การแยกเชื้อ Avian reovirus และ *Staphylococcus aureus* ในไก่กระทงที่แสดงอาการข้ออักเสบ

Isolation of Avian Reovirus and *Staphylococcus aureus* from Broiler Chickens Associated with Arthritis

ช้องมาศ อันตรเสน[1] อุไม บิลหมัด[1] พรทิพย์ พรมเมือง[1] และ ลัดดา ตรงวงศา[2]

Chongmas Antarasena[1] Umai Bilhmad[1] Porntip Prommuang[1] and Ladda Trongwongsa[2]

Abstract

A virus was isolated from hock joints and rectal contents of 38 days old broiler chickens from Krabi province, Thailand. The lame birds showed signs of depression and bilateral hock joints swelling. Autopsied lesions of affected birds were accumulation of purulent exudate in affected joints and inflammation of synovial membranes. After primary isolation in allantoic cavity of embryonated chicken eggs, the isolate was grown in chick embryo liver (CELi) cell cultures. Haemorrhagic embryos with slightly dwarfed and necrotic yellow-green foci on the liver were the main lesions observed. The cytopathic effect (CPE) characterized by syncytium formation were detected in infected CELi cells in the first passage within 24 hours postinoculation. The isolate virus was adapted to replicate in Vero cells and the CPE was characterized by focal areas of cell fusion occurring 48 hours postinoculation. The indirect fluorescent antibody test demonstrated viral antigen and granular fluorescent masses in the cytoplasm of multinucleate syncytia. Cross-virus neutralization test revealed an antigenic relationship between the field avian reovirus isolated and the reovirus strain S1133. Transmission electron microscopic study showed the nonenveloped virus

[1] ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110
Southern Veterinary Research and Diagnostic Center, Tungsong, Nakhonsithammarat. 80110

[2] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900
National Institute of Animal Health, Kasetklang, Bangkhen, Bangkok.10900

with 60-80 nm. in diameter and icosahedral symmetry and it formed crystalline arrays were observed in the cytoplasm of infected Vero cells. The virus, designated Kb538/40, was classified as reovirus. Coagulase positive, *Staphylococcus aureus*, were also recovered from affected birds and considered as a secondary invader. This report confirmed reoviral arthritis/ tenosynovitis in broiler chickens in the southern Thailand.
Key words: broiler chickens, CELi cells, Vero cells, syncytium formation, avian reovirus, *Staphylococcus aureus.*

บทคัดย่อ

ไก่กระทงอายุ 38 วัน จากฟาร์มไก่อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ แสดงอาการซึม มีข้อขาบวมทั้งสองข้าง จากการผ่าซากพบหนองในhock jointและเยื่อบุข้ออักเสบทำการแยกเชื้อไวรัสโดยฉีดตัวอย่างเข้า allantoic cavity ไข่ไก่ฟักและ CELi cells ตรวจพบวิการของเอ็มบริโอมีลำตัวสีแดง ขนาดแคระแกร็น และพบหย่อมเนื้อตายสีเหลืองที่ผิวตับ ส่วนใน CELi cells พบพยาธิสภาพของเซลล์เป็นแบบ syncytium formation เชื้อที่แยกได้สามารถเติบโตใน Vero cells ตรวจพบ CPE เป็นกลุ่มของ cell fusion ยืนยันชนิดของเชื้อ avian reovirus โดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์ ตรวจพบการเรืองแสงใน cytoplasm ของ syncytium cells จากการทำ cross-virus neutralization test เชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถนิวทราไลซ์ไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 เมื่อนำ infected Vero cellsไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบอนุภาคไวรัสในกลุ่มของ Reoviridae รูปร่าง icosahedral มีขนาด 60-80 nm.ใน cytoplasm ของเซลล์ เรียกเชื้อไวรัสนี้ว่า สเตรน Kb538/40 จากการแยกเชื้อแบคทีเรีย พบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ชนิดที่ให้ผลบวกกับ coagulase เป็นเชื้อแทรกซ้อน รายงานนี้ยืนยันการเกิดโรค reoviral arthritis/ tenosynovitis ในภาคใต้ของประเทศไทย
คำสำคัญ: ไก่กระทง, CELi cells, Vero cells, syncytium formation, avian reovirus, *Staphylococcus aureus.*

คำนำ

โรคข้อและเยื่อบุข้ออักเสบในไก่อาจมีสาเหตุเนื่องจากการขาดสารอาหาร เช่น แร่ธาตุและวิตามินบางชนิด หรือจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้ข้อและเยื่อบุข้ออักเสบในไก่มีทั้งเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย แต่ที่สำคัญและพบบ่อยครั้งคือเชื้อ avian reovirus เชื้อ *Mycoplasma synoviae* และเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Shane,1997)โดยอาจเกิดการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกันก็ได้ (van der Heide,1977; Rosenberger and Olson,1997)

เชื้อ avian reovirus เป็นสาเหตุสำคัญของโรค viral arthritis/tenosynovitis ในไก่และไก่งวง นอกจากนี้ ยังก่อให้เกิดกลุ่มอาการของโรคในระบบต่างๆ ได้แก่ ระบบทางเดินอาหาร (Dutta and Pomeroy,1967; Lenz *et al*.,1998) ทางเดินหายใจ (Sahu and Olson,1975) เป็นสาเหตุหรือสาเหตุร่วม

