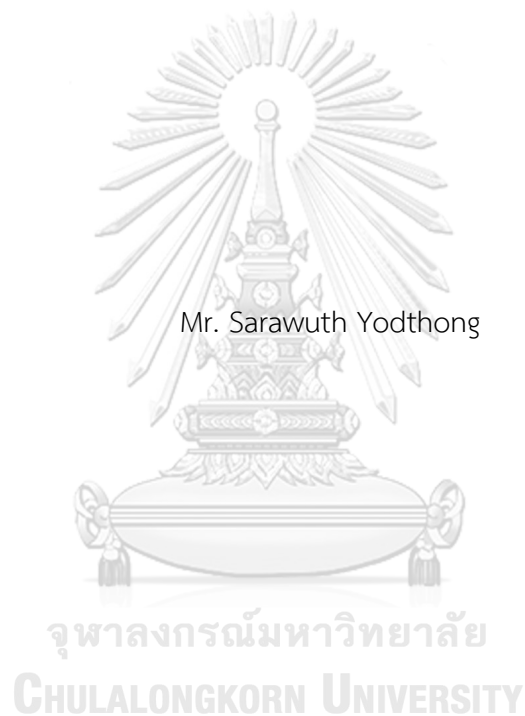


การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ AVIAN ADENOVIRUSES โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อใช้ในงาน
ประเมินคุณภาพวัคซีน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF IN-HOUSE PCR ASSAY FOR DETECTION OF AVIAN ADENOVIRUSES
FOR VACCINE EVALUATION



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

5976755037 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Avian adenoviruses, Fowl adenoviruses, real-time PCR, influenza vaccine, Extraneous agents, nested PCR, Influenza Vaccine

Sarawuth Yodthong : DEVELOPMENT OF IN-HOUSE PCR ASSAY FOR DETECTION OF AVIAN ADENOVIRUSES FOR VACCINE EVALUATION. Advisor: Assoc. Prof. Dr. PALANEE AMMARANOND

The vaccine must be free from extraneous agents to assure safety before administration in humans. The Avian adenoviruses (ADV) is one of the extraneous agents that potentially be contaminated in the Inactivated Influenza vaccine, IIV from the embryonated eggs, which are the raw material in the production process. The current method for detection of ADV in IIV vaccine is *in vitro* cell culture. However, this method can detect only ADV group 1 : Fowl adenovirus (FAV), labor-intensive, and time-consuming. In this study, the nested PCR and real-time PCR were developed and compared to conventional *in vitro* cell cultures assay for detection of ADV. The result revealed that both nested PCR and real-time PCR were specific to ADV group I, FAV serotype 1, 2 and 4, Group II, Hemorrhagic enteritis virus and Group III, Egg drop syndrome. No cross-reaction can be observed with other avian pathogens such as *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, Infectious laryngotracheitis virus, Chicken anemia virus, and Chicken bronchitis virus. The sensitivity of *in vitro* cell culture nested PCR and real-time PCR in detection of the most latent infection; FAV 1 was 10^{-2} , 10^{-8} , and 10^{-18} TCID₅₀/0.1ml, respectively. The real-time PCR demonstrated the specificity and highest sensitivity. It can be implemented to quantitative PCR within the precision range of 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml. It is suitable for evaluating vaccine quality and enhancing the safety of vaccine before use in humans.

Field of Study: Molecular Science of Student's Signature

Medical Microbiology and
Immunology

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาของ รศ.ดร.ปาลณี อัมรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนค่าเล่าเรียนและทุนวิจัย ขอขอบคุณองค์การเภสัชกรรมที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือสำหรับดำเนินการวิจัย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ อ.ดร. ศิริพร จิตแก้ว กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ ผ.ศ. ดร. นาวัน ห่อทองคำ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่กรุณาให้คำแนะนำและสละเวลามาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้เป็นอย่างสูง ขอขอบคุณคณาจารย์ ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และภูมิคุ้มกันวิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำตลอดระยะเวลาการศึกษา ขอขอบคุณกำลังใจจาก น้อง พี ในหลักสูตรฯ ขอขอบคุณบิดา มารดา และน้องสาว ที่ให้กำลังใจ และ ให้การสนับสนุนเสมอมา

ศราวุฒิ ยอดทอง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 คำถามของการวิจัย	7
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
1.4 สมมติฐาน	7
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	8
1.6 ขอบเขตงานวิจัย	9
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	10
2.1 เชื้อไข้หวัดใหญ่และวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่.....	10
2.2 การผลิตวัคซีนไข้หวัดใหญ่.....	12
2.3 การควบคุมคุณภาพวัคซีนไข้หวัดใหญ่.....	13
2.4 เชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนที่ใช้สำหรับมนุษย์	14

2.5	ไข่ไก่ฟักที่ใช้ในการผลิตวัคซีน.....	15
2.6	เชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนและวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝง.....	16
2.7	การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัตถุดิบตั้งต้นและวัคซีน	19
2.8	เชื้อ Avian adenoviruses	24
2.9	การระบาดของเชื้อ Avian adenoviruses	30
2.10	การตรวจและจำแนกเชื้อ Avian adenoviruses ในสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ปีกโดยวิธีดั้งเดิม ..	30
2.11	การจำแนกชนิดของเชื้อ Avian adenoviruses โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	32
2.12	การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	32
2.13	การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	44
2.14	การทดสอบความถูกต้อง (analytical validation) ของวิธีที่ใช้ในการทดสอบยาและวัคซีน	47
บทที่ 3	วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย	49
3.1	เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	49
3.2	โปรแกรม	50
3.3	น้ำยาและสารเคมี.....	50
3.4	ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	52
3.5	การสกัดดีเอ็นเอ.....	53
3.7	ไพรเมอร์สำหรับการวิจัย	54
3.8	การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง.....	55
3.9	การทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง	56
3.10	การทดสอบความไวของการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง.....	57
3.11	การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยวิธี nested PCR.....	58
3.12	การตรวจหาเชื้อโดยวิธี real-time PCR.....	60
บทที่ 4	ผลการทดลอง.....	63

4.1 ไพรเมอร์สำหรับวิธี nested PCR.....	63
4.2 ไพรเมอร์สำหรับวิธี real-time PCR.....	64
4.3 การทดสอบความจำเพาะโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง	66
4.4 การทดสอบความไวโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง.....	68
4.5 การทดสอบความจำเพาะโดยวิธี nested PCR.....	70
4.6 การทดสอบความไวโดยวิธี nested PCR.....	72
4.7 การทดสอบความจำเพาะโดยวิธี real-time PCR.....	75
4.9 การยืนยันผลผลิตดีเอ็นเอจากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี real-time PCR	85
บทที่ 5	86
สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ.....	86
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	86
5.2 สรุปผลการทดลอง	96
ข้อเสนอแนะ	97
บรรณานุกรม.....	99
ภาคผนวก.....	110
วิธีการเตรียม 1X TBE buffer	110
วิธีการเตรียม 1.5 % agarose gel.....	110
ประวัติผู้เขียน.....	111

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Avian adenoviruses(45).....	26
ตารางที่ 2 รูปแบบการพัฒนานิววิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยวิธี PCR.....	41
ตารางที่ 3 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ได้รับการตีพิมพ์.....	43
ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความจำเพาะโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง	68
ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความไวโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง.....	69
ตารางที่ 6 ค่า Ct value และค่า Virus Titer จากการศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR.....	84



สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างของเชื้อ Avian adenoviruses (Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1) ประกอบด้วย capsid protein 10 ชนิด ได้แก่ hexon protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบกันเป็น capsid ที่มีโครงสร้างแบบ icosahedral และ มี penton base อยู่ตรงมุม มี fiber สองแท่ง ต่อ 1 Penton base ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในกลุ่มนี้ โปรตีน pIIIa pVI และ pVIII เป็น capsid protein ที่พบได้น้อย และตั้งอยู่ด้านในของ capsid terminal protein โปรตีน μ โปรตีน VII และ โปรตีน V เป็นโปรตีนที่ยึดติดกับสารพันธุกรรมของไวรัส (40).....	24
รูปที่ 2 โครงสร้างของ hexon protein ของเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 ประกอบด้วย บริเวณอนุรักษ (pedestal : P1 & P2) และ บริเวณที่ความแปรผัน (loop : L1, L2, L3 & L4) (47).....	33
รูปที่ 3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	45
รูปที่ 4 การศึกษา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบโดยวิธี nested PCR (A): external primer; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1: 55°C; lane 2: 56°C; lane 3: 57°C; lane 4: 58°C; lane 5: 59°C; lane 6: 60°C; (B): internal primer; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1: 55°C; lane 2: 56°C; lane 3: 57°C; lane 4: 58°C; lane 5: 59°C; lane 6: 60°C.....	64
รูปที่ 5 การศึกษา annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบโดยวิธี real-time PCR A-1 : amplification plot (Ta=55°C); B-1 : amplification plot (Ta=56°C); C-1 : amplification plot (Ta=57°C); D-1 : amplification plot (Ta=58°C); E-1 : amplification plot (Ta=59°C); F-1 : amplification plot (Ta=60°C); A-2: melting curve (Ta=55°C); B-2: melting curve (Ta=56°C); C-2: melting curve (Ta=57°C); D-2: melting curve (Ta=58°C); E-2: melting curve (Ta=59°C); F-2 melting curve (Ta=60°C); เลขยกกำลังที่กำกับเส้นกราฟ แสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย TCID ₅₀ /0.1 ml.....	66
รูปที่ 6 การเกิด cytopathic Effect (CPE) ของ LMH ATCC CRL-2117 ที่มีการติดเชื้อ Avian adenovirus group 1 (A) : CPE (-) ; ไม่เกิด CPE (B) : CPE(+); เกิด CPE (111).....	67

- รูปที่ 7 การเกิด hemagglutination (HA) ระหว่างเชื้อ Avian Adenovirus group I (Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432) กับเม็ดเลือดแดงของหนูแรท (A) : ไม่พบการเกิด hemagglutination; (B): พบการเกิด hemagglutination..... 67
- รูปที่ 8 ผลการศึกษาความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยวิธี nested PCR. ลูกศรแสดงขนาดของ DNA target ขนาด 104 bp ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ external primer (Ex-F1 & Ex-R1) และต่อด้วย internal primer (In-F1 & In-R1) (A): Avian adenoviruses; lane L: DNA Ladder (100 bp); lane 1: FAV 1; lane 2: FAV 2; lane 3: FAV 4; lane 4: HEV; lane 5: EDS; (B): avian pathogens สายพันธุ์อื่น; lane L: DNA Ladder (100 bp); lane 6: MG; lane 7: MS; lane 8: ILV; lane 9: CAV; lane 10: CBV; lane N: NTC 72
- รูปที่ 9 ผลการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus ATCC VR-432) โดยวิธี nested PCR. ลูกศรแสดง DNA target ขนาด 455 bp ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ external primer (Ex-F1 & Ex-R1) (A): Replication 1; (B) Replication 2; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1-13: เรียงลำดับการเจือจางเชื้อ Fowl adenovirus ATCC VR-432 แบบ 10-fold serial dilution ระหว่าง 10^4 - 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml; lane N: non template control; lane L: DNA Ladder (100 bp) 73
- รูปที่ 10 ผลการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus ATCC VR-432) โดยวิธี nested PCR. ลูกศรแสดง DNA target ขนาด 104 bp ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ internal primer (In-F1 & In-R1) (A): Replication 1; (B): Replication 2; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1-13: เรียงลำดับการเจือจางเชื้อ Fowl adenovirus ATCC VR-432 แบบ 10-fold serial dilution ระหว่าง 10^4 - 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml; lane N: non template control; lane L: DNA ladder (100 bp) 74
- รูปที่ 11 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 และ เชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ (others avian virus) FAV1: Fowl adenovirus 1; FAV 2: Fowl adenovirus 2; FAV4: Fowl adenovirus 4; HEV: Hemorrhagic enteritis virus; EDS: Egg Drop Syndrome Virus; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; MS: *Mycoplasma synoviae*; ILV: Infectious laryngotracheitis virus; CAV; Chicken anemia virus; CBV: Chicken bronchitis virus และ NTC: non template control 76
- รูปที่ 12 ผลการทำ melting curve analysis หลังจากทำการศึกษาความจำเพาะโดยวิธี real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 และเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ FAV1:

Fowl adenovirus 1; FAV 2: Fowl adenovirus 2; FAV4: Fowl adenovirus 4; HEV: Hemorrhagic enteritis virus; EDS: Egg Drop Syndrome Virus; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; MS: *Mycoplasma synoviae*; ILV: Infectious laryngotracheitis virus; CAV; Chicken anemia virus; CBV: Chicken bronchitis virus และ NTC: non template control 77

รูปที่ 13 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus ATCC VR-432) เพื่อศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR โดยเรียงลำดับการเจือจางแบบ serial 10 fold dilution ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1ml (A): Experiment 1; (B): Experiment 2; (C): Experiment 3; log: logTCID₅₀/0.1 ml แถบระบุสีและค่า log ที่กำกับอยู่ใต้กราฟแสดงค่า virus titer ของแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏอยู่ในกราฟ 80

รูปที่ 14 ผลการทำ melt curve peak หลังจากการศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR (A-1): melt curve peak ของการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml; (A-2): melt curve peak ของการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml; PCR (B-1): melt curve peak ของการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1; (B-2): melt curve peak ของการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml; PCR (C-1): melt curve peak ของการทดลองที่ 3 ช่วง 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1; (C-2): melt curve peak ของการทดลองที่ 3 ช่วงความเข้มข้น 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml; Tm: melting temperature 83

รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า Virus titer (logTCID₅₀/0.1 ml และ Ct value แกน X แสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อ Fowl adenovirus 1 ในหน่วย logTCID₅₀/0.1ml แกน Y แสดงค่า Ct value (ค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง) โดยสมการเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของเชื้อ Fowl adenovirus 1 และ Ct value เท่ากับ $y = -2.4991x + 31$ และมีค่า R² เท่ากับ 0.9922 84

รูปที่ 16 ผลผลิตดีเอ็นเอจากที่ได้จากการทำ real-time PCR บน agarose gel electrophoresis L: DNA ladder; 1: Fowl adenovirus 1; 2: Fowl adenovirus 2; 3: fowl adenovirus 4; 4: Hemorrhagic enteritis virus; 5: Egg drop syndrome virus; N: non template control; L DNA ladder 85

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

วัคซีนจัดเป็นยาชีววัตถุชนิดหนึ่งที่ใช้สำหรับป้องกันโรค ความปลอดภัยของวัคซีนเป็นปัจจัยสำคัญที่จะต้องพิจารณาก่อนปล่อยผ่านวัคซีนไปใช้กับประชาชน วัคซีนที่ไม่มีความปลอดภัยอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง (AEFI: adverse event following immunization) ที่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ วัคซีนที่พบความผิดปกติแม้เพียงเล็กน้อยจะต้องถูกเรียกคืนจากท้องตลาด (recall) ทั้งรุ่นการผลิต เช่น การให้วัคซีนป้องกันโรคไข้เลือดออก Dengvaxia ของบริษัทซานofiพาสเจอร์ในประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งพบว่าประชาชนได้รับผลข้างเคียงหลังจากได้รับวัคซีนชนิดนี้เป็นจำนวนมาก จนรัฐบาลของประเทศฟิลิปปินส์ต้องประกาศงดการฉีด และระงับการนำเข้าวัคซีนชนิดนี้ พร้อมทั้งเรียกคืนผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ในสถานพยาบาลออกทั้งหมด (1) ด้วยเหตุนี้การนำวัคซีนมาใช้งานจึงจำเป็นต้องผ่านการประเมินอย่างเข้มงวด เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นนั้นจะมีทั้ง คุณภาพ (quality) ประสิทธิภาพ (efficacy) และ ความปลอดภัย (safety) วัคซีนที่นำมาใช้งานในมนุษย์ต้องผ่านการทดสอบความปลอดภัยโดยใช้สัตว์ทดลอง (non clinical study) การศึกษาความปลอดภัยและ ประสิทธิภาพในมนุษย์ (clinical study) ต้องผ่านการประเมินทะเบียนตำรับยา (drug registration) โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหาร จึงจะสามารถจำหน่ายออกสู่ท้องตลาดได้ สำหรับวัคซีนที่ได้รับ อนุญาตให้มีการจำหน่ายแล้วยังคงต้องมีการตรวจติดตามคุณภาพในทุกๆรุ่นการผลิต (lot release) โดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระบวนการทั้งหมดนี้มีไว้เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าผู้บริโภคจะได้รับ ความปลอดภัยสูงสุดจากการได้รับวัคซีน

การตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีน (extraneous agents หรือ adventitious agents test) เป็นการทดสอบด้านความปลอดภัยหนึ่งที่ต้องทำการทดสอบในวัคซีนไข้วัดใหญ่ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตมาจากไข่ไก่ฟัก (egg-derived vaccine) สิ่งที่ต้องเฝ้าระวังเป็นพิเศษในการผลิตวัคซีนจากไข่ไก่ฟักคือการปนเปื้อนของเชื้อจากไก่ลงมาสู่วัคซีน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อปนเปื้อนแฝงจึงต้องมีการควบคุมคุณภาพของไข่ไก่ฟักซึ่งถือเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการเพาะเชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่ โดยไข่ไก่ฟักสำหรับผลิตวัคซีนต้องมาจากแม่ไก่สุขภาพดีซึ่งไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรค Newcastle disease ชนิดเชื้อเป็นมาก่อน มีคุณสมบัติเหมือนหรือใกล้เคียงกับไข่ SPF (specific pathogen free) ซึ่งเป็นไข่ที่มีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อหลายชนิด และมีสถานะการเลี้ยงแบบปิด โดยเชื้อที่ถูกควบคุมมักเป็นเชื้อก่อโรคที่มักพบได้ในไก่ได้แก่ เชื้อ Avian leukosis virus Newcastle disease virus *Mycobacterium avium* *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* เป็นต้น

(2)

นอกจากการควบคุมคุณภาพของไข่ไก่ฟักให้ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อที่กำหนดแล้ว กระบวนการผลิตบางขั้นตอนยังสามารถลดหรือกำจัดเชื้อปนเปื้อนออกไปได้ เช่น ขั้นตอนการทำอนุภาคของไวรัสให้แตกออกเป็นอนุภาคที่เล็กลง (splitting) โดยใช้สารเคมี เช่น ether หรือ triton X-100 เป็นต้น (3) ขั้นตอนการฆ่าเชื้อ (inactivation) เพื่อกำจัดเชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่ที่ยังคงมีชีวิตหลงเหลืออยู่ในวัคซีนออกไป โดยการใช้สารฆ่าเชื้อ (inactivating agents) เช่น β -propiolactone หรือ ฟอรั่มลิตไฮด์ เป็นต้น (3) ซึ่งขั้นตอนการ splitting และ inactivation รวมไปถึงขั้นตอนการกรองแบบปลอดเชื้อด้วย sterile filtration โดยใช้แผ่นกรองปราศจากเชื้อที่มีขนาด $0.22 \mu\text{m}$ ในขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตก่อนทำการบรรจุ เป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่สามารถลดการปนเปื้อนลงได้ เป็นต้น

โดยองค์การอนามัยโลกระบุว่าวัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย ต้องปราศจากเชื้อ Avian leukosis virus Avian adenoviruses และ *Mycoplasma* spp. (2)

อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตที่กล่าวมาแล้วข้างต้น อาจจะไม่สามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนแฝงได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากในขั้นตอน splitting และ inactivation ไม่สามารถใช้สารเคมีที่ความเข้มข้นสูงในระดับที่ทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) ได้ ความเข้มข้นของสารเคมี และ เวลาที่ใช้ในการบ่มนั้น ถูกออกแบบมาให้เพียงพอสำหรับการทำลายอนุภาค และฆ่าเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่ที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ในวัคซีนนั้น แต่ต้องไม่ทำให้ hemagglutinin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันนั้นเสื่อมสภาพไป ซึ่งอาจไม่เพียงพอสำหรับการฆ่าเชื้อชนิดอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในวัคซีนได้ และการกรองปราศจากเชื้อด้วยแผ่นกรองขนาด 0.22 μm ในขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตนั้นไม่สามารถกำจัด เชื้อไวรัส และ เชื้อในกลุ่ม *Mycoplasma* spp. ที่สามารถผ่านแผ่นกรองได้ (4, 5) จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อเหล่านี้ อาจยังคงหลงเหลืออยู่ในวัคซีน

ถึงแม้กระบวนการผลิตจะมีความเข้มงวดแต่ยังมีความเป็นไปได้ที่เชื้อเหล่านี้จะยังคงปนเปื้อนลงมาในวัคซีน โดยปนเปื้อนลงมาในลักษณะของการปนเปื้อนแฝง กล่าวคือมีการปนเปื้อนในระดับต่ำ และตรวจพบได้ยาก ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพ (quality control) โดยการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวโดยจะทำการตรวจตั้งแต่ในขั้นตอนที่เป็นวัตถุดิบ ระหว่างการผลิต (in process) และในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย (finished product) ก่อนนำไปใช้กับผู้บริโภค การตรวจวิเคราะห์เหล่านี้มีไว้เพื่อให้เกิดมั่นใจว่าวัคซีนที่ผลิตขึ้นจะไม่มี การปนเปื้อนจนกลับไปก่อโรคกับผู้ได้รับวัคซีนซึ่งแต่เดิมแล้วเป็นผู้มีสุขภาพดี การทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนเป็นหัวข้อการทดสอบด้านความปลอดภัยที่สำคัญก่อนจำหน่ายวัคซีนออกสู่ตลาด โดยการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงได้ถูกระบุไว้ในทั้ง คู่มือขององค์การอนามัยโลก (2) และ ตำรายาสากล

(pharmacopeia) (6) ซึ่งกำหนดว่าจะต้องทำการทดสอบเพื่อพิสูจน์ให้เห็นว่าวัคซีนนั้นปราศจากเชื้อปนเปื้อนแฝงก่อนนำวัคซีนจำหน่ายออกสู่ท้องตลาด

เชื้อ Avian adenoviruses เป็นเชื้อปนเปื้อนแฝงที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ที่องค์การอนามัยโลกระบุว่าต้องกำจัดออกไปได้ในขั้นตอน inactivation (2) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อนี้มีความทนทานต่อสารเคมี และอุณหภูมิสูง (7) จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อดังกล่าวจะปนเปื้อนแฝงมากับไข่ไก่ฟัก และหลุดรอดไปจนถึงผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายจนส่งผลกระทบต่อประชาชนที่ได้รับวัคซีน เชื้อชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยเชื้อที่พบได้มากที่สุดคือเชื้อในกลุ่มที่หนึ่ง คือเชื้อ Fowl adenoviruses เชื้อที่พบได้รองลงมาคือเชื้อในกลุ่มที่สาม ทำให้เกิดโรคไขสด หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเชื้อ Egg drop syndrome virus ส่วนเชื้อในกลุ่มที่สอง มักก่อโรคในท่านจึงมักเรียกว่าเชื้อ Turkey Hemorrhagic enteritis virus อย่างไรก็ตาม เชื้อในกลุ่มที่สองนี้อาจก่อโรคในไก่ได้เช่นกัน เช่น โรค Marble spleen disease และ Splenomegaly disease เป็นต้น

การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในฟาร์มสัตว์ปีกจะเริ่มต้นโดยการเพาะแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (virus isolation) เมื่อแยกเชื้อออกมาได้แล้ว จะนำเชื้อดังกล่าวไปทำการจำแนกชนิดโดยวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น วิธี microneutralization test เป็นต้น และพบว่าเชื้อในกลุ่มที่หนึ่ง และ สาม สามารถเจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยสามารถเจริญได้ดีในเซลล์ chicken kidney cell หรือ chicken embryo liver cell เป็นต้น ส่วนการเพาะเชื้อในกลุ่มที่สอง นั้นมักไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากเชื้อเจริญได้อย่างจำกัดบนเซลล์เพาะเลี้ยง โดยสามารถเจริญได้บ้างบนเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด lymphoblastoid

การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ซึ่งเป็นเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนไขหวัดใหญ่ในปัจจุบันทำการทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้ตรวจหาเชื้อในฟาร์มสัตว์ปีก อย่างไรก็ตาม

พบว่าวิธีนี้ไม่สามารถหาเชื้อได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่ม และใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน โดยการควบคุมคุณภาพของวัคซีนต้องทำให้เสร็จสิ้นภายในระยะเวลา 6 เดือน นับตั้งแต่วันที่ได้รับเชื้อตั้งต้น (master virus seed) และต้องดำเนินการให้เสร็จสิ้นก่อนที่จะถึงฤดูกาลของการระบาดของไข้หวัดใหญ่ (8) โดยในการทดสอบจำเป็นต้องกำจัดสารเคมีที่ใช้ในการผลิต เช่น triton-X 100 ether ที่ใช้ในขั้นตอนการ splitting และ β -propiolactone หรือ พอร์มัลดีไฮด์ ที่ใช้ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อออกไป ก่อนที่จะนำมาทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงเนื่องจากสารเคมีเหล่านี้อาจเป็นพิษต่อเซลล์และอาจทำให้เซลล์ตายได้ การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง และการเพาะเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงใช้เวลา มากกว่า 1 เดือนขึ้นไป ซึ่งระยะเวลาของการทดสอบ (turnaround time) ไม่สอดคล้องกับกำหนดเวลา (lead time) ที่ใช้ในการทดสอบวัคซีน 1 รุ่นการผลิต คือต้องทำการทดสอบให้แล้วเสร็จภายในระยะเวลาไม่เกิน 30 วัน นับตั้งแต่วันที่ผลิต ทำให้ไม่สามารถนำวัคซีนไปใช้ได้ทันก่อนช่วงที่จะมีการระบาด ทั้งนี้ ยังพบอีกว่าการทดสอบโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง ต้องใช้บุคลากรจำนวนมาก ต้องมีการใช้พื้นที่ปราศจากเชื้อ (cleanroom) และเครื่องมือเฉพาะ เช่น CO₂ incubator ซึ่งต้องเปิดระบบไว้ตลอดเวลา เพื่อรักษาสถานะของการทดสอบ ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน ซึ่งมีผลทำให้ต้นทุนในการผลิต และราคาจำหน่ายวัคซีนเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย

จากการสำรวจชุดทดสอบที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในท้องตลาด พบชุดทดสอบดังนี้ ชุดทดสอบยี่ห้อ Genesig อาศัยหลักการตรวจโดยวิธี real-time PCR สามารถ ตรวจได้เฉพาะเชื้อ Egg drop syndrom (EDS76) ซึ่งเป็นเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่สาม ไม่สามารถตรวจเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่หนึ่ง และกลุ่มที่สองได้ (9) ชุดทดสอบยี่ห้อ Kylt@ (10) มีชุดทดสอบแยกตรวจเชื้อ Avian adenoviruses ในแต่ละกลุ่ม และชุดทดสอบยี่ห้อ Biocheck ใช้ตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ Fowl adenovirus ในกลุ่มที่หนึ่ง เป็นต้น (11) เนื่องจากการตรวจหาเชื้อ

ปนเปื้อนในวัคซีนต้องทำการตรวจหาเชื้อ หรือสารพันธุกรรมของเชื้อโดยตรง วิธีการตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อโรคจึงไม่สามารถนำมาตรวจหาเชื้อปนเปื้อนในวัคซีนได้ ชุดทดสอบที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ ยังไม่มีการจำหน่ายในประเทศไทย หรือ ยกเลิกการจำหน่ายไปแล้ว

ข้อจำกัดของการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน นำมาสู่การพัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ที่อาจปนเปื้อนจากไข่ไก่ฟักลงมาสู่ผลิตภัณฑ์วัคซีนไข้วัดใหญ่ชั้นสุดท้าย โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในตัวอย่างวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายโดยวิธี PCR ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน การทดสอบโดยวิธี PCR จะช่วยลดปริมาณของตัวอย่างวัคซีนที่ใช้ในการทดสอบ ลดระยะเวลาในการทดสอบ (turn-around time) ลดภาระงาน (work load) ของผู้ทดสอบ และ ลดจำนวนคนที่ใช้ในการทดสอบ (man power) ซึ่งการทดสอบโดยวิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses ที่มักมีการปนเปื้อนในปริมาณที่ต่ำได้ เป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือของการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ต้นทุนในการทดสอบลดลง อีกทั้งยังทำให้สามารถปล่อยผ่านวัคซีนได้ก่อนฤดูกาลการระบาด และช่วยเพิ่มความปลอดภัยต่อชีวิตของประชาชนที่มารับวัคซีน

1.2 คำถามของการวิจัย

วิธี nested PCR และ real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส Avian adenoviruses ในตัวอย่างวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย ได้อย่างมีความไว และความจำเพาะหรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

