



การพัฒนาเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification สำหรับการตรวจ

ไวรัสฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 สาเหตุโรคอินคลูชันบอดี เฮปาไตติส

สกุณา พัฒนกุลอนันต์¹ สิริลักษณ์ จาละ¹ สุวิมล พันธุ์ดี² ปรีดา เลิศวัชรสารกุล² สิทธิณี กุลประเสริฐศรี^{3,*}

¹ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140 ประเทศไทย

²ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140 ประเทศไทย

³ภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 73140 จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย

บทคัดย่อ: โรคอินคลูชันบอดี เฮปาไตติส (inclusion body hepatitis; IBH) เป็นโรคที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงในลูกไก่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลก ประเทศไทยพบการระบาดของโรค IBH ครั้งแรกในปี ค.ศ. 2007 มีสาเหตุเกิดจากฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจหาฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 ในการศึกษาได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 4 เส้นที่มีความจำเพาะต่อยีน hexon ของฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 ผลการทดสอบพบว่าอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนที่สุด การแปลผลสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าจากการเติม SYBR Green I และไม่พบการทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรมของไวรัส chicken anemia virus (CAV), Newcastle disease virus (NDV), duck plaque virus (DPV), infectious bronchitis virus (IBV) และ egg drop syndrome virus (EDSV) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้อาจตรวจพบไวรัสต่ำสุดที่ 10 copy number/μl ซึ่งมีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ถึง 1000 เท่า การศึกษานี้สรุปได้ว่าเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นเป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค IBH ที่มีสาเหตุมาจากฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงในการทดสอบและแปลผล ประกอบกับเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูงจึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมเป็นอย่างยิ่งกับการปฏิบัติงานภาคสนาม

คำสำคัญ: อินคลูชันบอดี เฮปาไตติส, ฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2, LAMP, ความไว, ความจำเพาะ

* ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2567. 19(1): 1-11.

E-mail address: fvetsnku@ku.ac.th

Development of Loop-mediated Isothermal Amplification for detection of Fowl Adenovirus serotype 2 causing Inclusion body Hepatitis

Sakuna Phattanakunanan¹ Siriluk Jala¹ Suwimon Phundee² Preeda Lertwatcharasarakul²
Sittinee Kulprasertsri^{3,*}

¹Kamphaengsaen Veterinary Diagnostic Center, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Kamphaeng Saen campus
Nakhon Pathom, 73140, Thailand

²Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Kamphaeng Saen campus Nakhon Pathom,
73140, Thailand

³Department of Farm Resources and Production Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University Kamphaeng
Saen campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand

Abstract: Inclusion Body Hepatitis (IBH) is a disease with a high mortality rate in chicks, causing significant devastation to the poultry production industry worldwide. Thailand first encountered an outbreak of IBH in 2007, caused by the fowl adenovirus serotype 2 (FAdV-2). To detect this virus, the study developed a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method using four primers specific to the hexon gene. The optimal results were obtained at a temperature of 63 degrees Celsius for 60 minutes. These results can be interpreted with the naked eye due to the addition of SYBR Green I in reaction mixture, and no reactions were detected with the genetic material of others viruses such as chicken anemia virus (CAV), Newcastle disease virus (NDV), duck plaque virus (DPV), infectious bronchitis virus (IBV), and egg drop syndrome virus (EDSV). The LAMP technique could detect virus levels as low as 10 copies/ μ l, making it 1000 times more sensitive than polymerase chain reaction (PCR) techniques. This study concludes that the LAMP technique is suitable for diagnosing IBH caused by the FAdV-2 virus. It is a simple, convenient, and fast method that does not require expensive equipment for testing and interpreting results. The technique has high specificity and sensitivity, making it ideal for fieldwork.

Keywords: Inclusion body hepatitis, Fowl adenovirus serotype 2 (FAdV-2), Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Sensitivity, Specificity