ของการดูดซึมอาหารผิดปกติในไก่กระทง (runting and malabsorption syndrome) (Rosenberger and Olson,1997) เชื้อนี้เป็น double stranded RNA virus จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae มี capsid 2 ชั้นไม่มี enveloped มีรูปร่างแบบ icosahedral (McNulty,1993; Rosenberger and Olson,1997) พบการระบาดของเชื้อ reovirus ในหลายประเทศทั่วโลกที่มีอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ Wood *et al*.(1980) ศึกษาเชื้อ reovirus ที่แยกได้ในประเทศสหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร เยอรมันนี และญี่ปุ่น พบว่ามีอย่างน้อย 11 ซีโรไทป์ อาการและความรุนแรงของโรคขึ้นกับอายุของสัตว์ป่วย ความรุนแรงของเชื้อไวรัส และทางที่เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย (Rosenberger and Olson, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าไก่พันธุ์เนื้อไวต่อการติดเชื้อ reovirus สูง มักพบการเกิดโรคในไก่อายุระหว่าง 4-16 สัปดาห์แต่มีความไวสูงที่อายุ 7 สัปดาห์ ไก่ป่วยด้วยโรค reoviral arthritis จะมีข้อส่วน hock และ stifle joint บวม อาจเกิดข้างเดียวหรือทั้งสองข้างก็ได้ ภายในข้อจะมีของเหลวสีเหลืองใส (serous exudate) บรรจุอยู่ เส้นเอ็นบริเวณนั้นจะขุ่นและบวม ถ้าเป็นแบบเรื้อรังจะเกิดการยึดติดกันของข้อเนื่องจากเกิดfibrosis ทำให้ไก่ป่วยไม่สามารถเคลื่อนตัวไปยังแหล่งน้ำและอาหารได้ จึงมีน้ำหนักลดลงอย่างรวดเร็ว พบมีจำนวนไก่แคระแกร็นในฝูงเพิ่มขึ้น ไก่จะตายเนื่องจากขาดสารอาหาร (McNulty,1993)

ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม*Staphylococcus*มีด้วยกัน20สปีชีส์ โดยชนิดที่ให้ผลบวกกับการทดสอบ coagulase เท่านั้นที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ปีก ที่สำคัญและพบได้บ่อยคือ ทำให้ข้อและเยื่อบุข้ออักเสบ กระดูกและไขกระดูกอักเสบ (osteomyelitis) ซึ่งอาจพบเป็นสาเหตุโดยตรงหรือเป็นเชื้อแทรกซ้อนตามมาหลังเกิดโรค reoviral arthritis (Skeeles,1997; Shane,1997; McNamee *et al*.,1998) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อ *S. aureus* ในกระแสเลือด (septicaemia) โดยมักเกิดตามมาหลังการติดเชื้อไวรัสอื่นๆที่กดภูมิคุ้มกัน (immune suppression) เช่น โรคกัมโบโร โรคโลหิตจางติดต่อในไก่ และโรคมาเร็กซ์ พบเชื้อนี้ได้ทั่วโลกเป็นปัญหาสำคัญในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ไก่เนื้อ (Skeeles,1997) เชื้อ *S. aureus* จะอาศัยอยู่ตามผิวหนังของไก่ (Kibenge *et al*.,1982) เมื่อเกิดบาดแผล เช่น จากรอยขีดข่วนหรือจิกตีกัน เชื้อจะเข้าสู่ร่างกาย และแพร่ไปยังข้อใกล้เคียง ทำให้ข้ออักเสบ บวม มีหนองสีเขียวหรือเหลืองอยู่ภายในไก่ป่วยจะนั่งบนข้อ ส่วนในรายติดเชื้อในกระแสเลือด ไก่ป่วยจะตายเฉียบพลัน ส่วนตัวที่รอดตายจะพบข้อขาบวม ไก่ป่วยไม่เคลื่อนไหว (Skeeles,1997) พบการเกิดโรคสูงในไก่ช่วงอายุ 8-16 สัปดาห์ และอาจตายสูงถึง 20% ของฝูง (Shane,1997)

มีผู้รายงานการติดเชื้อ reovirus ร่วมกับเชื้อ *S. aureus* ในไก่เนื้อที่แสดงอาการ lameness ในหลายประเทศทั่วโลกเช่น MacKenzie and Bains (1976) และ Kibenge *et al*.(1982) รายงานการแยกเชื้อทั้งสองชนิดจากข้อขาไก่ที่ประเทศออสเตรเลีย McNamee *et al*.(1998) รายงานการพบโรคที่ประเทศไอร์แลนด์เหนือ Sharifah *et al*.(1989) รายงานการเกิดโรคที่ประเทศมาเลเซีย ส่วนในประเทศไทย จิโรจและราตรี(2531) ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ avian reovirus โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ไก่เนื้อ ไก่ไข่ และไก่เนื้อ ซึ่งมีประวัติไก่ขาพิการ กระดูกผุ มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและไม่สม่ำเสมอ หรือไม่มีประวัติการ

แสดงอาการดังกล่าว โดยพบในอัตราสูงตั้งแต่ 10-85% ดังนั้นการวินิจฉัยโรคทางห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อที่เป็นสาเหตุแท้จริงของโรคข้อและเยื่อบุข้ออักเสบจึงเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากไก่ป่วยจะแสดงอาการและมีวิการของโรคคล้ายกัน

รายงานนี้จะกล่าวถึงการแยกและพิสูจน์เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคข้อและเยื่อบุข้ออักเสบในไก่กระทงที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ป่วย

ไก่กระทงอายุ 38 วัน จากฟาร์มไก่ขนาด 3000 ตัวที่อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ แสดงอาการซึม มีข้อขาบวมทั้งสองข้าง ไก่ป่วยเดินไม่ได้และนั่งบนข้อ ประวัติการทำวัคซีนป้องกันโรค อัตราการป่วยและตายไม่ได้ระบุ เจ้าของสัตว์ส่งซากไก่ป่วยจำนวน 2 ตัว มาทำการชันสูตรที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้

การผ่าซากและเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อ

ทำการชันสูตรซากไก่ป่วยทั้ง 2 ตัว พบหนองในข้อขาส่วน hock joint และมีเลือดคั่ง เยื่อบุข้ออักเสบ อวัยวะภายในพบตับ ม้าม ไต และต่อมเบอร์ซ่าบวมและมีเลือดคั่ง ที่ปอดพบเลือดคั่ง เก็บตัวอย่างอวัยวะภายในส่วนหนึ่งแช่ในน้ำยา 10% buffered formalin เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ส่วนการแยกเชื้อไวรัส เก็บเยื่อหุ้มข้อและของเหลวภายใน หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย ของไก่ป่วยทั้งสองตัวมาบดแยกทำเป็น 10% organ suspension ใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 ปั่นแยกน้ำใสส่วนบน (supernatant) ออก นำมากรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.45 μm เก็บตัวอย่างที่ -80° C จนกว่าจะใช้แยกเชื้อไวรัส การแยกเชื้อแบคทีเรียเก็บตัวอย่างอวัยวะภายในได้แก่ปอด หัวใจ ตับ ไต และswab ของเหลวภายในข้อขา