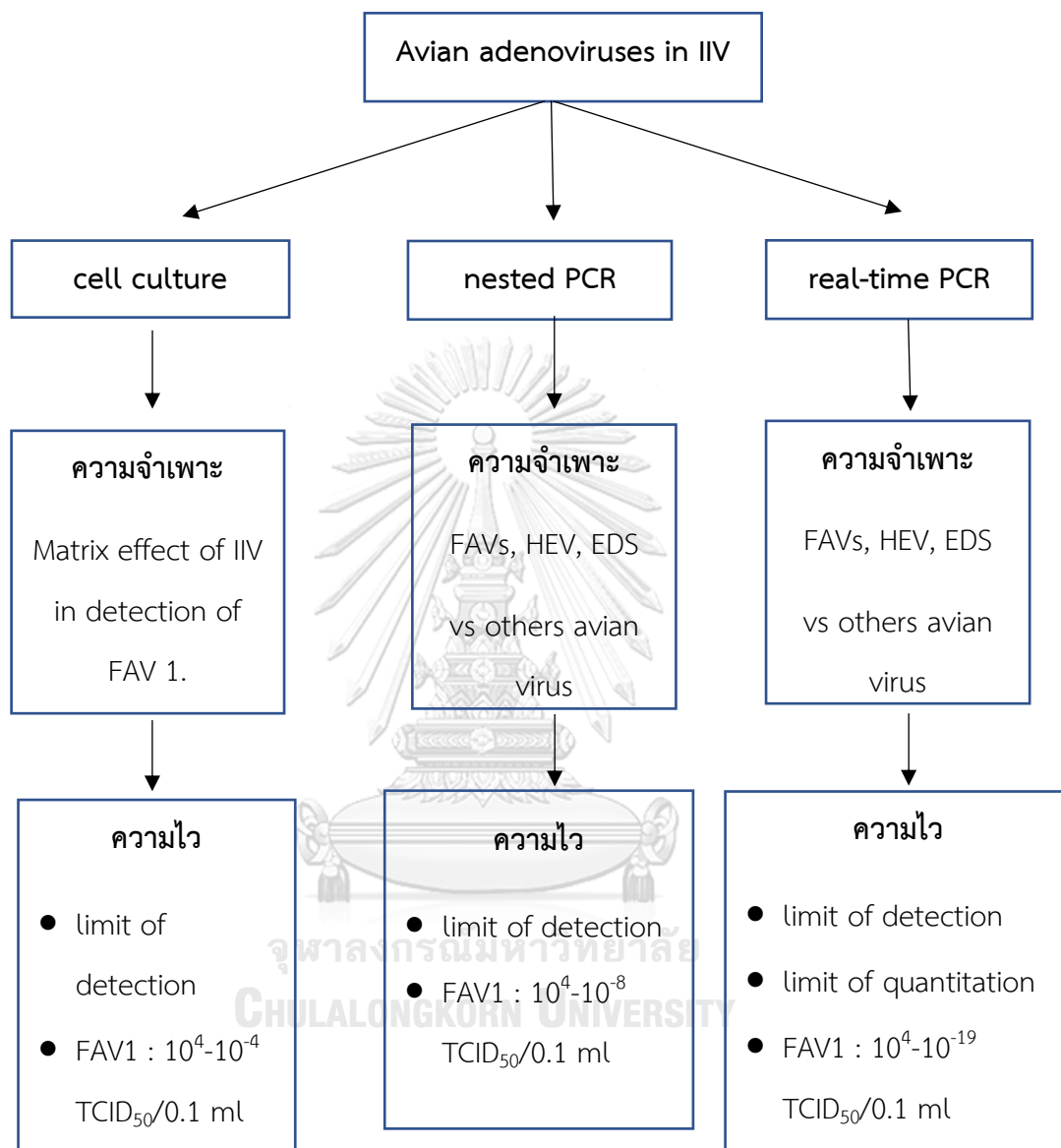
เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ที่ปนเปื้อนแฝงอยู่ในวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย โดยวิธี nested PCR และ real-time PCR

1.4 สมมติฐาน

วิธี nested PCR และ real-time PCR สามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย ได้อย่างมีความไว และความจำเพาะ



1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



หมายเหตุ: IIV; Inactivated Influenza vaccine; FAVs: Fowl adenovirus serotype 1, 2 และ 4; HEV: Hemorrhagic enteritis virus; EDS: Egg drop syndrome; TCID₅₀: Tissue Culture Infectious Dose 50%

1.6 ขอบเขตงานวิจัย

ทำการพัฒนาวิธี nested PCR และ real-time PCR สำหรับตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses สามกลุ่มได้แก่ Fowl adenovirus Hemorrhagic enteritis virus และ Egg drop syndrome ซึ่งเป็น Avian adenoviruses ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ โดยวิธี Spike เชื้อ Avian adenovirus ลงในวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตายที่ผลิตจากไข่ไก่ฟักเพื่อจำลองสภาวะการปนเปื้อนในตัวอย่างจริงและทำการประเมินประสิทธิภาพของวิธีทดสอบในสองพารามิเตอร์ ได้แก่ ความจำเพาะ และความไว

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ที่มีทั้งความไวและความจำเพาะมากยิ่งขึ้น
2. เพิ่มความปลอดภัยของวัคซีนจากวิธีการทดสอบที่มีความไวสูง
3. เพิ่มความเร็วในการทดสอบเพื่อให้สามารถปล่อยผ่านวัคซีนได้ทันก่อนที่จะมีการระบาด
4. ลดปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ในการทดสอบลง
5. ลดแรงงานที่ใช้ในการทดสอบลง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อไข้หวัดใหญ่และวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่จัดอยู่ในตระกูล *Orthomyxoviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด ribonucleic acid (RNA) แบบสายลบ (negative strand) มีจีโนม (genome) แยกออกเป็นท่อน (segments) โดยสายพันธุ์ A และ B มีจีโนมทั้งหมด 8 ท่อน (12) ส่วนสายพันธุ์ C มีจีโนมทั้งหมด 7 ท่อน แต่ละท่อนกำหนดหน้าที่ในการแสดงออกของไวรัสแตกต่างกันออกไป เช่น จีโนมท่อนที่ 4 และ 6 ทำหน้าที่กำหนดการแสดงออกของ hemagglutination (HA) และ neuraminidase (NA) บนเปลือกหุ้ม (envelope) ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ประกอบด้วยสายพันธุ์ A และ B สายพันธุ์ A ก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ สามารถทำให้เกิดไข้หวัดใหญ่ระบาดใหญ่ (pandemic) ได้ ส่วนสายพันธุ์ B ส่วนมากจะก่อโรคเฉพาะในมนุษย์ และทำให้เกิดการระบาดเฉพาะในระดับภูมิภาค (endemic) (13)

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมอยู่เสมอ การเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมเพียงบางจุด (point mutation) อาจทำให้ HA หรือ NA ที่พบบนเปลือกหุ้มของไวรัสเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย เรียกการเปลี่ยนแปลงประเภทนี้ว่า antigenic drift ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ แต่หากมีการแลกเปลี่ยนท่อนจีโนม (reassortant) จนมีผลทำให้ไวรัสนั้นมีสายพันธุ์เปลี่ยนแปลงไป เรียกการเปลี่ยนแปลงประเภทนี้ว่า antigenic shift โดยสันนิษฐานว่า antigenic shift นี้ เกิดจากการติดเชื้อร่วมในเซลล์เดียวกัน (co-infection) ระหว่างเชื้อไข้หวัดใหญ่สองสายพันธุ์ซึ่งมีที่มาจากเจ้าบ้านต่างชนิดกัน เช่น ระหว่าง หมู กับ นกน้ำ (aquatic birds) เป็นต้น การติดเชื้อร่วมมีผลทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนท่อนจีโนม โดยเฉพาะท่อนจีโนมที่กำหนดลักษณะของ

HA และ NA จะมีผลทำให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ในที่สุด (14) ทั้งนี้หากประชาชนส่วนมากไม่มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ใหม่ชนิดนี้มาก่อน จะส่งผลทำให้เกิดการระบาดของเชื้อกลายพันธุ์นี้อย่างรวดเร็ว และทำให้มีการเสียชีวิตเป็นจำนวนมาก เรียกการระบาดชนิดนี้ว่า ไข้หวัดใหญ่ระบาดใหญ่ (pandemic) ดังเช่น ไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์สเปน (Spanish flu) ที่เคยเกิดระบาดใหญ่มาแล้วในปี 1918 และได้คร่าชีวิตผู้คนทั่วโลกไปมากกว่า 50 ล้านคน (15) หรือไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ H1N1 ที่เคยระบาดใหญ่มาแล้วในปี 2009 โดยประมาณการว่าอาจมีผู้เสียชีวิตทั่วโลกรวมกันมากถึงห้าแสนคน (16) จะเห็นได้ว่าการระบาดของวัคซีนไข้หวัดใหญ่ ส่งผลต่อความมั่นคงระดับชาติ (national security) เนื่องจากก่อให้เกิดผลกระทบต่อประชาชนในวงกว้าง และก่อให้เกิดความเสียหายในทุกภาคส่วนไม่ว่าจะเป็นการสาธารณสุข เศรษฐกิจ การท่องเที่ยว จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่รัฐต้องวางแผนเตรียมความพร้อมเพื่อรับมือกับการระบาดที่อาจเกิดขึ้นได้ในอนาคต

วัคซีนเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการป้องกันการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ โดยวัคซีนไข้หวัดใหญ่ที่ให้บริการตามสถานพยาบาลในปัจจุบันประกอบด้วยวัคซีนไข้หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย (Inactivated Influenza Vaccine, IIV) มีทั้งแบบแยกอนุภาค (split virion) หรือ แบบที่มีเฉพาะ hemagglutinin (subunit vaccine) วัคซีนชนิดนี้ใช้สำหรับป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาล (seasonal flu) โดยมีช่องทางการให้วัคซีนผ่านการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular) ในหนึ่งเข็มจะประกอบด้วยเชื้อไวรัส 3 สายพันธุ์ (trivalent) ถึง 4 สายพันธุ์ (quadrivalent) (17) หรือวัคซีนชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (Live Attenuated Influenza Vaccine, LAIV) ที่มักใช้ในกรณีที่เกิดการระบาดใหญ่ และมีช่องทางการให้วัคซีนโดยการพ่นจมูก (nasal spray) อย่างไรก็ตามพบว่ามีการใช้วัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์สำหรับไข้หวัดใหญ่ตามฤดูกาลด้วยเช่นกัน เช่น วัคซีน FluMist® (18) ที่ผลิตโดยบริษัท Medimmune ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

2.2 การผลิตวัคซีนไขหวัดใหญ่

การผลิตวัคซีนไขหวัดใหญ่เชื้อตายมีขั้นตอนการผลิตซับซ้อน ภายในในพื้นที่สะอาดเพื่อรักษา สภาวะปลอดเชื้อตลอดการผลิต มีการควบคุมชีวอนามัยระดับ 2 enhance (19) โดยมีรายละเอียดการ ผลิตวัคซีนไขหวัดใหญ่โดยสังเขปดังนี้ ขั้นแรกทำการเพาะเชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่แต่ละสายพันธุ์ในไข่ไก่ ฟัก (embryonated egg) หรือ เซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อครบเวลาบ่มจึงทำการเก็บ allantoic fluid หรือ cell suspension มาทำให้ใส (clarification) โดยวิธีต่างๆ เช่นการกรอง (pre-filtration) หรือ การ บั่นเหวี่ยง (centrifugation) เพื่อกำจัด เศษเปลือกไข่ เนื้อเยื่อตัวอ่อน หรือ เศษเซลล์ ออกไป แล้วจึง นำไปทำให้เข้มข้นขึ้น (concentration) โดยการทำ tangential flow filtration (20) ต่อด้วยการ splitting เพื่อแยกอนุภาคของไวรัสให้แตกเป็นอนุภาคที่เล็กลง โดยการใช้สารเคมี (splitting agent) เช่น อีเทอร์ หรือ triton-X 100 (21) เป็นต้น หลังจากนั้นจึงนำไปทำบริสุทธิ์ (purification) โดยการ ทำ sucrose gradient (22) เพื่อแยกส่วนที่เป็นสารเคมีเหล่านั้นออกไปจนเหลือแต่ hemagglutinin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของวัคซีน (active ingredient) ขั้นตอนสำคัญ (critical process) ในการผลิต วัคซีนชนิดเชื้อตายคือการทำให้เชื้อไวรัสไขหวัดใหญ่มีชีวิตที่หลงเหลืออยู่ในวัคซีน (residual viable influenza viruses) หมดฤทธิ์ไป โดยการนำไปบ่มกับสารเคมี เช่น ฟอर्मัลดีไฮด์ หรือ β -propiolactone (23) ก่อนที่จะนำไปทำการผสม (formulation) และทำการบรรจุ (filling) เป็น ผลิตภัณฑ์วัคซีนขั้นสุดท้าย (final lots) ต่อไป

2.3 การควบคุมคุณภาพวัคซีนไขหวัดใหญ่

เนื่องจากกระบวนการผลิตวัคซีนมีขั้นตอนที่ซับซ้อน เพื่อเป็นการยืนยันว่ากระบวนการผลิตได้ดำเนินไปอย่างถูกต้อง และวัคซีนที่ผลิตขึ้นมีคุณภาพสอดคล้องกับมาตรฐานสากลที่กำหนด เช่น มาตรฐานขององค์การอนามัยโลก และตำรายาสากล จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพของวัคซีน (quality control) ซึ่งเป็นการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ในทุกแง่มุม ได้แก่ การตรวจทาง ฟิสิกส์-เคมี เคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา และสัตว์ทดลอง โดยทำการตรวจทั้งในตัวอย่างที่เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate) ซึ่งเก็บได้ระหว่างกระบวนการผลิต (in-process control) และ ในผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้าย (final product) ก่อนจำหน่ายออกสู่ท้องตลาด

การตรวจสอบคุณภาพสำหรับวัคซีนไขหวัดใหญ่ต้องดำเนินการภายใต้หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตยาแผนปัจจุบัน (Good Manufacturing Practice; GMP) ตามเกณฑ์ของ PIC/S (Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme) ซึ่งถือเป็นมาตรฐานที่ยอมรับในระดับสากล และเป็นกฎหมายของประเทศ ภายใต้การควบคุมของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีหัวข้อของการทดสอบเป็นไปตามที่ระบุในมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก และตำรายาสากล ได้แก่ การตรวจความแรง (potency) เพื่อหาปริมาณของ hemagglutinin ซึ่งเป็น active ingredient ของวัคซีนไขหวัดใหญ่ การตรวจด้านความปลอดภัย (safety test) เป็นการตรวจหาสิ่งเจือปนที่หลงเหลืออยู่ในวัคซีน เช่น การหาปริมาณ endotoxin สารเคมีปนเปื้อน (chemical residual) เช่น สารฟอร์มาลดีไฮด์ การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (abnormal toxicity test) การทดสอบความปราศจากเชื้อ แบคทีเรีย และ เชื้อรา (sterility test for bacterial and fungi) รวมไปถึง การตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝง (extraneous agents) ซึ่งจัดเป็นหัวข้อการทดสอบสำคัญ ที่ต้องทำการทดสอบในวัคซีนทุกชนิด รวมถึงวัคซีนไขหวัดใหญ่ด้วย โดยเชื้อปนเปื้อนแฝงดังกล่าวมัก

ปนเปื้อนมาพร้อมกับวัตถุดิบใช้ในการผลิต (raw material) เช่น เชื้อตั้งต้น (seed virus) ไข่ไก่ฟัก เซลล์เพาะเลี้ยง อาหารเลี้ยงเซลล์ ซีรัม หรือ ทริปซิน (trypsin) ซึ่งล้วนแต่มีที่มาจากสัตว์ เป็นต้น เชื้อปนเปื้อนแฝงที่มากับวัตถุดิบเหล่านี้ จะเพิ่มปริมาณไปพร้อมกับเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ขณะทำการผลิต การเจริญของเชื้อปนเปื้อนแฝงเหล่านี้ไม่สามารถตรวจพบได้จากการสังเกต ต้องทำการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเท่านั้นจึงจะสามารถตรวจพบได้

2.4 เชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนที่ใช้สำหรับมนุษย์

วัคซีนที่จำหน่ายออกสู่ตลาดต้องผ่านการตรวจเพื่อหาเชื้อปนเปื้อนแฝง อย่างไรก็ตามพบว่า วัคซีนที่จำหน่ายออกสู่ท้องตลาด และได้นำไปใช้กับประชาชนแล้ว ยังคงมีการปนเปื้อนของเชื้อปนเปื้อนแฝงอยู่ เช่น การพบ Simian virus 40 (SV40) ในวัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ แบบเชื้อตาย (inactivate polio vaccine) (24) และ แบบเชื้อเป็น (oral polio vaccine) (25) ซึ่งปนเปื้อนมากับเซลล์ Rhesus monkey kidney (RMK) ซึ่งเป็นเซลล์ตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสโปลิโอ โดยพบว่าเชื้อ SV40 เป็น oncogenic virus มีความสัมพันธ์ในการก่อให้เกิดมะเร็งในหนูทดลอง และอาจเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ (26) หรือ การพบ bacteriophage ในวัคซีนป้องกันโรคหัด (measles) คางทูม (mumps) และ โปลิโอ (27, 28) จากการสำรวจวัคซีนในท้องตลาดพบการปนเปื้อนของ bacteriophage มากถึง 11 รุ่นการผลิต (lots) จากการทดสอบทั้งหมด 60 รุ่นการผลิต (29) โดยพบว่า bacteriophage มีการปนเปื้อนมาจาก bovine sera ที่ใช้ในการผลิต รวมถึงการพบเอนไซม์ reverse transcriptase ของ endogenous retrovirus และ Avian leukosis virus ในวัคซีนป้องกันโรคหัดและคางทูม ซึ่งปนเปื้อนมาจากเซลล์ไก่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หรือแม้แต่การพบชิ้นดีเอ็นเอของ Porcine circovirus (PCV) ในวัคซีนป้องกันไวรัสโรต้า (rotavirus vaccine) (30) ซึ่งหลังจากการสืบหาสาเหตุโดยบริษัทผู้ผลิตพบว่าการปนเปื้อนมาจาก ทริปซิน ที่ใช้ในการผลิต (31)

เหตุการณ์เหล่านี้นำมาสู่การทบทวนและออกมาตรฐานสำหรับควบคุมและประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อปนเปื้อนแฝงของวัคซีนที่จำหน่ายสู่ท้องตลาดโดยองค์การอนามัยโลก (32) จะเห็นได้ว่าการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงก่อนจำหน่ายออกสู่ท้องตลาดมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นความเสี่ยงที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ได้รับวัคซีนโดยตรง

2.5 ไข่ไก่ฟักที่ใช้ในการผลิตวัคซีน

วัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายมีไข่ไก่ฟัก (embryonated egg หรือ Fertile egg) เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต โดยไข่ไก่ฟักหมายถึงไข่ที่ได้รับการผสมพันธุ์พร้อมที่จะเจริญเติบโตเมื่อทำการบ่มในอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม โดยไข่ไก่ฟักที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตวัคซีนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ไข่ไก่ฟักที่ใช้สำหรับผลิตเชื้อตั้งต้น (master seed หรือ working seed) มีคุณสมบัติเทียบเท่า หรือ ใกล้เคียงกับไข่ SPF โดยต้องปราศเชื้อ *Mycobacterium avium* Fowlpox virus Avian leukosis virus (ALV) และ Avian retroviruses อื่นๆ เชื้อ Newcastle disease virus Avian parainfluenza viruses Avian encephalomyelitis virus Infectious laryngotracheitis virus Avian reticuloendotheliosis virus Marek's disease virus Infectious bursal disease virus *Haemophilus paragallinarum* *Salmonella gallinarum* *Salmonella pullorum* *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* เป็นต้น ไข่ไก่ฟักในกลุ่มที่สอง เป็นไข่ที่จะถูกนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรม (mass production) เนื่องจากการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรมต้องใช้เวลาในปริมาณมาก การใช้ไข่ในกลุ่มแรกในการผลิตจะส่งผลทำให้ต้นทุนการผลิตสูง โดยองค์การอนามัยโลกกำหนดให้ไข่ไก่ฟักที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในระดับอุตสาหกรรมนั้น ต้องมาจากแม่ไก่สุขภาพดี มีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อเป็นไปตามที่กฎหมายของประเทศนั้นได้กำหนดไว้ แม่ไก่ที่ทำหน้าที่ผลิตไข่ไก่ฟักต้องไม่เคยได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาส

เชื้อชนิดเชื้อเป็นมาก่อน ต้องมีการควบคุมมาตรฐานในการควบคุมโรงเรือน และการอนุบาลสัตว์ เช่น โรงเรือนที่ผลิตไข่สำหรับใช้ในการผลิตวัคซีนต้องแยกออกมาโดยเฉพาะ ไม่ปะปนกับโรงเรือนที่มีการเลี้ยงสัตว์ชนิดอื่น มีการควบคุมการเข้า และออกจากโรงเรือน มีการฉีดวัคซีนตามกำหนด ไม่มีการฉีดวัคซีนชนิดเชื้อเป็นในไก่ที่ใช้ในการผลิตไข่สำหรับนำมาใช้ในการผลิตวัคซีนไข่หวัดใหญ่เนื่องจาก อาจมีความเสี่ยงที่เชื้อจากวัคซีนเชื้อเป็นเหล่านี้จะปนเปื้อนลงมาในวัคซีนได้

2.6 เชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนและวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝง

วัคซีนสำเร็จรูปต้องปราศจากสิ่งปนเปื้อนไม่ว่าสิ่งปนเปื้อนนั้นจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ได้รับวัคซีนหรือไม่ก็ตาม การตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัคซีนที่ใช้สำหรับมนุษย์ ประกอบด้วยวิธีที่ไม่จำเพาะ ได้แก่ การทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง หรือ เซลล์เพาะเลี้ยง และวิธีที่มีความจำเพาะโดยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล เช่น วิธี PCR หรือ Southern blot hybridization analysis เป็นต้น วิธีการทดสอบที่เลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ในการผลิต และความสามารถในการระบุชนิดหรือกลุ่มของเชื้อที่ปนเปื้อน และผ่านการเห็นชอบจากผู้มีอำนาจควบคุมทางกฎหมายในประเทศ นั้น สำหรับประเทศไทยคือหน่วยงานในสังกัดของกระทรวงสาธารณสุข 2 หน่วยงาน ได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในกรณีที่ไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อที่อาจปนเปื้อนได้ชัดเจน และวัคซีนชนิดนั้นยังไม่มีข้อกำหนดเฉพาะ ให้พิจารณาใช้วิธีที่ไม่จำเพาะ เพื่อให้สามารถตรวจเชื้อครอบคลุมได้หลายกลุ่มโดยการทดสอบในสัตว์ทดลอง เช่น หนูถีบจักร (adult mice) ลูกหนูถีบจักร (suckling mice) กระจาย และไขไก่ฟัก เป็นต้น สัตว์ทดลองแต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการตรวจหาเชื้อแต่ละกลุ่มได้แตกต่างกัน เช่น ใช้หนูถีบจักรในการตรวจหาเชื้อ Lymphocytic choriomeningitis virus Coxsackieviruses Flaviviruses และ Rabies virus เป็นต้น และใช้ลูกหนูถีบจักรในการตรวจหาเชื้อ Coxsackievirus types A และ B Picornaviruses เช่น

Polioviruses และ Echoviruses Alphaviruses Bunyaviruses เช่น Phleboviruses และ Nairoviruses Arenaviruses Flaviviruses Rabies และ herpesviruses เช่น Herpes simplex virus เป็นต้น การทดสอบจะทำการฉีดสัตว์ทดลองด้วยวัคซีน และติดตามผลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สัตว์ที่ป่วยหรือตายภายใน 24 ชั่วโมง จะถูกทำการุณยฆาต และนำออกจากการทดลอง ทำการติดตามผลสัตว์ทดลองที่เหลือต่อจนครบกำหนดซึ่งมีระยะเวลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของ สัตว์ทดลอง โดย หนูตะเภา กระต่าย หนูถีบจักร และ ลูกหนูถีบจักร มีระยะเวลาการติดตามผลเท่ากับ 42 30 21 และ 14 วันตามลำดับ หลังจากครบกำหนดการติดตามผล สัตว์ทดลองต้องมีสุขภาพดี และรอดชีวิตมากกว่า 80% ขึ้นไปจึงจะถือว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อปนเปื้อนแฝง เป็นต้น

วิธีการทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง เป็นวิธีการทดสอบแบบไม่จำเพาะอีกหนึ่งวิธี เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ มักใช้เซลล์ชนิดเดียวกันกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการผลิต หรือ อาจใช้ Human diploid cells หรือ Monkey kidney cells เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่มที่สามารถพบหรือก่อโรคในมนุษย์ เช่น Adenoviruses Alphaviruses Coronaviruses Enteroviruses (รวมถึง Poliovirus Echovirus และ Coxsackie B virus) Flaviviruses Hepatitis A virus Herpesviruses (รวมถึง Herpes simplex virus Varicella zoster virus และ Cytomegalovirus Orthomyxoviruses Paramyxoviruses Rabies virus Reoviruses Rhinoviruses บางชนิด Rubella virus Simian cytomegalovirus และ Herpes B virus เป็นต้น การทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการใช้ตัวอย่าง ในปริมาณมาก โดยใช้ตัวอย่าง 500 human doses หรือ 50 ml การใช้ตัวอย่างปริมาณมากมี วัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความไวในการทดสอบเมื่อทำการทดสอบวัคซีนบนเซลล์เพาะเลี้ยงจะมีการ ติดตามผลไปอีก 14 วัน การอ่านผลการทดสอบจะสังเกตจากการเกิด cytopathic effect (CPE) บน เซลล์เพาะเลี้ยง หรือการเกิดตะกอนกับเซลล์เม็ดเลือดแดง (hemagglutinating, HA) ของน้ำเลี้ยง

เซลล์ เป็นต้น วัคซีนที่ปราศจากการปนเปื้อนต้องไม่พบการเกิด CPE บนเซลล์เพาะเลี้ยง และไม่เกิด HA

หากสามารถระบุชนิดของเชื้อไวรัสที่มีความเสี่ยงได้ หรือเชื้อไวรัสนั้นเจริญเติบโตได้ยากบน เซลล์เพาะเลี้ยง สามารถใช้วิธีที่มีความจำเพาะ เช่น วิธี PCR โดยวิธี PCR ที่ใช้ ควรตรวจหาเชื้อได้ หลายชนิด หรือ มีการออกแบบไพรเมอร์ให้จับกับบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อหลายชนิดทำให้สามารถ ตรวจหาเชื้อหลายชนิดได้ในคราวเดียวกัน เป็นต้น ในกรณีที่วัคซีนนั้นผลิตมาจากเซลล์เพาะเลี้ยง ควร ทดสอบ เชื้อไวรัสที่พบในมนุษย์ หรือ สามารถก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ Hepatitis A B และ C viruses Enteroviruses Human HIV-1 HIV-2 HTLV-1 HTLV-2 Circoviruses Parvovirus B19 Papillomaviruses Human polyomaviruses Human adenoviruses Epstein-Barr virus Human cytomegalovirus Human herpes viruses 6 7 และ 8 Simian polyomaviruses เช่น SV40 Simian foamy virus Simian immunodeficiency virus Simian retrovirus และ Simian T-cell lymphotropic virus เป็นต้น (33, 34)

วัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย มีประวัติการใช้งานมายาวนานมากกว่า 60 ปี ข้อมูลที่ผ่านมา แสดงให้เห็นว่าวัคซีนชนิดนี้มีความปลอดภัย อย่างไรก็ตาม หลังจากพบการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses ใน candidate วัคซีน สำหรับใช้ในกรณีไขหวัดใหญ่ระบาดใหญ่ ส่งผลให้มีการเพิ่มความเข้มงวดในการตรวจเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนมากขึ้นพร้อมทั้งทำการปรับปรุงวิธีการตรวจหา เชื้อปนเปื้อนแฝงให้ดียิ่งขึ้น เชื้อปนเปื้อนแฝงสำหรับวัคซีนไขหวัดใหญ่นั้นมีที่มาจากไข่ไก่ฟักที่ใช้ใน การผลิต ได้แก่ เชื้อ Avian adenoviruses Avian Leukosis virus *Mycoplasma gallisepticum* และ *Mycoplasma synoviae* เป็นต้น คู่มือขององค์การอนามัยโลก (Recommendations for the production and control of influenza vaccine, inactivated, 2005) ระบุให้ทำการตรวจหาเชื้อ

ปนเปื้อนแฝงในวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายใน 2 ขั้นตอน ได้แก่ การตรวจในขั้นตอนที่เป็นเชื้อตั้งต้น (seed virus) ก่อนที่จะนำมาเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสโดยการเพาะเชื้อในไข่ไก่ฟัก หรือ เซลล์เพาะเลี้ยง และทำการตรวจยืนยันอีกครั้งใน Monovalent virus pools ซึ่งเป็นสารมัธยันตร์ (intermediate product) ที่ผ่านกระบวนการ Splitting (ทำให้อนุภาคของเชื้อไวรัสแตกออก) และ Inactivation (กำจัดเชื้อ) และ ถูกทำบริสุทธิ์จนเหลือแต่ hemagglutinin ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ของวัคซีนที่ใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เชื้อที่องค์การอนามัยโลกระบุให้ต้องทำการตรวจ ได้แก่ Avian leukosis virus mycoplasma และ Avian adenoviruses โดยเชื้อเหล่านี้ต้องถูกกำจัดให้หมดไปหลังเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต โดยวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้คือวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่มีความเร็ว เช่น วิธี multiplex PCR (35)

2.7 การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัตถุดิบตั้งต้นและวัคซีน

การตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงนั้นแบบดั้งเดิมจะทำการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*In Vivo*) และมีการใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก หลังจากมีการนำจริยธรรมการใช้สัตว์เข้ามาควบคุม และมีผลให้โทษทางกฎหมาย จึงทำให้การทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลองลดลงและมีการนำเซลล์เพาะเลี้ยงเข้ามาใช้ในการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงต่างๆ โดยได้มีกลุ่มของห้องปฏิบัติการร่วมกันศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง และการใช้สัตว์ทดลองอย่างเป็นระบบ ผู้วิจัยทำการตรวจเชื้อที่อาจปนเปื้อนอยู่ในวัคซีนหลายชนิดซึ่งมีที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสิ่งแวดล้อมของการผลิต และจากผู้ปฏิบัติงานเอง จำนวน 16 เชื้อ ได้แก่ เชื้อ Adenovirus 5 Adenovirus 41 Bovine Parainfluenzavirus 3 Bovine viral diarrhea virus Coxsackie A16 virus Coxsackie B3 virus Echovirus 11 Herpes simplex type 1 Influenza A virus Measles virus Mumps virus Rhinovirus 2 Rubella virus Simian Cytomegalovirus SV40 Vesicular