[#]Corresponding author

บทนำ

ฟาล์วอะดีโนไวรัส (Fowl adenovirus; FAdV) จัดอยู่ในสกุล *Aviadenovirus* วงศ์ *Adenoviridae* มีรูปร่างแบบ icosahedral ไม่มีเยื่อหุ้ม (non-enveloped) ขนาด 70-90 นาโนเมตร จีโนมของไวรัสเป็นชนิดดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) ยาว 43-45 กิโลเบส (Lai *et al.*, 2021) จีโนมถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนที่สำคัญอย่างน้อย 3 ชนิดประกอบด้วย โปรตีน hexon โปรตีน penton และโปรตีน fiber (Sohaimi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018) ไวรัสชนิดนี้สามารถจำแนกโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วสังเกตรูปแบบการตัดที่เกิดขึ้น (restriction enzyme digestion patterns) ออกเป็น 5 สปีชีส์ประกอบด้วย FAdV-A ถึง FAdV-E และเมื่อใช้เทคนิค cross-neutralization และ phylogenetic analysis สามารถจำแนกได้เป็น 12 ซีโรไทป์ (serotype) ประกอบด้วย FAdV-1 ถึง 8a และ FAdV-8b ถึง 11 (Meulemans *et al.*, 2001; Mase *et al.*, 2020) ไวรัสฟาล์วอะดีโนไวรัสแต่ละซีโรไทป์ก่อให้เกิดอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค อาทิเช่น FAdV-4 เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดกลุ่มอาการน้ำสะสมในถุงหุ้มหัวใจ (hydropericardium syndrome; HPS) (Kim *et al.*, 2014; Toroghi *et al.*, 2022) ในขณะที่ FAdV-1, FAdV-11 และ FAdV-8a ถูกระบุว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะบดกร่อน (adenoviral gizzard erosion; AGE) (Ono *et al.*, 2003; Manarolla *et al.*, 2009; Domanska-Blicharz *et al.*, 2011; Garmyn *et al.*, 2018; Mirzazadeh *et al.*, 2019) และโรคอินคลูชันบอดี เฮปาไตติส (inclusion body hepatitis; IBH) พบว่าเกิดจากการติดเชื้อ FAdV-2, 3, 9 และ 11 (สปีชีส์ D) และ FAdV-6, 7, 8a และ 8b (สปีชีส์ E) (Abghour *et al.*, 2019; Mase *et al.*, 2020; Chitradevi *et al.*, 2021; Schachner *et al.*, 2018, 2021).

โรค IBH ก่อให้เกิดอัตราการตายประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ แต่ในกรณีที่ติดเชื้อแบบรุนแรงหรือลูกสัตว์ปีกไม่มีภูมิคุ้มกันที่ได้รับถ่ายทอดมาจากแม่จะพบอัตราการตายที่สูงถึงร้อยละ 30 ภายใน 2-3 วันหลังจากที่พบการระบาด (Schachner *et al.*, 2018) นอกจากนี้ไวรัสยังส่งผลกระทบต่อไก่พ่อแม่พันธุ์ โดยทำให้เปอร์เซ็นต์ไข่ฟักลดลงและลูกไก่ที่เกิดมาอ่อนแอ ลูกไก่ที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่ฟักถ้าไม่ตายก็มักจะตามมาด้วยอาการแคระแกร็น นอกจากนี้ยังมีรายงานระบุว่าไวรัสยังเป็นไวรัสกดภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย ส่งผลให้ไก่ที่ติดเชื้อตอบสนองต่อวัคซีนไม่ดีและมีความไวต่อการติดเชื้อก่อโรคชนิดอื่นก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจตามมา (Songserm, 2007) จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงระบุได้ว่าโรค IBH ถือเป็นโรคระบาดที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกเป็นอย่างมาก ปัจจุบันมีรายงานการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศทั่วโลกได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา อินเดีย จีน ญี่ปุ่น อินโดนีเซียรวมทั้งประเทศไทย (Junnu *et al.*, 2015; Schachner *et al.*, 2018)

ไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์หลักของไวรัสที่มีอยู่ในประเทศนั้น ในประเทศไทยพบการระบาดของโรคนี้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 2007 จากรายงานของ Songserm (2007)ระบุว่าไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค IBH ในประเทศไทยคือฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 (FAdV-2) ในการตรวจหาเชื้อที่เป็นสาเหตุในการก่อโรคสามารถตรวจทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งเป็นการตรวจหา eosinophilic หรือ basophilic intranuclear inclusion body ในเซลล์ตับและเซลล์ตับอ่อน (Songserm, 2007; Junnu *et al.*, 2015) เทคนิค Immunohistochemistry และเทคนิค *in situ* hybridization เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสแอนติเจนหรือตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อในเนื้อเยื่อ (Saifuddin & Wilks, 1991; Kasantikul *et al.*, 2011)

