่ป่วยรายที่ 2 เพาะแยกเชื้อบน blood agar และ MacConkey agar อบที่ 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง ตรวจการเจริญของแบคทีเรีย หากพบโคโลนีเกิดขึ้น นำมาย้อมสีแกรม และทดสอบทางชีวเคมีโดยดัดแปลงตามวิธีการของ Carter และ Cole (1990) และ Barrow และ Feltham (1995) และนำเชื้อที่แยกได้ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพโดยวิธี agar disc diffusion test ตามมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standard (1997)

ผล

ผลการตรวจทางไวรัสวิทยา

จากการฉีดตัวอย่างที่ได้จากไก่ป่วยทั้ง 3 ราย เข้า AC ไข่ไก่ฟัก เพื่อแยกเชื้อไวรัสพบว่า เอ็มบริโอของไข่ไก่ฟักที่ฉีดตัวอย่างตายใน passage แรก ในวันที่ 3-5 จำนวน 1-3 ฟอง ส่วนไข่ไก่ฟักที่ฉีดตัวอย่างเยื่อบุข้อและของเหลวภายในตายใน passage ที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3-5 หลังฉีด จำนวน 3-4 ฟอง ตรวจพบเอ็มบริโอแคระแกร็น ลำตัวมีสีแดง ตับและม้ามมีขนาดใหญ่ ตรวจพบหย่อมเนื้อตายสีเหลืองที่ผิวตับ CAM หนาตัวและมีจุดเนื้อตายสีขาวขนาดปลายเข็มหมุดกระจายบน CAM ส่วนไข่ไก่ฟักที่ฆ่าในวันที่ 7 ตรวจพบเอ็มบริโอมีขนาดเล็กกว่าปกติ ตับและม้ามมีขนาดใหญ่ พบหย่อมเนื้อตายที่ผิวตับ จากการตรวจ allantoic fluid โดยวิธี HA test ไม่พบเชื้อ NDV

เมื่อนำตัวอย่างเอ็มบริโอไข่ไก่ฟักที่ตายใน passage ที่ 3 ของเชื้อท้องที่ไวรัสแต่ละสเตรน เพาะเชื้อใน CELi cells ตรวจพบ CPE เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงใน passage แรก ทั้ง 3 สเตรน เป็นแบบ syncytium formation กล่าวคือผนังเซลล์เกิดการรวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่มีลักษณะ multinucleated giant cells (Figure 1) ซึ่งต่อมาจะหลุดออก พบ giant cells ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อไวรัสที่แยกได้ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของไก่ ม้า วัว แกะ กระต่าย และหนูขาว เกาะกลุ่มกัน

นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อไวรัสที่แยกได้ เพาะเลี้ยงใน Vero cells ตรวจพบ CPE ทั้ง 3 สเตรน ภายใน 48 ชั่วโมงหลังหยอดเชื้อ เป็นแบบ syncytium formation โดยผนังเซลล์เกิดการรวมตัวกัน ตรวจพบกลุ่มเซลล์ขนาดใหญ่บน monolayer เมื่อทำ serial passage ใน Vero cells CPE จะเกิดอย่างรวดเร็วโดยตรวจพบภายใน 24 ชั่วโมง syncytial cells มีขนาดใหญ่ ประกอบด้วยนิวเคลียสจำนวนมากอยู่ตรงกลาง (Figure 2) เรียกเชื้อท้องที่ไวรัสที่แยกได้จากไก่ป่วยรายที่ 1, 2 และ 3 ว่า NK 917/37, Kb 538/40 และ Pn 1212/42 ตามลำดับ

เมื่อทำการพิสูจน์เชื้อไวรัสที่แยกได้โดยวิธี indirect FA test ตรวจพบการเรืองแสงของเชื้อ ARV ใน cytoplasm ของเซลล์ที่เกิดการรวมตัวกัน ทั้ง CELi cells และ Vero cells โดยพบการเรืองแสงของกลุ่มอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นเม็ดมีขนาดแตกต่างกัน (granular fluorescent masses) กระจายใน cytoplasm ของเซลล์ที่รวมตัวกัน (Figure 3)

จากการพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี cross-neutralization กับไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อไวรัสอ้างอิง ARV สเตรน S1133 พบว่าเชื้อท้องที่ทั้ง 3 สเตรนสามารถนิวทราไลซ์อิมมูนซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อ ARV สเตรน S1133 โดยมีค่า NI เท่ากับ 1.75 ในรายที่ 1, 2.0 และ 2.75 ในรายที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วน homologous antiserum มีค่า NI เท่ากับ 2.5

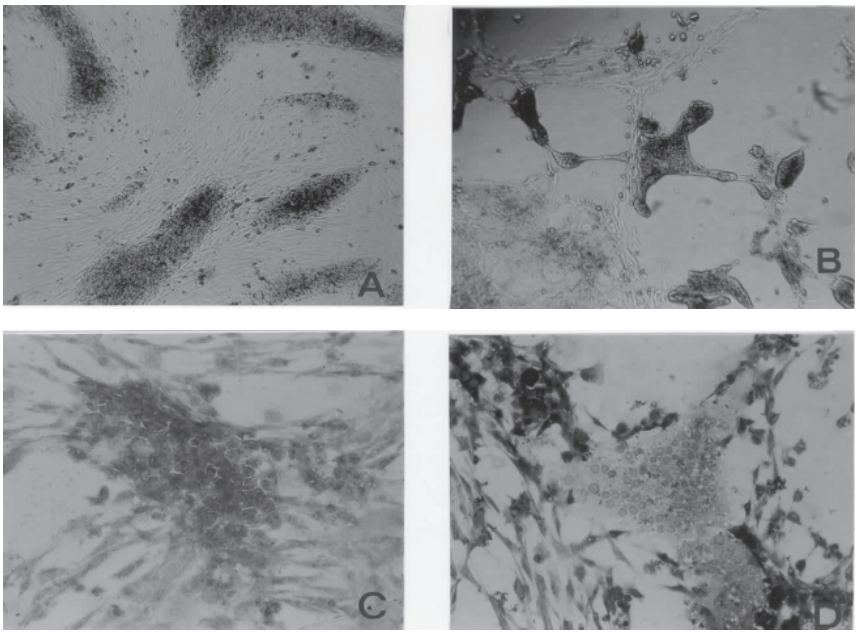

Figure 1. Syncytium formation induced by avian reovirus field isolate in chick embryo liver (CELi) cells at 24 hrs. postinoculation (PI). (A and C) uninfected cells ; (B and D) ARV-infected cells.(bottom row) Cells were fixed with methanol and stained with Giemsa.

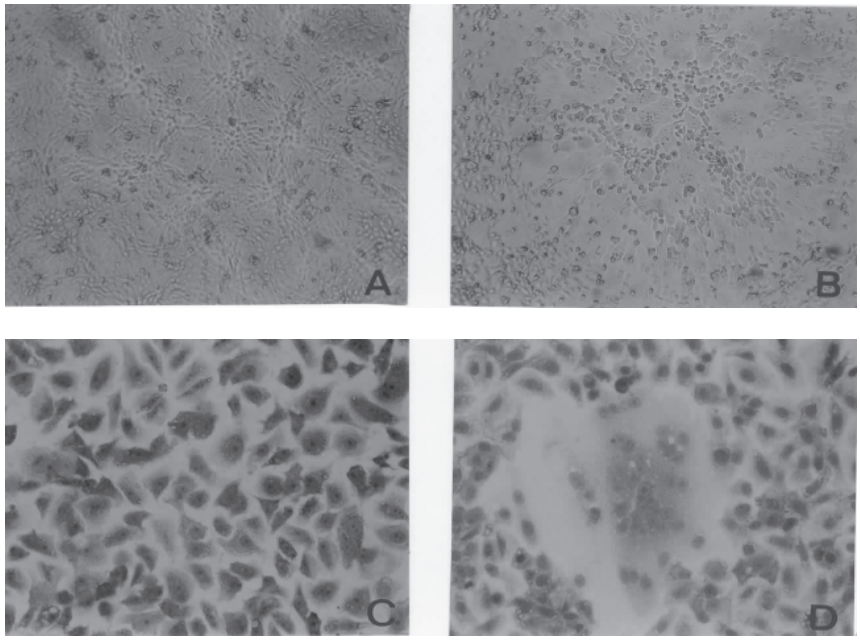

Figure 2. Focal areas of cell fusion induced by the adapted avian reovirus in Vero cells at 48 hrs.PI. (A and C) uninfected cultures ; (B and D) ARV-infected cultures. (bottom row) Cells were fixed with methanol and stained with Giemsa.