Stomatitis virus โดยทำการเพาะเชื้อเหล่านี้กับเซลล์สามชนิด ได้แก่ MRC-5 Hela Vero และ เซลล์อื่นๆ สำหรับเชื้อไวรัสบางตัว อ่านผลการเกิด cytopathic effect ร่วมกับการทำ hemadsorption หรือ immunofluorescence หรือ hemagglutination ที่เกิดขึ้นหลังจากทำการเพาะเชื้อไปแล้วเป็นเวลา 14 วัน เปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อเหล่านี้ในสัตว์ทดลอง 3 ชนิด ได้แก่ หนู Mice หนู sucking mice และ ไช้ไก่ฟัก ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบสัตว์ทดลองแต่ละชนิดเป็นเวลา 21 28 และ 24 วันตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า วิธีการทดสอบโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงมีความไวในการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงเกือบทุกชนิดสูงกว่าการทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถตรวจหาเชื้อที่ระดับความเจือจางสูงได้ ในขณะที่สัตว์ทดลองจะแสดงอาการของโรคให้เห็นได้เฉพาะเมื่อได้รับเชื้อที่ความเจือจางน้อยเท่านั้น ทั้งนี้ ยกเว้นเชื้อ Influenza A virus และ Vesicular Stomatitis virus ที่ยังคงมีความไวต่อทั้งสองวิธี (36)

นอกจากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงระหว่าง *In Vitro* และ *In Vivo* ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีงานวิจัยที่ทำการเปรียบเทียบระหว่างวิธี *In Vivo* กับ วิธีทางชีวโมเลกุลด้วยเช่นกัน โดยในปี 2010 Motitschke และ คณะ ทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนในวัคซีนเชื้อตายที่ใช้สำหรับป้องกันโรคในไก่โดยวิธี PCR และการฉีดเชื้อลงในไก่ SPF โดยเชื้อที่เลือกนำมาศึกษาเป็นเชื้อใช้ในการผลิตวัคซีนและสามารถก่อโรคในไก่ ได้แก่ เชื้อ Newcastle disease virus Avian reovirus Avian influenza virus และ Avian infectious bronchitis virus ผู้วิจัยทำการเจือจางเชื้อแต่ละชนิดแบบ serial 10-fold dilution แล้วทำการตรวจหาเชื้อในแต่ละความเจือจางโดยวิธี PCR (standard PCR และ Touchdown PCR) ระหว่างห้องปฏิบัติการ 2 แห่ง ได้แก่ ห้องปฏิบัติการของ The Institute of Virology and Immunoprophylaxis (IVI) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และ The Paul-Ehrlich-Institute ประเทศเยอรมัน พร้อมทั้งทำการฉีดเชื้อในแต่ละ

ความเจือจางลงในไก่ SPF อายุ 4 สัปดาห์ และฉีดกระตุ้นอีกครั้งหลังจากผ่านไป 21 วัน แล้วเก็บซีรัม ใน 2 สัปดาห์ต่อมา ทำการตรวจซีรัมโดยวิธี ELISA (Enzyme Linkage Immunosorbent Assay) โดยพบว่า วิธี PCR มีความไวในการตรวจมากกว่าวิธีการตรวจโดยใช้สัตว์ทดลอง และยังพบอีกว่า วิธี Touchdown PCR มีความไวมากกว่าวิธี standard PCR (37)

ในปี 2014 Veerasami และ คณะ ได้ทำการศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงอย่าง ครอบคลุม โดยทำการตรวจในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตวัคซีนซึ่งมีที่มาจากสัตว์ ได้แก่ ทริปซิน และ ซีรัม (fetal bovine serum) วัคซีนสำหรับสัตว์ และ วัคซีนสำหรับมนุษย์ ที่มีวางจำหน่ายอยู่ใน ท้องตลาดโดยอาศัยเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 คู่ ที่ ถูกออกแบบให้จับกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนของเชื้อเป้าหมายที่อาจปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบ และวัคซีน จำนวน 11 เชื้อ แบ่งออกเป็นเชื้อไวรัสที่พบในสุกร (porcine viruses) จำนวน 6 ชนิด และ เชื้อไวรัส ที่พบในวัว (bovine viruses) จำนวน 5 ชนิด ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของวิธีการตรวจ แยกทีละเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื่อนั้น และเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อโดยใช้ไพรเมอร์ รวม ในลักษณะของ PCR แบบผสม (multiplex PCR) ผลการทดสอบพบว่า วิธี multiplex PCR มี ความไวไม่แตกต่างจากการตรวจแบบแยกทีละเชื้อ เมื่อนำวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ไปทำการตรวจเชื้อใน วัตถุดิบ และ วัคซีน พบว่าวัคซีนสัตว์มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสทั้งจากสุกร และหมู จำนวน 6 ยี่ห้อ จาก ทั้งหมด 10 ยี่ห้อ พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจากวัว ในทริปซินจำนวน 7 รุ่นการผลิต จากทั้งหมด 9 รุ่นการผลิต โดยพบการปนเปื้อนของไวรัสมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไปในทริปซิน และพบการปนเปื้อน ของเชื้อ Pestivirus ในซีรัมจำนวน 5 รุ่นการผลิต จากทั้งหมด 8 รุ่นการผลิต หากคิดเป็นร้อยละของ การปนเปื้อนพบว่าวัคซีนสำหรับสัตว์ ทริปซิน ซีรัม มีการปนเปื้อนเท่ากับร้อยละ 60, 77.7 และ 62.5 ตามลำดับ ส่วนวัคซีนสำหรับมนุษย์ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส แสดงให้เห็นว่า วิธี multiplex

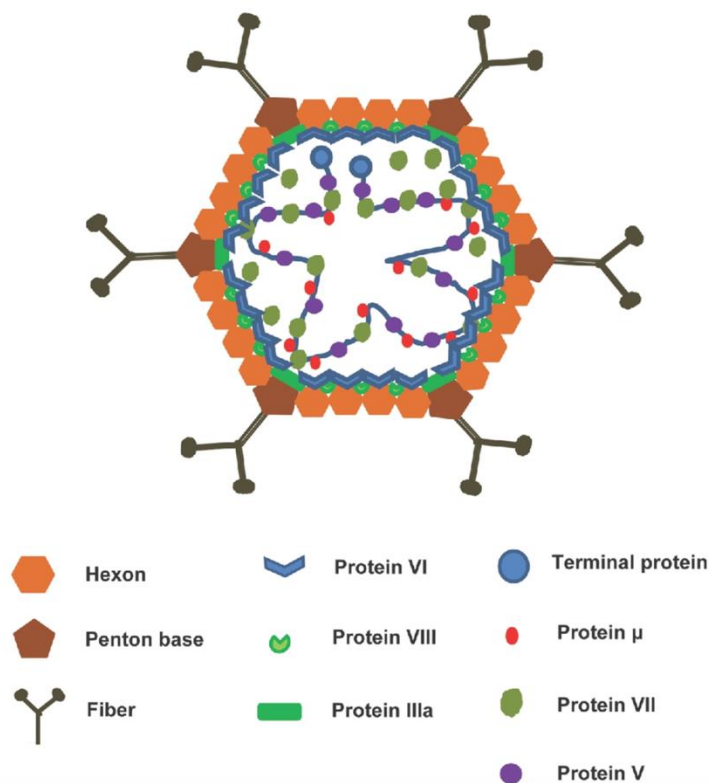
PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมสำหรับการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงในวัตถุดิบสำคัญในการผลิตวัคซีน และในวัคซีนสำเร็จรูป โดยจะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของเชื้อในวัตถุดิบทุกชนิดที่นำมาศึกษา จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการปนเปื้อนของเชื้อจากวัตถุดิบเหล่านี้ลงมาในวัคซีน อีกทั้งการพบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในวัคซีนสำหรับสัตว์ ทั้งๆที่เป็นวัคซีนชนิดเชื้อตาย (inactivated) แสดงให้เห็นถึงความหละหลวมในการผลิต ซึ่งจำเป็นจะต้องเพิ่มความเข้มงวดในการควบคุมคุณภาพต่อไป (38)

หลังจากที่พบว่ามีการระบาดของเชื้อ Fowl adenoviruses ในฟาร์มไก่ในประเทศจีน Yang Li และ คณะ ได้ตั้งข้อสมมติฐานว่าการระบาดของเชื้อ Fowl adenoviruses อาจมีที่มาจาก การได้รับวัคซีนเชื้อเป็นที่ฉีดให้กับไก่ ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ Fowl adenoviruses ที่ปนเปื้อนอยู่ในวัคซีนชนิดเชื้อเป็น สำหรับป้องกันโรคในไก่ จำนวน 32 รุ่นการผลิต ได้แก่ วัคซีนป้องกันโรค Marek's disease (10 รุ่นการผลิต) Newcastle disease (12 รุ่นการผลิต) และ fowlpox virus (10 รุ่นการผลิต) โดยใช้เทคนิค conventional PCR เป็นเครื่องมือในการตรวจหาเชื้อปนเปื้อน ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ให้จับบนยีน hexon และ ให้ผลผลิตดีเอ็นเอ 1,318 base pairs (bp) ผลการทดสอบพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อ Fowl adenoviruses ในวัคซีนป้องกันโรค Newcastle disease จำนวน 1 รุ่นการผลิต เมื่อนำวัคซีนที่ให้ผลบวกไปทำการเพาะเชื้อบนไข่ SPF แล้ว เก็บเนื้อเยื่อตับ และ allantoic fluid มาทำการศึกษาต่อ โดยวิธี PCR พบว่ายังคงให้ผลบวกต่อเชื้อ fowl adenoviruses และยังคงมีขนาดผลผลิตดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม คือเท่ากับ 1,318 bp เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างวัคซีน และ หลังจากการเพาะเชื้อ ไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) พบว่าผลผลิตดีเอ็นเอจากทั้งสองตัวอย่างว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกัน เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fowl adenovirus isolate N22 ที่แยกได้นี้ กับ Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ต่างๆ พบว่ามีความเหมือนกับ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 4 หรือ

สปีชีส์ C และเหมือนกับสายพันธุ์ JSJ13 มากที่สุด โดยมี % Homology เท่ากับ 99.8 % ซึ่งเชื้อ JSJ13 นี้ถูกแยกจากฟาร์มไก่ที่มีการติดเชื้อมาก่อนหน้า การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวัคซีนเชื้อเป็นนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของเชื้อ Fowl adenoviruses ในฟาร์มสัตว์ปีกอย่างรุนแรง ด้วยเหตุนี้การตรวจการปนเปื้อนของ exogenous viruses ในวัคซีนชนิดเชื้อเป็นที่ใช้ป้องกันโรคในสัตว์ปีก เป็นสิ่งที่ต้องตรวจติดตามอย่างเข้มงวด (39)



2.8 เชื้อ Avian adenoviruses



รูปที่ 1 โครงสร้างของเชื้อ Avian adenoviruses (Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1) ประกอบด้วย capsid protein 10 ชนิด ได้แก่ hexon protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่ประกอบกันเป็น capsid ที่มีโครงสร้างแบบ icosahedral และมี penton base อยู่ตรงมุม มี fiber สองแท่ง ต่อ 1 Penton base ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในกลุ่มนี้ โปรตีน pIIIa pVI และ pVIII เป็น capsid protein ที่พบได้น้อย และตั้งอยู่ด้านในของ capsid terminal protein โปรตีน μ โปรตีน VII และ โปรตีน V เป็นโปรตีนที่ยึดติดกับสารพันธุกรรมของไวรัส (40)

เชื้อ Adenoviruses เป็นเชื้อไวรัสชนิดไม่มีเปลือกหุ้ม (non enveloped) มีรูปร่างแบบ icosahedral มีขนาดอยู่ระหว่าง 70-90 nm อนุภาคของไวรัสเกิดจากการเรียงตัวของ capsomer จำนวน 252 capsomer ข้างในบรรจุสารพันธุกรรมแบบ deoxyribonucleic acid (DNA) สายคู่ เส้นตรง มีขนาด 35,000 bp (41) โครงสร้างหลักของอนุภาคหลักของไวรัส คือ hexon และ fiber ซึ่งจับอยู่กับ penton base (รูปที่ 1) ซึ่งโครงสร้างนี้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่าง mammalian adenovirus กับ Fowl adenoviruses ได้ โดย mammalian adenoviruses จะมี 1 fiber ต่อ 1 penton base แต่ Fowl adenoviruses จะมี 2 fiber ต่อ 1 penton base (42) ใน ส่วนหัวของ fiber ซึ่งเป็นส่วน C-terminal ของโปรตีน ทำให้เกิด type-specific- γ -antigen ที่ เกี่ยวข้องกับการเกิด hemagglutinin สำหรับ hexon protein สามารถใช้เป็นตัวกำหนด group และ subgroup ของเชื้อไวรัสได้ (43)

เชื้อ Avian adenoviruses เป็นเชื้อที่มีความทนทานสูง โดยสามารถทนต่อสารเคมีได้หลาย ชนิด เช่น อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม ทริปซิน sodium deoxycholate (7) เป็นต้น มีความทนอยู่ในช่วง pH ระหว่าง 3-9 สามารถทนต่ออุณหภูมิได้ดีกว่า adenoviruses ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย สามารถมีชีวิตอยู่ที่อุณหภูมิ 60-70 °C ได้ถึง 30 นาที และบางสายพันธุ์สามารถทนอยู่ที่อุณหภูมิ 56°C ได้ถึง 18 ชั่วโมง สามารถทำให้หมดฤทธิ์ได้โดยใช้ฟอร์มาลินที่ความเข้มข้น 1:1000 (44)

เชื้อ Avian adenoviruses เป็นเชื้อสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคในฟาร์มสัตว์ปีก ส่งผลกระทบต่อ เศรษฐกิจในวงกว้างเมื่อเกิดการระบาด จัดเป็นเชื้อไวรัสกลุ่มหนึ่งที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ เชื้อนี้จัดอยู่ในตระกูล *Adenoviridae* เชื้อในตระกูลนี้ยังสามารถแบ่งออกได้อีก 4 จีแนส (genus) ได้แก่ จีแนส *Aviadenovirus* จีแนส *Siadenovirus* จีแนส *Atadenovirus* และ *Mastadenovirus* โดยจีแนส *Aviadenovirus* จะเป็นเชื้อ Avian adenoviruses กลุ่มที่หนึ่ง จีแนส *Siadenovirus* จะ

เป็นเชื้อ Avian adenoviruses กลุ่มที่สอง ส่วนจีโนม *Atadenovirus* จะมีเชื้อ avian adenoviruses กลุ่มที่สาม เป็นหลัก สำหรับจีโนม *Mastadenovirus* นั้นจะเป็นเชื้อ Adenoviruses ที่ติดเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (45, 46)

ตารางที่ 1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Avian adenoviruses(45)

จีโนม	การจัดกลุ่มแบบดั้งเดิม	สายพันธุ์ของโฮสต์	ตัวอย่างของเชื้อ	ตัวอย่างของโรค
Mastadenovirus	Mastadenovirus	human simian bovine equine murine porcine ovine caprine และ อื่นๆ	Human adenovirus subgroup B	Upper/Lower respiratory infection, Acute respiratory infection และ Pharyngoconjunctival fever
Aviadenovirus	Group I Avian adenoviruses	chicken turkeys ducks geese pigeons various และ wild bird	Fowl adenoviruses	Inclusion body hepatitis , Quail bronchitis virus, Hydropericardium syndrome และ Gizzard erosion
Siadenovirus	Group II Avian adenoviruses	chicken turkeys pheasants	Turkey hemorrhagic enteritis virus.	Hemorrhagic enteritis (turkeys), Marble spleen disease (pheasants) และ Splenomegaly (chickens)
Atadenovirus	Group III Avian adenoviruses	Ducks	Egg drop syndrome virus.	Egg drop syndrome

เชื้อ Avian adenoviruses กลุ่มที่หนึ่ง เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Fowl adenoviruses พบได้ใน สัตว์ปีกหลายชนิด เช่น ไก่ ห่าน เป็ด นกพิราบ และ สัตว์ปีกอื่นๆ เป็นต้น มีลักษณะของแอนติเจน แตกต่างออกไปจาก adenoviruses ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยหากจำแนกเชื้อ Fowl adenoviruses ตาม ซีโรไทป์ โดยวิธี microneutralization กับซีรัมที่จำเพาะ จะสามารถแบ่งเชื้อนี้ออกได้เป็น 12 ซีโรไทป์ ประกอบด้วยซีโรไทป์ 1 2 3 4 5 6 7 8a 8b 9 10 และ 11 (47) หรือ หากจำแนกตามรูปแบบของดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น *Bam*HI และ *Hind*III จะสามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A B C D และ E ตามลำดับ (48) โดยทั้งซีโรไทป์ และ จีโนไทป์ มีความสัมพันธ์กันดังนี้ Fowl adenovirus A (ซีโรไทป์ 1) Fowl adenovirus B (ซีโรไทป์ 5) Fowl adenovirus C (ซีโรไทป์ 4 และ 10) Fowl adenovirus D (ซีโรไทป์ 2 3 9 และ 11) และ Fowl adenovirus E (ซีโรไทป์ 6 7 8a และ 8b) (49) เชื้อดังกล่าวสามารถถ่ายทอดได้ทั้งแบบ จากรุ่นสู่รุ่น (vertical transmission) และจากการสัมผัส (horizontal transmission) การติดต่อแบบ vertical transmission เป็นการติดต่อที่พบได้มากที่สุด โดยการติดเชื้อจากแม่ไก่ผ่านไปยังไข่ซึ่งไวรัสที่ติดอยู่ในไข่นั้นจะมีการเจริญไปพร้อมกันขณะที่มีการฟักไข่ เชื้อไวรัสจะแฝง (latent) อยู่ในลูกไก่โดยไม่แสดงอาการใดๆ เนื่องจากยังคงมีการทำงานของ local immunity โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้อีกครั้งในช่วง 8 ถึง 12 สัปดาห์ หลังจากที่ local immunity หายไป และตรวจพบได้มากที่สุด ในช่วงที่ไก่นั้นมีการเจริญเติบโตและพร้อมในการให้ไข่ ทั้งนี้ยังพบอีกว่า ภูมิคุ้มกันแบบ humoral antibody มีบทบาทน้อยมากในการป้องกันโรค เนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้แม้แม่ไก่จะมีการผลิต neutralizing antibody ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ในปริมาณที่สูงออกมา (46, 50, 51) การถ่ายทอดเชื้อที่สำคัญอีกแบบคือการถ่ายทอดแบบ horizontal transmission ซึ่งเป็นการถ่ายทอดผ่านทางอุจจาระ และสารคัดหลั่งของสัตว์ปีก หรือ แม้กระทั่งในน้ำเชื้อ ระยะเวลาการกระจายของเชื้อในไก่วัยรุ่น จะยาวนานมากกว่าในไก่แม่ โดยเชื้อสามารถติดต่อได้โดยตรงจากไก่สู่ไก่

หรือ จากการสัมผัสผ่านอุปกรณ์ที่ปนเปื้อน เช่น คนงาน กรง ลังไม้ ลังไข่ รถเข็น สามารถติดต่อผ่านอากาศได้หากเป็นระยะประชิด การติดข้ามผ่านฟาร์มโดย aerosol ยังเกิดขึ้นได้น้อย และเชื่อจะมีการแพร่กระจายได้ยาก หากการเลี้ยงดูของฟาร์มเป็นการเลี้ยงแบบ SPF (specific pathogen free) ซึ่งมีระบบการเลี้ยงแบบปิด (52, 53)

สัตว์ปีกที่ติดเชื้อไวรัสในกลุ่มที่หนึ่ง มักไม่แสดงอาการ (sub clinical) โดยอาจมีสาเหตุมาจากการกดของ maternal immunity หรือ อาจเกิดจากการที่เชื่อนั้นมีความรุนแรงน้อย (low virulence) เชื่อนี้ไม่ใช่เชื้อสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรค โดยพบว่าไก่จะยังคงมีสุขภาพดีถึงแม้จะพบว่าไก่นั้นมีแอนติบอดีต่อเชื้อ Fowl adenoviruses เชื่อนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรกระบบทางเดินหายใจ อุจจาระร่วง สูญเสียอัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของอาหารที่สัตว์กินกับน้ำหนักของสัตว์ที่เพิ่มขึ้น และ ไชซ์อ็อกเสบ เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อในกลุ่มที่หนึ่งบางซีโรไทป์สามารถก่อโรคในไก่ได้โดยตรง เช่น Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ 4 ที่สามารถก่อให้เกิดโรคระบาดที่สำคัญ ได้แก่ Inclusion body hepatitis (IBH) และ Hydropericardium syndrome (HPS) (54, 55)

สำหรับเชื้อ Avian adenoviruses กลุ่มที่สอง มีลักษณะของ common group antigen แตกต่างจาก Avian adenoviruses ในกลุ่มที่หนึ่ง และ ต่างจาก adenoviruses ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบได้มากในห่าน และเป็นเชื้อสาเหตุก่อให้เกิดโรค hemorrhagic enteritis (HE) ในห่าน (56) เชื่อดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ลิมโฟไซตชนิด B เป็นสาเหตุทำให้เกิดการกดของภูมิคุ้มกัน (57, 58) แต่ก็สามารถก่อให้เกิดโรคในไก่ได้เช่นกัน เช่น โรค splenomegaly และ marble spleen disease (MSD) (46, 59-61)

เชื้อในกลุ่ม Avian adenoviruses กลุ่มที่สาม หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเชื้อ egg drop syndrome viruses พบได้มากในไก่และเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไขลด ไก่ที่ติดเชื้อมีการผลิตไขลดลงอย่างมาก เชื้อนี้ มีลักษณะเหมือน Adenoviruses โดยทั่วไป แต่ตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงของไก่ และ ไม่ตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (62) สามารถแบ่งออกเป็น 1 ซีโรไทป์ หรือ 3 จีโนไทป์ โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เชื้อจะติดต่อเข้าแม่ไก่ผ่านระบบทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และมีการติดเชื้อแฝงอยู่ในไก่นั้น ไก่ที่ได้รับเชื้อจะยังคงมีสุขภาพแข็งแรง และไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อ โดยจะตรวจพบเชื้อนี้ได้อีกครั้งเมื่อไก่เจริญเติบโตจนถึงวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการวางไข่สูงสุด เชื้อจะมีการแบ่งตัวได้มากที่สุดบริเวณ pouch shell gland และอาจพบได้ในส่วนอื่นของระบบสืบพันธุ์ (63) เชื้อนี้จะแฝงอยู่ในตัวอ่อนไปจนถึงวัยเจริญพันธุ์ และติดผ่านท่อหน้าไข่ oviduct ถูกขับผ่านทาง cloaca แล้วถ่ายทอดสู่รุ่นถัดไปได้ ลักษณะเฉพาะของเชื้อในกลุ่มนี้คือสามารถติดต่อผ่านระบบสืบพันธุ์มากกว่าที่จะติดต่อผ่านระบบทางเดินอาหาร ไก่ที่มีการติดเชื้อจะมีคุณภาพและปริมาณของการผลิตไขลดลง เปลือกไข่สีเข้มมีสีซีดลง เปลือกบาง อ่อนยวบ หรือ ไม่มีเปลือกไข่ ผิวเปลือกไข่ขรุขระเหมือนกระดาษทราย หรือ มีเป็นเม็ดอยู่ตรงขั้วด้านใดด้านหนึ่ง (64, 65) ซึ่งหากเชื้อที่แฝงอยู่แสดงอาการขึ้นมาอาจทำให้ปริมาณไข่ที่ผลิตได้ลดลงมากถึง 40% (66) โดยไก่สายพันธุ์ที่ให้ไข่สีน้ำตาลจะได้รับผลกระทบจากการติดเชื้อ Egg drop syndrome viruses น้อยกว่าสายพันธุ์ที่ให้เปลือกไข่สีขาว (67) มีรายงานว่า การติดเชื้อมีสาเหตุมาจากการได้รับวัคซีนป้องกัน Egg drop syndrome viruses ที่มีการปนเปื้อน (68)

2.9 การระบาดของเชื้อ Avian adenoviruses

เชื้อ Avian adenoviruses มีการระบาดได้ทุกภูมิภาคทั่วโลก ในประเทศไทยมีการเก็บข้อมูลการระบาดอยู่น้อย โดยเชื้อที่มีการระบาดในประเทศไทยคือเชื้อ fowl adenovirus ซีโรไทป์ 2 ซึ่งก่อให้เกิดโรค Inclusion body hepatitis (69, 70) และเชื้อ Egg drop syndrome virus ซึ่งก่อให้เกิดโรคไข่นิ่มหรือไขลด (71, 72) ในประเทศญี่ปุ่นมีการระบาดของเชื้อ fowl adenovirus ซีโรไทป์ 2 เช่นเดียวกับประเทศไทย (73) อย่างไรก็ตามเชื้อที่มีการระบาดในปัจจุบันคือเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 4 (40, 74) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค hydropericardium syndrome ในฟาร์มไก่ ไก่ที่ติดเชื้อนี้มี mortality rate มากถึง 30-100 % (75) โดยพบการระบาดของเชื้อนี้ได้มากในประเทศจีน (54, 76, 77) และ เกาหลี (78, 79) เป็นต้น

2.10 การตรวจและจำแนกเชื้อ Avian adenoviruses ในสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ปีกโดยวิธีดั้งเดิม

การตรวจเชื้อ Avian adenoviruses จำแนกออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อแบบไม่ต้องการจำแนกกลุ่ม หรือ ซีโรไทป์ เช่น การตรวจหาตัวเชื้อโดยตรง (direct method) โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดสอบโดยวิธีนี้ ต้องผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ของไวรัสมาก่อน การตรวจการติดเชื้อในเนื้อเยื่อ โดยตรง ด้วยการย้อมเซลล์ที่ต้องการทดสอบด้วยสี haematoxylin และ eosin เพื่อตรวจหา eosinophilic intranuclear inclusion bodies ในเซลล์ hepatocytes ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการติดเชื้อ Adenoviruses (80) รวมถึงวิธีทางภูมิคุ้มกัน เช่น ELISA และ immunocytochemical พบว่าสามารถตรวจจับเชื้อได้ทั้ง 12 ซีโรไทป์ โดยการจับกันของแอนติบอดีกับ common group specific antigen ของเชื้อ Avian adenoviruses เหมาะสำหรับการปฏิบัติการณ์ที่ต้องการตรวจการก่อโรคที่ไม่ต้องทำการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ (81, 82) วิธีต่อมา

คือวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อ ซึ่งเชื้อ Avian adenoviruses ในมีลักษณะการทดสอบแตกต่างกันดังนี้

เชื้อ Fowl adenoviruses จะทำการเพาะแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง แล้วจึงนำเชื้อที่แยกได้ไปทำการจำแนกชนิดของเชื้อในขั้นตอนถัดไป เชื้อนี้สามารถเจริญได้ดีในเซลล์ chicken kidney cell และ chicken embryo liver cell โดยสามารถเจริญใน chicken embryo liver cell ได้ดีกว่า chicken kidney cell (83, 84) นอกเหนือไปจากการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเพาะเลี้ยงใน ไชไก่ฟัก โดยการฉีดเชื้อผ่านช่องทาง yolk sac ได้เช่นกัน (85) หลังจากที่มีการแยกเชื้อออกมาได้แล้ว สามารถทำการแยกกลุ่มของเชื้อได้โดยวิธี immunofluorescence assay และ จำแนกซีโรไทป์ได้โดยวิธี microneutralization test โดยการผสมเชื้อกับ antiserum ที่จำเพาะกับเชื้อ แล้วทำการทดสอบบนเซลล์ chicken kidney cell monolayers (86, 87)

เชื้อ Hemorrhagic enteritis viruses เป็นเชื้อที่เจริญได้อย่างจำกัดบนเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด เช่น lymphoblastoid cell line (MDCT-RP19) (88) สามารถเจริญได้ใน peripheral blood leukocytes จากห่านได้อย่างน้อย 7 passages ส่วนการเพาะเชื้อใน peripheral blood leukocytes ที่มาจากไก่ นั้นพบว่าการเจริญค่อนข้างต่ำ (89) ด้วยเหตุนี้การตรวจหาเชื้อ Hemorrhagic enteritis viruses จึงนิยมตรวจโดยวิธี (agar gel precipitin test, AGP) (90) หรือ ELISA ซึ่งพบว่ามีควมไวมากกว่าวิธี AGP ทั้งนี้ หากต้องการตรวจหาการกระจายของเชื้อในเนื้อเยื่อ และ ศึกษากลไกการก่อโรคสามารถใช้วิธี immunohistochemistry เป็นเครื่องมือในการทดสอบได้ (91)

เชื้อ Egg drop syndrome viruses สามารถตรวจได้โดยการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงต่างจาก Fowl adenoviruses อื่นๆที่ไม่สามารถเกิดการตกตะกอนกับเม็ดเลือดแดงได้ ยกเว้น Fowl

adenoviruses ซีโรไทป์ 1 ที่สามารถตกตะกอนได้กับเม็ดเลือดแดงของหนู (92) พบว่าวิธีที่มีความไวที่สุดในการเพาะแยกเชื้อที่มาจาก oviduct คือการเพาะเลี้ยงในไข่ไก่ฟัก และ เซลล์เพาะเลี้ยงที่มาจากห่าน สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยง chicken kidney cell หรือ chicken embryo liver cell สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อนี้ได้เช่นกัน (63, 93, 94)