การเพิ่มจำนวนไวรัสและทำไวรัสให้บริสุทธิ์ในเซลล์เพาะเลี้ยงตับชนิดปฐมภูมิ (primary chicken liver cells) โดยสังเกตการเกิด cytopathic effect (CPE) (Sohaimi *et al.*, 2018) ปัจจุบันเทคนิคทางอนุชีววิทยาเริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในการวินิจฉัยหาสาเหตุของโรคโดยเฉพาะเทคนิค PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมและเครื่องมือที่มีราคาแพง เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาสำหรับการตรวจสอบโรคอย่างแพร่หลาย เมื่อเปรียบเทียบเทคนิคนี้กับเทคนิคทางอนุชีววิทยาอื่นซึ่งได้แก่ PCR และ Real-time PCR พบว่าเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่มีความไวความจำเพาะสูงและรวดเร็ว (Notomi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2006) นอกจากนั้นเทคนิค LAMP ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีราคาแพงในการเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาอาศัยเพียงอุณหภูมิเดียวและเทคนิคนี้ยังสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตาเปล่า (visual detection) ด้วยเหตุนี้เทคนิคนี้จึงถือเป็นเทคนิคที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานภาคสนามและเหมาะสมกับห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีความพร้อมในเรื่องของเครื่องมือหรืออุปกรณ์ งานวิจัยฉบับนี้จึงได้พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัส FAdV-2 ที่เป็นสาเหตุก่อโรค IBH

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกและเพิ่มจำนวนไวรัส

นำเนื้อเยื่อของไก่ที่ติดเชื้อ FAdV-2 ที่พบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2550 (Songserm, 2007) มาเพาะแยกเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์ตับชนิดปฐมภูมิที่แยกได้จากตัวอ่อนลูกไก่ (primary chicken embryonic fibroblast; CEF) ซึ่งดำเนินการตามวิธีของ

(Junnu *et al.*, 2015) โดยการดำเนินการเกี่ยวกับสัตว์ปีกป่วยในงานวิจัยฉบับนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการการกักกันการดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ACKU66-VET-021)

การสกัดดีเอ็นเอ และ PCR

นำเชื้อฟาล์วอะดีโนไวรัสที่ผ่านการเพิ่มจำนวนใน CEF มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ FavorPrepTM Viral Nucleic Acid Extraction kit (Flavogen®) โดยปฏิบัติตามคู่มือของชุดสกัด ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการศึกษาซึ่งรายละเอียดการออกแบบไพรเมอร์ระบุในหัวข้อถัดไป ปฏิบัติการประกอบด้วยเอมไซม์ Thermo Scientific Phusion Hot start II High-Fidelity DNA polymerase (ThermoScientific, USA) ทำ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 30 วินาที ต่อด้วยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 35 รอบ โดยปฏิบัติการประกอบด้วย denaturation อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที primer annealing อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อครบจำนวนรอบที่กำหนดปฏิบัติการเข้าสู่ขบวนการของ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR จะถูกนำมาตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยไพรเมอร์ Ade2F3 และ Ade2B3 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่คณะผู้วิจัยออกแบบให้มีความจำเพาะต่อส่วนของยีน hexon ของเชื้อ FAdV-2 ด้วยการวิเคราะห์ multiple alignment โดยอาศัยโปรแกรม Bioedit version 7.0.5.3 จากลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank รายละเอียดของไพรเมอร์ระบุในตารางที่ 1

การโคลนยีน และการสกัดพลาสมิด

วัตถุประสงค์ในการโคลนยีนเพื่อนำโคลนที่ได้ไปใช้ในการทดสอบหาอุณหภูมิ เวลาและ the limit of detection (LOD) ในการทำปฏิกิริยา LAMP ซึ่งขั้นตอนในการทำโดยสังเขปเริ่มจากการนำยีนซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โคลนลง T&A cloning vector ด้วยชุด T&A cloning vector kit (Real Biotech Corp., Taiwan) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ transform เข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 (Sambrook et al., 1989) ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR นำโคลนที่ตรวจสอบแล้วมาเลี้ยงลง LB broth เช้าข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการสกัดพลาสมิดใช้ชุดสกัด FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini kit (Favorgen, Taiwan) โดยปฏิบัติตามวิธีการของชุดสกัด นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis และส่งยีนยืนยันความถูกต้องของยีนด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ 1st base Pte Ltd ประเทศมาเลเซีย (FirstBASE Laboratories, Malaysia) พลาสมิดที่สกัดได้นำมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NANODROP 2000 spectrophotometer (Thermo scientific, Delaware, USA) และนำค่าที่ได้มาคำนวณหา number of copies (<https://www.technologynetworks.com/tn/tools/copynumbercalculator>)

ตารางที่ 1 รายละเอียดของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา LAMP

Prime r name	Sequence (5'-3')
Ade2 F3	GGGTTGAGACAGAGGCCGA
Ade2 B3	CCAATCCGACTTGGTCTGC