ไก่ทดลองและไข่ไก่ฟัก

ได้จากพ่อ-แม่ไก่พันธุ์ไวท์เลคฮอร์น ที่เลี้ยงภายในคอกสัตว์ทดลองของ ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ภาคใต้ และไม่เคยทำวัคซีนป้องกันโรคใดๆ นำมาฟักในตู้ฟักที่อุณหภูมิ 37°C ไข่ฟักส่วนหนึ่งนำมาใช้เตรียม chick embryo liver (CELi) cells เมื่ออายุ 14 วัน อีกส่วนนำมาใช้เพื่อฉีดแยกเชื้อไวรัสเมื่ออายุ 10-11 วัน

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการแยกเชื้อไวรัสมี 2 ชนิด คือ

1. chick embryo liver (CELi) cells เตรียมโดยเลาะตับ embryo ไข่ไก่ฟักอายุ 14 วัน นำมาย่อยใน 0.25% trypsin เตรียม 0.3-0.4 % cell suspension ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Eagle's minimum essential medium (MEM) มี tryptose phosphate broth 0.3%, fetal calf serum 10%, เพนนิซิลลินและ สเตรปโตมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ยูนิตและ 100 มก./มล.ตามลำดับและ $NaHCO_3$ 1.125 มก./มล. เลี้ยงใน 6-well tissue culture plate มี coverglass อยู่ภายใน อบใน CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C และมี CO_2 5% นำมาใช้แยกเชื้อเมื่อเซลล์มีอายุ 3 วัน

2. Vero cell line (African green monkey

kidney cells) เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนประกอบเหมือน CELi cells แต่มี L-glutamine 0.03% เป็นส่วนประกอบร่วม และมี fetal calf serum 5% เลี้ยงเซลล์ใน 6-well tissue culture plate อบใน CO_2 incubator นำมาใช้แยกเชื้อไวรัสเมื่อเซลล์มีอายุ 1 วัน

เชื้อไวรัส

เชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 เป็นเชื้อไวรัสอ้างอิง เชื้อนี้เพาะเลี้ยงใน chicken kidney(CK) cells มาแล้ว15 ครั้ง จาก Veterinary Research Institute (VRI) ประเทศมาเลเซีย นำมาเพาะเลี้ยงใน Vero cells ที่ศูนย์ฯใต้อีก 7 ครั้ง จึงนำมาใช้เป็นอิมมูโนเจนเพื่อหยอดไก่ทดลอง

อิมมูนซีรั่มและคอนจูเกตโกลบุลิน

แอนติซีรั่มไก่ที่มีภูมิคุ้มเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 (ได้รับความอนุเคราะห์จาก VRI ประเทศมาเลเซีย) และ Rabbit anti - chick IgG FITC (Sigma®) เพื่อพิสูจน์เชื้อไวรัสโดยวิธี indirect fluorescent antibody (IFA) test

การเตรียมไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133

หยอดเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 เข้าปากและตาไก่ทดลอง อายุ 1 เดือน ตัวละ 0.5 มล. หลัง จากนั้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ฉีดเชื้อไวรัสชนิดเดียวกัน เข้ากระแสเลือดไก่ทดลอง ตัวละ 1 มล. ในวันที่ 7 หลังฉีดเชื้อครั้งสุดท้าย ฆ่าไก่ทดลองเก็บอิมมูนซีรั่ม ที่ -20°C และนำมาอุ่นใน waterbath ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที ก่อนใช้ทดสอบ cross-virus neutralization test

การแยกเชื้อไวรัส

ทำการแยกเชื้อไวรัสดังวิธีการต่อไปนี้

1. การแยกเชื้อไวรัสในไข่ไก่ฟัก

นำตัวอย่างน้ำใสของเยื่อบุข้อและของเหลวภายใน หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย ฉีดเข้า allantoic cavity (AC) ของไข่ไก่ฟักอายุ 10-11 วัน ฟองละ 0.2 มล. ตัวอย่างละ 7 ฟอง ตรวจการเปลี่ยนแปลงของ embryo และ chorioallantoic membrane (CAM) ไข่ฟักที่ตายหลังฉีด 48 ชั่วโมง นำ allantoic fluid ทดสอบหาเชื้อ Newcastle disease virus (NDV) โดยวิธี Haemagglutination & haemagglutination inhibition (HA&HI) test ส่วนตับ embryo, CAM และ allantoic fluid นำมาบดรวมกัน ปั่นแยกน้ำใสออก ฉีดเข้า AC ของไข่ไก่ชุดใหม่ ทำต่ออีก 2 passages เก็บเชื้อไวรัสจาก passage ที่ 3 ที่ -80°C เพื่อนำไปเพาะแยกเชื้อใน CELi cells

2. การแยกเชื้อใน chick embryo liver (CELi) cells

นำตัวอย่างน้ำใสของตับ embryo, CAM และ allantoic fluid จากตัวอย่างแยกเชื้อในไข่ไก่ฟัก passage ที่ 3 บดรวมกันและนำมาเพาะเลี้ยงใน CELi cells อายุ 3 วัน หลุมละ 0.2 มล. ตัวอย่างละ 3 หลุม อบที่ 37°C ใน CO_2 incubator นาน 1 ชั่วโมง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fetal calf serum 1% อบต่อใน CO_2 incubator ตรวจพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวันเมื่อตรวจพบ CPE ประมาณ 50-80% เก็บ culture fluid โดย freeze and thaw 1 ครั้ง นำมาเพาะเลี้ยงต่อใน CELi cells ชุดใหม่อีก 5 passages ก่อนเพาะเลี้ยงใน Vero cells

3. การแยกเชื้อใน Vero cells

นำ culture fluid ของ CELi cells ใน passages ที่ 6 เพาะเลี้ยงใน Vero cells อายุ 1 วัน หลุมละ 0.3