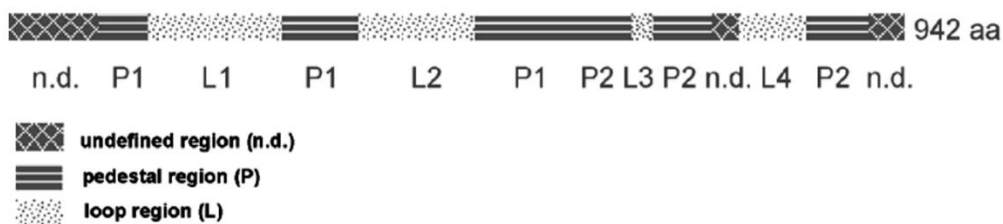
2.11 การจำแนกชนิดของเชื้อ Avian adenoviruses โดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจวินิจฉัย และจำแนกชนิดของเชื้อโดยวิธีนี้ อาศัยการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme analysis, REA) ในตำแหน่งที่ต่างกันของจีโนม จนทำให้เกิดรูปแบบเฉพาะของสารพันธุกรรมของเชื้อแต่ละกลุ่ม พบว่าสามารถบอกความแตกต่างของเชื้อได้มากกว่าวิธีทางน้ำเหลืองวิทยา เนื่องจากโปรตีนที่แสดงออกเป็นเพียง 15% ของ genome ทั้งหมด โดยวิธี REA สามารถแบ่งเชื้อ Fowl adenoviruses จำนวน 12 ซีโรไทป์ ได้เป็นอีก 5 กลุ่ม โดยดูรูปแบบของ สารพันธุกรรมที่เกิดขึ้น จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Bam*HI และ *Hind*III (48)

2.12 การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

วิธีทางด้านชีวโมเลกุลเป็นที่นิยมมากในปัจจุบันโดยเฉพาะการตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) มีนักวิจัยหลายท่านได้พยายามทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สำหรับตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในตัวอย่างจากฟาร์มสัตว์ปีกโดยอาศัยหลักการ PCR ซึ่งสิ่งสำคัญสำหรับวิธี PCR คือคู่ของไพรเมอร์ที่สามารถจับกับช่วงยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษา และสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในช่วงยีนนั้นได้อย่างจำเพาะ โดยหากต้องการพัฒนาวิธี PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ได้ครอบคลุมทุกกลุ่ม ยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ควรเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) อย่างไรก็ตามหากต้องการทำการจำแนกเชื้อ (differentiation) ในภายหลังไม่ว่าจะเป็นการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ การทำ sequencing

บริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปจับควรครอบคลุมบริเวณของยีนในส่วนที่เป็นความแปรผัน (variable region) ที่จำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ด้วย



รูปที่ 2 โครงสร้างของ hexon protein ของเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 ประกอบด้วย บริเวณอนุรักษ์ (pedestal : P1 & P2) และ บริเวณที่ความแปรผัน (loop : L1, L2, L3 & L4) (47)

ยีนที่นิยมใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในปัจจุบัน คือ hexon gene ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้าง hexon protein (รูปที่ 2) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ capsid ของอนุภาคไวรัส ประกอบด้วยบริเวณอนุรักษ์ซึ่งทำหน้าที่กำหนดโครงสร้างของตำแหน่งที่เรียกว่า pedestals (P1 และ P2) ของ hexon protein ซึ่งอยู่ก่อนมาด้านในของอนุภาคไวรัส และบริเวณแปรผัน (variable region) จะคอยกำหนดการสร้างส่วน loop (ตั้งแต่ L1 จนถึง L4) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ก่อนออกมาข้างนอกของอนุภาคไวรัส โครงสร้างส่วน variable loop นี้เป็นตัวกำหนด ชนิดของไวรัส (type-specific neutralizing epitopes) เมื่อทำการจำแนกด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ การออกแบบไพรเมอร์ สำหรับตรวจหา Fowl adenoviruses นั้น มักออกแบบให้จับยีนในส่วน ที่กำหนดการสร้าง P1 และ P2 หากบริเวณที่ไพรเมอร์ครอบคลุมส่วนที่เป็น variable region ด้วยแล้วจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกเชื้อด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในภายหลัง ทำให้สามารถเปรียบเทียบรูปแบบของผลผลิตดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction profiles) ระหว่าง สายพันธุ์อ้างอิงกับเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ได้ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น อย่างไรก็ตาม

ตามในปัจจุบันยังไม่มีวิธี PCR ที่สามารถจำแนก ซีโรไทป์ ของ Fowl adenoviruses ทั้ง 12 ชนิด ได้ โดยตรง แต่หากต้องการตรวจจำแนกเชื้อสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมาก สามารถทำได้โดยออกแบบไพรเมอร์ให้ไปจับกับบริเวณของยีนที่เป็น low sequence identity เช่น ยีนที่ควบคุมการสร้าง fiber ซึ่งจะมีลักษณะจำเพาะในแต่ละซีโรไทป์

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Avian adenoviruses โดยวิธี PCR ได้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง เริ่มแรก ในปี 1998 M. Hess และ คณะ ได้พยายามพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อใช้ทดแทนวิธีดั้งเดิมที่มีขั้นตอนซับซ้อน และใช้เวลานาน โดยอาศัยปฏิกิริยา PCR ร่วมด้วยการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำการทดสอบเชื้อ 2 กลุ่มซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในไก่ ได้แก่ เชื้อในกลุ่มที่หนึ่ง (Fowl adenoviruses) และ เชื้อในกลุ่มที่สาม (Egg drop syndrome viruses) ในการนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ ไพรเมอร์ 2 คู่แรก (H1/H2, H3/H4) ใช้สำหรับตรวจเชื้อ Fowl adenoviruses จำนวน 12 ซีโรไทป์ และ ไพรเมอร์คู่ที่ 3 (H5/H6) ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อ Egg drop syndrome viruses ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ Fowl adenoviruses ถูกออกแบบให้จับกับบริเวณอนุรักษที่เรียกว่า hexon ยีน แต่ครอบคลุมส่วนของยีน loop ซึ่งเป็นส่วนของยีนที่มีความแปรผันสูง ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการจำแนกโดยอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นขั้นตอนที่ต่อเนื่องกันหลังจากทำ PCR สำหรับ ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจจับเชื้อ Egg drop syndrome viruses นั้นมีบริเวณของยีนที่จับต่างออกไปจากไพรเมอร์ที่ใช้จับ Fowl adenoviruses โดยถูกออกแบบให้จับกับยีนในส่วน L1 และ L4 ทำให้สามารถจำแนกเชื้อ Egg drop syndrome viruses ออกจากกลุ่ม Fowl adenoviruses ได้ ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบแต่ละคู่สามารถเพิ่มปริมาณเชื้อ Fowl adenoviruses ได้ทั้ง 12 ซีโรไทป์ ไพรเมอร์ H1/H2 ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 1219 bp ไพรเมอร์ H3/H4 ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 1319 bp สาร

พันธุกรรมที่ถูกเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์คู่แรกสามารถถูกจำแนกได้โดย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeII* ได้ทุกซีโรไทป์ยกเว้น ซีโรไทป์ 4 และ 5 สำหรับสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์คู่ที่ 2 สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *HpaII* ได้จำนวน 6 ซีโรไทป์ ได้แก่ Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ที่ 1 2 4 5 และ 11 ส่วนซีโรไทป์อื่นๆ ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของรูปแบบหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ สำหรับเชื้อ Egg drop syndrome viruses สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ได้โดยไพรเมอร์ H5/H6 ให้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1901 bp และ ไม่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่ม Fowl adenoviruses จะเห็นได้ว่า เชื้อ Fowl adenoviruses และ Egg drop syndrome viruses สามารถจำแนกออกจากกันได้โดยวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีบริเวณที่จับแตกต่างกัน ส่วนเชื้อในกลุ่ม Fowl adenoviruses นั้นสามารถตรวจหาเชื้อได้ แต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อออกจากกันได้โดยสมบูรณ์ ยังคงต้องทำการทดสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพิ่มเติม อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะมีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่ศึกษาไม่สามารถจำแนกซีโรไทป์ได้ทั้งหมดโดยอาศัยเอนไซม์เพียงชนิดเดียว จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาดูด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นต่อไป (95)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่อมาในปี 1999 Zhixun Xie และคณะได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่ม ได้แก่ Fowl adenoviruses Hemorrhagic enteritis viruses และ Egg drop syndrome viruses ตามลำดับ ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์ (MK89/MK90) ให้สามารถจับยีน hexon ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ M. Hess ที่ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้ แต่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอในขนาดที่เล็กกว่า คือ 421 bp ผลการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นนี้สามารถตรวจจับเชื้อและให้ผลผลิตดีเอ็นเอเท่ากับ 421 bp ตามที่ได้ออกแบบไว้ สามารถตรวจหาเชื้อ Fowl adenoviruses ได้ครอบคลุมทั้ง 12 ซีโรไทป์ รวมถึงสามารถ

ตรวจหาเชื้อ Hemorrhagic enteritis viruses และ Egg drop syndrome viruses ซึ่งเป็นเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่ สอง และ สาม ร่วมด้วย เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อก่อโรคกลุ่มอื่นที่อาจปนเปื้อนมาด้วยในสิ่งส่งตรวจ เช่น เชื้อ mammalian adenoviruses *Salmonella enteritidis* *Proteus* spp. Chicken anemia virus Infectious laryngotracheitis virus และ *Mycoplasma gallisepticum* เป็นต้น เป็นวิธีที่มีความไว สามารถตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1 fg (96)

หลังจากที่มีการพัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง (real time polymerase chain reaction, real-time PCR) เริ่มเป็นที่นิยมในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรค ซึ่งมีข้อดีคือไม่มีขั้นตอนการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้เร็วขึ้น และสามารถตรวจวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นได้ตามสภาวะจริง อีกทั้งยังสามารถรายงานผลในเชิงปริมาณได้อีกด้วย ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการนำวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง มาตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ด้วยเช่นกัน เช่น ในปี 2008 Romanova และ คณะ ได้พยายามพัฒนาวิธีเพื่อตรวจหาเชื้อในสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นเนื้อเยื่อของไก่ที่เพาะด้วยเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 9 โดยวิธี real-time PCR ในการศึกษานี้ใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ เพื่อจับกับบริเวณ ORF20A ที่อยู่บริเวณด้านขวาสุดของจีโนม และ ให้ผลผลิตดีเอ็นเอเท่ากับ 114 bp โดยใช้สี SYBR Green I เป็นตัวชี้วัดปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้น พร้อมทั้งทำการเปรียบเทียบวิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นกับวิธี conventional PCR และ nested PCR ผลการทดสอบพบว่า วิธี real-time PCR มีความไวเท่ากับวิธี nested PCR โดยสามารถวัดได้ต่ำสุดที่ 6.6 copies ในขณะที่วิธี conventional PCR วัดได้ต่ำสุด 6.6×10^2 copies ซึ่งต่ำกว่าทั้งสองวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น 100 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (97) เมื่อนำวิธีนี้ไปทำการศึกษาในเนื้อเยื่อ Liver Bursa of Fabricius และ

Cecal tonsil แล้วทำการเปรียบเทียบระหว่าง real-time nested PCR และ วิธีการแยกเชื้อไวรัส โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลบวกเท่ากัน บนเนื้อเยื่อ Cecal tonsil โดยให้ผลบวก 12 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง สำหรับ Liver วิธี nested PCR ให้ผลบวกมากที่สุด โดยให้ผลบวก 9 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง สำหรับ Bursa of Fabricius วิธีการแยกเชื้อโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงให้ผลบวกมากที่สุด ให้ผลบวก 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยเห็นว่าวิธี nested PCR อาจมีผลบวกปลอมเกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มรอบของการ amplification (98) ส่วนวิธีการแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงนั้นใช้เวลาในการทดสอบมากกว่าทั้งวิธี real-time PCR และ nested PCR เนื่องจากใช้การเพาะเชื้อเป็นจำนวน 3 passage (99)

ต่อมาในปี 2012 Michael Hess และ คณะ ได้พัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อโดยวิธี real-time PCR ได้แบบครอบคลุมทุกสายพันธุ์ ได้แก่ Fowl adenoviruses A B C D และ E โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ที่ออกแบบให้จับอยู่กับบริเวณอนุรักษ์ของยีน 52K และใช้สีย้อมชนิด SYBR green พบว่าวิธีนี้มีความไวกว่าวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิมถึง 10^4 เท่า (ใช้ Fowl adenovirus สปีชีส์ D สายพันธุ์ SR48 ในการศึกษา) โดยพบว่าวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงสามารถตรวจหาเชื้อได้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-6} ขณะที่วิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธีดั้งเดิมนั้นสามารถตรวจหาเชื้อได้ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} เท่านั้น ในศึกษานี้ยังพบอีกว่าวิธีการทดสอบโดยวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงนี้ เมื่อนำวิธีนี้ไปทดสอบกับเชื้อที่ได้จากการ cloacal swabs พบว่าให้ผลบวกอยู่ระหว่าง 65 – 80 % ซึ่งมากกว่าที่พบจากการทดสอบในเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งให้ผลบวกรองลงมาโดยมีผลบวกอยู่ระหว่าง 27.5–60 % และ พบว่าวิธีการเพิ่มปริมาณพันธุกรรมโดยวิธีดั้งเดิมให้ผลบวกต่ำสุด โดยมีค่าร้อยละของผลบวกเท่ากับ 22.5 (100)

วิธี real-time PCR ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2017 Jianchang Wang และ คณะ ได้ทำการพัฒนาวิธีเพื่อตรวจหาเชื้อก่อโรครุนแรง ได้แก่ เชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 4 ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดของโรค Hepatitis และ Hydropericardiam syndrome ในฟาร์มสัตว์ปีก ผู้วิจัยได้เลือกใช้ไพรเมอร์ชนิด TaqMan Probe แทนการใช้ SYBR green โดยมียื่นเป้าหมายคือยีน hexon เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นที่ได้พัฒนามาก่อนหน้า เมื่อเทียบผลระหว่างวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นใหม่ เทียบกับวิธีดั้งเดิมพบว่าวิธีพัฒนาขึ้นมีความไวสูงกว่าโดยสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อได้ต่ำสุดที่ 10 copies/reaction ซึ่งสูงกว่าวิธีดั้งเดิม ถึง 10 เท่า และยังมีความจำเพาะกับเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 4 เท่านั้น โดยไม่จับกับซีโรไทป์อื่น และไม่จับกับเชื้ออื่นที่นำมาใช้ในการทดสอบ เช่น เชื้อ Avian influenza virus Newcastle disease virus Infectious bronchitis virus และ Avian leukosis virus subgroup J เป็นต้น เมื่อนำไปทดสอบกับสิ่งส่งตรวจที่ได้จากฟาร์มสัตว์ปีกพบว่าวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงมีร้อยละของผลบวกเท่ากับ 95 ในขณะที่วิธีดั้งเดิมมีร้อยละของผลบวกเพียง 85 (101)

นอกจากวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งวิธีดั้งเดิม และวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริงซึ่งเป็นที่นิยมในช่วงหลังแล้ว ยังมีการศึกษาวิธีการตรวจหาเชื้อโดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคอื่นด้วยเช่นกัน เช่น การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิเดียว หรือ ที่เรียกว่า isothermal amplification ซึ่งเริ่มเป็นที่นิยม เป็นวิธีที่มีความไว เหมาะสำหรับการใช้ตรวจตัวอย่างในพื้นที่ที่ทำได้ง่ายโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน เช่น ในงานวิจัยของ Xie และ คณะ ในปี 2011 ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses กลุ่มที่หนึ่ง โดยใช้เทคนิค loop-mediated isothermal amplification โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ เข้าไปทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบนยีน hexon ใช้อุณหภูมิสำหรับการบ่มเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเพียง

อุณหภูมิเดียว ที่ 63°C เป็นเวลา 60 นาที และอ่านผลจากสปีฟลูออเรสเซนซ์ที่เกิดขึ้น หรือ ตะกอนสีขาวที่เกิดขึ้น ผลการทดลองพบว่า วิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อได้ครบทั้ง 12 ซีโรไทป์ มีความจำเพาะกับเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่หนึ่ง โดยไม่เกิดผลบวกกับเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่สอง และ สาม สามารถตรวจหาเชื้อต่ำสุดที่ 238 copies ในขณะที่วิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิมต้องมีเชื้อ 2.38×10^5 copies ถึงจะตรวจพบได้ เมื่อนำวิธีนี้ไปทำการทดสอบกับสิ่งส่งตรวจจาก cloacal swab จำนวน 184 ตัวอย่าง พบว่าวิธีดังกล่าวให้ผลบวกมากกว่าวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิม โดยให้ผลบวก 72 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 184 ตัวอย่าง (คิดเป็น 39.1 %) ในขณะที่วิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบดั้งเดิมให้ผลบวก 54 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 184 ตัวอย่าง หรือ คิดเป็น 29.3 % แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งสองวิธียังให้ผลบวกน้อยกว่าวิธีการ real-time PCR ซึ่งให้ผลบวก 74 ตัวอย่างจากทั้งหมด 184 ตัวอย่าง (คิดเป็น 40.2 %) (102)

ต่อมาในปี 2015 ได้มีผู้คิดค้นวิธีการทดสอบโดยวิธี cross-priming amplification (CPA) ขึ้นเป็นครั้งแรก ซึ่งใช้หลักการ isothermal amplification เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Xie ในการศึกษา ผู้วิจัยได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ให้จับกับบริเวณอนุรักษ์ที่มีขนาด 151 bp ของบริเวณ loop-1 ที่ตั้งอยู่บนยีน hexon ของเชื้อ Fowl adenoviruses และทำการย้อมด้วยสี SYBR Green I หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จ หลอดที่ให้ผลบวกจะเกิดสีเขียวเมื่อส่องกับแหล่งกำเนิดแสงยูวี พร้อมทั้งมีการยืนยันผลโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อดูลักษณะแบบขั้นบันไดที่เกิดขึ้น (ladder like pattern) จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ Fowl adenoviruses ได้ทั้ง 12 ซีโรไทป์โดยมีความไวเท่ากับวิธี real-time PCR คือ 10^{-2} TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose) (ใช้เฉพาะ Fowl adenoviruses A ในการศึกษา) และ มีความจำเพาะต่อเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้ออื่นที่นำมาใช้

เปรียบเทียบ ได้แก่ เชื้อ Marek's disease virus (MDV) Infectious laryngotracheitis virus (ILT) Chicken anemia virus (CAV) และ Egg drop syndrome virus เมื่อนำไปทดสอบกับ เชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นตัวแทนของ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 2 4 5 7 8a และ 8b พบว่าวิธี CPA นี้สามารถตรวจหาเชื้อและให้ผลบวกครบทั้ง 7 ซีโรไทป์ที่นำมาทำการศึกษา (103)

รูปแบบการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มต่างๆ โดยอาศัยหลักการ PCR สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2 วิธี PCR ที่นำมาตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ประกอบไปด้วยหลายเทคนิค เช่น conventional PCR (cPCR) quantitative PCR (qPCR) และ isothermal amplification เช่น loop-mediated isothermal amplification (LAMP) และ cross-priming amplification (CPA) เชื้อที่มีการศึกษามากที่สุดคือเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่หนึ่ง หรือพัฒนาวิธีเพื่อศึกษาเชื้อบางซีโรไทป์ที่ก่อโรครุนแรงในไก่ เช่น เชื้อ Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ 4 และ 9 เป็นต้น การทดสอบความจำเพาะโดยวิธี PCR เป็นการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses บางกลุ่ม หรือ บางซีโรไทป์ ที่ต้องการตรวจหา เทียบกับเชื้อที่อาจปนเปื้อนมากับตัวอย่าง โดยเชื้อที่มักนำมาทำเปรียบเทียบเพื่อศึกษาความจำเพาะ ได้แก่ เชื้อ Chicken anemia virus Infectious laryngotracheitis และ Marek's disease virus เป็นต้น วิธีที่มีความจำเพาะ ต้องให้ผลบวกเฉพาะ เชื้อที่ต้องการตรวจหา และ ให้ผลลบกับเชื้อที่นำมาเปรียบเทียบ

การทดสอบความไว เป็นการตรวจหาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจหาเชื้อได้ โดยปริมาณของ เชื้อที่ศึกษาสามารถแสดงได้ในหน่วยของ นาโนกรัม copies number หรือ ความเจือจาง เป็นต้น งานวิจัยที่ผ่านมา หากมีการศึกษาเชื้อเป็นกลุ่ม หรือ หลายซีโรไทป์ มักเลือกเชื้อเพียงหนึ่งชนิดในกลุ่ม ขึ้นมาทำการศึกษาความไวของวิธี เช่น การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่หนึ่ง เชื้อที่นำมาทำการทดสอบความไวมักเป็นเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 (Fowl adenovirus จีโนไทป์

A) เป็นต้น งานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า วิธี qPCR มีความไวเท่ากับ nPCR หรือ CPA โดยวิธี cPCR มีความไวต่ำสุด

ตารางที่ 2 รูปแบบการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยวิธี PCR

Technique	Target Strain	Target Gene	Specificity	Sensitivity	Result	Authors
cPCR	ADV Group 1 & 3	hexon	-	-	-	M. Hess, 1998
cPCR	ADV Group 1, 2 & 3	hexon	Target (+) FAV 1-11 (ADV group I) (+) HEV (ADV group II) (+) EDS (ADV group III) avian viruses อื่นๆ และ bacteria (-) <i>Salmonella enteritidis</i> (-) <i>Proteus</i> spp. (-) Chicken anemia virus (-) Infectious laryngotracheitis virus (-) <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Model FAV 1 (CELO) Sensitivity 1 fg	Sample : Fields Isolate (+) FAV 1-11 (-) HEV (+) EDS	Xie, 1999
qPCR	FAV	ORF20A	Target (+) FAV 9 Other avian viruses (-) Marek's disease virus (-) Fowlpox virus (-) Infectious laryngotracheitis virus	Model FAV 9 Sensitivity qPCR = 6.6 copies nPCR = 6.6 copies cPCR = 6.6 x 10 ² copies	Caecal tonsil = 63% (qPCR) Liver = 47% (nested PCR) Bursa. = 37% (Cell culture)	Ramanova, 2008
qPCR	FAV A-E	52K	Target (+) FAV 1-11 Other avian viruses (-) Poxvirus (-) Chicken anemia virus	Model FAV D (SR48) Sensitivity qPCR = dil 10 ⁶ cPCR = dil 10 ²	Sample: Cloacal swab qPCR = 65-80 % Cell = 27.5-60 % cPCR = 22.5 %	M. Hess, 2012

			(-) Marek's disease virus			
			(-) Hemorrhagic enteritis virus			
			(-) Egg drop syndrome virus			
qPCR (TagMan)	FAV 4	hexon	Target (+) FAV 4 Other serotype of FAV (-) FAV 1-11 (except FAV4) Other avian viruses (-) Avian influenza virus (-) Newcastle disease virus, (-) Infectious bronchitis virus (-) Avian leukosis virus (Subgroup J)	Model FAV 4 Sensitivity qPCR = 10 copies cPCR = 100 copies	Sample: Liver, Spleen, Caecal tonsil, Gross lesions.	Jianchang, 2017
LAMP	Group I	hexon	Target: ADV Group I (+) FAV 1-11 Others ADV (Group II & III) (-) Turkey hemorrhagic enteritis (-) Marble spleen disease (-) Avian adenovirus splenomegaly (-) Egg drop syndrome virus Others Avian viruses (-) Infectious bursal disease virus (-) Chicken anemia virus (-) Avian reovirus (-) Infectious bronchitis virus (-) Infectious laryngotracheitis virus	Model FAV 1 Sensitivity LAMP = 238 copies cPCR = 2.38 x 10 ⁵ copies	Sample: Cloacal swab	Xie, 2011
CPA	Group I	hexon	Target (+) FAV 1 (CELO) Others Avian viruses (-) Egg drop syndrome virus	Model FAV A Sensitivity	Sample : Fields (+) FAV 1, 2, 4, 5, 8a, 8b	Niczyporuk, 2015

(EDS76)	CPA = 10 ² TCID ₅₀
(-) Marek's disease virus	qPCR = 10 ² TCID ₅₀
(-) Infectious laryngotracheitis virus	
(-) Chicken anaemia virus	

หมายเหตุ : cPCR : conventional PCR, qPCR : quantitative PCR, LAMP : loop-mediated isothermal amplification, nPCR : nested PCR, CPA : cross-priming amplification, FAV : Fowl adenovirus, HEV : Hemorrhagic enteritis virus, EDS : Egg drop syndrome virus, (+) : positive, (-) : negative

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของไพรเมอร์ที่ได้รับการตีพิมพ์

Target Viruses	Technique	Target gene	Name of Primer	Sequence (5'-3')	Length (bases)	%GC	Tm (-C)	Amplicons size (bp)	reference																																																																																																				
AVD Group 1	cPCR	hexon	FadV(F)	AAC GTC AAT CCC TTC AAC CACC	22	50	57.7	1318	Yang Li, 2017																																																																																																				
			FadV(R)	TTG CCT GTG GCG AAA GGC G	19	63.2	61.7			AVD Group 1	cPCR	hexon	H1 (F)	TGG GAC ATG GGG GCG ACC TA	20	65	63.2	1219	Raue & Hess, 1998	H2 (R)	AAG GGA TTG ACG TTG TCC A	19	47.4	54	ADV Group 1	cPCR	hexon	H3 (F)	AAC GTC AAC CCC TTC AAC CAC C	22	54.5	60	1319	Raue & Hess, 1998	H4 (F)	TTG CCT GTG GCG AAA GGC G	19	63.2	61.7	ADV Group 3 (EDS)	cPCR	hexon	H5 (F)	TTC TGT CAC CGA TAA AGG T	19	42.1	50.7	1901		H6 (R)	AGT TAT TCC AAA TGG GCA T	19	36.8	49.3	ADV Group 2 (HEV)	cPCR	hexon	HEV1F	TAC TGC TGC TAT TTG TTG TG	20	40	50.6	1647	Hess et al., 1999a	HEV2R	TCA TTA ACT CCA GCA ATT GG	20	40	50.5	ADV Group 1, 2 & 3	cPCR	hexon	MK89 (F)	CCC TCC CAC CGC TTA CCA	18	66.7	59.8	421	Xie et al., 1999	MK 90(R)	CAC GTT GCC CTT ATC TTG C	19	52.6	54.2	ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012	52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3	FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017
AVD Group 1	cPCR	hexon	H1 (F)	TGG GAC ATG GGG GCG ACC TA	20	65	63.2	1219	Raue & Hess, 1998																																																																																																				
			H2 (R)	AAG GGA TTG ACG TTG TCC A	19	47.4	54			ADV Group 1	cPCR	hexon	H3 (F)	AAC GTC AAC CCC TTC AAC CAC C	22	54.5	60	1319	Raue & Hess, 1998	H4 (F)	TTG CCT GTG GCG AAA GGC G	19	63.2	61.7	ADV Group 3 (EDS)	cPCR	hexon	H5 (F)	TTC TGT CAC CGA TAA AGG T	19	42.1	50.7	1901		H6 (R)	AGT TAT TCC AAA TGG GCA T	19	36.8	49.3	ADV Group 2 (HEV)	cPCR	hexon	HEV1F	TAC TGC TGC TAT TTG TTG TG	20	40	50.6	1647	Hess et al., 1999a	HEV2R	TCA TTA ACT CCA GCA ATT GG	20	40	50.5	ADV Group 1, 2 & 3	cPCR	hexon	MK89 (F)	CCC TCC CAC CGC TTA CCA	18	66.7	59.8	421	Xie et al., 1999	MK 90(R)	CAC GTT GCC CTT ATC TTG C	19	52.6	54.2	ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012	52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3	FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017	Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7										
ADV Group 1	cPCR	hexon	H3 (F)	AAC GTC AAC CCC TTC AAC CAC C	22	54.5	60	1319	Raue & Hess, 1998																																																																																																				
			H4 (F)	TTG CCT GTG GCG AAA GGC G	19	63.2	61.7			ADV Group 3 (EDS)	cPCR	hexon	H5 (F)	TTC TGT CAC CGA TAA AGG T	19	42.1	50.7	1901		H6 (R)	AGT TAT TCC AAA TGG GCA T	19	36.8	49.3	ADV Group 2 (HEV)	cPCR	hexon	HEV1F	TAC TGC TGC TAT TTG TTG TG	20	40	50.6	1647	Hess et al., 1999a	HEV2R	TCA TTA ACT CCA GCA ATT GG	20	40	50.5	ADV Group 1, 2 & 3	cPCR	hexon	MK89 (F)	CCC TCC CAC CGC TTA CCA	18	66.7	59.8	421	Xie et al., 1999	MK 90(R)	CAC GTT GCC CTT ATC TTG C	19	52.6	54.2	ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012	52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3	FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017	Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7																									
ADV Group 3 (EDS)	cPCR	hexon	H5 (F)	TTC TGT CAC CGA TAA AGG T	19	42.1	50.7	1901																																																																																																					
			H6 (R)	AGT TAT TCC AAA TGG GCA T	19	36.8	49.3			ADV Group 2 (HEV)	cPCR	hexon	HEV1F	TAC TGC TGC TAT TTG TTG TG	20	40	50.6	1647	Hess et al., 1999a	HEV2R	TCA TTA ACT CCA GCA ATT GG	20	40	50.5	ADV Group 1, 2 & 3	cPCR	hexon	MK89 (F)	CCC TCC CAC CGC TTA CCA	18	66.7	59.8	421	Xie et al., 1999	MK 90(R)	CAC GTT GCC CTT ATC TTG C	19	52.6	54.2	ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012	52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3	FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017	Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7																																								
ADV Group 2 (HEV)	cPCR	hexon	HEV1F	TAC TGC TGC TAT TTG TTG TG	20	40	50.6	1647	Hess et al., 1999a																																																																																																				
			HEV2R	TCA TTA ACT CCA GCA ATT GG	20	40	50.5			ADV Group 1, 2 & 3	cPCR	hexon	MK89 (F)	CCC TCC CAC CGC TTA CCA	18	66.7	59.8	421	Xie et al., 1999	MK 90(R)	CAC GTT GCC CTT ATC TTG C	19	52.6	54.2	ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012	52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3	FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017	Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7																																																							
ADV Group 1, 2 & 3	cPCR	hexon	MK89 (F)	CCC TCC CAC CGC TTA CCA	18	66.7	59.8	421	Xie et al., 1999																																																																																																				
			MK 90(R)	CAC GTT GCC CTT ATC TTG C	19	52.6	54.2			ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012	52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3	FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017	Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7																																																																						
ADV Group 1 (FAV A-E)	qPCR	52K	52K-fw	ATG GCK CAG ATG GCY AAG G	19	-	-	NA	M. Hess, 2012																																																																																																				
			52K-rw	AGC GCC TGG GTC AAA CCG A	19	63.2	62.3			FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017	Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7																																																																																					
FAV 4	qPCR		Sense	TTA CGC TTA CGG TGC CTA CGT	21	52.4	58.5	NA	Jianchang, 2017																																																																																																				
			Antisense	CCG CGT TAT TCAT GAT CCA GTA	21	45.5	54.7																																																																																																						