Ade2 FIP	CGCGGCAGTCTTGTCTTTAGCGAGACAGT CATCACGGGTCAG
Ade2 BIP	CGCCGCTCTTTCAGGGGTTTTCTGGTCTA AGGCACCCATC

การศึกษาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา LAMP

องค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา LAMP ได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสำหรับใช้ในปฏิกิริยา LAMP โดยในปริมาณ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x Thermopol buffer (New England Biolabs, USA) 1.6mM dNTP, 40pMol Ade2BIP, 40pMol Ade2FIP, 5pMol Ade2B3, 5pMol Ade2F3, 8mM MgSO₄, 0.8M Betaine (Sigma, USA) 8 Units of *Bst* DNA Polymerase large fragment (New England Biolabs, USA) และดีเอ็นเอ 2.5 ไมโครลิตร ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 57, 59, 61, 63, 65 และ 67 องศาเซลเซียส การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาโดยนำองค์ประกอบทั้งหมดมาบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการศึกษาข้างต้นในช่วงเวลาต่างกัันดังนี้ประกอบด้วย 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง gradient PCR thermocycle (Biometra®, USA) ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis และเติม SYBR Green I (Biotium®, USA)

การเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา LAMP กับเทคนิค PCR

การทดสอบความไวในการตรวจสอบโดยเจือจางพลาสมิดที่มียีน hexon ของ FAdv-2 ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10⁸ จนถึง 10⁰ copy number ซึ่งนำไปใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา LAMP ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย

1.5 % agarose gel electrophoresis และเติม SYBR Green I (Biotium[®], USA) และความเข้มข้นเดียวกันนี้ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย pre-denature 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที denature 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที annealing 53 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที extension 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ดำเนินการทั้งหมด 35 รอบและ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP

ตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้สารพันธุกรรมที่สกัดจากตัวอย่างที่ตรวจสอบพบไวรัสที่ก่อโรคในสัตว์ปีกชนิดอื่นประกอบด้วย chicken anemia virus (CAV) Newcastle disease virus (NDV) Duck plaque virus (DPV) Infectious bronchitis virus (IBV) และ egg drop syndrome virus (EDSV) ในการทำปฏิกิริยา LAMP ตรวจสอบผลที่ได้ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis

ผลการศึกษา

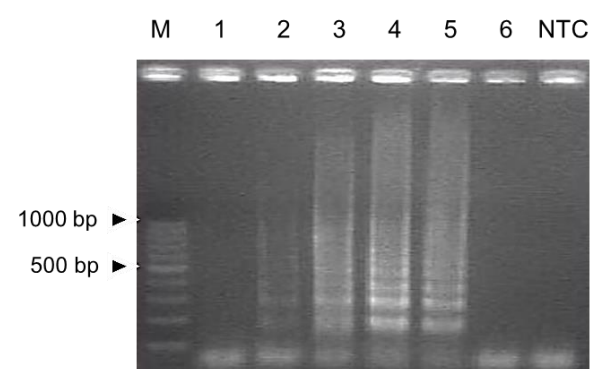
การศึกษาหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทำปฏิกิริยา LAMP

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 57, 59, 61, 63, 65 และ 67 องศาเซลเซียส โดยพบปฏิกิริยาเกิดที่อุณหภูมิ 59, 61, 63 และ 65 องศาเซลเซียสแต่ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสให้ผลที่ชัดเจนกว่าอุณหภูมิอื่นๆ (ภาพที่ 1) ดังนั้นจึงใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP พบแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 30 นาที และแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้นเมื่อเพิ่มเวลา

ในการทำปฏิกิริยา จากการทดลองพบแถบดีเอ็นเอชัดเจนตั้งแต่ 60 นาที (ภาพที่ 2A) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงใช้เวลาที่ 60 นาทีในการทดสอบต่อไปและเมื่อเติม SYBR Green I แล้วตรวจสอบผลภายใต้แสงยูวีพบการเรืองแสงตั้งแต่ 30 นาที (ภาพที่ 2B)

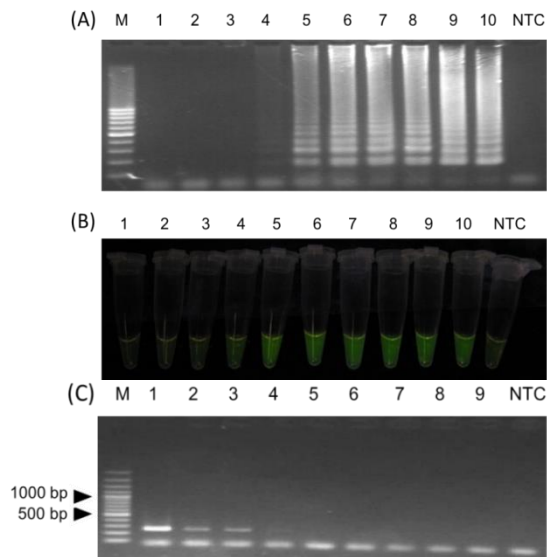
การเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา LAMP กับเทคนิค PCR