มล. ตัวอย่างละ 3 หลุม อบที่ 37° C ใน CO_2 incubator นาน 1 ชั่วโมง เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fetal calf serum 1% อบต่อใน CO_2 incubator ตรวจ CPE ทุกวัน ถ้าตรวจพบCPE ประมาณ 80% นำเซลล์ไป freeze and thaw 1 ครั้ง แล้วนำ culture fluid ไปเพาะเชื้อใน Vero cells ชุดใหม่ ทำ serial passages ใน Vero cells ต่ออีก 6 ครั้ง ครั้งสุดท้าย เก็บเชื้อไวรัสที่ -80°C

การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

1. นำไต ม้าม และต่อมเบอร์ซ่าของไก่ป่วยมาตรวจหาเชื้อ Infectious bursal disease virus(IBDV) โดยวิธี direct FA test (ช้องมาศ และนิมิตร, 2536)

2. ตรวจการติดเชื้อ avian reovirus ใน infected CELi cells และ Vero cells โดยเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้ใน CELi cells 2 ครั้ง และ Vero cells 1 ครั้ง เมื่อตรวจพบ CPE นำเซลล์ที่เลี้ยงบน coverglass ภายหลังหยอดเชื้อใน CELi cells 24 ชั่วโมงและใน Vero cells 48 ชม. มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วแช่ใน acetone นาน 10 นาที จากนั้นนำ coverglass มาตรวจโดยวิธี indirect FA test ตามวิธีการของ Kawamura (1977) ตรวจการติดเชื้อ avian reovirus ด้วยกล้องฟลูออเรสเซนท์

การทำ Cross -virus neutralization test

ใช้วิธี alpha-neutralization test แบบ constant-serum,variable-virus ทำไวรัสนิวทราไลเซชั่นเทสต์ 2 ตัวอย่าง คือ เชื้อไวรัสอ้างอิง avian reovirus สเตรน S1133 และเชื้อท้องที่ที่แยกได้และต้องการทดสอบ ทั้ง 2 สเตรนผ่านการเพาะเลี้ยงใน Vero cells มาแล้ว 7 ครั้ง นำเชื้อไวรัสทั้ง 2 สเตรน มาเจือจางทำเป็น ten-fold dilution ตั้งแต่ระดับ 10^{-1} ถึง 10^{-8} ผสมเชื้อไวรัสแต่ละสเตรนกับไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 ที่เจือจาง 5 เท่า จำนวนเท่ากัน นำส่วนผสมซีรั่ม-ไวรัส แช่ใน waterbath ที่อุณหภูมิ 37° C นาน 1 ชม. แล้ว inoculate ส่วนผสมแต่ละ dilution ปริมาณ 0.1 มล./หลุม บน Vero cells อายุ 1 วัน ที่เลี้ยงใน 48-well tissue culture plate ส่วนผสมละ 4 หลุม เพื่อหาเชื้อไวรัสที่หลงเหลืออยู่ หลังอบใน CO_2 incubator นาน 1 ชม. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี fetal calf serum เป็นส่วนผสม ปริมาณ 0.5 มล./หลุม อบต่อใน CO_2 incubator ส่วน virus control ทำเช่นเดียวกัน แต่ใช้ MEM แทนไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มในวันที่ 8 อ่านผลการเกิด neutralization test ของเชื้อไวรัสแต่ละสเตรน นำมาคำนวณค่า $TCID_{50}$ และ neutralizing index (NI) ตามวิธีของ American Association of Avian Pathologists (1980)

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นำ infected CELi cells และ infected Vero cells ที่เลี้ยงบน coverglass และ inoculate เชื้อไวรัสที่แยกได้ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน CELi cells และ Vero cells มาแล้ว จำนวน 4 และ 6 ครั้งตามลำดับ เมื่อตรวจพบการเกิด CPE 50-80% นำ coverglass มาล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แช่ใน 10% buffered formalin 24 ชม. นำมาย้อมด้วยสี haematoxylin&eosin (H&E) ตรวจการเกิด inclusion bodies ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (TEM) เพื่อศึกษารูป

ร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้ เตรียมตัวอย่าง infected Vero cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้ passage ที่ 7 เพาะเลี้ยงนาน 18 ชม. เกิด CPE ประมาณ 50% ล้างด้วย phosphate buffer (pH 7.4) ที่ 4°C 3 ครั้ง fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4°C ตามลำดับ ผ่านขบวนการdehydration ด้วย alcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อค ตัด section ให้ได้ขนาด 700°A ย้อมด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (JEOL model TEM-1200)

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างอวัยวะภายในได้แก่ปอด หัวใจ ตับ ไต และ swab ของเหลวภายในข้อขา มาเพาะเชื้อบน blood agar และ MacConkey agar อบที่ 37° C นาน 18-24 ชม.จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลมนูน สีขาวถึงสีทอง มี hemolysis แบบ double zone บน blood agar และไม่เจริญบน MacConkey agar มาย้อมสีแกรม และทดสอบทางชีวเคมีโดยดัดแปลงตามวิธีของ Carter and Cole (1990) และ Barrow and Feltham (1995)

นำเชื้อที่แยกได้ทดสอบหาความไวต่อยาต้านจุลชีพ โดยวิธี agar disc diffusion test ตามมาตรฐานของ National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997)

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะภายในที่แช่ใน 10% buffered formalin แล้ว embed ในพาราฟิน ตัดให้มีความหนา 5 ไมครอนแล้วย้อมด้วยสี H&E ตรวจการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ผล

ผลการแยกเชื้อไวรัส

จากการฉีดตัวอย่างน้ำใสของเยื่อบุข้อและของเหลวภายใน หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย เข้า AC ของไข่ไก่ฟัก พบว่าไข่ไก่ฟักที่ฉีดตัวอย่าง หลอดลม ม้ามและไต และลำไส้ส่วนปลาย ตายตั้งแต่ passage แรก ในวันที่ 3-5 จำนวน 3 ฟอง ส่วนไข่ฟักที่ฉีดตัวอย่างเยื่อบุข้อและของเหลวภายใน ตายใน passage ที่ 2 และ 3 ในวันที่ 3 และ 5 หลังฉีด จำนวน 4 ฟอง embryo แคระแกร็น มีลำตัวสีแดง (haemorrhage) ตับและม้ามมีขนาดใหญ่ ตรวจพบหย่อมเนื้อตายสีเหลืองที่ผิวตับ ที่ CAM ตรวจพบจุดเนื้อตายสีขาว ขนาดปลายเข็มหมุดกระจายบน CAM ส่วนไข่ฟักที่ฆ่าในวันที่ 7 หลังฉีด ตรวจพบ embryo มีขนาดเล็กกว่าปกติ ตับและม้ามมีขนาดโต พบหย่อมเนื้อตายที่ผิวตับ