	TagMan probe	FAM-5'-CGACGGTCCAGTCCTCACG-3'-Eclipse.	22	68.2	63.9	
	pX-For	CAG GAA GCG TCG CCA ACA TCA T	22	54.5	60.2	440
	pX-Rev	ACC GTT TCT CCT TCT CCT CGT TGA	24	50	59.7	
ADV Group 1	nested PCR					Ramanova, 2018
	pXin-For	CTT ACG GGC GGG CGA ACA GC	20	70	63.8	370
	pXin-Rev	CGG CAC CTG AAA CGG GAA CC	20	65	61.4	

หมายเหตุ : ADV; Avian adenoviruses, FAV; Fowl adenovirus, HEV; Hemorrhagic enteritis virus, EDS; gg drop syndrome virus, cPCR; conventional PCR, qPCR; quantitative PCR, NA; Not Available

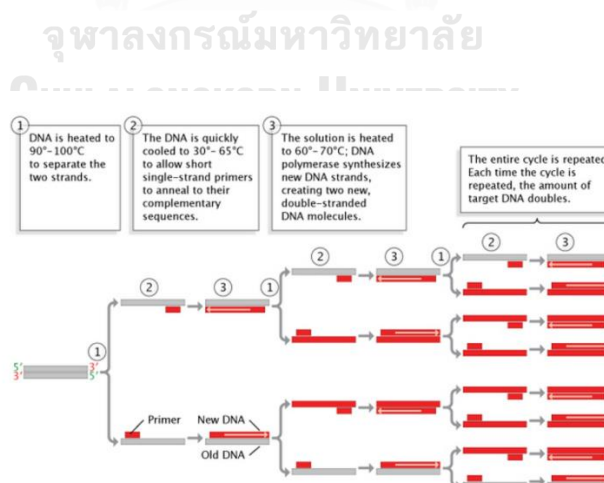
2.13 การเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ในปี 1984 ได้มีการค้นพบปฏิกิริยาาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Kary Mullis ซึ่งสามารถเลียนแบบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตในหลอดทดลองได้ โดยอาศัยองค์ประกอบในการ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังนี้ ดีเอ็นเอแม่แบบที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบที่ปลายด้าน 3' และ 5' เอนไซม์ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เช่น Taq DNA polymerase Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP) ได้แก่ dATP dTTP dGTP dCTP สารละลายบัฟเฟอร์ (PCR buffer) โคแฟกเตอร์ของ ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส เช่น Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} และเครื่องมือสำหรับการเปลี่ยนอุณหภูมิ เช่น เครื่อง Thermal Cycler

องค์ประกอบเหล่านี้จะถูกนำมาผสมรวมกันแล้วทำการเปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอน Denaturation เพื่อแยกสายดีเอ็นเอซึ่งแต่เดิมที่มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double strand DNA) ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว (single strand DNA) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 94 - 95 องศาเซลเซียส ในการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสของดี

เอ็นเอซึ่งแตกต่างจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติ ซึ่งจะใช้เอนไซม์เฮลิคาส (Helicase) ในการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ เมื่อทำการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวแล้ว จะมีการลดอุณหภูมิลงอยู่ระหว่าง 45-65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้าไปจับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ เรียกขั้นตอนนี้ว่า annealing โดยไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น จะเข้าไปจับบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกัน สำหรับในสิ่งมีชีวิตจะอาศัยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า ไพรเมส (Primase) ในการสร้างอาร์เอ็นเอไพรเมอร์ขึ้น โดยเมื่อไพรเมอร์เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอต้นแบบแล้วจะสามารถทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ เรียกขั้นตอนนี้ว่า extension ทำได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 68-72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทนร้อน *Taq* DNA polymerase เอนไซม์นี้จะนำนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอสายเดี่ยวมาต่อจากไพรเมอร์จนเกิดดีเอ็นเอสายคู่ คู่ใหม่เกิดขึ้น ใน 1 รอบของการเปลี่ยนอุณหภูมิ (cycle) จะทำให้เกิดดีเอ็นเอสายคู่ 2 สาย จากดีเอ็นเอสายคู่ 1 สาย เมื่อทำการเปลี่ยนอุณหภูมิเป็นจำนวน n รอบจะทำให้มีดีเอ็นเอสายคู่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2^n สาย โดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสามารถแสดงได้ตาม

รูปที่ 3



รูปที่ 3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ขั้นตอนที่ 1 denature ขั้นตอนที่ 2 annealing ขั้นตอนที่ 3 extension (104)

ไพรมเมอร์ที่ดีควรมีขนาดประมาณ 20 เบส หากไพรมเมอร์มีความยาว (ประมาณ 24 เบส) จะสามารถเพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยาได้ในทางกลับกัน หากไพรมเมอร์มีสายสั้นเกินไป (16 เบส) จะทำให้เกิดการจับแบบไม่จำเพาะ ในบริเวณที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ต้องไม่เกิด secondary structure โดยต้องไม่จับกันเองกับไพรมเมอร์สายเดียวกัน (self-dimer) หรือ เกิดการจับกันระหว่างไพรมเมอร์อีกสาย (cross dimer) ไม่ควรมีลำดับเบสชนิดเดียวกันเรียงติดกันตั้งแต่ 3 เบสขึ้นไป หรือ มีเบสคู่สมกันในสายจนเกิด hairpin structure ได้ เนื่องจากไพรมเมอร์ใช้ปลายด้าน 3' จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ ดังนั้นปลายด้าน 3' ของไพรมเมอร์ควรเป็นเบสชนิด G หรือ C มากกว่าที่จะเป็น A หรือ T โดยไพรมเมอร์แต่ละสายควรมี %GC อยู่ระหว่าง 40-60%

melting temperature (T_m) ของไพรมเมอร์ เป็นอุณหภูมิที่ไพรมเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอครึ่งหนึ่ง ค่า T_m นี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเบสที่เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากพันธะระหว่าง Guanine (G) และ Cytosine (C) แข็งแรงมากกว่าพันธะระหว่าง Adenine (A) และ Thymine (T) หากมีเบส G และ C เป็นองค์ประกอบจำนวนมาก T_m ก็จะมีค่าสูง ทั้งนี้สามารถคำนวณค่า T_m ของไพรมเมอร์ได้ดังนี้

$$T_m = (\text{number of G} + \text{number of C}) \times 4^\circ\text{C} + (\text{number of A} + \text{number of T}) \times 2^\circ\text{C}$$

ค่า T_m นี้มีประโยชน์ในการนำมาประมาณค่า annealing temperature (T_a) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่จะใช้ในขั้นตอน annealing โดยปกติค่า T_m ของไพรมเมอร์แต่ละคู่ควรมีค่าใกล้เคียงกัน เพื่อให้สามารถกำหนดค่า T_a ได้ง่ายขึ้น โดยสามารถทำการคำนวณหาค่า T_a ได้ตามสมการ

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

อย่างไรก็ตามในบางตำราอาจมีการนำค่า T_m ของผลผลิตดีเอ็นเอมาใช้ในการหาค่า T_a ด้วยเช่นกัน โดยสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$T_a = 0.3 \times T_m (\text{primer}) + 0.7 \times T_m (\text{product}) - 14.9$$

การประมาณค่า T_a ที่เหมาะสมเป็นประโยชน์ในการทำ PCR อย่างยิ่งเนื่องจากหากมีการตั้งค่า T_a สูงไป จะทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบอย่างไม่มีประสิทธิภาพ ในขณะที่เดียวกัน หากมีการตั้งค่า T_a ต่ำไป จะทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบอย่างไม่จำเพาะ (105-108)

2.14 การทดสอบความถูกต้อง (analytical validation) ของวิธีที่ใช้ในการทดสอบยาและวัคซีน

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสบนป้อนในวัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย จำเป็นต้องมีการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามแนวทางของ International Conference on Harmonization (ICH) ซึ่งเป็นข้อกำหนดสำหรับตรวจสอบความถูกต้องของยา โดยหัวข้อการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี (Validation of Analytical Procedures) หมวด Q2(R1) (109) รวมถึงมาตรฐานการขึ้นทะเบียนยาในฝั่งยุโรป European Medical Agencies (EMA) (110) ระบุว่าพารามิเตอร์ที่ต้องใช้ในการประเมิน สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัส บนป้อนแผลง ได้แก่ ความจำเพาะ และความไวของวิธี

ความจำเพาะ เป็นความสามารถในการตรวจหาสิ่งที่ต้องการศึกษา (analyte) ได้ตรงตามความเป็นจริงในสถานะที่มีสิ่งรบกวน (109) ซึ่งในที่นี้ analyte คือ เชื้อ Avian adenoviruses และสิ่งรบกวนคือองค์ประกอบของวัคซีน (vaccine matrix) เช่น triton-x ฟอรั่มัลดีไฮด์ และ โพรตีน เป็นต้น ซึ่ง matrix เหล่านี้สามารถรบกวนการตรวจพบเชื้อไวรัส ที่อาจปนเปื้อนอยู่ในวัคซีนไขหวัดใหญ่ได้ เพื่อศึกษาความจำเพาะดังกล่าวจึงจำเป็นต้องทำการตรวจหาเชื้อไวรัสบนป้อนที่เติมลงไปในตัวอย่าง vaccine matrix หากวิธีที่ศึกษามีความจำเพาะ ต้องสามารถตรวจเชื้อที่ใส่ลงไปในวัคซีน

ใช้หัตถ์ใหญ่ได้ สำหรับการทดสอบความไวของวิธี เป็นการหาขีดจำกัดในการตรวจหา (limit of detection) เป็นการตรวจหาปริมาณไวรัสที่น้อยที่สุดที่สามารถหาได้ โดยทำการตรวจหาเชื้อไวรัส ในช่วงที่ความเข้มข้นต่ำมาก (109)



บทที่ 3

วัสดุและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

1. Deep Freezer (Thermo Fisher Scientific, USA)
2. 75 cm² Tissue culture flasks (Corning, USA)
3. 5 ml, 10 ml disposable pipettes (Corning, USA)
4. 15 ml, 50 ml centrifuge tubes (Corning, USA)
5. 20-200 µl sterile tips (Corning, USA)
6. 200-1,000 µl sterile tips (Corning, USA)
7. 2.0 ml cryotubes (Corning, USA)
8. Cell scraper (Corning, USA)
9. CO₂ Incubator (LEEC, UK)
10. Hemocytometer
11. Light microscope (Nikon, Japan)
12. Inverted Microscope Eclipse Ti (Nikon, Japan)
13. Micropipette 0.2-2 µl (Thermo Fisher Scientific, USA)
14. Micropipette 2-20 µl (Thermo Fisher Scientific, USA)
15. Micropipette 20-200 µl (Thermo Fisher Scientific, USA)
16. Micropipette 200-1000 µl (Thermo Fisher Scientific, USA)
17. Microcentrifuge tube 1.5-2 ml (Thermo Fisher Scientific, USA)

18. Microcentrifuge tube 0.2 ml (Thermo Fisher Scientific, USA)
19. Laminar Air Flow (ESCO, Singapore)
20. Spinner (Labnet, USA)
21. Microcentrifuge (Thermo Fisher Scientific, USA)
22. Biosafety Cabinet (Thermo Fisher Scientific, USA)
23. Thermal Cycler (Biometra, Germany)
24. QuanStudio™ 5 real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)
25. Power supply (Labnet, USA)
26. Electrophoresis chamber (Labnet, USA)
27. Gel documentation (Syngene, USA)
28. Refrigerator 2-8°C (Sanden Intercool, Thailand)
29. -20°C Freezer (Sunyo, Japan)

3.2 โปรแกรม

1. โปรแกรมสำหรับการถ่ายภาพและวิเคราะห์ข้อมูล Genesys 3.0 (Syngene, USA)
2. โปรแกรม QuanStudio™ Design and Analysis Software สำหรับควบคุมการทำงานของเครื่อง QuanStudio™ 5 และ วิเคราะห์ผลการทดสอบ (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.3 น้ำยาและสารเคมี

1. Vivaspin 20; 30 kDa MWCO Polyethersulfone (GE Healthcare, USA)
2. เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LMH สายพันธุ์ ATCC CRL-2117
3. Waymouth's MB 752/1

4. Inactivated FBS
5. PBS pH 7.2 (Ca^{2+} , Mg^{2+} free) (Gibco, USA)
6. 0.05% Trypsin-EDTA in PBS (Gibco, USA)
7. 0.75% Rat red blood cells (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล)
8. 0.2% Gelatin in ultrapure water (Merck, Germany)
9. ชุดสกัด ดีเอ็นเอ Dneasy blood and tissue kits (Qiagen, Germany)
10. PCR water (Qiagen, Germany)
11. ไพรเมอร์ (Macrogen, Korea)
12. น้ำยาสำหรับตรวจและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม 2x Sensimix SYBR (Bioline, Australia)
13. น้ำยาสำหรับตรวจและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR SuperMix 1.1 X (Invitrogen, USA)
14. สีย้อมเจล GelStar™ (Lonza, USA)
15. Agarose gel (SeaKem LE Agarose, USA)
16. DNA Ladder ขนาด 100 bp (Vivantis, Malaysia)
17. Tris-borate-EDTA (TBE) buffer (Wisent Bioproduct, Canada)

3.4 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

วัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย (Influenza vaccine split virion, Inactivated) ในขั้นตอนที่เป็น Monovalent bulk ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว และมีองค์ประกอบดังนี้ hemagglutinin antigen neuraminidase antigen triton X-100 formaldehyde thimerosal protein gentamicin และ ovalbumin เป็นต้น

เชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ Phelps CELO (Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432) ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์ LMH (ATCC CRL-2117) และมีความเข้มข้น 10^4 TCID₅₀/0.1 ml จาก American Type Culture Collection ประเทศสหรัฐอเมริกา

เชื้อ Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 Hemorrhagic enteritis virus และ Egg drop syndrome virus ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน hexon จากฐานข้อมูล GenBank ดังนี้ Fowl adenovirus 2 ATCC VR-827 (AF339915.1) Fowl adenovirus 4 ATCC VR-829 (AF339917.1) สำหรับเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 Hemorrhagic enteritis virus (AF075681.1) สำหรับเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 2 และ Egg drop syndrome virus (NC_001813.1) สำหรับเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 3 โดยทำการสังเคราะห์ยีนดังกล่าวบนเวกเตอร์ชนิด pUC57-Basal free โดยบริษัท Gene Universal ประเทศสหรัฐอเมริกา

เชื้อก่อโรคในไก่ที่นำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ เชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* 56/85 ATCC-15302 *Mycoplasma synoviae* ATCC-25204 Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus และ Chicken bronchitis virus 793B (4/91, CR88) ซึ่งนำเข้าจากบริษัท GD Animal Health ประเทศเนเธอร์แลนด์

3.5 การสกัดดีเอ็นเอ

นำชุดสกัดดีเอ็นเอ Dneasy blood and tissue kits บริษัท Qiagen วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใส่เชื้อ Avian adenoviruses ที่ spike ในวัคซีน ปริมาตร 200 μ l ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml ที่เตรียมไว้ ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ ความเร็ว 300 g เป็นเวลา 5 นาที ดูด supernatant ออก และ resuspend ในสารละลาย PBS จนได้ปริมาตร 200 μ l ใส่เอนไซม์ proteinase K ปริมาตร 20 μ l ลงในตัวอย่างและผสมให้เข้ากัน ใส่สารละลาย AL buffer ปริมาตร 200 μ l ลงไปในตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 10 นาที ใส่สารละลาย เอทานอลบริสุทธิ์ (99.5%) ปริมาตร 200 μ l ลงไปในตัวอย่าง และ ผสมให้เข้ากัน ใส่สารละลายดังกล่าว ลงบน DNeasy mini spin column แล้วทำการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 rpm (round per minute) เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ ไปยังหลอด DNeasy mini spin column หลอดใหม่ ใส่สารละลาย AW1 ปริมาตร 500 μ l แล้วทำการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ ไปยังหลอด DNeasy mini spin column หลอดใหม่ และใส่สารละลาย AW2 ปริมาตร 500 μ l แล้วทำการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ย้ายคอลัมน์ DNeasy mini spin column ไปยังหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5-2 ml หลอดใหม่ แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 200 μ l ลงบนเมมเบรนโดยตรง แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำหลอด microcentrifuge tube ที่บ่มแล้วเสร็จ ไปทำการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำการ elute ดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่ -20°C เป็นเวลาไม่เกิน 2 ปี

3.7 ไพรเมอร์สำหรับการวิจัย

ไพรเมอร์สำหรับวิธี nested PCR

ออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน hexon ซึ่งเป็นยีนอนุรักษ์ของเชื้อ Avian adenovirus (Accession no. AF339914.1) จากฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม PrimerQuest™ Tool (Integrate DNA Technologies) ทำการคัดเลือกไพรเมอร์คู่นอก (external primer) ซึ่งให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และไพรเมอร์คู่ใน (internal primer) ซึ่งให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่าและจับได้ในช่วงกึ่งกลางของผลผลิตดีเอ็นเอจากไพรเมอร์คู่แรก โดยได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 2 ชุดที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นวิธี nested PCR ได้แก่ external primer ซึ่งประกอบด้วย forward primer: Ex-F1 (5'TGCGCCAAGAGAAGCTATTT3') reverse primer: Ex-R1 5' (CGGAGTTGACTTGCTGGTAA 3') จับได้กับนิวคลีโอไทด์ของยีน hexon ระหว่างตำแหน่งเบสที่ 243 ถึง 697 ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 455 bp และ internal primer ซึ่งประกอบด้วย forward primer: In-F1 (5'TCAGCAGGTCAATAGCATCTC3') reverse primer: In-R1 (5'CCACCAGCCAATATTATCC 3') จับได้กับนิวคลีโอไทด์ของยีน hexon ระหว่างตำแหน่งเบสที่ 363 ถึง 466 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ด้านในของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบแรกและให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 104 bp

ไพรเมอร์สำหรับวิธี real-time PCR

ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Multiple Sequence Alignment Clustal Omega ของ EMBL-EMB โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ Fowl adenovirus 1 (AF339914.1) Fowl adenovirus 2 (AF339915.1) Fowl adenovirus 3 (AF339916.1) Fowl adenovirus 4 (AF339917.1) Fowl adenovirus 5 (AF339919.1) Fowl adenovirus 6 (AF339921.1) Fowl

adenovirus 7 (AF339922.1) Fowl adenovirus 8 (AF339918.) Fowl adenovirus 9 (AF339923.1) Fowl adenovirus 10 (AF339924.1) Hemorrhagic enteritis virus (AF075681.1) Egg Drop syndrome virus (NC_001813.1) จากฐานข้อมูล GenBank โดยพบไพรเมอร์ที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ Avian adenoviruses ได้ทั้ง 3 กลุ่ม จำนวน 1 คู่ ประกอบด้วย forward primer FUH02: 5'-GGBGAYRRYHGGRTBBTKGAYATGGG-3' และ reverse primer RUH03: 5'-AARTTRTCHCKRAANCCRATRTRATT-3' ซึ่งจับได้กับยีน hexon ระหว่างตำแหน่งเบสที่ 136-746 และให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 610 bp

การเตรียมไพรเมอร์

นำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทำการปั่นด้วยเครื่อง spinner เป็นเวลา 10 วินาที ทำการละลายไพรเมอร์ด้วย PCR water ตามปริมาตรที่ถูกกำหนดมาจากบริษัทผู้ผลิตเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100 pmol/μl ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งโดยเครื่อง spinner เป็นเวลา 10 วินาที แบ่งไพรเมอร์ที่ละลายเสร็จแล้วเก็บใส่ microcentrifuge tube ขนาด 0.2 ml หลอดละ 5 μl เก็บไว้ที่ -20°C

3.8 การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

ก่อนที่จะนำวัคซีนมาทำการทดสอบบนเซลล์เพาะเลี้ยงจะต้องทำการ Dialysis เพื่อกำจัดสารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงออกจากวัคซีนเสียก่อน ขั้นแรก ทำการล้างแผ่นกรอง Vivaspin-20 โดยการเติมสารละลาย PBS ปริมาตร 10 ml ลงบน concentrator ของ Vivaspin-20 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความแรง 1,000 x g 4°C เป็นเวลา 10 นาที ผสมวัคซีน ปริมาตร 5 ml กับสารละลาย PBS ปริมาตร 5 ml แล้วเทส่วนผสมดังกล่าวลงบน Vivaspin-20 ทำการปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความแรง 3,200 x g 4°C เป็นเวลา 60 นาที ทำการ Rinse สารที่ถูกกักอยู่ใน concentrator ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 10 ml แล้วย้ายสารละลายนี้ไปยัง Vivaspin-20

หลอดใหม่ ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 ครั้ง แล้วจึงทำการ Elute ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 5 ml แล้วกรองปราศจากเชื้อด้วยฟิลเตอร์ขนาด 0.22 μm เก็บสารละลายนี้ไว้ในหลอด Centrifuge ขนาด 15 ml ที่ 4°C จนกว่าจะนำมาทำการทดสอบบนเซลล์เพาะเลี้ยง

เตรียมเซลล์ LMH (ATCC CRL-2117) บน tissue culture flask ขนาด 75 cm^2 ที่ความเข้มข้น 3×10^6 cells/flask บ่มเซลล์ไว้ที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 1-2 วัน จนเซลล์เกาะเต็มพื้นผิวของ flask ก่อนเริ่มการทดสอบ เติมวัคซีนที่ผ่านการ Dialysis ปริมาตร 1 ml กับ serum free Waymouth's medium ปริมาตร 1 ml เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมแบบลบ ลงบนเซลล์ LMH ที่เกาะอยู่บน flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ($3-5 \times 10^6$ cells/flask) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเพลาทุก 15 นาทีจนครบเวลาบ่ม ล้างส่วนผสมดังกล่าวออกเป็นจำนวน 2 ครั้งด้วย serum free Waymouth's medium ปริมาตร 5 ml เติมอาหาร Waymouth's medium ที่มี Fetal bovine serum 5% แล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 14 วัน อ่านผลการเกิด cytopathic effect (CPE) และ hemagglutination (HA) ด้วยเม็ดเลือดแดงของหนูแรทความเข้มข้น 0.75% ในวันที่ 1 5 7 12 และ 14 หากมีการตรวจพบ CPE และ HA ให้รายงานผลเป็นบวก หากไม่มีการตรวจพบ CPE และ HA ให้รายงานผลเป็นลบ ต้องไม่พบ CPE ของเซลล์เพาะเลี้ยง และ HA ของน้ำเลี้ยงในทั้ง 14 วัน จึงจะถือว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses

3.9 การทดสอบความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

เป็นการศึกษาผลกระทบขององค์ประกอบที่มีอยู่ในวัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย เช่น hemagglutinin ovalbumin ฟอสฟอรัส tritonX-100 หรือ tween หลังจากทำการ dialysis ที่มีต่อความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่ 1 เพื่อศึกษาความจำเพาะ

ดังกล่าว จึงทำการเติมเชื้อ Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ ATCC VR-432 ที่ความเข้มข้น 3 Log TCID₅₀/0.1 ml ปริมาตร 0.1 ml ลงในตัวอย่างวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายที่ผ่านการ dialysis แล้ว ปริมาตร 0.9 ml จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2 Log TCID₅₀/0.1 ml พร้อมทั้งทำการเติม serum free Waymouth's medium ลงไปในตัวอย่างวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายที่ผ่านการ dialysis แล้ว เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม เติมนส่วนผสมระหว่างวัคซีนกับเชื้อ หรือ วัคซีนกับ serum free Waymouth's medium ปริมาตร 1 ml ลงบนเซลล์ LMH ที่เกาะอยู่บน flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (3-5 x 10⁶ cells/flask) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เขย่าเพลาทุกๆ 15 นาทีจนครบเวลาบ่ม ล้างส่วนผสมดังกล่าวออก เป็นจำนวน 2 ครั้งด้วย serum free Waymouth's medium ปริมาตร 5 ml เติมนอาหาร Waymouth's medium ที่มี Fetal bovine serum 5% แล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 14 วัน อ่านผลการเกิด CPE และ ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการทดสอบ HA ด้วย เม็ดเลือดแดงของหนู ความเข้มข้น 0.75% ในวันที่ 1 5 7 12 และ 14 หากมีการตรวจพบ CPE และ HA ให้รายงานผลเป็นบวก หากไม่มีการตรวจพบ CPE และ HA ให้รายงานผลเป็นลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.10 การทดสอบความไวของการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

เป็นการตรวจหาปริมาณของเชื้อ Avian adenoviruses ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ โดยวิธีเพาะเลี้ยงบนเซลล์ LMH ทำการเจือจางเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ ATCC VR-432 ที่มีความเข้มข้น 10⁴ TCID₅₀/0.1 ml แบบ serial ten-fold dilution จนมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 10⁴-10⁻⁴ TCID₅₀/0.1 ml เติมนเชื้อแต่ละความเข้มข้น และ serum free Waymouth's medium เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม ปริมาตร 1 ml ลงบนเซลล์ LMH ที่เกาะอยู่บน flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (3-5 x 10⁶ cells/flask) นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 1

ชั่วโมง เขย่าเพลาทุกๆ 15 นาทีจนครบเวลาบ่ม ล้างส่วนผสมดังกล่าวออกเป็นจำนวน 2 ครั้งด้วย serum free Waymouth's medium ปริมาตร 5 ml เติมอาหาร Waymouth's medium ที่มี fetal bovine serum 5% แล้ว นำไปบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 14 วัน อ่านผลการเกิด CPE และ ทำการเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์มาทำการทดสอบ HA ด้วยเม็ดเลือดแดงของหนูความเข้มข้น 0.75% ในวันที่ 1 5 7 12 และ 14 โดยทำการทดสอบเป็นจำนวนทั้งสิ้น 3 ซ้ำ

3.11 การตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยวิธี nested PCR

นำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้สำหรับวิธี nested PCR จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์คู่นอก (external primer) ที่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอ 455 bp และ ไพรเมอร์คู่ใน (internal primer) ที่ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 104 bp มาทำการทดสอบกับเชื้อ Avian adenoviruses โดยมีองค์ประกอบของสารในหลอดทำปฏิกิริยาดังนี้ ดีเอ็นเอตั้งต้น 2 µl forward primer 1 pmol/µl reverse primer 1 pmol/µl PCR supermix 1X ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM KCl 50 mM Magnesium Chloride 1.5 mM dGTP 200 µM dATP 200 µM dTTP 200 µM dCTP 200 µM recombinant *Taq* DNA Polymerase 20 U/ml และ stabilizers มีการกำหนดอุณหภูมิ และ จำนวนรอบ สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เรียงตามลำดับ ดังนี้ pre-denature 90°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ denature 94°C 1 นาที annealing 60°C 1 นาที extension 74°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ post extension 74°C 10 นาที 1 รอบ และ ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4°C จนกว่าจะมีการนำไปศึกษาต่อ

การทดสอบความจำเพาะ เป็นการศึกษาความสามารถในการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยไม่เกิด cross-reaction กับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ รวมถึงประเมินผลกระทบขององค์ประกอบที่มีอยู่ในวัคซีนไข่หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย เช่น hemagglutinin ovalbumin ฟอสฟอรัส

ไฮด์ tritonX-100 หรือ tween ส่งผลต่อความสามารถในการตรวจหาเชื้อ Fowl adenoviruses 1 Fowl adenoviruses 2 Fowl adenoviruses 4 Hemorrhagic enteritis virus และ Egg drop syndrome virus เพื่อเป็นการจำลองสถานการณ์ในกรณีที่เชื่อนั้นปนเปื้อนอยู่ในวัคซีน จึงทำการเติมเชื้อ Fowl adenoviruses 1 Fowl adenoviruses 2 Fowl adenoviruses 4 Hemorrhagic enteritis virus และ Egg drop syndrome virus รวมถึงเชื้อก่อโรคในไก่ ได้แก่ *Mycoplasma gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus Chicken bronchitis virus รวมถึงสารละลาย PBS เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมแบบลบ ปริมาตร 50 μ l ลงไปในหลอดที่บรรจุวัคซีนปริมาตร 150 μ l ไว้แล้ว ทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัคซีนที่เติมเชื้อ หรือ PBS ลงไป ทำการทดสอบโดยวิธี nested PCR ซึ่งมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยไพรเมอร์ 2 รอบ รอบแรก ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ลงในหลอดทำปฏิกิริยาที่เติมไพรเมอร์คู่นอกแล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR รอบที่สอง ผสมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบแรก ปริมาตร 2 μ l ลงไปในหลอดทำปฏิกิริยาหลอดใหม่ที่มีไพรเมอร์คู่ในแล้วทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งโดยเครื่อง PCR ผสมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ ปริมาตร 10 μ l กับ loading dye ปริมาตร 2 μ l โหลดผลผลิตดีเอ็นเอ และ DNA ladder ขนาด 100 bp ลงบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% ที่วางอยู่ใน electrophoresis chamber ที่เติมสารละลาย TBE ไร้จนท่อม ปลอ่ยกระแสไฟฟ้าผ่านเจล โดยตั้งค่าความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลท์ ในโหมด Constant volts ย้อมเจลที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้วเสร็จด้วยสีย้อม GelStar™ เก็บไว้ในที่มีเดเป็นเวลา 30 นาที ย้ายเจลเข้าไปในเครื่อง gel documentation แล้วทำสองด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้กับ DNA ladder และ ทำการบันทึกภาพ

