

การแยกเชื้อรีโอไวรัสในไก่ที่มีการตายเฉียบพลันในไก่ไข่ และการกดภูมิคุ้มกันชนิดชั่วคราวต่อวัคซีนป้องกัน โรคนิวคาสเซิล

Avian Reovirus Infection Associated with Sudden Death in Laying Chickens and Transient Immune Suppression to Newcastle Disease Virus Vaccination

ชื่องมาศ อันตรเสน¹ นฤพล พร้อมขุนทด¹ วันดี คงแก้ว¹
พรทิพย์ พรหมเมือง¹ ลัดดา ตรงวงศา² และ ไพรสน พรหมเมือง¹
Chongmas Antarasena¹ Naruepol Promkuntod¹ Wandee Kongkaew¹
Porntip Prommuang¹ Ladda Trongwongsa² and Praisorn Prommuang¹

Abstract

Forty seven-day-old, New hubbard-type laying chickens from a commercial flock in Tung yai district Nakhon si thammarat province, exhibited sudden death with bursal atrophy. The morbidity and mortality rates were identical, 7.93% (119/1,500). The affected flock had been administered with Newcastle disease vaccine at 17 days of age. Pieces of bursa, kidney, liver, spleen, myocardium, trachea with lung and rectum were taken from necropsied birds and inoculated separately onto chick embryo liver (CELi) cells. A characteristic cytopathic effect (CPE) of rounding and pleomorphic syncytium formation was apparent in the first and second passages 2-4 days after inoculation. The infectious agent was isolated from all of the organs examined and could not agglutinated chicken red blood cell. Indirect immunofluorescence assay and transmission electron microscopy were used to confirm the presence of the isolated virus. The results

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ อำเภอยะรัง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110.

Southern Veterinary Research and Development Center, Tung song, Nakhon si thammarat 80110, Thailand

² สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900.

National Institute of Animal Health, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

showed that avian reovirus was the causative agent of the disease and designated NK 548/44.

Newcastle disease virus (NDV) haemagglutination inhibition (HI) test was carried out to determine the post-vaccinated immune response of the affected flock. Serum samples were taken on five occasions for ND-HI titer measurement; the first bleed was 17 days after the onset of the disease, the second and the third were at 14 and 36 days after the first bleed. The geometric mean HI titers (GMTs) were $2.25(\pm 1.887)\log_2$ (1:4.76), $7.583(\pm 0.504)\log_2$ (1:191) and $1.478(\pm 1.039)\log_2$ (1:3.07) respectively. At 103 days of age, the chickens were revaccinated (vaccination schedule) and sera were titrated for NDV antibodies at 15 and 29 days later. The GMTs were $6.64(\pm 1.036)\log_2$ (1:99.69) and $6.00(\pm 1.225)\log_2$ (1:64) respectively. The results support the concept that avian reovirus induced transient immune suppression of chickens.

Key words : laying chickens, avian reovirus, immune response, ND-HI titer.

บทคัดย่อ

ไก่ไข่พันธุ์นิวฮัมบาร์ด อายุ 47 วัน จากฟาร์มเลี้ยงไก่แห่งหนึ่งในอำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช แสดงอาการตายกระทันหัน มีอัตราการป่วยและการตายเท่ากัน คือ 7.93% (119/1,500) ไก่ฝูงนี้ได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลเมื่ออายุ 17 วัน ทำการผ่าซากไก่ป่วย เก็บตัวอย่างอวัยวะภายใน ได้แก่ ต่อมเบอริช่า ไต ตับ ม้าม กล้ามเนื้อหัวใจ หลอดลมรวมปอด และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย เพื่อนำไปแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงตับของเอ็มบริโอไก่ (chick embryo liver cells , CELi) ตรวจพบพยาธิสภาพของเซลล์เป็นแบบ syncytium formation จากทุกอวัยวะที่ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสที่แยกได้ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของไก่เกาะกลุ่มกัน ทำการตรวจยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน ผลการชันสูตรโรคทั้ง 3 วิธี แสดงว่าไก่ป่วยเนื่องจากติดเชื้อ avian reovirus เรียกเชื้อไวรัสที่แยกได้ว่า NK548/44

จากการตรวจการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ระดับ haemagglutination inhibition (HI) titers ต่อเชื้อไวรัสโรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus, NDV) เป็นตัวชี้วัด โดยทำการเจาะเลือดไก่ร่วมฝูง รวมจำนวน 5 ครั้ง ครั้งแรกในวันที่ 17 หลังไก่แสดงอาการป่วย ครั้งที่ 2 และ 3 ห่างจากครั้งแรก 14 และ 36 วัน ตรวจพบระดับ ND-HI titers เท่ากับ $2.25(\pm 1.887)\log_2$ (1:4.76), $7.583(\pm 0.504)\log_2$ (1:191) และ $1.478(\pm 1.039)\log_2$ (1:3.07) ตามลำดับ เมื่อไก่มีอายุได้ 103 วัน ให้วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลตามกำหนด ต่อมาในวันที่ 15 และ 29 หลังทำวัคซีนครั้งที่ 2 เจาะเลือดไก่ตรวจวัดระดับ ND-HI titers เท่ากับ $6.64(\pm 1.036)\log_2$ (1:99.69) และ $6.00(\pm 1.225)\log_2$ (1:64) ตามลำดับ การศึกษานี้บ่งชี้ว่าการติดเชื้อ avian reovirus มีผลลดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มโรคของไก่แบบชั่วคราว

คำสำคัญ : ไก่ไข่, เชื้อ avian reovirus, การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน, ระดับ ND-HI titers