การศึกษาเปรียบเทียบความไวจากการทำ LAMP และ PCR โดยใช้พลาสมิดที่มีจำนวน copy number ตั้งแต่ 10^8 เจือจางเป็น 10 เท่าโดยเริ่มตั้งแต่ 10^8 จนถึง 10^0 เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา ในการทำปฏิกิริยา LAMP พบแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 10^8 จนถึง 10^2 (ภาพที่ 3A) แต่เมื่อเติม SYBR Green I แล้วตรวจสอบผลภายใต้แสงยูวีพบการเรืองแสงตั้งแต่ 10^8 จนถึง 10^1 (ภาพที่ 3B) ส่วนการทำปฏิกิริยา PCR พบแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 10^8 จนถึง 10^5 (ภาพที่ 3C) จากการทดลองนี้พบว่า LAMP มีความไวในการตรวจหา FAdV-2 มากกว่า PCR ถึง 1000 เท่า ผลการตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP กับสารพันธุกรรมของไวรัส CAV, NDV, DPV, IBV และ EDSV พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้น (ภาพที่ 4) แสดงให้เห็นว่าวิธีการทำปฏิกิริยา LAMP นี้มีความจำเพาะต่อ FAdV-2

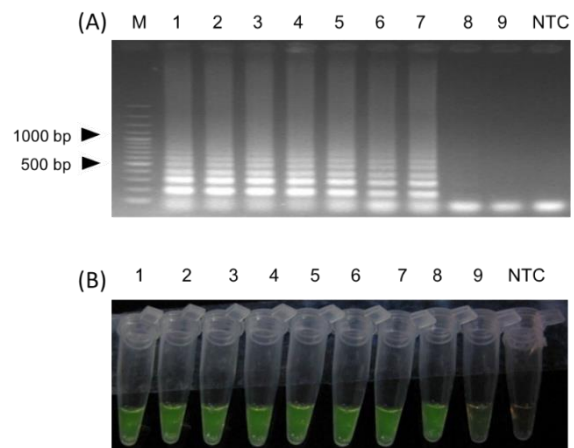


ภาพที่ 1 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจหา Fowl adenovirus serotype 2 ด้วย 1.5% agarose gel

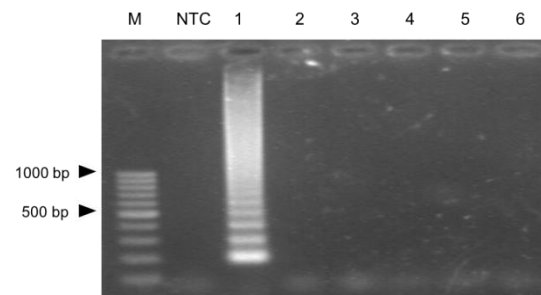
electrophoresis โดย Lane M: 100 bp DNA marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas®); Lane 1-6: ณ อุณหภูมิที่ 57, 59, 61, 63, 65, and 67°C ตามลำดับ; NTC: Non template control



ภาพที่ 2 เวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจหา Fowl adenovirus serotype 2 detection แสดงผลการตรวจสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (A) และผลที่ได้จากการตรวจสอบด้วยตาเปล่าเมื่อย้อมด้วย SYBR Green I dye (B) โดย Lane M: 100 bp DNA marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas®); Lane 1-10: ณ เวลา 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 นาที ตามลำดับ; NTC: Non template control



ภาพที่ 3 ความไวของปฏิกิริยา LAMP และ PCR ในการตรวจหา Fowl adenovirus serotype 2 detection แสดงผลการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ด้วย 1.5 % agarose gel (A) and PCR products (C) และแสดงผลการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ที่ได้ด้วยตาเปล่าเมื่อย้อมด้วย SYBR Green I dye (B); Lane M: 100 bp DNA marker (GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas®); Lane 1-9: Plasmid concentration 10^8 to 10^0 copy number; NTC: Non template control



ภาพที่ 4 ความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจหา Fowl adenovirus serotype 2 detection แสดงผลการตรวจสอบด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis; Lane M: 100 bp DNA marker (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas®); Lane1: DNA ของ Fowl adenovirus serotype 2; Lane 2-6: nucleic acid ของ chicken anemia virus, Newcastle disease virus, duck plaque virus,

infectious bronchitis virus และ egg drop syndrome virus ตามลำดับ; NTC: Non template control