การทดสอบความไว เป็นการตรวจหาปริมาณของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ ทำการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ ATCC VR-432 แบบ serial ten-fold dilution ที่มีความเข้มข้น 10^4 TCID₅₀/0.1 ml เจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีปั่นหัวใหญ่ชนิดเชื้อตาย แบบ 10 fold dilution จนมีความเจือจางอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^8 TCID₅₀/0.1 ml ผสมดีเอ็นเอของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทำปฏิกิริยาซึ่งผสมไพรเมอร์คู่กันไว้แล้ว นำหลอดทำปฏิกิริยาที่เติมดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ววางลงบนหลุมของเครื่อง PCR ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขั้นตอนที่สอง ผสมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบแรก ปริมาตร 2 μ l ลงในหลอดทำปฏิกิริยาหลอดใหม่โดยใช้ไพรเมอร์คู่ใน ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง PCR อีกครั้ง ผสมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ ปริมาตร 10 μ l กับ loading dye ปริมาตร 2 μ l หยอดผลผลิตดีเอ็นเอ และ DNA ladder ขนาด 100 bp ลงบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% ที่วางอยู่ใน electrophoresis chamber ที่เติมสารละลาย TBE ใ้จนวนท่วม ปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านเจล โดยตั้งค่าความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ ในโหมด constant volts ย้อมเจลที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้วเสร็จด้วยสีย้อม GelStar™ เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ย้ายเจลเข้าไปในเครื่อง gel documentation แล้วทำการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดผลผลิตดีเอ็นเอ ที่ได้กับ DNA ladder และ ทำการบันทึกภาพ

3.12 การตรวจหาเชื้อโดยวิธี real-time PCR

การทดสอบโดยวิธี real-time PCR ทำได้โดยการผสมดีเอ็นเอตั้งต้นที่สกัดได้จากตัวอย่างลงในหลอดทำปฏิกิริยาซึ่งมีองค์ประกอบสำหรับ 1 ปฏิกิริยาดังนี้ ดีเอ็นเอตั้งต้น 2 μ l forward primer 0.25 pmol/ μ l reverse primer 0.25 pmol/ μ l 2x SensiMix 12.5 μ l เติมด้วย PCR water จนมีปริมาตร 25 μ l มีการกำหนดอุณหภูมิ และจำนวนรอบ สำหรับทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

เรียงตามลำดับ ดังนี้ pre-denature 95°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ denature 95°C 30 วินาที annealing 55°C 30 นาที extension 72°C 1 นาที จำนวน 40 รอบ โดยบันทึกค่าสัญญาณของสี SYBR Green I ที่เกิดขึ้นในขั้น annealing และ extension ตามด้วยการทำ melting curve analysis ดังนี้ 95°C 15 วินาที 60°C 1 นาที และ Dissociation 95°C 15 วินาที บันทึกค่าสัญญาณของสี SYBR Green I ที่เกิดขึ้นในขั้นตอน Dissociation

การทดสอบความจำเพาะ เป็นการศึกษาความสามารถในการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses โดยไม่เกิด cross-reaction กับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ รวมถึงประเมินผลกระทบขององค์ประกอบที่มีอยู่ในวัคซีนไข่หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย เช่น hemagglutinin ovalbumin ฟอสฟอไรต์ tritonX-100 หรือ tween ที่ส่งผลต่อความสามารถในการตรวจหาเชื้อ Fowl adenoviruses 1 Fowl adenoviruses 2 Fowl adenoviruses 4 Hemorrhagic enteritis virus และ Egg drop syndrome virus เพื่อเป็นการจำลองสถานการณ์ในกรณีที่เขื่อนั้นปนเปื้อนอยู่ในวัคซีน จึงทำการเติมเชื้อ Fowl adenovirus 1 Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 Hemorrhagic enteritis virus และ Egg drop syndrome virus รวมถึงเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ ได้แก่ *Mycoplasma gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus Chicken bronchitis virus และสารละลาย PBS เพื่อใช้เป็นตัวอย่างควบคุมแบบลบ ปริมาตร 50 µl ลงไปในหลอดที่บรรจุวัคซีนปริมาตร 150 µl ไว้แล้ว ทำการสกัดดีเอ็นเอจากวัคซีนที่เติมเชื้อหรือ PBS ลงไป ทำการทดสอบโดยวิธี real-time PCR ทำการผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแต่ละชนิดลงในหลอดทำปฏิกิริยา ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time PCR ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสถานะจริง และ melting curve analysis ผ่านโปรแกรม QuanStudio™ Design and Analysis Software ทำการยืนยันผลผลิตดีเอ็นเอบน agarose gel

โดยผสมผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ real-time PCR ปริมาตร 10 μ l กับ loading dye ปริมาตร 2 μ l โทลด์ผลผลิตดีเอ็นเอ และ DNA ladder ขนาด 100 bp ลงบน agarose gel ความเข้มข้น 1.5% ที่วางอยู่ใน electrophoresis chamber ที่เติมสารละลาย TBE ไ่ว้จนวนท่วม ปล่อยกระแสไฟฟ้า ผ่านเจล โดยตั้งค่าความต่างศักย์เท่ากับ 100 โวลต์ ในโหมด Constant volts ย้อมเจลที่ผ่านการทำ electrophoresis แล้วด้วยสีย้อม GelStar™ เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ย้ายเจลเข้าไปในเครื่อง gel documentation แล้วทำการส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดผลผลิตดีเอ็นเอ ที่ได้กับ DNA ladder และทำการบันทึกภาพ

การทดสอบความไว เป็นการตรวจหาปริมาณของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบในภาวะที่เชื้อปนเปื้อนอยู่ในวัคซีน โดยทำการสกัดสารพันธุกรรมของเชื้อ Fowl adenoviruses ซีโรไทป์ 1 สายพันธุ์ ATCC VR-432 แบบ serial ten-fold dilution ที่มีความเข้มข้น 10^4 TCID₅₀/0.1 ml เจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยวัคซีนไข้หวิดใหญ่ชนิดเชื้อตาย แบบ 10 fold dilution จนมีความเจือจางอยู่ระหว่าง 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ลงในหลอดทำปฏิกิริยา ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเครื่อง real-time PCR ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาวะจริง และการทำ melting curve analysis ผ่านโปรแกรม QuanStudio™ Design and Analysis Software

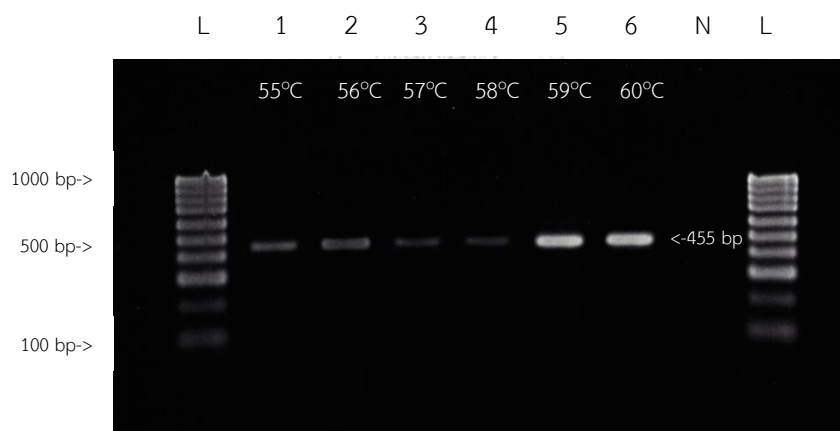
บทที่ 4

ผลการทดลอง

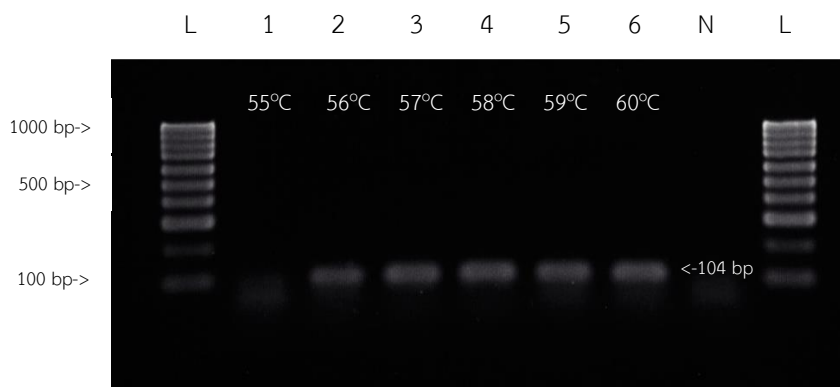
4.1 ไพรเมอร์สำหรับวิธี nested PCR

เมื่อนำไพรเมอร์คู่นอกและคู่ในสำหรับการทำ nested PCR มาทำ PCR Gradient เพื่อหา annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมในช่วงอุณหภูมิ 55-60°C ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4 โดยพบว่าไพรเมอร์คู่นอกสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีเมื่อ Ta มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 59°C และ 60°C ส่วนไพรเมอร์คู่ในสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในช่วง Ta ระหว่าง 56-60°C ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยง non-specific product ที่อาจเกิดขึ้นได้จึงเลือก Ta ที่สูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 60°C สำหรับไพรเมอร์คู่นอกและคู่ใน

(A)



(B)

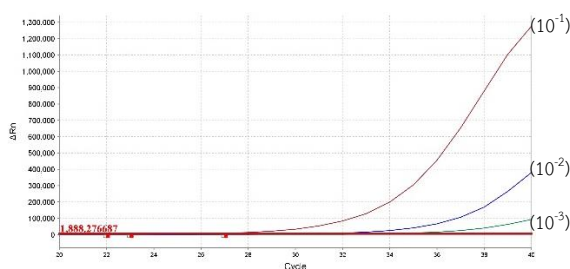


รูปที่ 4 การศึกษา annealing temperature ที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบโดยวิธี nested PCR (A): external primer; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1: 55°C; lane 2: 56°C; lane 3: 57°C; lane 4: 58°C; lane 5: 59°C; lane 6: 60°C; (B): internal primer; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1: 55°C; lane 2: 56°C; lane 3: 57°C; lane 4: 58°C; lane 5: 59°C; lane 6: 60°C

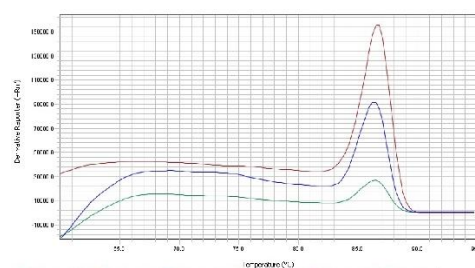
4.2 ไพรเมอร์สำหรับวิธี real-time PCR

เมื่อนำไพรเมอร์สำหรับ real-time PCR ที่ออกแบบมาทำการศึกษา Ta ที่เหมาะสมโดยการทำ PCR Gradient ระหว่างช่วงอุณหภูมิ 55-60°C กับเชื้อ Fowl adenovirus 1 ในช่วงความเข้มข้นต่ำ จำนวน 3 ความเข้มข้นได้แก่ 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} TCID₅₀/0.1 ml ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5 โดยพบว่า เมื่อกำหนดค่า Ta เท่ากับ 55°C สามารถตรวจพบการเกิดปฏิกิริยาได้ทั้ง 3 ความเข้มข้น และพบ melt curve peak ที่ 86.5 °C โดยไม่พบการเกิด melt curve peak อื่นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 80°C ลงไป สำหรับ Ta ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 56-60°C พบว่าการเกิดปฏิกิริยาจะลดลงอย่างต่อเนื่องตาม อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นโดยที่อุณหภูมิ 59-60 °C ความชันของ amplification plot ลดลงจนตรวจพบ สัญญาณได้น้อยมาก จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าค่า Ta ที่เหมาะสมสำหรับ ทำการศึกษาโดยวิธี real-time PCR มีค่าเท่ากับ 55°C

(A-1): amplification plot (Ta=55°C)

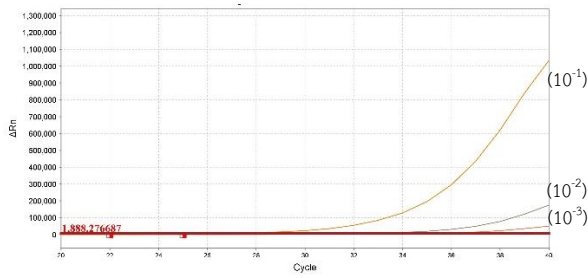


(A-2): melting curve (Ta=55°C)

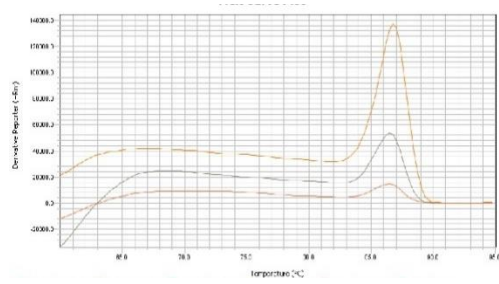


(B-1): amplification plot (Ta=56°C)

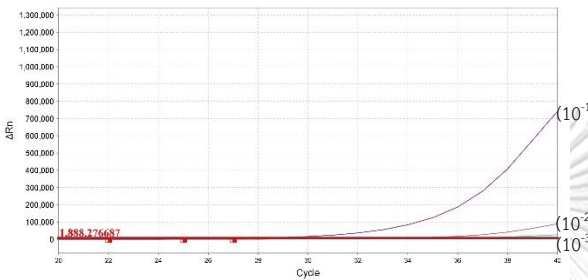
(B-2): melting curve (Ta=56°C)



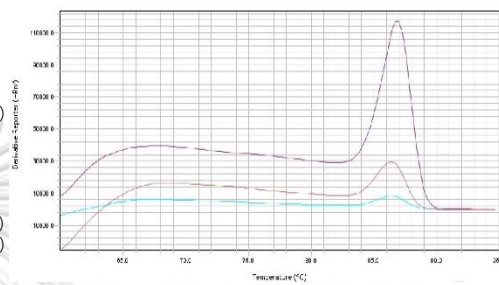
(C-1): amplification plot (Ta=57°C)



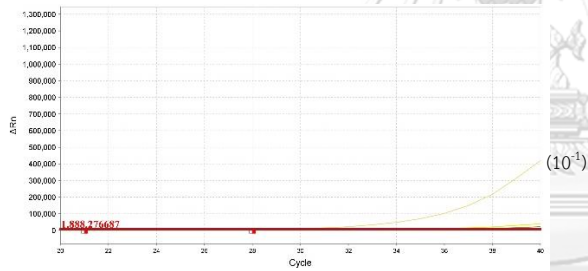
(C-2): melting curve (Ta=57°C)



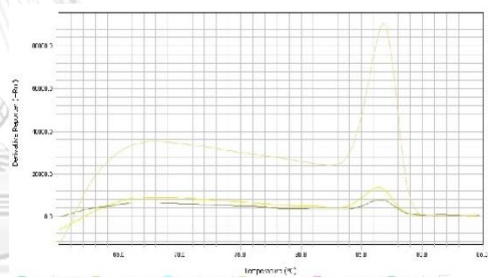
(D-1): amplification plot (Ta=58°C)



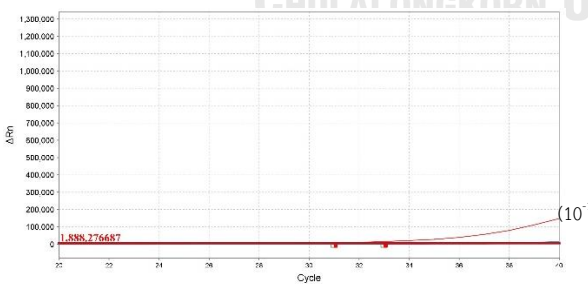
(D-2): melting curve (Ta=58°C)



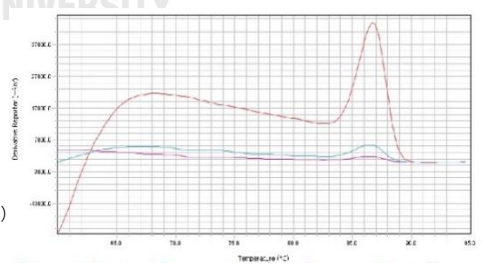
(E-1): amplification plot (Ta=59°C)



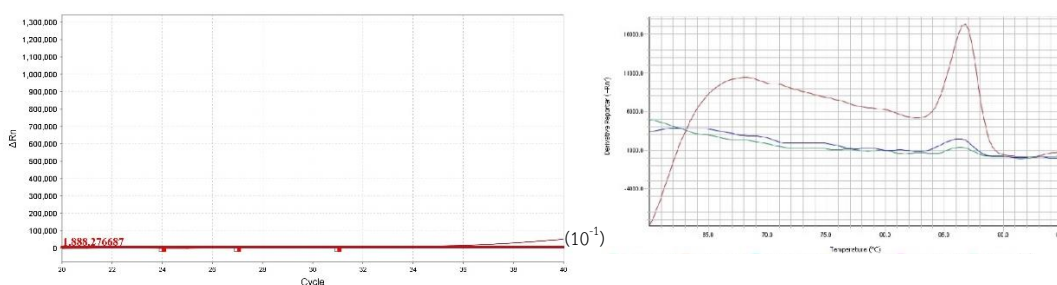
(E-2): melting curve (Ta=59°C)



(F-1): amplification plot (Ta=60°C)



(F-2): melting curve (Ta=60°C)

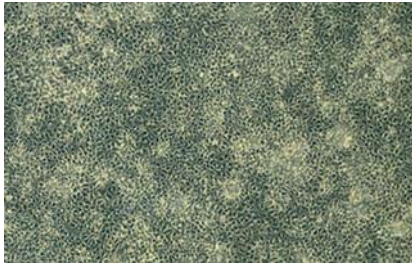


รูปที่ 5 การศึกษา annealing temperature (Ta) ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบโดยวิธี real-time PCR A-1 : amplification plot (Ta=55°C); B-1 : amplification plot (Ta=56°C); C-1 : amplification plot (Ta=57°C); D-1 : amplification plot (Ta=58°C); E-1 : amplification plot (Ta=59°C); F-1 : amplification plot (Ta=60°C); A-2: melting curve (Ta=55°C); B-2: melting curve (Ta=56°C); C-2: melting curve (Ta=57°C); D-2: melting curve (Ta=58°C); E-2: melting curve (Ta=59°C); F-2 melting curve (Ta=60°C); เลขยกกำลังที่กำกับเส้นกราฟ แสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย TCID₅₀/0.1 ml

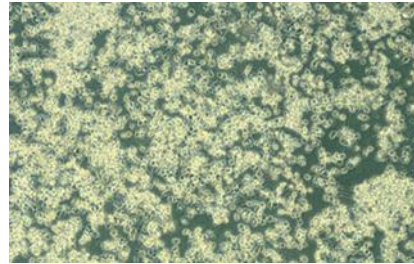
4.3 การทดสอบความจำเพาะโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษาคความจำเพาะโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยงโดยทดสอบการเกิด cytopathic effect (CPE) และทดสอบการเกิด hemagglutination (HA) โดยผล CPE ลบ เซลล์มีลักษณะเกาะกันแบบกระจัดกระจายไม่มีการเกาะกันแบบรวมกลุ่ม ในขณะที่ CPE บวก พบลักษณะของเซลล์เกาะกันเป็นกลุ่มก้อน ตามรูปที่ 6(A) และ 6(B) ตามลำดับ ส่วนผล HA ลบ พบลักษณะเป็นก้อนกระดุมที่ก้นหลุม ในขณะที่ HA บวก พบลักษณะเป็นร่างแหจากการเกิดปฏิกิริยา hemagglutination ตามรูปที่ 7(A) และ 7(B) ตามลำดับ และได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4 โดยพบการเกิด CPE ควบคู่ไปกับการตรวจพบ HA ในตัวอย่างวัคซีนที่มีการเติมเชื้อ Avian adenovirus ลงไปในวันที่ 7 12 และ 14 ของการทดสอบ และไม่พบการเกิด CPE และ HA ในตัวอย่างควบคุมแบบลบ ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ

(A) : CPE (-)

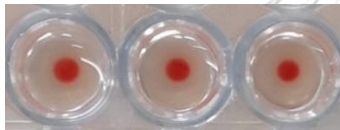


(B) : CPE (+)

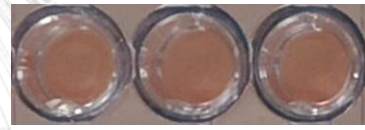


รูปที่ 6 การเกิด cytopathic Effect (CPE) ของ LMH ATCC CRL-2117 ที่มีการติดเชื้อ Avian adenovirus group 1 (A) : CPE (-) ; ไม่เกิด CPE (B) : CPE(+); เกิด CPE (111)

(A) HA (-)



(B) HA(+)



รูปที่ 7 การเกิด hemagglutination (HA) ระหว่างเชื้อ Avian Adenovirus group I (Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432) กับเม็ดเลือดแดงของหนูแรท (A) : ไม่พบการเกิด hemagglutination; (B): พบการเกิด hemagglutination

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาความจำเพาะโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง

Spiked Virus	Set	1 day		5 days		7 days		12 days		14 days	
		CPE	HA	CPE	HA	CPE	HA	CPE	HA	CPE	HA
ADV	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
No ADV	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

หมายเหตุ CPE : cytopathic effect; HA : hemagglutination; ADV : Avian adenoviruses; (+) positive result; (-): negative result

4.4 การทดสอบความไวโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง

จากการศึกษาความไวในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ได้ทำการเจือจางเชื้อ Fowl Adenovirus 1 ATCC VR-432 ที่ความเจือจางตั้งแต่ 10^4 จนถึง 10^{-4} TCID₅₀/0.1 ml ลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง LMH (ATCC CRL-2117) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 14 วัน และทดสอบการเกิด CPE และ HA ในวันที่ 1 5 7 12 และ 14 ตามลำดับ จากผลการทดลองพบการเกิด CPE และ HA ในวันที่ 5 ที่ความเข้มข้น 10^4 และ 10^3 TCID₅₀/0.1ml ในวันที่ 7 ตรวจพบการเกิด CPE และ HA ที่มีความเข้มข้น 10^2 และ 10^1 TCID₅₀/0.1ml ในวันที่ 12 ตรวจพบการเกิด CPE และ HA ที่ความเข้มข้น 10^0 10^{-1} และ 10^{-2} TCID₅₀/0.1ml และไม่พบการเกิด CPE และ HA ในตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10^{-3} และ 10^{-4} TCID₅₀/0.1ml และไม่พบการเกิด CPE และ HA ในกลุ่มควบคุม ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ

ตารางที่ 5 ผลการศึกษาความไวต่อไวรัสเซลล์เพาะเลี้ยง

Virus Titer		Incubation Periods (37°C, 5% CO ₂)									
(log TCID ₅₀ /0.1 ml)	Set	1 day		5 days		7 days		12 days		14 days	
		CPE	HA	CPE	HA	CPE	HA	CPE	HA	CPE	HA
4	1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
3	1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
0	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
-1	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
-2	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
-3	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
-4	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
NC	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

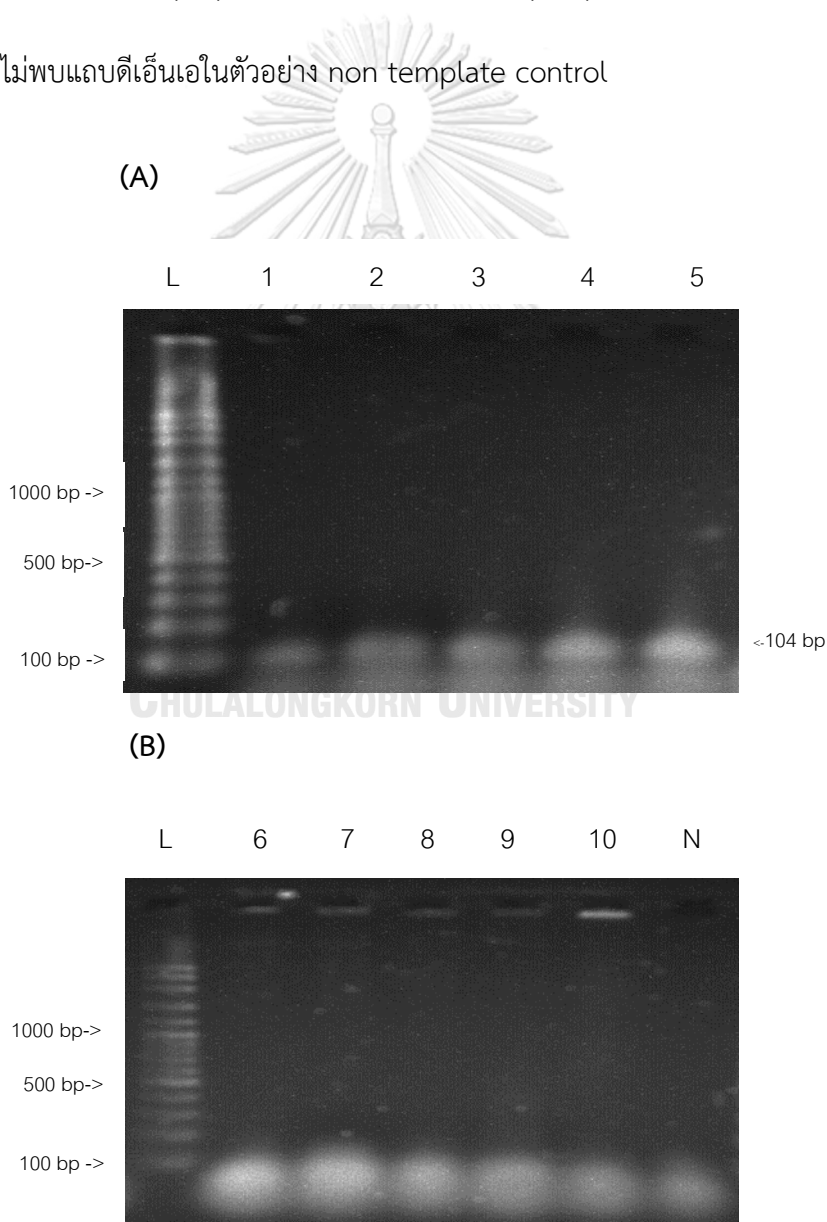
หมายเหตุ TCID₅₀ : 50% Tissue culture infective dose; CPE : cytopathic effect; HA :

hemagglutination; NC: Negative Control; (+): positive results; (-): negative results

4.5 การทดสอบความจำเพาะโดยวิธี nested PCR

การศึกษาความจำเพาะโดยวิธี nested PCR ในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus เป็นการศึกษาความสามารถในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) กับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ ในสถานะที่เชื้อเหล่านี้ถูกผสมอยู่ในวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย โดยพบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมครบทั้ง 2

รอบ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 8 สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 104 bp ของเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ Fowl adenovirus 1 (FAV 1) Fowl adenovirus 2 (FAV 2) Fowl adenovirus 4 (FAV 4) กลุ่มที่ 2 ได้แก่ Hemorrhagic enteritis virus (HEV) และ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ Egg drop syndrome (EDS) โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 104 bp ในเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ เช่น *Mycoplasma gallisepticum* (MG) *Mycoplasma synoviae* (MS) Infectious laryngotracheitis virus (ILV) Chicken anemia virus (CAV) และ Chicken bronchitis virus (CBV) และไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่าง non template control

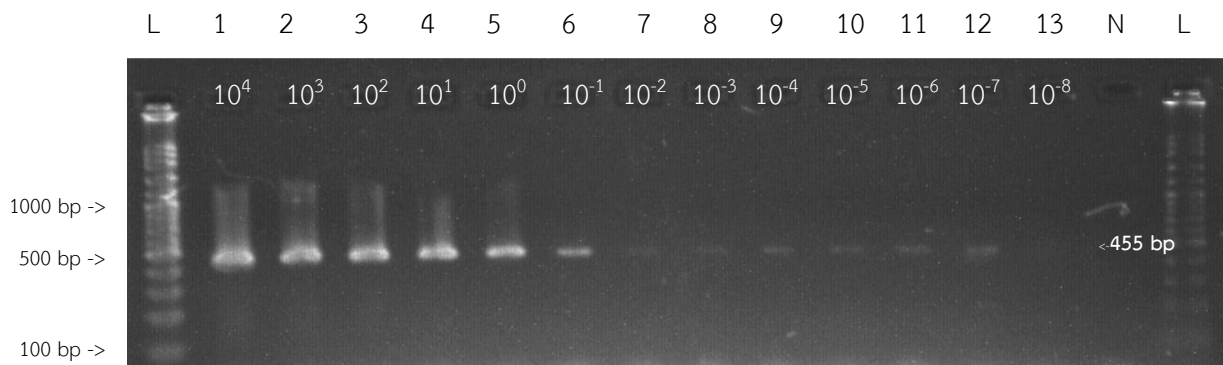


รูปที่ 8 ผลการศึกษาความจำเพาะของการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยวิธี nested PCR. ลูกศรแสดงขนาดของ DNA target ขนาด 104 bp ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ external primer (Ex-F1 & Ex-R1) และต่อด้วย internal primer (In-F1 & In-R1) (A): Avian adenoviruses; lane L: DNA Ladder (100 bp); lane 1: FAV 1; lane 2: FAV 2; lane 3: FAV 4; lane 4: HEV; lane 5: EDS; (B): avian pathogens สายพันธุ์อื่น; lane L: DNA Ladder (100 bp); lane 6: MG; lane 7: MS; lane 8: ILV; lane 9: CAV; lane 10: CBV; lane N: NTC