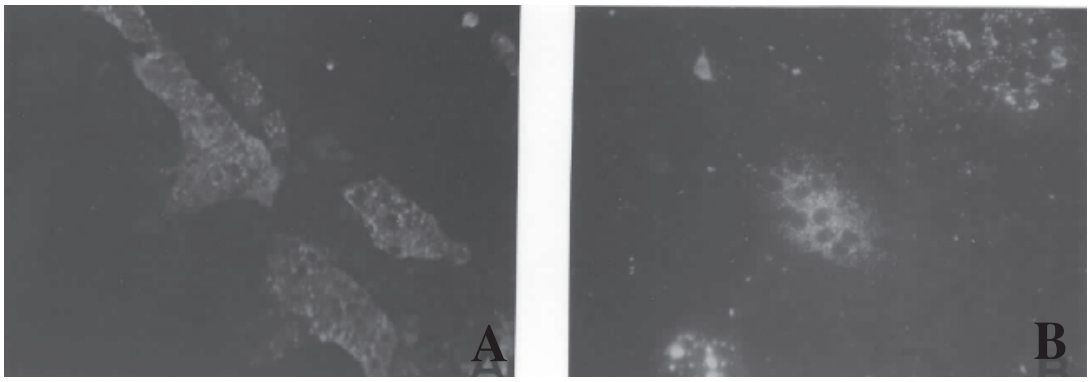

Figure 3. Intracytoplasmic fluorescence of chick embryo liver cells (A) and Vero cells (B). Indirect fluorescent antibody staining.

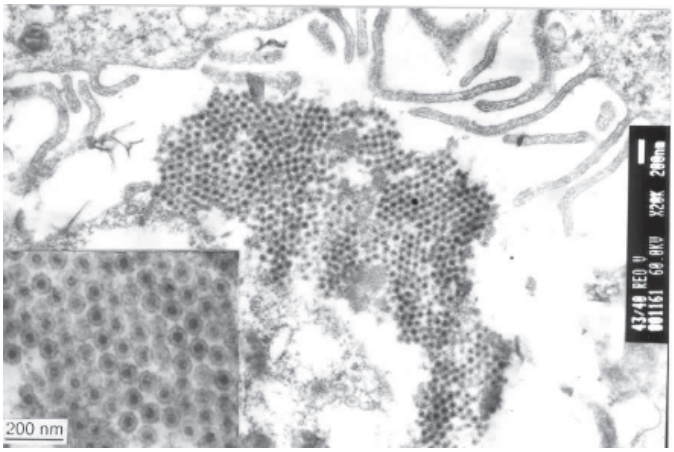

Figure 4. Transmission electron micrograph of ARV-infected Vero cells that had a large cytoplasmic inclusions. The inclusions comprises crystalline arrays of icosahedral particles with central electron dense cores and double-capsid shell. The inset shows arrays of virions at higher magnification.

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการนำ infected Vero cells ที่เพาะแยกเชื้อท้องที่ไวรัสแต่ละสเตรน ศึกษารูปร่างและลักษณะของอนุภาคไวรัส ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบกลุ่มอนุภาคไวรัสเรียงเป็นแถว (crystalline arrays) อยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ เชื้อไวรัสมีรูปร่างแบบ icosahedral มี core อยู่ตรงกลางขนาด 30-40 nm. เป็น electron dense และมี capsid 2 ชั้น (double-capsid shell) ไม่มี envelope อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80 nm. (Figure 4)

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการนำตัวอย่างปอด หัวใจ ตับ และไตไก่ป่วยทุกราย และของเหลวภายในข้อขาไก่ป่วยรายที่ 2 เพาะแยกเชื้อบน blood agar และ MacConkey agar ให้ผลดังนี้ ในไก่ป่วยรายที่ 1 และ 3 ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non-pathogenic bacteria) ส่วนไก่ป่วย