วิจารณ์ผลการศึกษา

โรคอินทูลชันบอดี เฮปาไตติสเป็นโรคที่ก่อให้เกิดอัตราการป่วยและตายที่สูงอย่างเฉียบพลัน โดยเฉพาะในไก่อายุน้อยนอกจากนั้นยังส่งผลเสียต่อฝูงไก่พ่อแม่พันธุ์โดยทำให้เกิดปัญหาไข่ออก ลูกไก่อ่อนแอและแคะแกระ (Saifuddin & Wilks, 1991) ไวรัสนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางไข่ฟัก (vertical transmission) (Grafl *et al.*, 2012) จึงก่อให้เกิดการตายของลูกไก่แรกเกิดอย่างรวดเร็วซึ่งลูกไก่ที่ได้รับไวรัสมาจากไข่ฟักจะเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อในฝูงต่อไปก่อให้เกิดการตายของลูกไก่เป็นครั้งที่ 2 ด้วยเหตุนี้เมื่อพบการระบาดของโรคนี้และไม่สามารถวินิจฉัยและควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพการระบาดของโรคจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องส่งผลเสียต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกเป็นวงกว้าง ดังนั้นการควบคุมและป้องกันโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการวินิจฉัยและระบุสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรคนี้ให้ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการตรวจวินิจฉัยโรคจำเป็นต้องอาศัยการตรวจสอบยืนยันในห้องปฏิบัติการ โดยเทคนิค PCR ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อยังมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการตรวจสอบที่นาน ต้องใช้เครื่องมือและสารเคมีที่มีราคาแพง จำเป็นต้องมีห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อม (Mori *et al.*, 2006) เทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมเนื่องจากปฏิกิริยาเกิดได้โดยใช้อุณหภูมิที่คงที่เพียงอุณหภูมิเดียวในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจึงไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีซับซ้อนและราคาแพงจึงเหมาะกับการนำไปใช้ในภาคสนาม นอกจากนั้นเทคนิคนี้ใช้ไพรเมอร์ 4 เส้นจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ 6 ตำแหน่งในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจึงทำให้มีความจำเพาะและ

ความไวในการตรวจสอบสูง (Notomi *et al.*, 2000) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อหาเชื้อฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 โดยออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีน hexon ที่มีความสำคัญในการติดเชื่อในเซลล์ของโฮสต์และความรุนแรงของเชื้อ (Sohaimi & Hair-Bejo, 2021) โดยยีน hexon มีการรายงานถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างซีโรไทป์ มีการนำมาใช้เพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อและใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อในพื้นที่ต่างๆ (Sohaimi *et al.*, 2018; Mase *et al.*, 2020) ซึ่งความแตกต่างของลำดับเบสของยีนส่วนนี้พบมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาออกแบบไพรเมอร์ในการพัฒนาเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์ 2 ในการศึกษาครั้งนี้ โดยไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ

ผลจากการศึกษาพบว่า เทคนิค LAMP มีความไวกว่าเทคนิค PCR ถึง 1000 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yinur *et al.* (2023) เมื่อเจือจางดีเอ็นเอของเชื้อ 1000 เท่า พบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจได้ แต่เทคนิค PCR ไม่สามารถตรวจสอบได้ (Yinur *et al.*, 2023) และจากรายงานของ Parthiban *et al.* (2004) พบว่าเทคนิค PCR นั้นสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อฟาล์วอะดีโนไวรัสในเนื้อเยื่อได้หลังติดเชื้อ 12 - 24 ชั่วโมง แต่หลังติดเชื้อไปแล้ว 60 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบได้เนื่องจากปริมาณเชือน้อยลง (Parthiban *et al.*, 2004) ดังนั้นเทคนิค LAMP จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อเมื่อมีการติดเชื่อเป็นระยะเวลานานหรือมีปริมาณของเชือน้อย นอกจากเทคนิค LAMP จะมีความไวมากกว่าเทคนิค PCR แล้วนั้นเทคนิคนี้ยังสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า โดยตรวจสอบผลจากความขุ่นที่เกิดจากการที่ pyrophosphate จับกับ magnesium หรือการใช้สารเรืองแสงทำให้การตรวจสอบผลทำได้ง่ายขึ้น (Iwamoto *et al.*, 2003;