คำนำ

เชื้อ avian reovirus (ARV) เป็น double-stranded RNA virus จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae พบเชื่อนี้ในหลายประเทศทั่วโลกที่มีอุตสาหกรรมเลี้ยงไก่และไก่วง ทั้งในทวีปยุโรป อเมริกา และออสเตรเลีย (Rosenberger and Olson, 1997) เชื้อ ARV เป็นสาเหตุสำคัญของโรคข้อและเยื่อข้ออักเสบในไก่ (viral arthritis/tenosynovitis) (van der Heide, 1977; Robertson and Wilcox, 1986) และยังก่อให้เกิดโรคในอวัยวะหลายระบบของร่างกาย เช่น กล้ามเนื้อหัวใจและเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Tang *et al.*, 1987) ลำไส้อักเสบ (Dutta and Pomeroy, 1967) โรคในระบบทางเดินหายใจ (McNulty, 1993) เป็นสาเหตุการตายเฉียบพลันในลูกไก่กระทง (Bagust and Westbury, 1975) เป็นสาเหตุหรือสาเหตุร่วมของภาวะการดูดซึมอาหารผิดปกติ (malabsorption syndrome) (Hieronymus *et al.*, 1983) เชื้อ ARV ยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) อีกด้วย Montgomery *et al.* (1985; 1986a) ศึกษาพบว่าเชื้อ ARVs หลายสเตรนที่แยกได้จากไก่ที่แสดงอาการป่วยในหลายกลุ่มอาการ เมื่อทดลองฉีดเชื้อไวรัสดังกล่าวเข้าลูกไก่อายุ 1 วัน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันทั้งโครงสร้างและหน้าที่ กล่าวคือ ตรวจพบต่อมเบอริชามีขนาดเล็กลง (bursal atrophy) ส่วนม้ามมีขนาดโตขึ้น (splenomegaly) และมีการตอบสนองของระดับ ND-HI titers ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แต่การเปลี่ยนแปลงที่พบจะเป็นแบบชั่วคราว (transient) ดังนั้นเชื้อ ARV จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ในไก่ นอกจากนี้ยังแยกเชื้อ ARV

ได้จากไก่ปกติแสดงถึงการติดเชื้อไวรัสแบบไม่แสดงอาการ (subclinical infection) เมื่อมีการติดเชื้อจุลชีพอื่น ๆ แทรกซ้อน เช่น เชื้อ *E. coli*, *Mycoplasma synoviae*, เชื้อ infectious bursal disease virus (IBDV) และเชื้อ chicken anemia agent (CAA) ตลอดจนเชื้อโปรโตซัว เช่น เชื้อบิด (coccidia) เชื้อ ARV ที่แอบแฝงอยู่ในร่างกาย (latent infection) จะเป็นสาเหตุทำให้ภาวะของโรครุนแรงเพิ่มขึ้น (McNulty, 1993)

ในการแยกเชื้อ ARV อาจใช้ไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น เซลล์เพาะเลี้ยงไตไก่ (chicken kidney cells, CKC) หรือเซลล์เพาะเลี้ยงตับของเอ็มบริโอไก่ (chick embryo liver cells, CELi) (Guneratne *et al.*, 1982; Rosenberger *et al.*, 1998) ส่วนการพิสูจน์ชนิดของเชื้อไวรัส นั้น อาจใช้การตกตะกอนในเนื้อวุ้น (agar gel precipitation test, AGPT) หรือวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ทั้งชนิด direct และ indirect methods ก็ได้ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ ARV มี group-specific antigen ร่วมกันจึงเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) ระหว่างเชื้อ ARV แต่ละสเตรน (Kawamura and Tsubahara, 1966) ส่วนอวัยวะที่ใช้ในการแยกเชื้อไวรัส นั้น สามารถแยกเชื้อไวรัสได้จากอวัยวะหลายส่วนของร่างกาย ได้แก่ ต่อมเบอริช่า ตับ ม้าม ลำไส้เล็ก ไต กล้ามเนื้อหัวใจ และเยื่อข้อ (synovium) ในกรณีที่พบรอยโรคที่ข้อและเยื่อข้อ (Rosenberger *et al.*, 1998; Czekaj *et al.*, 1999)

ในประเทศไทยจิโรจและราตรี (2531) ตรวจพบภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ ARV โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay ในฟาร์มพ่อ-แม่พันธุ์ไก่กระทง, ไก่ไข่ และไก่กระทง ซึ่งมีประวัติไก่ขาพิการ กระดูกพรุน มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและไม่

humidity) ที่อุณหภูมิ 37°C นำมาใช้เพื่อแยกเชื้อไวรัสเมื่อเซลล์มีอายุ 3 วัน

อิมมูนิซั่มและคอนจูเกตโกลบูลิน

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

การแยกเชื้อไวรัส

ทำการแยกเชื้อไวรัสใน CELi cells โดยนำตัวอย่างที่เตรียมขึ้นได้แก่ supernatant ของต่อมเบอร์ซ่า ม้าม ตับ ไต กล้ามเนื้อหัวใจ ปอดรวมหลอดลม และลำไส้ส่วนปลาย เพาะแยกเชื้อใน CELi cells หลุมละ 0.3 มล. ตัวอย่างละ 3 หลุมอบในตู้อบ (5% CO₂, 90% humidity) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชม. เติมหอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fetal calf serum 1% ออบต่อในตู้อบ ตรวจพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect, CPE) ทุกวันนาน 7 วัน

เมื่อตัวอย่างใดตรวจพบ CPE ประมาณ 50-80% เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ นำไป freeze and thaw 1 ครั้ง นำ culture fluid ทดสอบการเกาะกลุ่มกัน (haemagglutination test) กับเม็ดเลือดแดงของไก่ที่มีความเข้มข้น 0.5 % แล้วเพาะเชื้อไวรัสต่อใน CELi cells ชุดใหม่อีก 3 ครั้ง ส่วนตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ CPE ในการเพาะเชื้อครั้งแรก เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์ในวันที่ 7 หลังเพาะแยกเชื้อ เพื่อนำไปเพาะแยกเชื้อไวรัสใน CELi cells อีก 2 ครั้ง (blind passage) ก่อนตัดสินว่าตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในตัวอย่างนั้น

การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะภายในได้แก่ ปอด, ตับ, หัวใจ และไตไก่ป่วยทั้งสองตัว เพาะแยกเชื้อบน blood agar และ MacConkey agar อบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 18-24 ชม. ตรวจการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

การตรวจโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

1. นำต่อมเบอร์ซ่าไตและม้ามของไก่ป่วยทั้ง 2 ตัว ตรวจหาเชื้อ infectious bursal disease virus (IBDV) โดยวิธี direct FA test ตามวิธีการของซ็องมาศและนิมิตร (2536)

2. ตรวจยืนยันการติดเชื้อ avian reovirus ใน infected CELi cells โดยเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้จากแต่ละอวัยวะของไก่ป่วยใน CELi cells 2 ครั้ง เมื่อตรวจพบการเกิด CPE ประมาณ 50% นำเซลล์ที่เลี้ยงบน coverglass ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แช่ใน acetone นาน 10 นาที จากนั้นนำ coverglass มาตรวจโดยวิธี indirect FA test โดยย้อมตัวอย่างด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อเชื้อ ARV สเตรณอ้างอิง S1133 และ rabbit anti-chick IgG FITC ตามวิธีการของ Kawamura (1977) ตรวจการติดเชื้อไวรัสด้วยกล้องฟลูออเรสเซนซ์

การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน

ทำการตรวจลักษณะพยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) ที่ติดเชื้อไวรัสโดยนำ infected CELi cells ที่เลี้ยงบน coverglass และ inoculate เชื้อไวรัสที่แยกได้จากแต่ละอวัยวะและเพาะเลี้ยงใน CELi cells มาแล้วจำนวน 2-3 ครั้ง เมื่อตรวจพบการเกิด CPE ประมาณ

50% นำ coverglass ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แช่ใน methanol นาน 5 นาที ย้อมด้วยสี Giemsa นาน 10 นาที ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

สำหรับการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (TEM) เพื่อศึกษารูปร่างและลักษณะของเชื้อไวรัสที่แยกได้ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้จากต่อมเบอริช่า (passage ที่ 4) ใน CELi cells เพาะเลี้ยงนาน 18-20 ชม. เกิด CPE ประมาณ 50% ล้าง infected cells ด้วย phosphate buffer (pH 7.4) ที่ 4°C 3 ครั้ง fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde และ 1% osmium tetroxide ที่ 4°C ตามลำดับ ผ่านขบวนการ dehydration ด้วย alcohol series จากนั้น infiltrate และ embed ด้วย epon mixture เพื่อทำเป็นบล็อก ตัดตัวอย่างให้ได้ขนาด 700Å ย้อมด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (JEOL model TEM-1200) วัดขนาดของอนุภาคไวรัสบนรูปถ่ายภาพจากกล้อง TEM

การตรวจการตอบสนองของ humoral immunity ต่อเชื้อ NDV

ทำการเจาะเลือดไก่รวมฝูงจากเส้นเลือดดำที่ปีก (wing vein) จำนวน 5 ครั้งๆ ละ 25 ตัวๆ ละ 2 มล. ครั้งแรกในวันที่ 17 หลังพบไก่ในฝูงป่วยและตาย ครั้งที่ 2 และ 3 ห่างจากครั้งแรก 14 และ 36 วันตามลำดับ (ไก่อายุ 64, 78 และ 100 วัน หรือหลังทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลครั้งแรก 47, 61 และ 83 วันตามลำดับ) เมื่อไก่ในฝูงทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลครั้งที่สอง ที่อายุ 103 วันทำการเจาะเลือดอีก 2 ครั้ง ในวันที่ 15 และ 29 หลังทำวัคซีน (ไก่อายุ 118 และ 132 วัน ตาม

ลำดับ) นำซีรัมไก่ที่ได้ทั้ง 5 ครั้ง ตรวจระดับแอนติบอดีต่อเชื้อ NDV โดยวิธี microtiter HI test ตามวิธีการของ Shortridge *et al.* (1982) โดยใช้เชื้อ NDV สเตรน F เป็นแอนติเจน

นำผลการตรวจ ND-HI titer (\log_2 HI titer) ที่ได้คำนวณค่า Geometric mean titers (GMTs) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (\pm SD) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ย \log_2 HI titer ของครั้งที่ 1 กับครั้งที่ 2 และครั้งที่ 4 กับครั้งที่ 5 ด้วยวิธี Student's t-test

ผล

ผลการผ่าซากไก่ป่วย

จากการผ่าซากตรวจอวัยวะภายใน พบต่อมเบอริช่ามีขนาดเล็กลง (bursal atrophy) และปอดมีเลือดคั่ง (congestion) ในไก่ป่วยทั้งสองตัว

ผลการแยกเชื้อไวรัส

จากการนำตัวอย่างน้ำใส (supernatant) ที่เตรียมจากอวัยวะหลายส่วนของไก่ป่วยทั้งสองตัวเพาะแยกเชื้อไวรัสใน CELi cells พบว่าในวันที่ 2-4 หลังทำการแยกเชื้อไวรัส เซลล์ดับของเอ็มบริโอที่หยอดตัวอย่างที่เตรียมจากต่อมเบอริช่า ม้าม ตับ กล้ามเนื้อหัวใจ ปอดรวมหลอดลม และลำไส้ ส่วนปลาย เกิดพยาธิสภาพของเซลล์ (CPE) เป็นแบบ syncytium formation (Figure 1) เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อและ infected cells ไป freeze and thaw และเพาะเลี้ยงต่อใน CELi cells ใน passage ที่ 2 ตรวจพบ CPE เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชม. หลังเพาะเชื้อ ซึ่งต่อมาจะลอกหลุด พบ giant cells ลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน CELi cells