รายที่ 2 ตรวจพบแบคทีเรียมีโคโลนีลักษณะกลมนูนสีเหลืองทองมี hemolysis แบบ double zone บน blood agar และไม่เจริญบน MacConkey agar มีรูปร่างกลมและติดสีแกรมบวก เมื่อทดสอบทางชีวเคมี เชื้อที่แยกได้ให้ผลบวกกับการทดสอบ Coagulase, DNase, Mannitol และ Maltose แสดงว่าเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Carter and Cole, 1990; Barrow and Feltham, 1995) โดยแยกได้จากทุกอวัยวะที่เพาะแยกเชื้อ

จากการนำเชื้อ *Staph. aureus* มาทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่าเชื้อมีความไว (sensitive) ต่อยา Bacitracin, Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamycin, Kanamycin, Novobiocin, Polymycin B และ Sulphamethazone+Trimethoprim และเชื้อดื้อ (resistant) ต่อยา Ampicillin, Cloxacillin, Erythromycin, Lincomycin, Neomycin, Norfloxacin, Oxytetracycline, Penicillin G และ Streptomycin

วิจารณ์

จากการวินิจฉัยไก่ป่วยทั้ง 3 รายที่ส่งตรวจจาก 3 จังหวัดภาคใต้ โดยการแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยง, พิสูจน์เชื้อที่แยกได้โดยวิธี indirect FA test และศึกษารูปร่างของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน แสดงว่าเชื้อท้องที่ไวรัสที่แยกได้ทั้ง 3 สเตรนเป็นเชื้อ ARV ทั้งนี้ไก่ป่วยทั้ง 3 รายแสดงอาการแตกต่างกัน รายแรกเป็นไก่พื้นเมืองจากจังหวัดนครศรีธรรมราช แสดงอาการตายกระทันหัน ตรวจพบรอยโรคที่ตับและไตมีเลือดคั่ง อาการของไก่ป่วยในลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับรายงานการเกิดโรคที่ประเทศออสเตรเลียโดย Bagust and Westbury (1975) พบเป็นในไก่อายุ 14-38 วัน แสดงอาการตายกระทันหัน ตรวจพบรอยโรคที่ตับและไตอักเสบเช่นเดียวกัน ส่วนไก่ป่วยรายที่ 2 เป็นไก่กระทงจากจังหวัดกระบี่ แสดงอาการข้อและเยื่อบุข้ออักเสบ นอกจากตรวจพบเชื้อ ARV แล้ว ยังพบการติดเชื้อ *Staph. aureus* ร่วมด้วยโดยพบในทุกอวัยวะที่ทำการแยกเชื้อ แสดงถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด (Bacteraemia) เชื้อ ARV เป็นสาเหตุสำคัญของโรคข้อและเยื่อบุข้ออักเสบในไก่ (Glass *et al*., 1973; Robertson and Wilcox, 1986; Rosenberger and Olson, 1997) แต่มักพบเชื้ออื่นๆ แทรกซ้อน โดยเฉพาะเชื้อ *Staph. aureus* นั้นพบได้บ่อยครั้ง (MacKenzie and Bains, 1976; Kibenge *et al*.,1982; Sharifah *et al*., 1989) ทำให้โรครุนแรงขึ้น การควบคุมเชื้อ *Staph. aureus* ในฝูงโดยการทดสอบความไวของยาต้านจุลชีพจะทำให้เลือกชนิดของยาได้ถูกต้อง การใช้ Novobiocin ขนาด 200-350 กรัมต่ออาหาร 1 ตันจะให้ผลดีในการรักษาการติดเชื้อนี้ในฝูง (Tanner, 1994) ไก่ป่วยรายสุดท้ายเป็นไก่ไข่แสดงอาการถ่ายเหลวเป็นน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lenz และคณะ (1998) ที่ตรวจพบไก่กระทงติดเชื้อ ARV แสดงอาการลำไส้อักเสบ ถ่ายเหลวที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ไก่ป่วยรายแรกและรายสุดท้ายตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิด ที่ก่อให้เกิดโรค ทำให้เชื่อว่าเชื้อ ARV เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคทั้ง 2 ราย