Mori *et al.*, 2004) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ SYBR Green I dye เติมลงในหลอดหลังเสร็จปฏิกิริยาสำหรับการช่วยแปลผล ซึ่งสะดวก และมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าการตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การอ่านผลด้วย SYBR Green I dye มีความไวมากกว่าการตรวจสอบด้วย electrophoresis ถึง 10 เท่า แต่อย่างไรก็ตามการเติม SYBR Green I dye ยังต้องมีการเปิดหลอดหลังทำปฏิกิริยาทำให้มีโอกาสเกิดการฟุ้งกระจายของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกเพิ่มจำนวน และทำให้เกิดความเสี่ยงในการปนเปื้อนในการตรวจสอบครั้งต่อไป ปัจจุบันมีการพัฒนาสารที่เป็น indicator เช่น calcein และ hydroxynaphthol blue ซึ่งสามารถเติมในส่วนผสมก่อนทำปฏิกิริยาและจะเปลี่ยนสีถ้ามีการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (Goto *et al.*, 2009) ทำให้สามารถอ่านผลได้อย่างชัดเจนและรวดเร็วโดยไม่ต้องเปิดหลอดหลังเสร็จปฏิกิริยาและช่วยลดการปนเปื้อนภายหลังเกิดปฏิกิริยา นอกจากนั้นอ้างอิงข้อมูลที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ของศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนระบุว่ามีการตรวจพบเชื้อฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์อื่นที่ก่อให้เกิดโรค IBH ได้อีกด้วยอาทิเช่น ซีโรไทป์ 8 เป็นต้น ดังนั้นในอนาคตคณะผู้วิจัยมีความตั้งใจในการพัฒนาเทคนิคนี้เพิ่มเติมเพื่อให้สามารถใช้ในการตรวจสอบฟาล์วอะดีโนไวรัสซีโรไทป์อื่นๆ ที่เป็นสาเหตุก่อโรคนั้นในประเทศไทยได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าเทคนิค LAMP ที่ถูกพัฒนาขึ้นในงานวิจัยฉบับนี้เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูงในการตรวจหาเชื้อ FAdV-2 ได้อย่างสะดวกและจำเพาะ เหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้เป็นชุดตรวจสอบในพื้นที่ เนื่องจากขั้นตอน

การตรวจและการอ่านผลไม่ซับซ้อน รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องขนส่งตัวอย่างเพื่อตรวจในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเทคนิคที่ได้พัฒนานี้สามารถช่วยให้การควบคุมและป้องกันโรคนั้นเป็นไปอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยและขอขอบคุณศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์กำแพงแสน คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาควิชาพยาธิวิทยาและภาควิชาเวชศาสตร์และทรัพยากรการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องของสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ประกอบการทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Abghour, S., Zro, K., Mouahid, M., Tahiri, F., Tarta, M., Berrada, J., & Kichou, F. (2019). Isolation and characterization of fowl avian adenovirus serotype 11 from chickens with inclusion body hepatitis in Morocco. *PLoS ONE*, 14(12).
- Chitradevi, S., Sukumar, K., Suresh, P., Balasubramaniam, G. A., & Kannan, D. (2021). Molecular typing and pathogenicity assessment of fowl adenovirus associated with inclusion body hepatitis in chicken from India. *Tropical Animal Health and Production*, 53(4).
- Domanska-Blicharz, K., Tomczyk, G., Smietanka, K., Kozaczynski, W., & Minta, Z. (2011). Molecular characterization of fowl adenoviruses isolated from chickens with gizzard erosions. *Poultry Science*, 90(5), 983–989.
- Garmyn, A., Bosseler, L., Braeckmans, D., Van Erum, J., & Verlinden, M. (2018). Adenoviral Gizzard