จากการตรวจ allantoic fluid โดยวิธี HA&HI test ตรวจไม่พบเชื้อ Newcastle disease virus (NDV)

เมื่อนำตัวอย่าง embryo ของไข่ไก่ฟักที่ตายใน passage 3 เพาะเชื้อใน CELi cells ตรวจพบการเกิดCPE อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชม. ใน passage แรก เป็นแบบ syncytium formation (Figure 1) คือผนังเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจะหายไป เกิด cell fusion ในวันถัดไปจะลอก พบ giant cells ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นอกจากนี้เมื่อนำ culture fluid ของ CELi cells ใน passage ที่ 6 เพาะเลี้ยงใน Vero cells

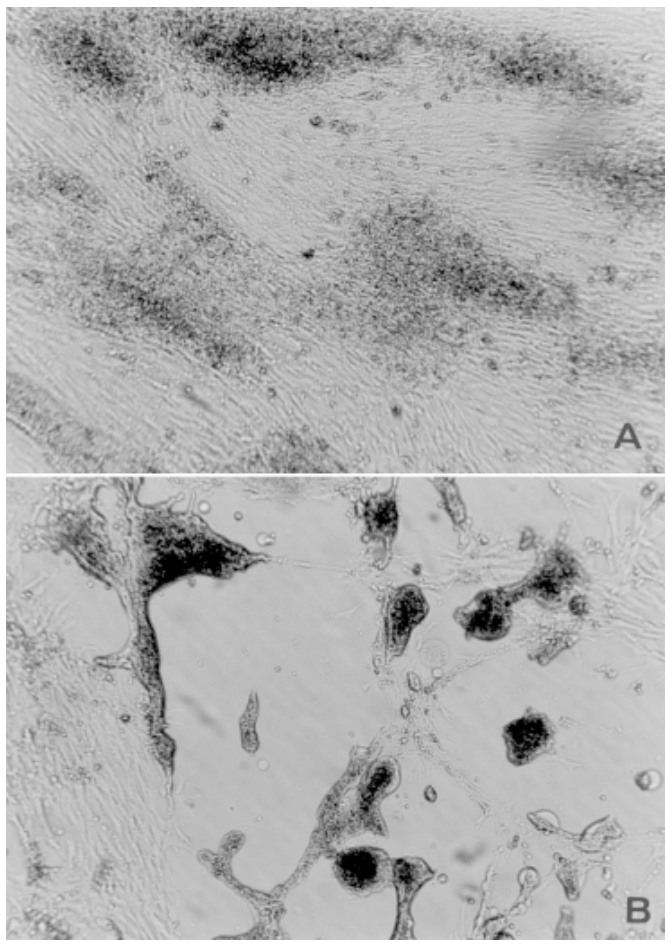

Figure 1 Syncytial-type CPE in avian reovirus-infected CELi cells.
a) uninfected culture b) infected culture.

ตรวจพบ CPE ในวันที่ 2 หลังหยอดเชื้อ เป็นแบบ syncytium formation พบเป็นกลุ่ม cell fusion บน monolayer เมื่อทำ serial passage ใน Vero cells CPE จะเกิดอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ passage ที่ 2 โดยตรวจพบภายใน 24 ชม.หลังจากนั้นในวันถัดไป syncytial cells จะมีขนาดใหญ่ พบการเกิด CPE ถึง 90% ของ monolayer (Figure 2) เมื่อนำ infected CELi cells และ infected Vero cells ย้อมด้วยสี H&E ตรวจพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ภายใน multinucleate syncytia ของเซลล์ทั้งสองชนิด เชื้อไวรัสที่แยกได้เรียกว่าสเตรน Kb538/40

ผลการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์

1. จากการตรวจหาเชื้อ IBDVในเนื้อเยื่อไตม้าม และต่อมเบอร์ซ่าของไก่ป่วยทั้งสองตัว ตรวจไม่พบเชื้อ IBDV โดยวิธี direct FA. test

2. จากการนำ infected CELi cells และ infected Vero cells มาตรวจหาเชื้อ avian reovirus

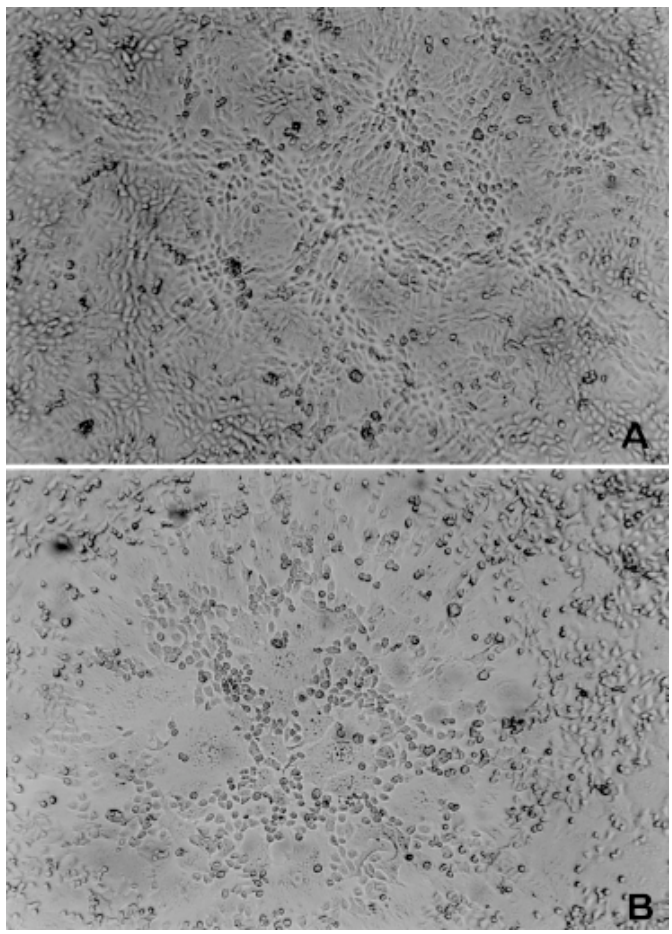

Figure 2 Focal areas of cell fusion of the adapted avian reovirus strain Kb538/40 in Vero cells a) uninfected culture b) infected culture.