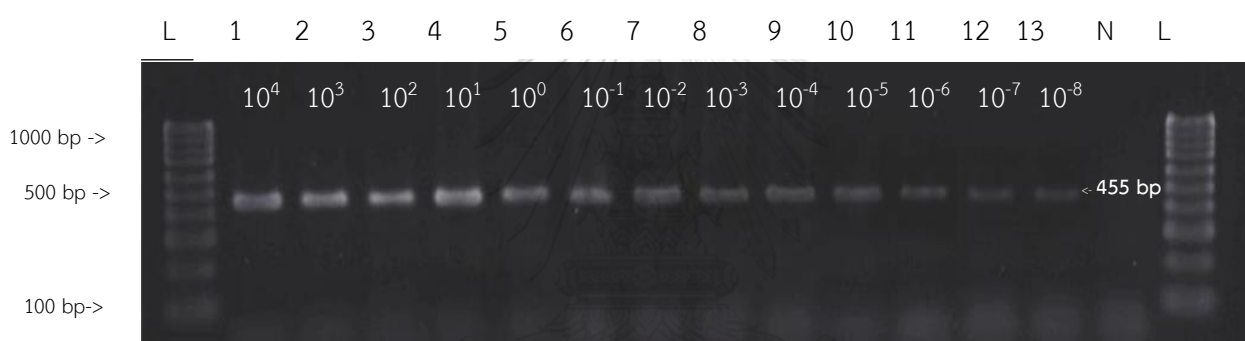
4.6 การทดสอบความไวโดยวิธี nested PCR

จากการศึกษาความไวโดยวิธี nested PCR ในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses (Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432) ที่ถูกเจือจางอยู่ในวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย โดยทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำนวน 2 รอบด้วย external primer และ internal primer ตามลำดับ พบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ external primer (Ex-F1/Ex-R1) ปรากฏผลดังแสดงในรูปที่ 9(A) และ 9(B) สามารถตรวจพบผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาด 455 bp ซึ่งเป็นไปตามที่ออกแบบไว้ และไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่าง non template control (NTC) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเมื่อใช้ external primer คือ 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบแรกไปทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ internal primer (In-F1/In-R1) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 10(A) และ 10(B) พบว่าได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 104 bp ซึ่งเป็นไปตามที่ออกแบบไว้ และไม่พบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่าง NTC โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเมื่อใช้ internal primer คือ 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml

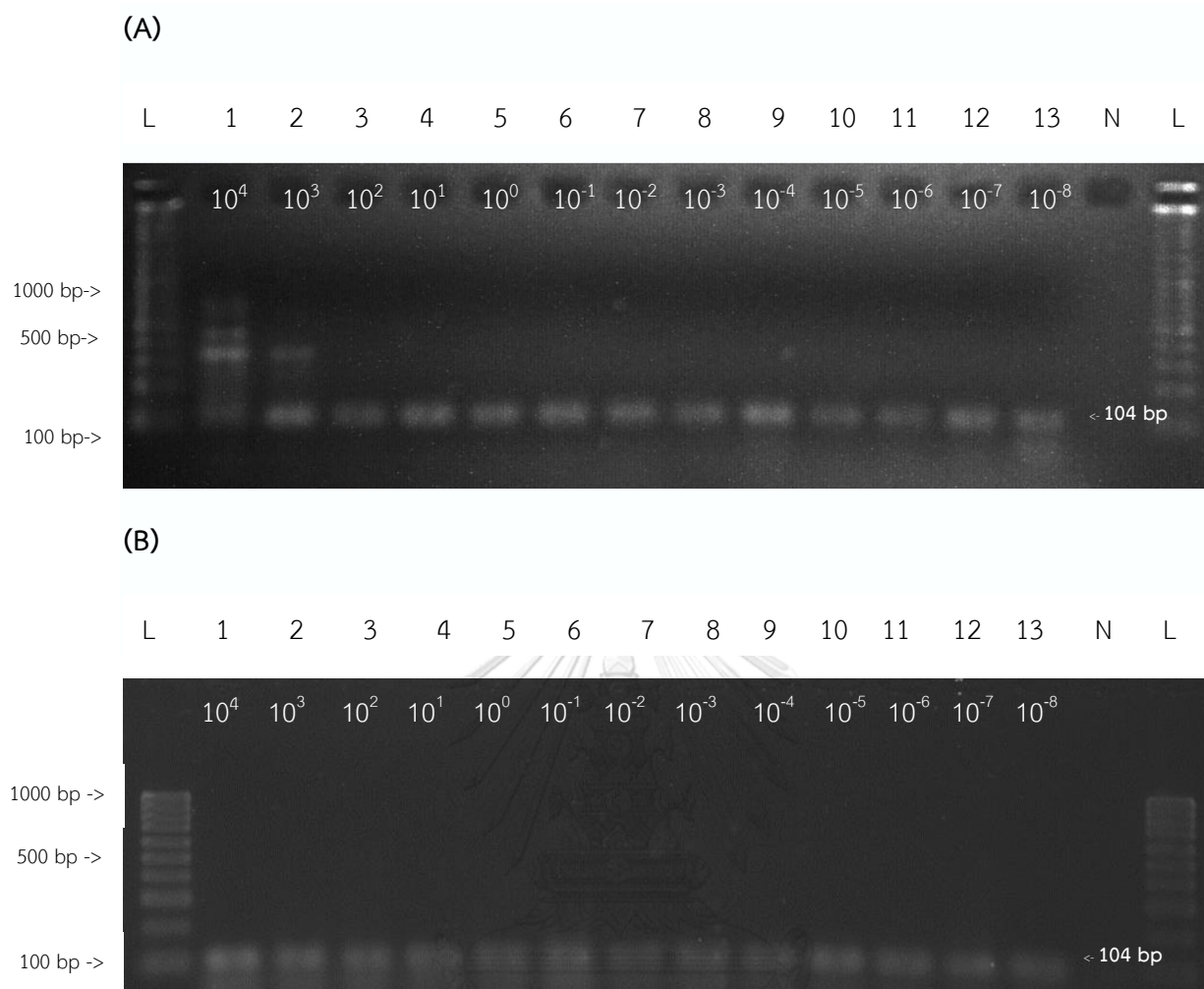
(A)



(B)



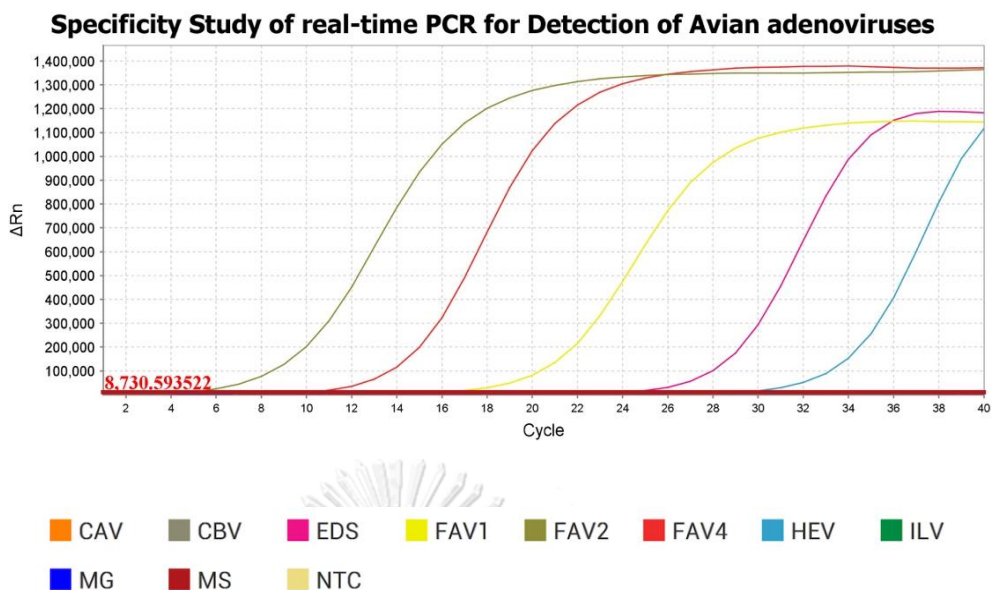
รูปที่ 9 ผลการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus ATCC VR-432) โดยวิธี nested PCR. ลูกศรแสดง DNA target ขนาด 455 bp ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ external primer (Ex-F1 & Ex-R1) (A): Replication 1; (B) Replication 2; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1-13: เรียงลำดับการเจือจางเชื้อ Fowl adenovirus ATCC VR-432 แบบ 10-fold serial dilution ระหว่าง 10^4 - 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml; lane N: non template control; lane L: DNA Ladder (100 bp)



รูปที่ 10 ผลการทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus ATCC VR-432) โดยวิธี nested PCR. ลูกศรแสดง DNA target ขนาด 104 bp ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ internal primer (In-F1 & In-R1) (A): Replication 1; (B): Replication 2; lane L: DNA ladder (100 bp); lane 1-13: เรียงลำดับการเจือจางเชื้อ Fowl adenovirus ATCC VR-432 แบบ 10-fold serial dilution ระหว่าง 10^4 - 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml; lane N: non template control; lane L: DNA ladder (100 bp)

4.7 การทดสอบความจำเพาะโดยวิธี real-time PCR

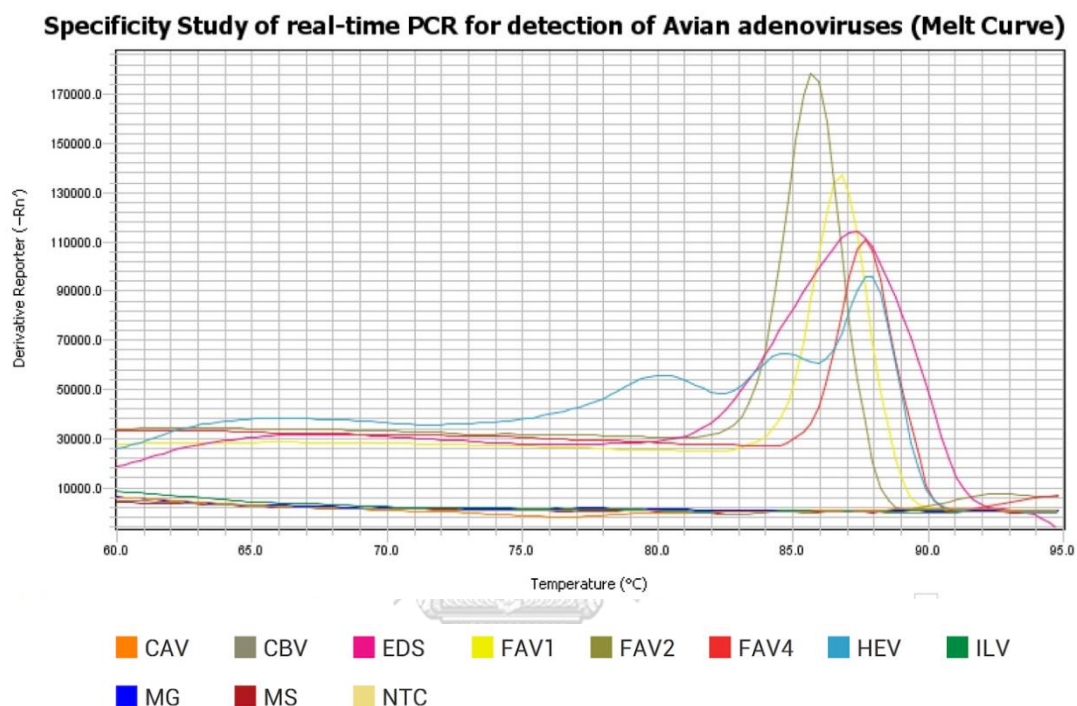
จากการศึกษาความจำเพาะโดยวิธี real-time PCR ในการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ทั้ง 3 กลุ่ม และ เชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ ในสภาวะที่เชื้อเหล่านี้ถูกผสมอยู่ในวัคซีนป้องกันโรคไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย พบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time PCR และอ่านค่าสัญญาณของสีฟลูออเรสเซนซ์ (SYBR Green I) ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจำนวน 40 รอบ ได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 11 กราฟแสดงการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Amplification Plot, deltaRn vs Cycle) จากผลการทดลองตรวจพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenoviruses ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 Fowl adenovirus 1 กลุ่มที่ 3 Egg drop syndrome และ กลุ่มที่ 2 Hemorrhagic enteritis virus ซึ่งมีค่า Ct value เท่ากับ 10 15 22 29 และ 34.5 ตามลำดับ (ใช้เส้นตัดที่ deltaRn 200,000) และไม่พบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตัวอย่างเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ ได้แก่ *Mycoplasma gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus และ Chicken bronchitis virus และไม่พบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตัวอย่าง non template control (NTC)



รูปที่ 11 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 และ เชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ (others avian virus) FAV1: Fowl adenovirus 1; FAV 2: Fowl adenovirus 2; FAV4: Fowl adenovirus 4; HEV: Hemorrhagic enteritis virus; EDS: Egg Drop Syndrome Virus; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; MS: *Mycoplasma synoviae*; ILV: Infectious laryngotracheitis virus; CAV; Chicken anemia virus; CBV: Chicken bronchitis virus และ NTC: non template control

เมื่อนำดีเอ็นเอหลังทำการศึกษาความจำเพาะโดยวิธี real-time PCR มาทำการศึกษา melting curve analysis ได้ผลดังแสดงในกราฟรูปที่ 16 แสดงผลการทำ melting curve analysis (Derivative Reporter) พบว่าเชื้อ Fowl adenovirus 1 Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 Hemorrhagic Enteritis Virus และ Egg Drop Syndrome มีค่า melting temperature (T_m) เท่ากับ 86.8°C 85.5°C 87.7°C 87.9°C และ 87.5°C ตามลำดับ โดยไม่พบการเกิด melt curve peak ของในเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ เช่น *Mycoplasma gallisepticum*

Mycoplasma synoviae Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus และ Chicken bronchitis virus และไม่พบการเกิด melt curve peak ในตัวอย่าง non template control

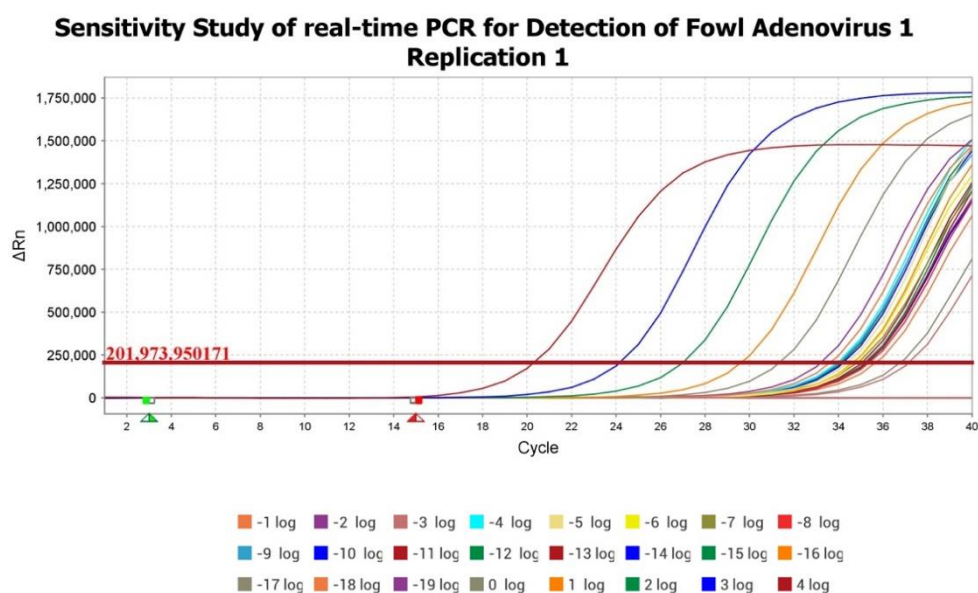


รูปที่ 12 ผลการทำ melting curve analysis หลังจากทำการศึกษาความจำเพาะโดยวิธี real-time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 2 และ 3 และเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ FAV1: Fowl adenovirus 1; FAV 2: Fowl adenovirus 2; FAV4: Fowl adenovirus 4; HEV: Hemorrhagic enteritis virus; EDS: Egg Drop Syndrome Virus; MG: *Mycoplasma gallisepticum*; MS: *Mycoplasma synoviae*; ILV: Infectious laryngotracheitis virus; CAV; Chicken anemia virus; CBV: Chicken bronchitis virus และ NTC: non template control

4.8 การศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR

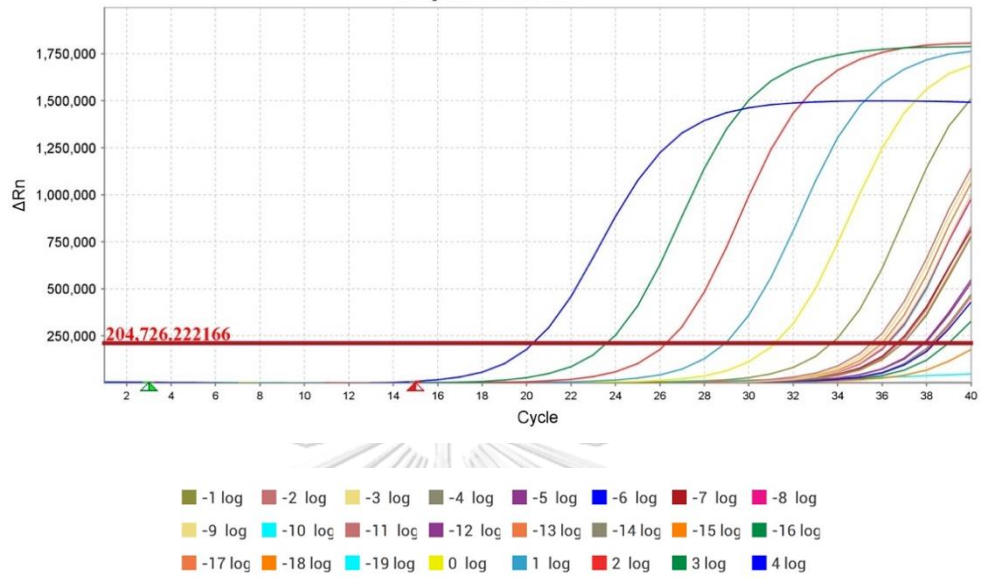
จากการศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432) ที่ถูกเจือจางอยู่ในวัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย โดยทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1ml ในการศึกษาเตรียมตัวอย่างและเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแยกออกจากกันจำนวน 3 ครั้ง ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FUH02 และ RUH03 และตรวจจับสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ของสี SYBR Green I ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละรอบ จำนวนทั้งสิ้น 40 รอบ ได้ผลการทดลองในครั้งที่ 1 2 และ 3 ดังแสดงในรูปที่ 13(A) 11(B) และ 11(C) ตามลำดับ สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมตั้งแต่รอบที่ 14 เป็นต้นไป โดยปริมาณของเชื้อต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สำหรับการทดลองในรอบที่ 1 2 และ 3 คือ 10^{-19} 10^{-18} และ 10^{-18} TCID₅₀/0.1 ml ตามลำดับ

(A)



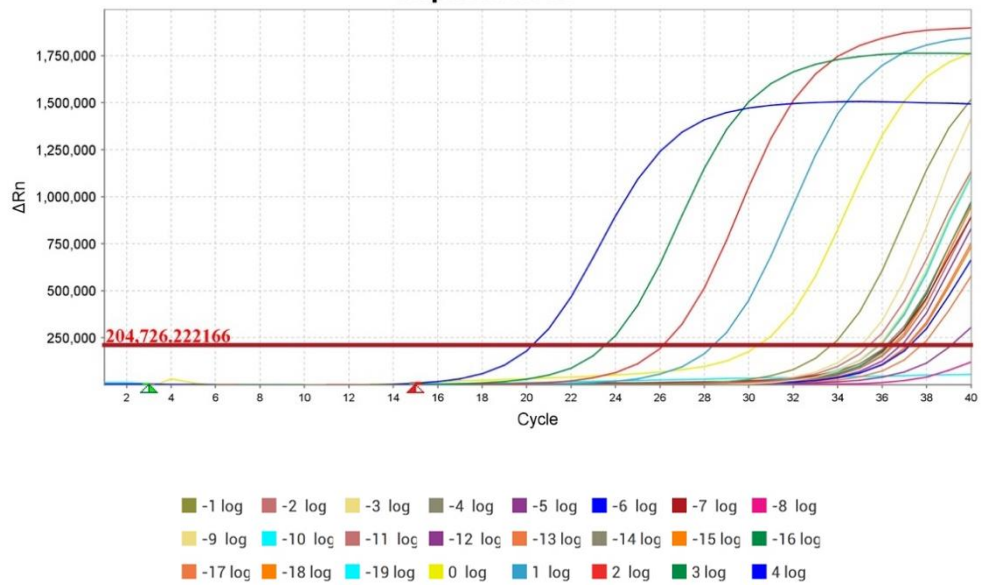
(B)

**Sensitivity Study of real-time PCR for Detection of Fowl Adenovirus 1
Replication 02**



(C)

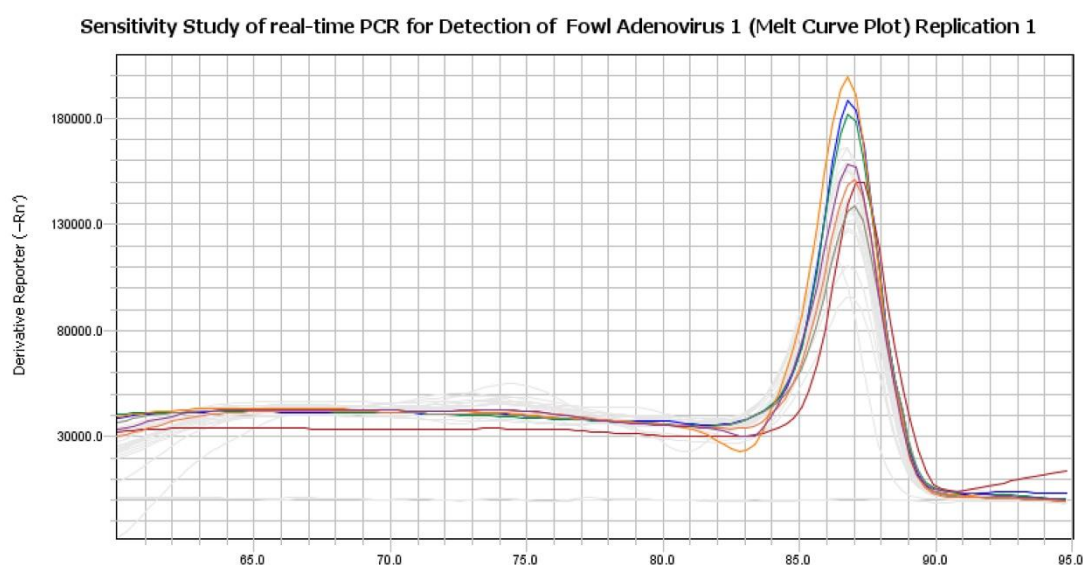
**Sensitivity Study of real-time PCR for Detection of Fowl Adenovirus 1
Replication 03**



รูปที่ 13 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus (Fowl adenovirus ATCC VR-432) เพื่อศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR โดยเรียงลำดับการเจือจางแบบ serial 10 fold dilution ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 10^4 - 10^{-19} TCID₅₀/0.1ml (A): Experiment 1; (B): Experiment 2; (C): Experiment 3; log: logTCID₅₀/0.1 ml แถบระบุสีและค่า log ที่กำกับอยู่ใต้กราฟแสดงค่า virus titer ของแต่ละตัวอย่างที่ปรากฏอยู่ในกราฟ

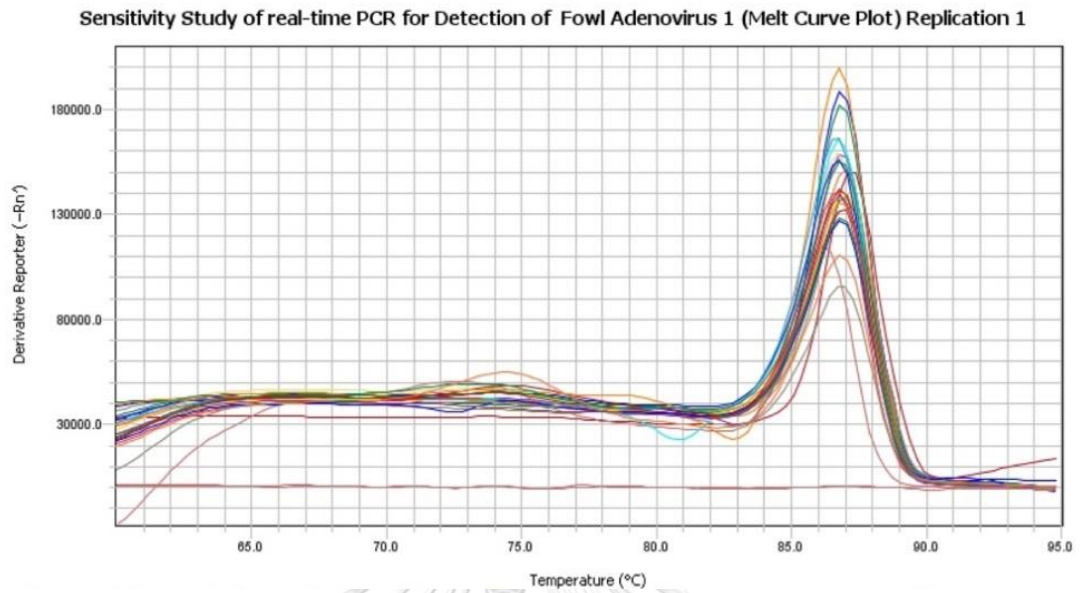
เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอหลังจากการศึกษาความไวมาทำการศึกษา melting curve analysis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 14 โดยพบว่าช่วงความเข้มข้นที่ 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml ปรากฏ melt curve peak เดียวชัดเจน และมีค่า melting temperature (Tm) เท่ากับ 87 °C 86.5 °C และ 86.5 °C (รูปที่ 14 A-1 B-1 และ C-1) อย่างไรก็ตามความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-3} TCID₅₀/0.1 ml ลงไป จะปรากฏ melt curve peak ขนาดเล็กที่อุณหภูมิ 75°C ร่วมด้วย (รูปที่ 14 A-2 B-2 และ C-2) ทั้งนี้ไม่พบการเกิด melt curve peak ของตัวอย่าง non template control

(A-1)

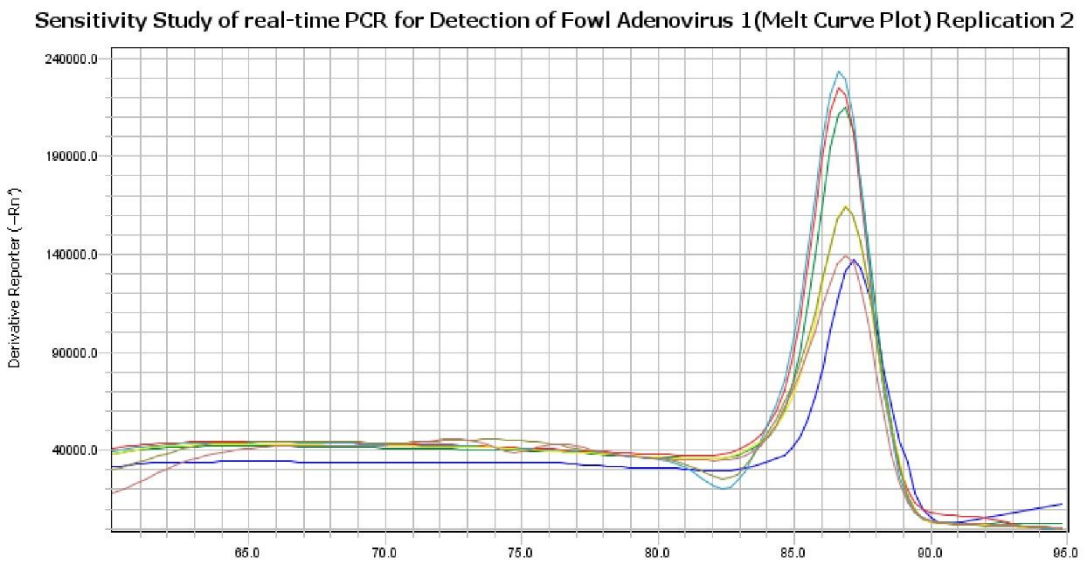


หมายเหตุ: แสดง Melt curve peak เฉพาะช่วงความเข้มข้นที่ 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml ของการทดลองที่ 1

(A-2)