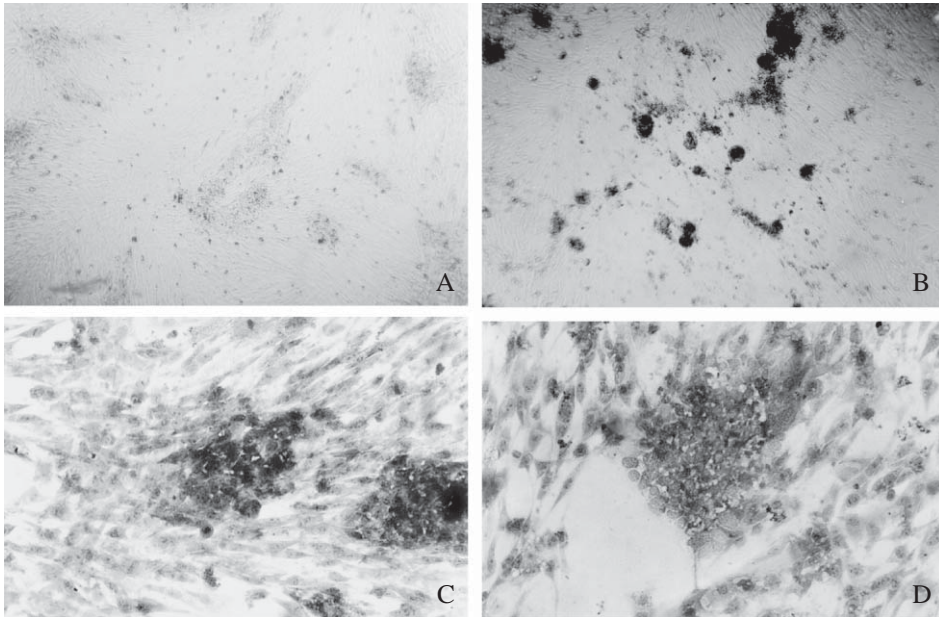


Figure 1 Syncytium formation induced by avian reovirus, a field isolate named NK 548/44 in CELi cell monolayers. (A and C) uninfected cells, (B and D) infected cells. (bottom row) The cell monolayers were fixed with methanol at 20 hr. post-inoculation and stained with Giemsa.

ที่เพาะเลี้ยงตัวอย่างจากไต ตรวจไม่พบ CPE ใน passage แรก เมื่อทำ blind passage ต่อใน CELi cells ตรวจพบ CPE แบบ syncytial ใน passage ที่ 2 ในวันที่สองหลังหยอดเชื้อ เชื้อไวรัสที่แยกได้จากทุกอวัยวะไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของไก่เกาะกลุ่มกัน เรียกเชื้อไวรัสที่แยกได้ว่า NK548/44

เมื่อตรวจลักษณะของ syncytial cells ที่ย้อมด้วยสี Giemsa พบว่าผนังเซลล์ทับหลายไปเกิดการรวมตัวเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ภายในประกอบด้วยนิวเคลียสจำนวนมากอยู่ตรงกลาง (multinucleated giant cells) (Figure 1D)

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรีย

จากการนำตัวอย่างปอด, ตับ, หัวใจ และไต ไก่ป่วยทั้งสองตัว เพาะแยกเชื้อแบคทีเรียบน blood

agar และ MacConkey agar ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด

ผลการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

จากการตรวจการติดเชื้อ IBDV ในเนื้อเยื่อของต่อมเบอรัช่า ม้าม และไตของไก่ป่วยทั้งสองตัว ปรากฏว่าตรวจไม่พบเชื้อ IBDV โดยวิธี direct FA test เมื่อนำ infected CELi cells ตรวจยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect FA test พบการเรืองแสงของเชื้อ avian reovirus ใน cytoplasm ของเซลล์ดับที่เกิดการรวมตัวกัน โดยพบการเรืองแสงของกลุ่มอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นเม็ดมีขนาดต่างกันกระจายอยู่บริเวณใกล้เคียงกับนิวเคลียส (perinuclear regions) ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส (Figure 2)

ผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดลำแสงส่องผ่าน

จากการนำ infected CELi cells ที่เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสที่แยกได้จากต่อมเบอริชซ่าของไก่ป่วย ตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่านเมื่อตรวจกำลังขยายต่ำ ($\times 10,000$) พบกลุ่มอนุภาคไวรัส (viral clusters) ขนาดต่างๆกระจายอยู่ภายใน cytoplasm บริเวณใกล้เคียงนิวเคลียสของ syncytial cells (Figure 3A) และเมื่อตรวจกำลังขยายสูงขึ้น ($\times 50,000$) พบว่าภายในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยอนุภาคไวรัส (virion) เรียงเป็นแถว (crystalline arrays) มีรูปร่างเป็นหกเหลี่ยม (icosahedral) มี core อยู่ตรงกลาง มี capsid 2 ชั้น ไม่มี envelope และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 nm. (Figure 3B) ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อไวรัสในกลุ่ม Reoviridae