จากการศึกษาไก่ป่วยทั้ง 3 ราย ซึ่งแสดงอาการต่างกันในหลายกลุ่มอาการ โรคติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียอื่น อาจมีอาการและวิการคล้ายกัน ดังนั้นการแยกเชื้อเพื่อหาสาเหตุหรือสาเหตุร่วมจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในการแยกเชื้อ ARV นั้นอาจใช้ไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยงเช่น CK หรือ CELi cells ก็ได้ Guneratne *et al*. (1982) ศึกษาการแยกเชื้อ ARV พบว่า การฉีดตัวอย่างอวัยวะของสัตว์ป่วยเข้า yolk sac (YS) หรือเพาะเลี้ยงใน CELi cells เป็นวิธีที่ดีที่สุด มีความไวสูงต่อการแยกเชื้อ ARV และยังให้เชื้อไวรัสในระดับสูงด้วย แต่การยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจะทำได้ง่ายกว่าและสะดวกกว่า โดยตรวจลักษณะพยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) ที่เกิดขึ้น และนำ coverglass มาตรวจยืนยันชนิดของเชื้อไวรัส ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ การแยกเชื้อ ARV ในครั้งนี้ฉีดตัวอย่างเข้า allantoic cavity (AC) ทั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกเชื้อไวรัสอื่นๆที่อาจเกิดร่วมเช่นเชื้อ NDV อย่างไรก็ตามการศึกษานี้สามารถแยกเชื้อ ARV ได้ใน passage แรกจากตัวอย่างอุจจาระ และจากเยื่อบุข้อของไก่ป่วยรายที่ 2 ใน passage ที่ 2 โดยฉีดเข้า AC วิการของเอ็มบริโอและ CAM สอดคล้องกับรายงานการแยกเชื้อ ARV ของ Glass *et al*. (1973) ที่ฉีดเข้า YS และ AC, Guneratne *et al*. (1982) ที่ฉีดเข้า YS, CAM และ AC และ Hieronymus *et al*. (1983) ที่ฉีดเข้า AC, CAM และ YS แต่ 2 รายแรกตรวจไม่พบการตายและวิการของเอ็มบริโอเมื่อฉีดเข้า

AC ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อได้จากสัตว์ป่วยที่มีไวรัสไตเตอร์ในระดับสูงโดยเฉพาะในอุจจาระ เนื่องจากสัตว์ป่วยจะขับเชื้อไวรัสในปริมาณสูงออกมากับอุจจาระ (Olson, 1980) หรืออาจเป็นเพราะเชื้อไวรัสที่แยกได้มีความรุนแรงสูง (Hieronymus *et al*.,1983; Tang *et al*., 1987)

เมื่อเพาะเชื้อท้องที่ไวรัสที่แยกได้จากไข่ไก่ฟัก ลงใน CELi cells ตรวจพบ CPE เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ภายใน 24 ชั่วโมงใน passage แรก เป็นแบบ syncytium formation โดยเซลล์ตับรวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ภายในประกอบด้วย nuclei จำนวนมาก (multinucleated giant cells) แต่ตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ fibroblast cells ที่อยู่รอบๆ (Figure 1) ซึ่งคล้ายกับรายงานของ van der Heide, 1977; Guneratne *et al*., 1982 และ Robertson and Wilcox, 1986 และเมื่อนำเชื้อท้องที่ ARV ที่แยกได้เพาะเลี้ยงใน Vero cells ซึ่งเป็น mammalian cell line ตรวจพบเซลล์รวมตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ภายในมี nuclei อยู่รวมกันตรงกลาง ทั้ง 3 สเตรน (Figure 2) สอดคล้องกับรายงานของ Barta *et al*. (1984) และ Wilcox และคณะ (1985) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ ARV สเตรน WVU 2937 และสเตรน RAM-1 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ RAM-1 เป็นสเตรนเดียวใน 6 สเตรนที่ทำการศึกษาและทำให้เกิด CPE ใน Vero cells การ adaptation ของเชื้อ ARV ใน Vero cells มีประโยชน์สำหรับใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ ARV และทดสอบโรคนี้ทางซีรั่มวิทยาเนื่องจากประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย เพราะเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง สามารถ subculture ได้และใช้เวลาเตรียมเซลล์เพียง 1 วัน