โดยวิธี indirect FA. test ตรวจพบการเรืองแสงของเชื้อ avian reovirus ใน cytoplasm และยังพบการเรืองแสงของกลุ่มอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นเม็ด (granular fluorescent masses) กระจายใน cytoplasm ของ multinucleate syncytia ในเซลล์ทั้งสองชนิด (Figure 3)

ผลการทำ cross-virus neutralization test

จากการทำไวรัสนิวทราไลเซชั่นเทสต์ระหว่างเชื้อไวรัสที่แยกได้กับไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มต่อเชื้อไวรัสอ้างอิง avian reovirus สเตรน S1133 พบว่าเชื้อที่ทำการทดสอบสามารถนิวทราไลซ์ แอนติซีรั่มเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133ได้โดยมีค่า NI เท่ากับ 2.0 ส่วน homologous antiserum มีค่า NI เท่ากับ 2.5 ค่า NI ของเชื้อไวรัสทั้งสองแตกต่างกัน 0.5 แสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้เป็นเชื้อ avian reovirus

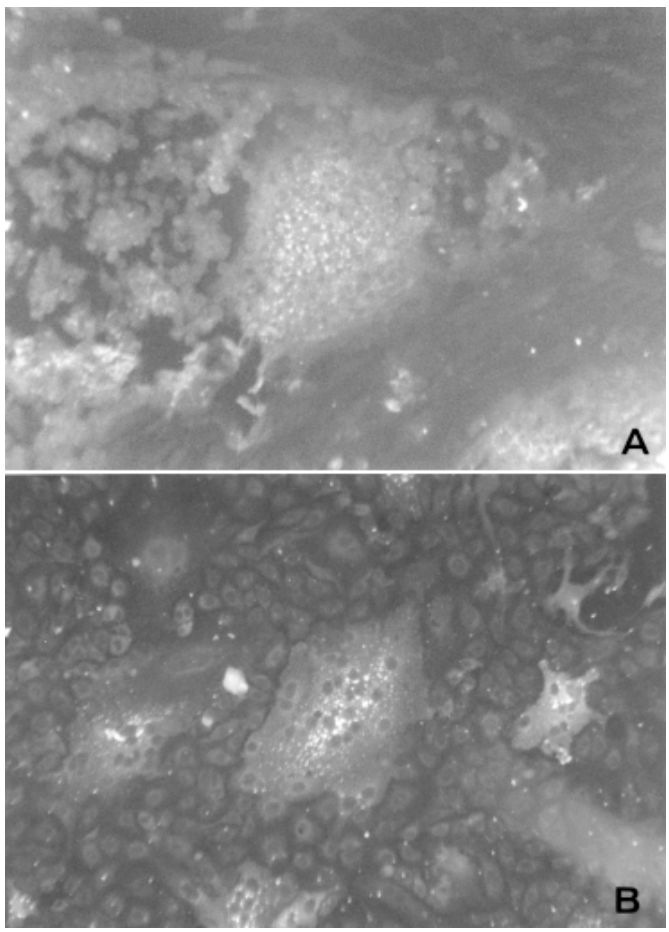

Figure 3 Intracytoplasmic fluorescence and large granular masses of syncytial cells inoculated with avian reovirus strain Kb538/40 a) infected CELi cells b) infected Vero cells. (Indirect fluorescent antibody test).

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการนำ infected Vero cells ตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน ตรวจพบกลุ่มของอนุภาคไวรัสเรียงเป็นแถวอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่มของ Reoviridae มีลักษณะเป็นหกเหลี่ยม (icosahedral) มี core อยู่ตรงกลางมี capsid 2 ชั้น ไม่มี enveloped มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80 nm. (Figure 4)

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการนำปอด หัวใจ ตับ ไต และ swab ของเหลวภายในข้อขาของไก่ป่วยมาเพาะบน blood agar และ MacConkey agar สามารถแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้จากทุกอวัยวะที่เพาะเชื้อโดยเชื้อแบคทีเรียที่เพาะได้มีโคโลนีสีเหลืองทอง hemolysis แบบ double zone บน blood agar (Figure

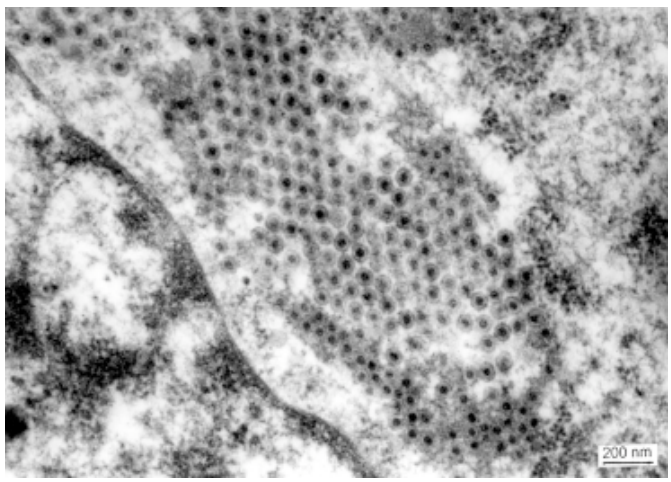

Figure 4 Electron micrograph of reovirus strain Kb538/40 isolated from a lame broiler chicken in the cytoplasm of Vero cells.