ผลการตรวจการตอบสนองของ humoral immunity ต่อเชื้อ NDV

จากการตรวจการตอบสนองของ humoral immunity ของไก่ร่วมฝูงโดยใช้ระดับ HI titers ต่อเชื้อ NDV เป็นตัวชี้วัด โดยทำการตรวจรวมจำนวน 5 ครั้ง พบว่าค่าเฉลี่ย (\pm SD) ของ ND-HI titers ครั้งแรกและครั้งที่สอง ซึ่งตรวจในวันที่ 17 และ 31 หลังพบไก่ในฝูงป่วยและตาย (ไก่อายุ 64 และ 78 วัน หรือหลังทำวัคซีนป้องกันโรค 47 และ 61 วัน ตามลำดับ) เท่ากับ $2.25(\pm 1.887)\log_2$ (1:4.76) และ $7.583(\pm 0.504)\log_2$ (1:191) ตามลำดับ เมื่อทำการเจาะเลือดครั้งที่ 3 เมื่อไก่อายุ 100 วัน พบว่า ND-HI titers เท่ากับ $1.487(\pm 1.039)\log_2$ (1:3.07) เมื่อไก่ในฝูงทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลครั้งที่สอง ตามกำหนดเมื่ออายุ 103 วัน หลังจากนั้นในวันที่

15 และ 29 หลังทำวัคซีน ทำการตรวจ ND-HI titers พบว่ามีค่าเฉลี่ย (\pm SD) เท่ากับ $6.64(\pm 1.036)\log_2$ (1:99.69) และ $6.00(\pm 1.225)\log_2$ (1:64) ตามลำดับ (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย \log_2 HI titers ของครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่าค่าเฉลี่ย \log_2 HI titers ของครั้งที่ 1 ต่ำกว่าครั้งที่สอง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ส่วนความแตกต่างของค่า \log_2 HI titers ของครั้งที่ 4 และ 5 ซึ่งตรวจหลังทำวัคซีนครั้งที่สอง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.01$)

วิจารณ์

จากผลการชันสูตรไก่ป่วยโดยการแยกเชื้อไวรัสใน CELi cells พิสูจน์เชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect FA test และศึกษาขนาดและรูปร่างของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงว่าไก่ป่วยมีสาเหตุจากเชื้อ ARV ซึ่งเชื้อนี้ก่อให้เกิดโรคได้หลายกลุ่มอาการ ไก่ป่วยรายนี้แสดงอาการตายกระทันหัน ตรวจพบต่อมเบอริชซ่ามีขนาดเล็กลง (bursal atrophy) ลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับรายงานของ Bagust and Westbury (1975) ที่ตรวจพบไก่อายุระหว่าง 14-38 วัน แสดงอาการตายกระทันหันที่ประเทศออสเตรเลีย และตรวจพบรอยโรคที่ต่อมเบอริชซ่าเช่นเดียวกัน เชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น เชื้อ infectious bursal disease virus (IBDV), chicken anaemia agents (CAA) และเชื้อ Marek's disease virus (MDV) ก่อให้เกิดรอยโรคที่ต่อมเบอริชซ่าได้เช่นกัน (อ้างถึงโดย Pastoret *et al.*, 1998) ดังนั้นการแยกเชื้อและพิสูจน์ชนิดของเชื้อไวรัสเพื่อหาสาเหตุที่แท้จริงของโรคจึงเป็นสิ่งสำคัญ

Table 1 Schedule of serum collection and mean ND-HI titers of ARV-infected chickens

	Bleeding time				
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
Age of birds (day)	64	78	100	118	132
Day after NDV vaccination	47 ^(a)	61 ^(a)	83 ^(a)	15 ^(b)	29 ^(b)
Day after onset of the disease	17	31	53	71	85
mean ND-HI titers	2.25(±1.887) ^{(c)*} (4.76) ^(d)	7.583(±0.504)* (191)	1.487(±1.039) (3.07)	6.64(±1.036)** (99.69)	6.00(±1.225)** (64)

Note : (a) day after first NDV vaccination at 17 day-old

(b) day after second NDV vaccination at 103 day-old

(c) mean ND-HI titers expressed as log base 2 (± standard deviation)

(d) reciprocal geometric mean HI titers

* significant at the 0.01 probability level

** not significant

ในการแยกเชื้อ ARV นั้น อาจใช้ไข่ไก่ฟักหรือเซลล์เพาะเลี้ยง เช่น CK cells หรือ CELi cells ก็ได้ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสใน CELi cells เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีความไวสูงต่อการแยกเชื้อ ARV ตรวจพบพยาธิสภาพของเซลล์อย่างรวดเร็วภายใน 24-72 ชม.หลังติดเชื้อไวรัสและยังให้เชื้อไวรัสในระดับสูงอีกด้วย (Guneratne *et al.*, 1982; McNulty *et al.*, 1993) และการยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงยังทำได้ง่ายกว่าและสะดวกกว่าโดยตรวจลักษณะ CPE ที่เกิดขึ้น และทำการยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

เมื่อทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างไก่ป่วยใน CELi cells ตรวจพบ CPE เป็นแบบ syncytium formation โดยเซลล์ตัวกันเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ภายในประกอบด้วยนิวเคลียส

จำนวนมาก (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ van der Heide, 1977; Guneratne *et al.*, 1982; Heggen *et al.*, 2002 เซลล์ที่ติดเชื้อ ARV จะมี inclusion bodies เกิดขึ้นภายใน cytoplasm ของ multinucleated cells โดย inclusion จะมีขนาดไม่เท่ากันขึ้นกับระยะเวลาของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ ถ้าติดเชื้อนานขนาดของ inclusion จะใหญ่และอยู่ใกล้นิวเคลียสของเซลล์ (Tyler and Fields, 1996) เมื่อพิสูจน์ชนิดของเชื้อไวรัสโดยวิธี indirect FA test ตรวจพบลักษณะการเรืองแสงของ inclusion มีลักษณะเป็นเม็ดกระจายอยู่ภายใน cytoplasm ของ syncytial cells (Figure 2) (Robertson and Wilcox, 1986; Nibert *et al.*, 1996) และเมื่อนำ infected cells ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน พบว่าภายใน inclusion ประกอบด้วยอนุภาคไวรัสมี capsid 2 ชั้น ไม่มี

envelope มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 nm. เรียงตัวเป็นแถวแบบ crystalline arrays (Figure 3) เชื้อไวรัสที่แยกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Reoviridae (Glass *et al.*, 1973; Nibert *et al.*, 1996)

จากการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อไวรัสต่อการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือดแดงไก่ ตรวจไม่พบปฏิกิริยา haemagglutination จึงกล่าวได้ว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้ไม่ใช่เชื้อไวรัสโรคนิวคาสเซิล (Shortridge *et al.*, 1982) และสอดคล้องกับรายงานของ Robertson and Wilcox (1986) ที่กล่าวว่าเชื้อ ARV ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของไก่เกาะกลุ่มกัน

ในการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากไก่ป่วยรายนี้ ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย แต่ตรวจพบเชื้อ ARV จากทุกอวัยวะที่ทำการเพาะแยกเชื้อ (ต่อมเบอร์ซ่า

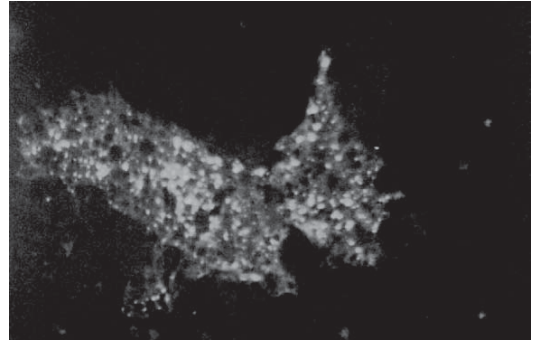


Figure 2 Intracytoplasmic fluorescence of CELi cells 24 hours after inoculation with avian reovirus strain NK 548/44. Indirect fluorescent antibody staining.

ดัม ม้าม ไต หัวใจ ปอดรวมหลอดลม และลำไส้ส่วนปลาย) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jones *et al.* (1989) ที่ทดลองป้อนเชื้อ ARV สเตรน R2 เข้า

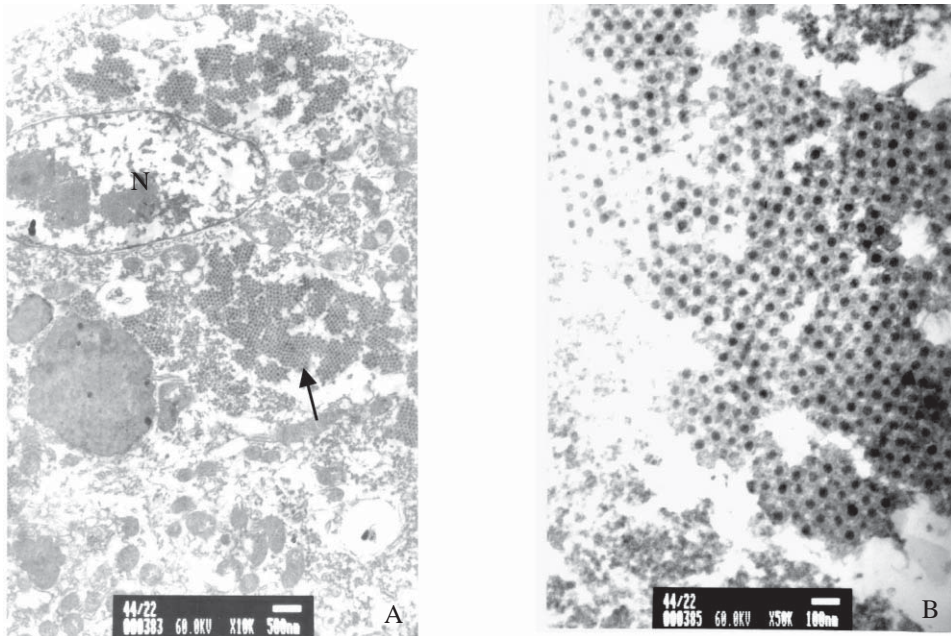


Figure 3 Electron micrograph of ARV-infected CELi cells. (A) Low-magnification ($\times 10,000$) of part of multinucleated cell 20 hr. post-inoculation, with viral inclusions (arrows) in the perinuclear region. (B) Higher magnification ($\times 50,000$) of one of the crystalline arrays of ARV, NK 548/44. (N=nucleus)

ปากลูกไก่อายุ 1 วัน และตรวจพบเชื้อไวรัสได้จากทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา ตั้งแต่วันที่ 2 หลังป้อนเชื้อ ARV โดยพบเชื้อไวรัสในระดับสูงที่ต่อมเบอริช่าตั้งแต่วันที่ 1-2 หลังป้อนเชื้อ จากนั้นไวรัสไตเตอร์จะค่อยๆลดลงแต่ตรวจพบเชื้อได้จนถึงวันที่ 12 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลอง นอกจากตรวจพบเชื้อ ARV ในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษแล้ว ยังตรวจพบเชื้อไวรัสในซีรัมตั้งแต่วันที่ 2-3 หลังหยอดเชื้อ Tang *et al.* (1987) และ Jones *et al.* (1989) กล่าวว่าไก่ที่ได้รับเชื้อ ARV โดยการกินเชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนเป็นครั้งแรก (primary replication) ที่ต่อมเบอริช่าและผนังลำไส้ภายใน 12 ชม.หลังป้อนเชื้อ โดยเชื้อจะผ่าน M cells ที่อยู่บน Peyer's patches ของผนังลำไส้ จากนั้นจะแบ่งตัวใน epithelial cells และเชื้อไวรัสจะเข้าสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะต่างๆของร่างกาย ส่วนที่ต่อมเบอริช่าเชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนใน bursal epithelium และ lymphoid follicles ต่อมาเชื้อไวรัสจึงเข้าสู่กระแสเลือดหรือกระแสน้ำเหลืองไปยังอวัยวะต่างๆของร่างกาย ทำให้เกิดภาวะ viraemia ซึ่งตรวจพบในวันที่ 2-5 หลังติดเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงตรวจพบเชื้อ ARV ได้จากทุกอวัยวะที่ทำการแยกเชื้อ