จากการทดสอบการเกาะกลุ่มกันของเชื้อไวรัสที่แยกได้ กับเม็ดเลือดแดงของสัตว์หลายชนิด ตรวจไม่พบปฏิกิริยา haemagglutination ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Gershowitz และ Wooley (1973), Glass *et al*. (1973) และ Robertson และ Wilcox (1986)

เชื้อไวรัสในกลุ่ม Reoviridae จะให้ inclusion bodies ภายใน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งตรวจได้โดยย้อมด้วยสี เช่น Haematoxylin & Eosin (Robertson and Wilcox, 1986 ; McNulty, 1993) แต่การศึกษานี้ใช้วิธี indirect FA test เนื่องจากมีความแม่นยำและจำเพาะสูง โดยเชื้อ ARVs จะมี common group-specific antigen ร่วมกันจึงเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) ระหว่างเชื้อ ARVs แต่ละสเตรน (Kawamura and Tsubahara, 1966) และจากการตรวจ CELi และ Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อท้องที่ไวรัสทั้ง 3 สเตรน ตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของเซลล์ที่เกิดการรวมตัวกันมีลักษณะเป็น granular masses กระจายอยู่รอบๆ นิวเคลียสของ multinucleated cells ทั้ง 2 ชนิด inclusion มีขนาดไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการติดเชื้อในเซลล์ (Robertson and Wilcox, 1986; Nibert *et al*.,1996) เมื่อนำ infected Vero cells ของเชื้อท้องที่ไวรัสทั้ง 3 สเตรน ศึกษารูปร่างและลักษณะของอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน พบกลุ่มอนุภาคไวรัสใน cytoplasm ของเซลล์ viral particles มี capsid 2 ชั้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80 nm. เรียงตัวเป็นแถวแบบ crystalline arrays เชื้อที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae (Glass *et al*., 1973 ; Nibert *et al*., 1996) เชื้อ ARVs ทั้ง 3 สเตรน มีรูปร่างและขนาดไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษา antigenic relationship ระหว่างเชื้อท้องที่ ARVs ที่แยกได้ทั้ง 3 สเตรน กับเชื้อ ARV สเตรน S1133 ซึ่งเป็นสเตรนที่นำมาใช้ทำวัคซีนป้องกันโรคครีโอไวรัสในไก่ โดยวิธี cross-neutralization ซึ่งวิธีนี้ใช้เพื่อทดสอบ type-specific antigen พบว่าเชื้อ ARV สเตรน Kb 538/40 และ Pn1212/42 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (serologically closely related) หรือเหมือนกับเชื้อ S1133 มากกว่าเชื้อ NK 917/37

Montgomery *et al*. (1986) และ Rosenberger *et al*. (1998) กล่าวว่าอาการและความรุนแรงของโรคครีโอไวรัสในไก่ขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ ความรุนแรงของเชื้อไวรัสและทางที่เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย ไก่อายุน้อยจะไวต่อการติดเชื้อไวรัสและเป็นโรครุนแรงกว่าไก่อายุมาก ความไวของการติดเชื้อระหว่างไก่พันธุ์เนื้อ (meat-type chicken) และไก่ไข่ไม่พบว่ามีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบการเกิดโรคทั้งในไก่ไข่ ไก่กระทงและไก่พันธุ์พื้นเมือง ซึ่งแสดงอาการแตกต่างกันใน 3 กลุ่มอาการ ไก่ที่ติดเชื้อ ARV เชื้อจะเพิ่มจำนวนในต่อมเบอร์ซ่า (Jones *et al*.,1989) ทำให้ขนาดของต่อมเบอร์ซ่าเล็กลงและมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของไก่ เกิดภาวะภูมิคุ้มกันถูกกด

(immunosuppression) แต่เป็นอย่างชั่วคราวโดยพบเฉพาะในระยะแรกของการติดเชื้อไวรัส ดังนั้นในระยะนี้ไก่จึงติดเชื้ออื่นๆ แทรกซ้อนได้ง่ายดังเช่นการติดเชื้อ *Staph. aureus* ในไก่ป่วยรายที่ 2 และเป็นสาเหตุทำให้เกิดความสูญเสียตามมา นอกจากนี้ไก่ที่ติดเชื้อ ARV จะมีภูมิคุ้มกันเฉพาะต่อวัคซีนโรคนิวคาสเซิล (ND-HI titer) ต่ำกว่าไก่ที่ไม่เคยได้รับเชื้อ ARV อีกด้วย (Montgomery *et al*.1985)