- Erosions in Two Belgian Broiler Farms. *Avian Diseases*, 62(3), 322–325.
- Goto, M., Honda, E., Ogura, A., Nomoto, A., & Hanaki, K. I. (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*, 46(3), 167–172.
- Grafl, B., Aigner, F., Liebhart, D., Marek, A., Prokofieva, I., Bachmeier, J., & Hess, M. (2012). Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion. *Avian Pathology*, 41(6), 599–604.
- Iwamoto, T., Sonobe, T., & Hayashi, K. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2616–2622.
- Junnu, S., Lertwatcharasarakul, P., Jala, S., Phattanakulanan, S., & Monkong, A. (2015). An Inactivated Vaccine for Prevention and Control of Inclusion Body Hepatitis in Broiler Breeders. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 45(1), 16.
- Kasantikul, T. (2011). Development of *In Situ* Hybridization Technique for Detecting Fowl Adenovirus in Chicken Tissues. Ms.D. Kasetsart University.
- Kim, M. S., Lim, T. H., Lee, D. H., Youn, H. N., Yuk, S. S., Kim, B. Y., Choi, S. W., Jung, C. H., Han, J. H., & Song, C. S. (2014). An inactivated oil-emulsion fowl Adenovirus serotype 4 vaccine provides broad cross-protection against various serotypes of fowl Adenovirus. *Vaccine*, 32(28), 3564–3568.
- Lai, V. D., Min, K., Lai, H. T. L., & Mo, J. (2021). Epidemiology of fowl adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013–2019 following introduction of FAdV-4 vaccines. *Avian Pathology*, 50(2), 182–189.
- Manarolla, G., Pisoni, G., Moroni, P., Gallazzi, D., Sironi, G., & Rampin, T. (2009). Short communications adenoviral gizzard erosions in Italian chicken flocks. *Veterinary Record*, 164(24), 754–756.
- Mase, M., Hiramatsu, K., Nishijima, N., Iguchi, H., Honda, S., Hanyu, S., Iseki, H., & Watanabe, S. (2020). Fowl Adenoviruses Type 8b Isolated from Chickens with Inclusion Body Hepatitis in Japan. *Avian Diseases*, 64(3), 330–334.
- Meulemans, G., Boschmans, M., Van den Berg, T. P., & Decaesstecker, M. (2001). Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathology*, 30(6), 655–660.
- Mirzazadeh, A., Asasi, K., Schachner, A., Mosleh, N., Liebhart, D., Hess, M., & Grafl, B. (2019). Gizzard Erosion Associated with Fowl Adenovirus Infection in Slaughtered Broiler Chickens in Iran.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., & Notomi, T. (n.d.). *Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA*.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., & Notomi, T. (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of*

- Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), 145–157.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(12), e63.
- Ono, M., Okuda, Y., Yazawa, S., Shibata, I., Sato, S., & Okada, K. (2003). Outbreaks of adenoviral gizzard erosion in slaughtered broiler chickens in Japan. *Veterinary Record*, 153(25), 775–779.
- Parthiban, M., Manoharan, S., Aruni, A. W., Prabhakar, T. G., Chandran, N. D. J., & Koteeswaran, A. (2004). Usefulness of polymerase chain reaction in early detection and tissue tropism of fowl adenovirus in experimentally infected chicken. *Veterinary Research Communications*, 28(7), 617–622.
- Saifuddin, M., & Wilks, C. R. (1991). Pathogenesis of an acute viral hepatitis: inclusion body hepatitis in the chicken. *Archives of Virology*, 116(1–4), 33–43.
- Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, E. F. (1989). Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 545. https://books.google.com/books/about/Molecular_Cloning.html?hl=th&id=EO2XXwAACAAJ
- Schachner, A., Grafl, B., & Hess, M. (2021). Spotlight on avian pathology: fowl adenovirus (FAdV) in chickens and beyond—an unresolved host-pathogen interplay. *Avian Pathology*, 50(1), 2–5.
- Schachner, A., Matos, M., Grafl, B., & Hess, M. (2018). Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a review on the current global situation. *Avian Pathology*, 47(2), 111–126.
- Songserm, T. (2007). Inclusion body hepatitis. *Journal of Kasetsart Veterinary*, 17: 97–102.
- Sohaimi, N. M., Bejo, M. H., Omar, A. R., Ideris, A., & Isa, N. M. (2018). Hexon and fiber gene changes in an attenuated fowl adenovirus isolate from Malaysia in embryonated chicken eggs and its infectivity in chickens. *Journal of Veterinary Science*, 19(6), 759.
- Sohaimi, N. M., & Hair-Bejo, M. (2021). A recent perspective on fiber and hexon genes proteins analyses of fowl adenovirus toward virus infectivity—a review. *Open Veterinary Journal*, 11(4), 569–580.
- Toroghi, R., Sodavari, S., Tabatabaeizadeh, S. E., Sharghi, A. S., Irankhah, N., Fakhraee, M., Farzin, H. R., Sarani, M., Khayyat, S. H., Ashouri, M., & Torabi, M. (2022). The First Occurrence of Hepatitis-Hydropericardium Syndrome in Iran and Effective Applied Control Measures in the Affected Commercial Broiler Flock. *Avian Diseases*, 66(2), 213–219.
- Yinur, D., Moges, B., Hassen, A., & Tessema, T. S. (2023). Loop mediated isothermal amplification as a molecular diagnostic assay: Application and evaluation for detection of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (O157:H7). *Practical Laboratory Medicine*, 37, e00333.
- Zhang, Y., Liu, R., Tian, K., Wang, Z., Yang, X., Gao, D., Zhang, Y., Fu, J., Wang, H., & Zhao, J. (2018). Fiber2 and hexon genes are closely associated with the virulence of the emerging and highly pathogenic fowl adenovirus 4. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 199.