ต่อมเบอริช่าเป็น central lymphoid organ ที่พบเฉพาะในสัตว์ปีกมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (avian immune system) คือเป็นแหล่งกำเนิดของ B lymphocytes (B cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ผลิต humoral immunity (antibody producing cells) (Pastoret *et al.*, 1998) เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพของต่อมเบอริช่าที่สำคัญได้แก่เชื้อ IBDV และเชื้อ ARV (Sharma *et al.*, 1994) Kerr and Olson (1969) ทดลองพบว่าไก่ที่ติดเชื้อ

ARV จะมีจำนวน lymphocytes ในกระแสเลือดลดลง (lymphopenia) และเกิดการเสื่อมของ lymphoid cells ในต่อมเบอริช่า (lymphoid cells degeneration) Sharma *et al.* (1994) กล่าวว่าเชื้อ ARV ทำให้เกิดรอยโรคชนิดเนื้อตาย (necrosis) ของต่อมเบอริช่า ผลที่เกิดตามมาภายหลังต่อมเบอริช่าถูกทำลายคือการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในส่วนของ humoral immunity บกพร่อง และเกิดการกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบต่อมเบอริช่ามีขนาดเล็กลง และจากการชันสูตรโรคตรวจไม่พบเชื้อ IBDV ในต่อมเบอริช่า โดยวิธี FA test และจากการเพาะแยกเชื้อไวรัสใน CELi cells ตรวจพบเชื้อ ARV จากต่อมเบอริช่าและอวัยวะอื่นๆทุกอวัยวะที่ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัส และเมื่อศึกษาการตอบสนองของ humoral immunity ไก่ร่วมฝูง โดยใช้ระดับ ND-HI titers เป็นตัวชี้วัดและทำการตรวจจำนวน 5 ครั้ง โดย 2 ครั้งแรกตรวจหลังการเป็นโรค 17 และ 31 วัน ตามลำดับ พบว่าระดับ HI titers ครั้งแรกจะต่ำกว่าครั้งที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ทั้งนี้เนื่องจากจากการตรวจครั้งแรก ไก่ยังอยู่ในระยะภูมิคุ้มกันถูกกดจากสาเหตุการติดเชื้อ ARV และเมื่อไก่หายป่วยระบบภูมิคุ้มกันกลับคืนสู่สภาพปกติ จึงพบว่าระดับ HI titers ที่ตรวจพบครั้งที่สองมีระดับสูงขึ้นตามปกติ ต่อมาภูมิคุ้มกันจากการทำวัคซีนจะค่อยๆลดลง (Alexander, 1997) ดังจะเห็นได้ว่าระดับ HI titers ของการตรวจครั้งที่ 3 ที่ตรวจเมื่อไก่มีอายุได้ 100 วัน เพื่อประเมิน protective immunity ของไก่ในฝูงก่อนทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลซ้ำ (revaccination) ตามกำหนด มี HI titers ระดับต่ำ ระดับ HI titers ของการตรวจครั้งที่สองที่สูงขึ้นนั้นไม่ได้เพิ่มขึ้น

เนื่องจากการติดเชื้อ NDV Rahman *et al.*(2002) ทดลองพบว่าไก่ที่ทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิล เชื้อเป็นสเตรน clone 30 เมื่ออายุ 10 วัน จะตรวจพบระดับ HI titers เท่ากับ 251.52(±60.10) เมื่อไก่มีอายุ 60 วัน และเมื่อไก่มีอายุได้ 120 วันระดับภูมิคุ้มกันจะลดลงโดยมีระดับ HI titers เท่ากับ 50.30(±17.76) Alexander (1997) กล่าวว่า ไก่ที่ติดเชื้อ NDV และรอดตายจะตรวจพบ ND-HI titers .ในระดับสูงได้นานมากกว่า 1 ปี ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเชื้อ ARV เป็นสาเหตุสำคัญของภาวะการกดภูมิคุ้มกันไก่ในฝูงแต่เป็นแบบชั่วคราว ไก่ที่ภูมิคุ้มกันถูกกดจะไวต่อการติดเชื้อจุลชีพและการตอบสนองต่อวัคซีนป้องกันโรคตา (Sharma *et al.*,1994) เมื่อทำการตรวจ HI titers อีก 2 ครั้งหลังทำวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลครั้งที่สองเมื่อไก่มีอายุ 103 วัน พบว่าระดับ HI titers ที่ตรวจครั้งที่ 4 และ 5 ไม่แตกต่างกัน ($P>0.01$) Montgomery *et al.*(1985;1986a) ศึกษาพบว่าเชื้อ ARV หลายสเตรนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของต่อมเบอริช้ำคือทำให้ต่อมเบอริช้ำมีขนาดเล็กลงและยังทำให้การตอบสนองของ ND-HI titers ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ติดเชื้อไวรัส แต่การเปลี่ยนแปลงทั้งโครงสร้างและหน้าที่ของต่อมเบอริช้ำจะเป็นแบบชั่วคราวโดยพบในระยะแรกของการติดเชื้อไวรัส

ไก่ป่วยรายนี้มีระยะเวลาของการเป็นโรคสั้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sharma *et al.* (1994) ที่กล่าวว่าไก่ที่ติดเชื้อ IBDV หรือ ARV จะเป็นโรคแบบเฉียบพลัน (acute disease) ส่วนอาการและความรุนแรงของโรคนั้น ขึ้นกับความรุนแรงของเชื้อไวรัส อายุของสัตว์ป่วย และทางที่เชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกาย ไก่อายุน้อยจะไวต่อการติดเชื้อ