การป้องกันการสูญเสียเนื่องจากโรคนี้โดยการทำวัคซีนเชื้อเป็นให้ลูกไก่อายุ 1 วัน หรือทำทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายให้พ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อถ่ายทอดแอนติบอดีทาง yolk จะช่วยลดอัตราการตายในลูกไก่ แต่ต้องพิจารณาชนิดของวัคซีนว่าต้องเป็นซีโรไทป์เดียวกับเชื้อไวรัสท้องที่ (Rosenberger and Olson, 1997)

เนื่องจากพบการติดเชื้อรีโอไวรัสในไก่พื้นเมือง จึงควรมีการศึกษาโรคนี้ทางซีรั่มวิทยาและระบาดวิทยา โดยนำเชื้อท้องที่มาพัฒนาเป็นแอนติเจนจะทำให้ทราบสภาวะโรคและพิจารณาใช้วัคซีนป้องกันโรครีโอไวรัส เพื่อลดความสูญเสียทั้งจากโรคนี้โดยตรงและเชื้อแทรกซ้อนอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Mr.K.T. Lim แห่ง Veterinary Research Institute เมืองอิโปร์ รัฐเปรัก ประเทศมาเลเซีย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 และแอนติซีรั่มจำเพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133

เอกสารอ้างอิง

จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และ ราตรี วงษ์วัชรดำรง. 2531. การสำรวจภูมิคุ้มเฉพาะต่อเชื้อรีโอไวรัสในไก่. สัตวแพทยสาร. 39(3) : 101-103.

ช้องมาศ อันตรเสน วีณา เชื้อเงิน และ ชวพันธุ์ อันตรเสน. 2536. โรคไข่ลดในไก่ไข่ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช. ว. สงขลานครินทร์. 15(4) : 413-421.

ช้องมาศ อันตรเสน อุไม บิลหมัด พรทิพย์ พรมเมือง และ ลัดดา ตรงวงศา. 2544. การแยกเชื้อ Avian reovirus และ *Staphylococcus aureus* ในไก่กระทงที่แสดงอาการข้ออักเสบ. วารสารสัตวแพทย์. 11(2) :10-24.

Bagust, T.J. and Westbury, H.A. 1975. Isolation of reoviruses associated with diseases of chickens in Victoria. Aust. Vet. J. 51 : 406-407.

Barrow, G.I. and Feltham, R.K.A. 1995. Characters of Gram-positive bacteria. **In**: Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge. p. 50-57.

Barta, V., Springer, W.T. and Millar, D.L. 1984. A comparison of avian and mammalian cell cultures for the propagation of avian reovirus WVU 2937. Avian Dis. 28(1) : 216-222.

Carter, G.R. and Cole, Jr.J.R. 1990. Micrococcus and Staphylococcus. **In**: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 5th ed. Academic Press, San Diego. p. 201-209.

Conzo, G., Magnino, S., Sironi, G., Lavazza, A., Vigo, P.G., Fioretti, A. and Kaleta, E.F. 2001. Reovirus infection in two species of psittaciformes recently imported into Italy. Avian Pathol. 30 : 43-47.

Czekaj, H., Samorek-Salamonowicz, E. and Kozdrun, W. 1999. Properties of avian reoviruses isolated from chickens in Poland. Bull. Vet. Inst. Pulaway. 43(1) : 3-7.

Dutta, S.K. and Pomeroy, B.S. 1967. Isolation and characterization of an enterovirus from baby chicks having an enteric infection. II. Physical and chemical characteristics and ultrastructure. Avian Dis. 11 : 9-15.

Gershowitz, A. and Wooley, R.E. 1973. Characterization of two reoviruses isolated from turkeys with infectious enteritis. Avian Dis. 17 : 406-414.

Glass, S.E., Naqi, S.A., Hall, C.F. and Kerr, K.M. 1973. Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens. Avian Dis. 17 : 415-424.