5) และไม่เจริญบน MacConkey agar มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีให้ผล Mobile (-), Catalase (+), Oxidase (-), Oxidation-Fermatation (F) และ Glucose (+) ซึ่งแสดงว่าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus* และเชื้อที่แยกได้ให้ผลบวกกับการทดสอบ Coagulase, Dnase, Mannitol และ Maltose แสดงว่าเป็นเชื้อ *Staphylococcus aureus* (Carter and Cole,1990; Barrow and Feltham,1995)

จากการทดสอบหาความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ พบว่า เชื้อมีความไว (sensitive) ต่อยา Bacitracin, Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamycin, Kanamycin, Novobiocin, Polymycin B และSulfamethoxazone+Trimethoprim และเชื้อดื้อ (resistant) ต่อยา Ampicillin, Cloxacillin, Erythromycin, Lincomycin, Neomycin, Norfloxacin, Oxytetracycline, Penicillin G และ Streptomycin

ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

จากการตรวจรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาพบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลม (coccoid) ใน nodular lesions ภายในปอด ที่หัวใจพบเม็ดเลือดขาวชนิด heterophil, macrophage และ lymphocyte cellsแทรกอยู่ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจและพบเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ ส่วนที่ตับพบกลุ่ม lymphocyte cells กระจายอยู่รอบๆ portal area

วิจารณ์

โรคข้ออักเสบที่พบในไก่กระทงที่จังหวัดกระบี่ครั้งนี้ ไก่ป่วยแสดงอาการข้อบวมและไม่เคลื่อนไหว การหาสาเหตุของโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากมีหลายสาเหตุที่ทำให้เกิดข้ออักเสบในไก่ การแยกเชื้อ avian reovirus จากตัวอย่างสัตว์ป่วยอาจใช้ไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยงก็ได้ Guneratne *et al.*(1982) ศึกษาการแยกเชื้อ avian reovirus พบว่าการฉีดตัวอย่างเข้า yolk sac (YS) หรือ inoculate ลงใน CELi cells เป็นวิธีที่ดีที่สุด มีความไวสูงต่อการแยกเชื้อ avian reovirus และให้ virus titers ในระดับสูงด้วย ส่วนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ ถ้า

Figure 5 *Staphylococcus aureus* (B-hemolysis) on bovine blood agar.

ใช้อุจจาระจะแยกเชื้อได้ใน passage แรก แต่ถ้าใช้เยื่อบุข้อจะตรวจพบพยาธิสภาพของembryoหรือ CELi cellsใน passage ที่ 2 ในการแยกเชื้อ avian reovirus จากไก่ป่วยในครั้งนี้ ฉีดตัวอย่างเข้า allantoic cavity (AC) ทั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อแยกเชื้อไวรัสอื่นๆที่อาจเกิดร่วม เช่นเชื้อ NDV หลังฉีดตัวอย่างตรวจพบ วิการของ embryo และ CAM สอดคล้องกับรายงานการแยกเชื้อ avian reovirus ของ Glass *et al*.(1973) ที่ฉีดเข้าทาง YS และ AC, Guneratne *et al*. (1982) ที่ฉีดเข้า YS, CAM และ AC และ Hieronymus *et al*.(1983) ที่แยกเชื้อ avian reovirus โดยฉีดตัวอย่างเข้า AC, CAM และ YS แต่สองรายแรกตรวจไม่พบการตายและวิการของembryo เมื่อฉีดเข้า AC ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อมี virus titers ในระดับสูงโดยเฉพาะในอุจจาระ ทั้งนี้เนื่องจากไก่ป่วยจะขับเชื้อไวรัสในปริมาณสูงออกมากับอุจจาระ (Olson,1980) หรืออาจเป็นเพราะเชื้อไวรัสที่แยกได้มีความรุนแรงสูง (Hieronymus *et al*.,1983; Tang *et al*., 1987a) เมื่อนำตัวอย่างของไข่ฟักที่ตาย เพาะเลี้ยงใน CELi cells ตรวจพบ CPE อย่างรวดเร็วภายใน 24 ชม.เป็นแบบ syncytium formation เมื่อย้อมด้วยสี H&E ตรวจพบ eosinophilic intracytoplasmic inclusion bodies ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ reovirus (van der Heide,1977; Guneratne *et al*.1982) เมื่อนำเชื้อ avian reovirus ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงใน Vero cells ซึ่งเป็น mammalian cell line ตรวจพบ CPE ลักษณะเป็นกลุ่มของ cell fusion สอดคล้องกับรายงานของ Barta *et al*.(1984) และ Wilcox *et al*. (1985) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ avian reovirus สเตรน WVU2937 และสเตรน RAM-1 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อ RAM-1 เป็น สเตรนเดียวใน 6 สเตรนที่ทำการศึกษาและทำให้เกิด CPE ใน Vero cells การ adaptation ของเชื้อ avian reovirus ใน Vero cells มีประโยชน์ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ avian reovirus และทดสอบโรคนี้ทางซีรั่มวิทยา เนื่องจากประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย เพราะเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง สามารถ subculture ได้และใช้เวลาเตรียมเซลล์เพียง 1 วัน

ในการยืนยันชนิดของเชื้อ avian reovirus

ทำได้หลายวิธี การใช้วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและจำเพาะสูง ให้ผลการทดสอบเร็ว จากการตรวจ syncytial cells ของ CELi และ Vero cells ตรวจพบการเรืองแสงเฉพาะในส่วน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อ และกลุ่มอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็น granular masses (Glass *et al.*,1972; Guneratne *et al.*,1982) จากการทำ cross-virus neutralization test พบว่าเชื้อ avian reovirus ที่แยกได้สามารถนิวทราไลซ์ไฮเปอร์อิมมูนซีรั่มเฉพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรน S1133 แสดงว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้มี antigenic relationship กับ reovirusสเตรน S1133 ในการศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน เชื้อไวรัสที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-80 nm. ตรวจพบเฉพาะใน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Glass *et al.*,1973; Rosenberger and Olson, 1997)

เชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่แยกได้จากข้อเป็นเชื้อแทรกซ้อนที่มักเกิดตามมาหลัง reoviral arthritis (Kibenge *et al.*,1982) นอกจากนี้ยังพบเชื้อในปอด หัวใจ ตับ และไตไก่ป่วยแสดงถึงการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteraemia) การแยกเชื้อ *S. aureus* สนับสนุนผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาที่พบเชื้อแบคทีเรียรูปร่างกลมในปอด ส่วนการตรวจพบรอยโรคในกล้ามเนื้อหัวใจสอดคล้องกับรายงานของ van der Heide (1977) และ Rosenberger and Olson (1997)ที่พบการแทรกตัวของ heterophils ในกล้ามเนื้อหัวใจไก่ที่ติดเชื้อ avian reovirus ในรายงานนี้ยังตรวจพบ macrophage และ lymphocyte cells ด้วย เนื่องจากมีการติดเชื้อ *S. aureus* เป็นสาเหตุร่วม

จากการศึกษาของ MacKenzie and Bains (1976) และ Kibenge *et al.*(1982) พบว่าโรคข้อและเยื่อบุข้ออักเสบ เกิดจากการติดเชื้อ avian reovirus เป็นสาเหตุนำก่อน แต่ไก่จะไม่แสดงอาการป่วย (subclinical) เชื้อไวรัสจะทำลายระบบภูมิคุ้มกัน (Rinehart and Rosenberger, 1983) ทำให้เกิดการติดเชื้ออื่นๆแทรกซ้อนได้ง่าย ที่พบบ่อยคือเชื้อ *S. aureus* ซึ่งมีอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทำให้โรครุนแรงขึ้น ไก่จะแสดงอาการพร้อมทั้งมีวิการข้อและเยื่อบุข้ออักเสบ (MacKenzie and Bains,1976; Kibenge *et al.*,1982) ดังนั้นการควบคุมเชื้อ *S. aureus* ในฝูงจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยลดความสูญเสียลงได้ นอกจากนี้การทดสอบความไวของยาปฏิชีวนะจะทำให้เลือกชนิดของยาได้ถูกต้อง Tanner (1994) แนะนำให้ใช้ Novobiocin ขนาด 200-350 กรัมผสมอาหาร 1 ตัน จะให้ผลดีในการรักษาการติดเชื้อ *S. aureus*

รายงานนี้เป็นการยืนยันการเกิดโรค reoviral arthritis/ tenosynovitis ในไก่กระทงในภาคใต้ของประเทศไทย นอกจากนี้เชื้อไวรัสที่แยกได้สามารถนำไปพัฒนาเตรียมเป็นชีวภัณฑ์เพื่อตรวจแอนติบอดีในฟาร์มไก่ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณน.สพ.นิมิตร ไตรวนาธรรม ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยและชันสูตรโรคสัตว์ที่สนับสนุนการศึกษา Dr.S. Taniguchi ผู้เชี่ยวชาญชาวญี่ปุ่นที่ช่วยยืนยันผลทางจุลพยาธิวิทยา Mr.K.T.Lim แห่ง Veterinary Research Institute อิโปร์ ประเทศมาเลเซียที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ avian reovirus สเตรนS1133 และแอนติซีรั่มเฉพาะต่อเชื้อavian reo-

virus สเตรน S1133 นายอำนวย ปานเผาะ หัวหน้าฝ่ายสัตว์ทดลองที่ช่วยเหลือด้านสัตว์ทดลอง และ นส.สมจิตร รุจิขวัญ ที่ช่วยด้านภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

เอกสารอ้างอิง

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

ช้องมาศ อันตรเสน และ นิมิตร เชื้อเงิน. 2536. การวินิจฉัยโรคกัมโบโรโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนท์เทคนิค.ว.สงขลานครินทร์.15(4): 399-408.

American Association of Avian Pathologists.1980. Virus Neutralization test (VN), pp.320-326. In Isolation and identification of avian pathogens. Hitchner, S.B., C.H. Domermuth, H.G.Purchase,and J.E. Williams. (Eds). Arnold Printing Cop. Ithaca, NY.

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

Barta, V., W.T. Springer and D.L. Millar. 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 Jr.J.R.Cole 1990. Micrococcus and Staphylococcus. pp. 201-209. In Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 5th ed. Academic Press, California.

Dutta, S.K. and B.S. Pomeroy. 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.

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

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

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

Kawamura, A. 1977. Fluorescent Antibody Techniques and Their Application. 2nd ed. Tokyo University Press, Tokyo. 292 p.

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

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

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

McNamee, P.T., J.J. McCullagh , B.H. Thorp, H.J. Ball, D. Graham, S.J. McCullough, D. McConaghy and J.A. Smyth. 1998. Study of leg weakness in two commercial broiler flock. Vet.Rec.143: 131-135.

McNulty, M.S. 1993. Reovirus, pp. 177-193. In Virus Infection of Birds. McFerran,J.B. and M.S. McNulty.(eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

National Committee for Clinical Standards.1997. Approved Standard M2-Ab. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, 6th ed. NCCLS, Wayne, 26 p.

Olson, N.O. 1980. Viral arthritis, pp.219-225. In Isolation and identification of avian pathogens. Hitchner,S.B., C.H. Domermuth, H.G. Purchase and J.E. Williams.(Eds.) American Association of Avian Pathologists. Arnold Printing Cop. Ithaca,NY.

Rinehart, C.L. and J.K. Rosenberger. 1983. Effect of avian reoviruses on the immune response of chickens. Poult. Sci. 62: 1488-1489.

Rosenberger,J.K. and N.O. Olson. 1997. Viral arthritis, pp. 711-719. In Disease of Poultry.10th ed. Calnek, B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif. (Eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Sahu, S.P. and N.O. Olson.1975. Comparison of the characteristics of avian reoviruses isolated from the digestive and respiratory tract with viruses isolated from the synovia. Am.J. of Vet.Res. 36: 847-850.

Shane, S.M. 1997. Skeletal deformities and arthritis, pp. 132-139. In Handbook on Poultry Diseases. American Soyabean Association (Singapore).

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

Skeeles, J.K. 1997. Staphylococcosis, pp. 247-251. In Diseases of Poultry. 10th ed. Calnek, B.W., Barnes, H.J., C.W. Beard, L.R. McDougald, and Y.M. Saif. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

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

Tanner, A.C. 1994. Antimicrobial drug use in poultry, pp. 507-523. In Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 2nd ed. Prescott, J.F. and J.D. Baggot (eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa.

van der Heide,L. 1977. Viral arthritis/tenosynovitis: a review. Avian Pathol. 6:271-284.

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

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