ไวรัสและรุนแรงกว่าไก่อายุมาก (Montgomery *et al.*,1986b; Rosenberger and Olson,1997) ส่วนการควบคุมโรคในฝูงที่พบเชื้อ ARV นั้น เนื่องจากเชื้อ ARV มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมดังนั้นในฝูงที่พบการติดเชื้อไวรัส นอกจากคัดไก่ป่วยทิ้ง ควรใช้ยาฆ่าเชื้อที่มีส่วนประกอบของไฮโอดีน ความเข้มข้น 0.5% กำจัดเชื้อที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อม และป้องกันโรคโดยการทำวัคซีนเชื้อเป็นให้ลูกไก่อายุ 1 วัน หรือทำทั้งชนิดเชื้อเป็นและเชื้อตายให้พ่อ-แม่พันธุ์ เพื่อถ่ายทอดแอนติบอดีทาง yolk จะลดอัตราการตายในลูกไก่ แต่ต้องพิจารณาชนิดของวัคซีนว่าเป็นซีโรไทป์เดียวกับเชื้อไวรัสที่ระบาดในพื้นที่ (Rosenberger and Olson,1997)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Mr.K.T. Lim แห่ง Veterinary Research Institute เมืองอิปรี ประเทศมาเลเซีย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ avian reovirus สเตรนอ้างอิง S1133 และแอนติซีรัมจำเพาะต่อเชื้อ avian reovirus สเตรนอ้างอิง S1133 และคุณสมศักดิ์ อนันต์ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานระบาดวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคใต้ที่ช่วยเก็บตัวอย่างซีรัมไก่.

เอกสารอ้างอิง

- จิโรจ ศศิปรียจันทร์ และราตรี วงษ์วีชรดำรง. 2531. การสำรวจภูมิคุ้มเฉพาะต่อเชื้ออีโรวีไวรัสในไก่. สัตวแพทยสาร. 39(3): 101-103.
 ช้องมาศ อันตรเสน และ นิมิตร เชื้อเงิน.2536.

- การวินิจฉัยโรคกัมโบโรโดยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์เทคนิค. วารสารสงขลานครินทร์. 15(4): 399-408.
- ชื่องมาศ อันตรเสน วิณา เชื้อเงิน และชวพันธุ์ อันตรเสน. 2536. โรคไขลดในไก่ไข่ที่จังหวัด นครศรีธรรมราช. วารสารสงขลานครินทร์. 15(4): 413-421.
- ชื่องมาศ อันตรเสน พรทิพย์พรมเมือง นฤพลพร้อม ขุนทด ลัดดา ตรวงศา ไพโรสน พรมเมือง และสมจิตร์ รุจิขวัญ. 2545. การแยกเชื้อ avian reovirus จากไก่ป่วยในภาคใต้ของประเทศ ไทย. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24(2): 329-340.
- Alexander, D.J. 1997. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa. pp. 541-569.
- Bagust, T.J. and Westbury, H.A. 1975. Isolation of reoviruses associated with diseases of chickens in Victoria. Aust. Vet. J. 51: 406-407.
- Czekaj, H., Samorek-Salamonowicz, E. and Kozdrun, W. 1999. Properties of avian reoviruses isolated from chickens in Poland. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 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.
- 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.
- Heggen-Peay, C.L., Qureshi, M.A., Edens, F.W., Sherrey, B., Wakenell, P.S., Connell, P.H. and Schat, K.A. 2002. Isolation of reovirus from poult enteritis and mortality syndrome and its pathogenicity in turkey poults. Avian Dis. 46: 32-47.
- 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. pp. 13-76.
- Kawamura, A. and Tsubahara, H. 1966. Common antigenicity of avian reoviruses. Natl. Inst. Anim. Health Quart. 6: 187-193.
- Kerr, K.M. and Olson, N.O. 1969. Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis-producing virus. Avian Dis. 13: 729-745.
- McNulty, M.S. 1993. Reovirus. In: Virus Infections of Birds. Elsevier Science Publisher Amsterdam. pp. 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., Dawe, D.L. and Brown, J. 1986a. A comparison between the effect of an avian reovirus and infectious bursal disease virus on selected aspects of the immune system of the chicken. *Avian Dis.* 30(2): 298-308.
- Montgomery, R.D., Villegas, P. and Kleven, S.H. 1986b. 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..
- 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. pp.1557-1596.
- Pastoret, P-P., Griebel, P., Bazin, H. and Govaerts, A. 1998. Avian Immunology. In: *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, London. pp. 73-136.
- Rahman, M.M., Bari, A.S.M., Giasuddin, M. Islam, M.R. and Sil, G.C. 2002. Evaluation of maternal and humoral immunity against Newcastle disease virus in chicken. *International Journal of Poultry Science.* 1(5): 161-163.
- 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. pp. 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 ed., American Association of Avian Pathologists. Rose Printing, Tallahassee, Florida. pp. 207-210.
- Sharma, J.M., Karaca, K. and Pertile, T. 1994. Virus-induced immunosuppression in chickens. *Poultry Sci.* 73: 1082-1086.
- Shortridge, K.F., Allan, W.H. and Alexander, D.J. 1982. Newcastle disease laboratory diagnosis and vaccine evaluation. Hong Kong University Press, Hong Kong. 53 pages.
- Tang, K.N., Fletcher, O.J., and Villegas, P. 1987. Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. *Avian Dis.* 31: 577-583.
- Tyler, K.L. and Fields, B.N. 1996. Reoviruses. In : *Fields Virology*. Volumn 2. 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York. p.1597-1623.
- van der Heide, L. 1977. Viral arthritis/tenosynovitis : a review. *Avian Pathol.* 6: 271-284.