Guneratne, J.R.M., Jones, R.C. and Georgion, K. 1982. Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. Avian Pathol. 11 : 453-462.

Hieronymus, D.R.K., Villegas, P. and Kleven, S.H. 1983. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. Avian Dis. 27(1) : 246-254.

Jones, R.C., Islam, M.R. and Kelly, D.F. 1989. Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens. Avian Pathol. 18 : 239-253.

Kawamura, A. 1977. Fluorescent Antibody Techniques and Their Application. 2nd ed. University Tokyo Press, Tokyo. p. 13-76.

Kawamura, A. and Tsubahara, H. 1966. Common antigenicity of avian reoviruses. Natl. Inst. Anim. Health Quart. 6 : 187-193.

Kibenge, F.R.B., Robertson, M.D., Wilcox, G.E. and Pass, D.A. 1982. Bacterial and viral agents associated with tenosynovitis in broiler breeders in western Australia. Avian Pathol. 11 : 351-359.

Lenz, S.D., Hoerr, F.J., Ellis, A.C., Toivio-Kinnucan, M.A. and Yu, M. 1998. Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama. J. Vet. Diag. Invest. 10 : 145-151.

MacKenzie, M.A. and Bains, B.S. 1976. Tenosynovitis in chickens. Aust. Vet. J. 52 : 468-470.

McNulty, M.S. 1993. Reovirus. **In**: Virus Infections of Birds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p. 177-193.

Montgomery, R.D., Villegas, P., Dawe, D.L. and Brown, J. 1985. Effect of Avian Reoviruses on lymphoid organ weights and antibody response in chickens. Avian Dis. 29(2) : 552-560.

Montgomery, R.D., Villegas, P. and Kleven, S.H. 1986. Role of route of exposure, age, sex and type of chicken on the pathogenicity of avian reovirus strain 81-176. Avian Dis. 30(3) : 460-467.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Approved Standard M2-Ab. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Testing. 6th ed. NCCLS, Wayne, PA. 26p.

Nibert, M.L., Schiff, L.A. and Fields, B.N. 1996. Reoviruses and Their Replication. **In**: Fields Virology. Volume 2. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York. p.1557-1596.

Olson, N.O. 1980. Viral arthritis. **In**: Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. Arnold Printing Cop. Ithaca, NY. p. 219-225.

Robertson, M.D. and Wilcox, G.E. 1986. Avian Reovirus. Vet. Bulletin. 56(3) : 155-175.

Rosenberger, J.K. and Olson, N.O. 1997. Viral arthritis. **In**: Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. p. 711-719.

Rosenberger, J.K., Olson, N.O. and van der Heide, L. 1998. Viral arthritis/tenosynovitis and other reovirus infections. **In**: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. 4th edition. American Association of Avian Pathologists. Rose Printing, Thallahassee, Florida. p. 207-210.

Sharifah, S.H., Mahani, A.H., Loganathan, D. and Lim, K.T. 1989. Pathogenicity of an avian reovirus isolated from tendons of broilers with leg weakness. J. Vet. Malaysia. 1(2) : 17-27.

Tang, K.N., Fletcher, O.J. and Villegas, P. 1987. Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. Avian Dis. 31 : 577-583.

Tanner, A.C. 1994. Antimicrobial drug use in poultry. **In**: Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 2nd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p. 507-523.

Thayer, S.G. and Beard, C.W. 1998. Serologic procedures. **In**: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Rose Printing, Thallahassee, Florida. p. 255-266.

van der Heide, L. 1977. Viral arthritis/tenosynovitis : a review. Avian Pathol. 14 : 321-328

van der Heide, L., Lutticken, D. and Horzinek, M.1981. Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis "brittle bone disease", "femoral head necrosis" in broiler chickens. Avian Dis. 25 : 847-856.

Wilcox, G.E., Robertson, M.D. and Line, A.D. 1985. Adaptation and characteristics of replication of a strain of avian reoviruses in Vero cells. Avian Pathol. 14 : 321-328.

Wood, G.W., Nicholas, R.A.J., Hebert, C.N. and Thornton, D.H. 1980. Serological comparison of avian reoviruses. J. Comp. Pathol. 90 : 29-38.