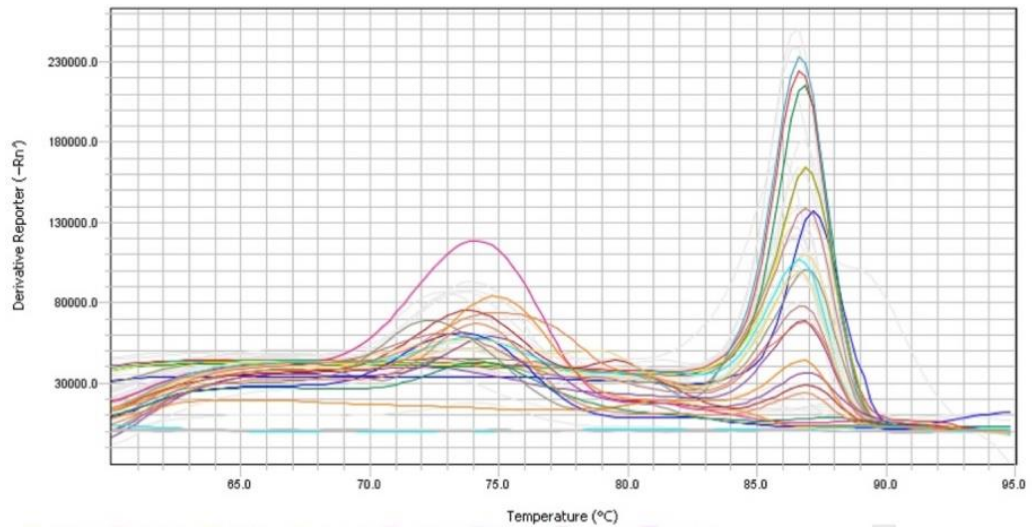
(B-1)



หมายเหตุ: แสดง Melt curve peak เฉพาะช่วงความเข้มข้นที่ 10^4 - 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml ของการทดลองที่ 2

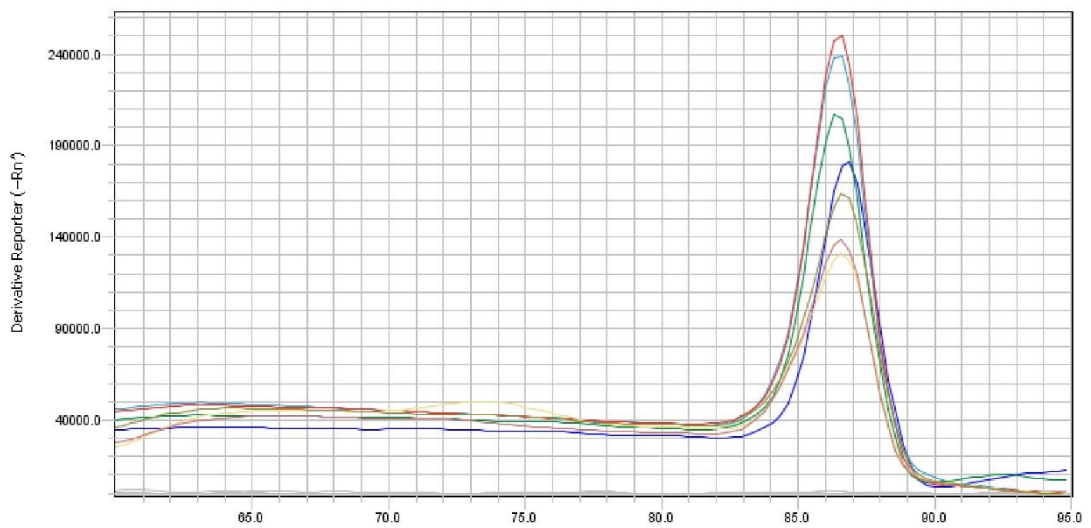
(B-2)

Sensitivity Study of real-time PCR for Detection of Fowl Adenovirus 1(Melt Curve Plot) Replication 2



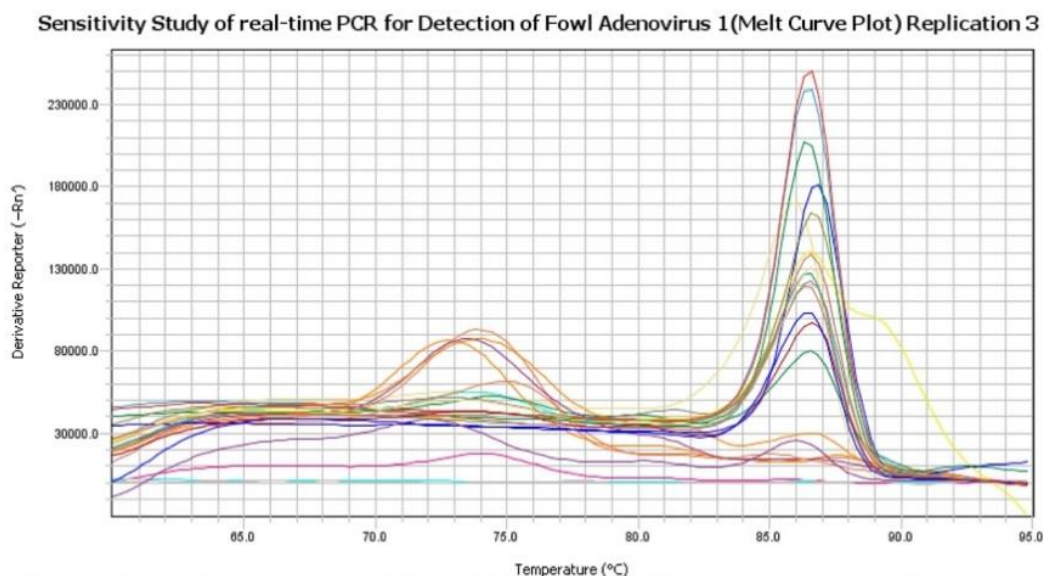
(C-1)

Sensitivity Study of real-time PCR for Detection of Fowl Adenovirus 1(Melt Curve Plot) Replication 3



หมายเหตุ: แสดง Melt curve peak เฉพาะช่วงความเข้มข้นที่ 10^4 - 10^2 TCID₅₀/0.1 ml ของการทดลองที่ 3

(C-2)



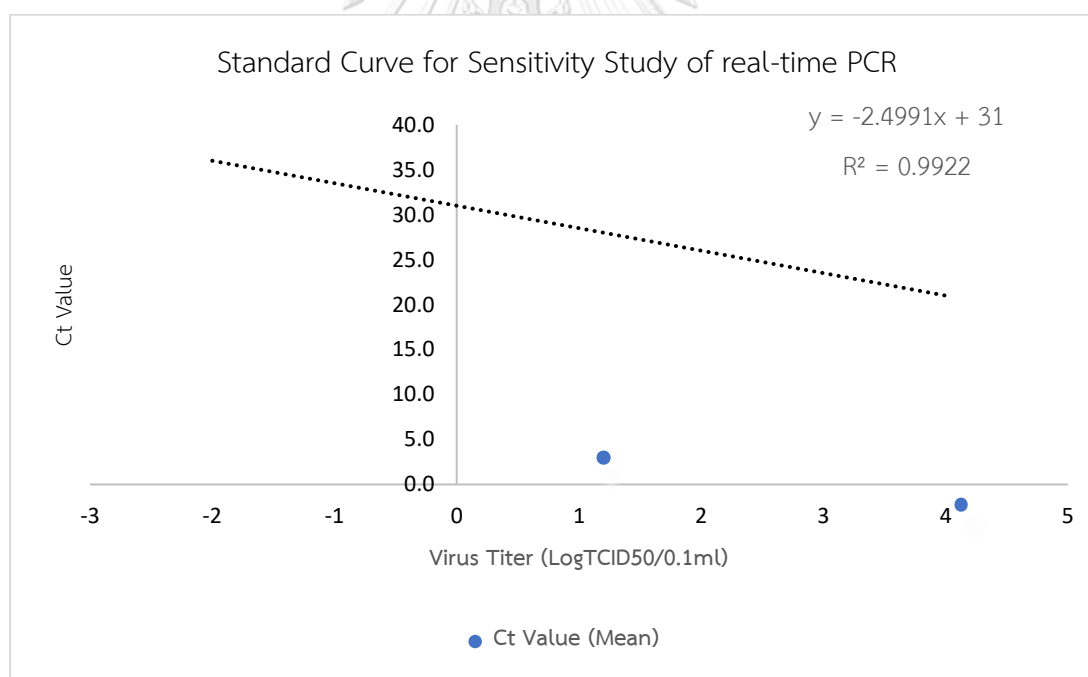
รูปที่ 14 ผลการทำ melt curve peak หลังจากการศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR (A-1): melt curve peak ของการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 10^4-10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml; (A-2): melt curve peak ของการทดลองที่ 1 ช่วงความเข้มข้น 10^4-10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml; PCR (B-1): melt curve peak ของการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 10^4-10^{-2} TCID₅₀/0.1; (B-2): melt curve peak ของการทดลองที่ 2 ช่วงความเข้มข้น 10^4-10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml; PCR (C-1): melt curve peak ของการทดลองที่ 3 ช่วง 10^4-10^{-2} TCID₅₀/0.1; (C-2): melt curve peak ของการทดลองที่ 3 ช่วงความเข้มข้น 10^4-10^{-19} TCID₅₀/0.1 ml; Tm: melting temperature

เมื่อนำค่า Ct value ที่เกิดขึ้นจากการศึกษาความไวของเชื้อ Avian adenoviruses ก่อนถึงจุดอิ่มตัวของปฏิกิริยา (Plateau phase) ระหว่างความเข้มข้น $10^4 - 10^{-2}$ TCID₅₀/0.1 ml มาสร้างกราฟมาตรฐานได้ผลดังแสดงในรูปที่ 15 โดยพบว่ามีสมการเส้นตรง $y = -2.4991X+31$ และมีค่า $R^2 = 0.9922$

ตารางที่ 6 ค่า Ct value และค่า Virus Titer จากการศึกษาความไวโดยวิธี real-time PCR

Dilution	Virus Titer (Log TCID ₅₀ /0.1 ml)	Ct Value			Average Ct value	%CV
		Experiment 01	Experiment 02	Experiment 03		
Undilute	4	20.285	20.245	20.227	20.252	0.15
10 ⁻¹	3	24.131	23.588	23.529	23.749	1.40
10 ⁻²	2	26.980	26.248	26.101	26.443	1.78
10 ⁻³	1	29.625	28.887	28.399	28.970	2.13
10 ⁻⁴	0	31.334	31.127	30.423	30.961	1.54
10 ⁻⁵	-1	33.619	33.698	33.706	33.675	0.14
10 ⁻⁶	-2	33.713	35.501	35.408	35.455	0.19

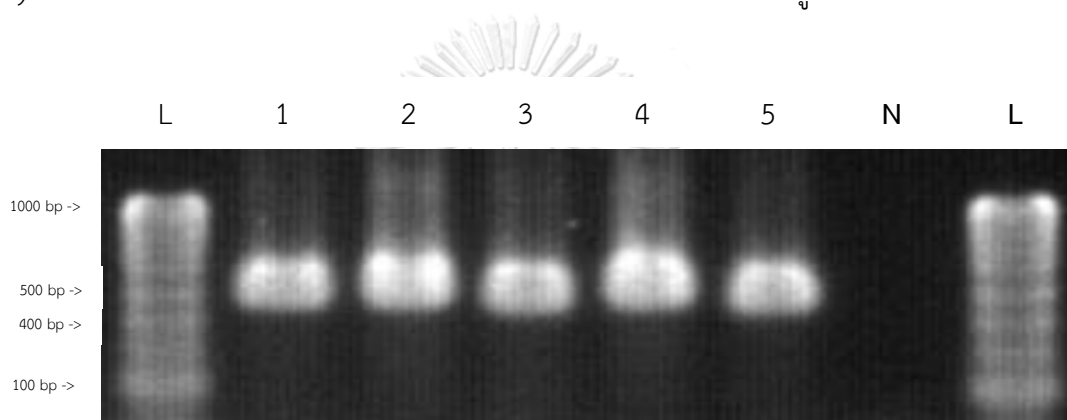
หมายเหตุ: Ct: Cycle Threshold; %CV: Coefficient of Variation



รูปที่ 15 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า Virus titer (logTCID₅₀/0.1 ml และ Ct value แกน X แสดงค่าความเข้มข้นของเชื้อ Fowl adenovirus 1 ในหน่วย logTCID₅₀/0.1ml แกน Y แสดงค่า Ct value (ค่าเฉลี่ยจากการทดลองทั้ง 3 ครั้ง) โดยสมการเส้นตรงระหว่างค่าความเข้มข้นของเชื้อ Fowl adenovirus 1 และ Ct value เท่ากับ $y = -2.4991 + 31$ และมีค่า R² เท่ากับ 0.9922

4.9 การยืนยันผลผลิตดีเอ็นเอจากการตรวจหาเชื้อด้วยวิธี real-time PCR

เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการศึกษาจำเพาะด้วยวิธี real-time PCR มาทำการศึกษาบน 1.5% agarose gel electrophoresis สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 610 คู่เบส ของเชื้อ ในกลุ่มที่ 1 Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432 Fowl adenovirus 2 ATCC VR-827 Fowl adenovirus 4 ATCC VR-829 กลุ่มที่ 2 Hemorrhagic enteritis virus และกลุ่มที่ 3 Egg drop syndrome virus และไม่พบผลผลิตดีเอ็นเอในตัวอย่าง NTC ดังแสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 ผลผลิตดีเอ็นเอจากการที่ได้จากการทำ real-time PCR บน agarose gel electrophoresis L: DNA ladder; 1: Fowl adenovirus 1; 2: Fowl adenovirus 2; 3: fowl adenovirus 4; 4: Hemorrhagic enteritis virus; 5: Egg drop syndrome virus; N: non template control; L DNA ladder

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

วัคซีนเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรค วัคซีนที่มีคุณภาพและเพียงพอกับความต้องการของประชาชนจะช่วยสร้างความมั่นคงด้านสาธารณสุข วัคซีนใช้ป้องกันการเกิดโรคติดต่อหลายชนิด เช่น วัคซีนสำหรับเด็กตาม EPI (expanded immunization program) สำหรับเด็ก วัคซีนป้องกันโรคในกรณีที่เกิดการระบาดใหญ่ (pandemic) เช่น วัคซีนป้องกันโรคไข้หวัดนก และ วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) เป็นต้น โดยวัคซีนที่ดีต้องประกอบไปด้วยคุณภาพ ประสิทธิภาพ ความปลอดภัย และไม่ก่อให้เกิดโรคหรือผลข้างเคียงกับผู้ได้รับวัคซีนซึ่งแต่เดิมเป็นผู้มีสุขภาพดี วัคซีนจัดเป็นยาชีววัตถุ (biological product) ชนิดหนึ่งที่ต้องดำเนินการผลิตตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่องหลักเกณฑ์และวิธีการในการผลิตยาแผนปัจจุบัน กฎหมายยา พ.ศ. 2559 ซึ่งโรงงานผลิตยาทุกแห่งต้องปฏิบัติตาม โดยการผลิตวัคซีนมีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนเพื่อให้ได้มาซึ่งสารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์ และ ต้องดำเนินการภายใต้สภาวะปลอดเชื้อหรือเรียกว่าพื้นที่สะอาด (cleanroom) ต้องมีการควบคุมการผลิตอย่างเข้มงวดในทุกขั้นตอน โดยต้องมีการตรวจควบคุมคุณภาพทางห้องปฏิบัติการ (quality control) และการประกันคุณภาพ (quality assurance) เพื่อยืนยันถึงคุณภาพของวัคซีน ก่อนปล่อยผ่านวัคซีนไปใช้กับประชาชน

การตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝง (adventitious agents หรือ extraneous agents) ในวัคซีนเป็นหัวข้อการตรวจปล่อยผ่านด้านความปลอดภัย (safety test) ที่สำคัญ ใช้ยืนยันถึงความปลอดภัยของวัคซีนก่อนนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง (pre-clinical study) การศึกษาวิจัยในมนุษย์ (clinical study) หรือ ก่อนนำไปใช้กับประชาชน โดยเชื้อปนเปื้อนแฝงมักปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบตั้ง

ต้นที่ใช้ในการเพาะเชื้อสำหรับผลิตวัคซีนและมีที่มาจากสิ่งมีชีวิต (biological substrate) เช่น Simian Virus (SV40) ที่ปนเปื้อนมากับเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับผลิตวัคซีนป้องกันโรคโปลิโอ เชื้อ bacteriophage ที่ปนเปื้อนมากับ Bovine sera ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนเชื้อเป็นหลายชนิด เช่น วัคซีนป้องกันโรค MMR (Measles Mumps และ Rubella) และ โปลิโอ Avian retrovirus ที่ปนเปื้อนมากับเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากไก่ที่ใช้ในการผลิตวัคซีน MMR หรือ Porcine Circovirus (PCV-1) ซึ่งปนเปื้อนมากับ Trypsin ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคโรตา (112) เป็นต้น

วัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย (Inactivated Influenza Vaccine) ทำการผลิตโดยการเพาะเชื้อไวรัสไข้วัดใหญ่ในไข่ไก่ฟัก (embryonated eggs) ซึ่งองค์การอนามัยโลกระบุให้กระบวนการผลิตจะต้องสามารถกำจัดเชื้อ Avian adenoviruses Avian Leukosis Virus และ Mycoplasma ได้ (35) ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการตรวจหาเชื้อปนเปื้อนแฝงทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าจะไม่มีเชื้อปนเปื้อนแฝงหลงเหลืออยู่ในวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายที่ผลิตขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses จำนวน 3 วิธี ประกอบด้วย วิธีเซลล์เพาะเลี้ยง nested PCR และ real-time PCR โดยเปรียบเทียบในแง่ของความจำเพาะ และ ความไวของวิธีทดสอบ

การตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยวิธีการเซลล์เพาะเลี้ยงทำได้โดยเพาะเชื้อ Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432 ลงบนเซลล์เพาะเลี้ยง Leghorn Male Hepatoma (LMH ATCC CRL-2117) ซึ่งมีที่มาจากเซลล์มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) ของไก่บ้าน (*Gallus gallus*) สายพันธุ์ Leghorn (111) ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกันกับไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการผลิตไข้วัดใหญ่เชื้อเฉพาะ (SPF: specific pathogen free) สำหรับผลิตวัคซีน (113)

จากการศึกษาความจำเพาะโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าเชื้อ Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432 ที่ผสมอยู่ในวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตายสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนเซลล์ LMH (ATCC CRL-2117) เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตและทำให้เกิด cytopathic effect พร้อมทั้งสามารถตรวจพบการเกิด hemagglutination กับ 0.75% rat red blood cell หลังทำการเพาะเชื้อไปแล้วอย่างน้อย 7 วัน โดยการเกิด hemagglutination กับเม็ดเลือดแดงของหนูแรท เป็นคุณสมบัติที่ใช้จำแนกเชื้อ Fowl adenovirus 1 ออกจาก Fowl adenovirus ซีโรไทป์อื่น (Fowl adenovirus 2-11) และ Hemorrhagic enteritis virus ซึ่งไม่เกิด hemagglutination กับเม็ดเลือดแดงของหนู และจำแนกออกจากเชื้อ egg drop syndrome ซึ่งเกิด hemagglutination กับเม็ดเลือดแดงของสัตว์ปีกเท่านั้น (46, 47, 92) ทั้งนี้ไม่พบการเกิด cytopathic effect และ hemagglutination ในกลุ่มควบคุมแบบลบ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อ Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432 มี susceptibility ที่ดีกับเซลล์เพาะเลี้ยง LMH (ATCC CRL-2117) ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของเชื้อ Fowl adenovirus ที่สามารถเจริญได้ดีบนเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด chicken kidney cell และ chicken embryo liver cell (83, 84) และ สอดคล้องกับวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าสามารถเพาะเชื้อในกลุ่ม Fowl adenovirus บนเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด LMH ได้เช่นเดียวกัน (114-117) โดยความสามารถในการเจริญของเชื้อ Fowl adenovirus ที่ถูกผสมอยู่ในวัคซีนไข้วัดใหญ่ซึ่งมีสารประกอบหลายชนิด เช่น formaldehyde tween triton-X100 ที่อาจยับยั้งการเจริญของเชื้อ Fowl adenovirus แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความจำเพาะและไม่ได้รับผลกระทบจาก product matrix effect สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าเชื้อ Fowl adenovirus มีความทนทานสูงสามารถทนต่อสารเคมีที่คล้ายคลึงกับองค์ประกอบในวัคซีนได้หลายชนิด เช่น formaldehyde chloroform และ ether เป็นต้น (92) สำหรับการศึกษาความไวโดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อหาปริมาณเชื้อไวรัสต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ในสภาวะที่เชื้อไวรัสถูกผสมอยู่ในวัคซีนไข้วัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย จากผล

การศึกษาความไวในการตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432 ซึ่งมีความเข้มข้นระหว่าง 10^4 - 10^4 TCID₅₀/0.1ml โดยวิธีเซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus 1 (ATCC VR-432) ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดได้ที่ 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml โดยตรวจพบการเกิด cytopathic effect บนเซลล์ LMH (ATCC CRL-2117) และ hemagglutination กับ 0.75% rat red blood cell ที่ความเข้มข้นดังกล่าวหลังจากบ่มไปแล้ว 12 วัน

วิธี nested PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในสัตว์ปีกหลายชนิดเช่น Avian Influenza Avian leukosis virus และ Newcastle disease virus (118-120) เป็นต้น เนื่องจากเชื้อ Avian adenovirus เป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ปีกงานวิจัยส่วนมากจึงมุ่งเน้นการตรวจส่งตรวจจากฟาร์มเพาะเลี้ยง เช่น cloacal swab ชิ้นเนื้อ มูล หรือ ซิรัม เป็นต้น การตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ซึ่งเป็น extraneous agent ในวัคซีนไข่หวัดใหญ่ชนิดเชื้อตายโดยเทคนิค nested PCR ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยวิธี nested PCR ที่พัฒนาขึ้นอาศัยการจับกันของของไพรเมอร์ 2 ชุด ประกอบด้วย ไพรเมอร์คู่นอก (external primer) ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายคือ ยีน hexon ซึ่งช่วงยีนดังกล่าวเป็นบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อ Avian adenovirus ที่กำหนดการสร้าง hexon protein บน capsid ของเชื้อไวรัส และ ไพรเมอร์คู่ใน (internal primer) ซึ่งจับได้กับผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยไพรเมอร์คู่นอก โดย external primer และ internal primer จะให้ผลผลิตดีเอ็นเอเท่ากับ 455 และ 104 bp ตามลำดับ

จากการศึกษาความจำเพาะวิธี nested PCR พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อในกลุ่ม Avian adenovirus ได้แก่ Fowl adenovirus 1 (จีโนไทป์ A) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการติดเชื้อแบบแฝง Fowl adenovirus 2 (จีโนไทป์ D) ซึ่งเป็นเชื้อที่พบการระบาดในประเทศไทย (121) Fowl adenovirus 4 (จีโนไทป์ C) เป็นเชื้อที่มีการก่อโรคแบบ acute infection และมีการระบาดในหลายในหลายภูมิภาค

โดยเฉพาะทวีปเอเชีย (117, 122-124) รวมถึง Hemorrhagic enteritis virus และ egg drop syndrome โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) กับเชื้อก่อโรคในไก่ชนิดอื่นได้แก่ เชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus Chicken bronchitis virus ทั้งนี้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะฟังก์กระจาย มีขนาดใกล้เคียงหรือเล็กกว่า 100 bp ที่ปรากฏในรูปที่ 8(B) นั้น อาจเกิดจาก primer dimer

เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของวิธี nested PCR กับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ได้ครอบคลุมมากกว่าวิธีของ Ramanova และ Wang ซึ่งตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 ได้บางซีโรไทป์ (99, 101) สามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Xie และ Mase ที่สามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยใช้เทคนิค conventional PCR ได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่ม (96, 125) สามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus สายพันธุ์ที่สำคัญในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ Fowl adenovirus 1 Fowl adenovirus 2 และ Fowl adenovirus 4 ซึ่งจัดอยู่ในจีโนไทป์ A D และ C ตามลำดับ ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Gunes และคณะ (100) ที่สามารถตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus โดยวิธี real-time PCR ได้ครอบคลุมตั้งแต่จีโนไทป์ A ถึง E จะเห็นได้ว่าวิธี nested PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่ม โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ สามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่มในเวลาเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดขั้นตอนการทดสอบให้สั้นลงเนื่องจากไม่จำเป็นต้องแยกทำการทดสอบทีละเชื้อ

สำหรับการศึกษาความไวโดยวิธี nested PCR พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ Fowl adenovirus ATCC-VR432 ที่มีความเข้มข้น 10^4 TCID₅₀/0.1 ml ถึง 10^8 TCID₅₀/0.1 ml ด้วย external primer ปรากฏแถบดีเอ็นเอในช่วง 10^4 TCID₅₀/0.1 ml ถึง 10^8 TCID₅₀/0.1 ml

อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอในรอบแรกมาทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมต่อโดยใช้ internal primer พบว่าแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจนขึ้นในทุกความเข้มข้นรวมถึงตรวจพบแถบดีเอ็นเอเพิ่มเติมที่ความเข้มข้น 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml ซึ่งตรวจไม่พบจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบแรก ทั้งนี้หากประเมินจากจุดต่ำสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อ Avian adenoviruses ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ internal primer จะพบว่าวิธี nested PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวเท่ากับ 10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml ซึ่งมีความไวสูงกว่าวิธี cross-priming amplification (CPA) ของ Niczyporuk ซึ่งความไวเท่ากับ 10^{-6} TCID₅₀/0.1 ml (103) มีความไวสูงกว่าวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งมีความไวเท่ากับ 10^{-5} TCID₅₀/0.1 ml (126)

วิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นอาศัยหลักการจับกันของผลผลิตดีเอ็นเอกับสี SYBR Green I โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้สามารถจับได้กับ hexon ยีนของเชื้อ Avian adenovirus เช่นเดียวกับกับวิธี nested PCR ซึ่งเทคนิคการตรวจหาเชื้อโดยวิธี real-time PCR ซึ่งอาศัยการวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นในสภาวะจริงโดยใช้สี SYBR Green I สามารถพบได้ในงานวิจัยของ Romanova ที่ทำการตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus ซีโรไทป์ 9 (99) และ งานวิจัยของ Gunness ซึ่งทำการตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus (A-E) (100) การตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยวิธี real-time PCR ในวัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตายยังไม่มีการศึกษามาก่อน จากการศึกษาความจำเพาะพบว่าสามารถตรวจพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus ทั้งสามกลุ่มได้แก่ เชื้อ Fowl adenovirus 1 Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 ในกลุ่มที่ 1 เชื้อ Hemorrhagic enteritis virus ในกลุ่มที่ 2 และ เชื้อ egg drop syndrome ในกลุ่มที่ 3 โดยไม่พบการเกิด cross-reaction กับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ ซึ่งเป็นเชื้อกลุ่มเดียวกับกับที่ใช้ทดสอบโดยวิธี nested PCR ได้แก่เชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* *Mycoplasma synoviae* Infectious laryngotracheitis virus Chicken anemia virus Chicken bronchitis virus รวมถึง

ไม่พบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตัวอย่าง non template control โดยตรวจพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 ได้เร็วที่สุด โดยมีช่วง Ct value อยู่ระหว่าง 10-22 โดยสามารถตรวจพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 และ Fowl adenovirus 1 ซึ่งมี Ct value เท่ากับ 10 15 และ 22 ตามลำดับ ตามมาด้วยการตรวจพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 2 ซึ่งมี Ct value เท่ากับ 29 และ 34.5 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้ทำการวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ก่อนทำการทดสอบจึงส่งผลให้ค่า Ct value มีค่าไม่เท่ากัน

เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการศึกษาความจำเพาะไปทำ melting curve analysis พบว่าเชื้อ Flow adenovirus 1 Flow adenovirus 2 Flow adenovirus 4 และ Egg Drop Syndrome มีค่า melting temperature (T_m) อยู่ระหว่าง 85.5-87.9°C อย่างไรก็ตาม Hemorrhagic enteritis virus ปรากฏ melt curve peak สูงสุดอยู่ที่ 87.9°C แต่พบ melt curve peak ขนาดเล็กในช่วง 80°C และ 84.5°C กอปรกับค่า Ct value ที่ค่อนข้างสูง สันนิษฐานว่า melt curve peak ดังกล่าวเกิดจาก non-specific binding เนื่องจากมีค่า T_m ใกล้เคียงกับค่า T_m ของ product จริง ทั้งนี้ไม่พบการเกิด primer dimer เนื่องจากไม่พบการสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมใน Amplification plot ของตัวอย่าง NTC โดยเฉพาะในช่วง cycle ที่ 35-40 (รูปที่ 11) ไม่พบการเกิด melt curve peak ในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่า 65°C และ ไม่พบผลดีเอ็นเอขนาดน้อยกว่า 100 คู่เบส โดยการทดสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 16) โดยพบผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 610 คู่เบส เพียงชนิดเดียว

จากข้อมูลการตรวจความจำเพาะด้วยวิธี real-time PCR ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสถานะที่ ออกแบบมาสำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยวิธี real-time PCR เหมาะสมกับการตรวจหา เชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 (Fowl adenoviruses) ในกลุ่มที่ 3 สำหรับเชื้อ (egg drop syndrome) ในกลุ่มที่ 2 (Hemorrhagic enteritis virus) ตามลำดับ สำหรับเชื้อในกลุ่มที่ 2 ซึ่งยัง เกิดปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์เพียงพอ อาจจะต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบเพิ่มเติมในแง่ของชนิดของน้ำยา master mix ค่า T_m ที่เหมาะสมโดยไม่กระทบกับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อ Avian adenovirus ในกลุ่มที่ 1 และ 3 รวมถึงทำการทดสอบกับเชื้อ Hemorrhagic enteritis virus สายพันธุ์อื่น เป็นต้น

จากการศึกษาความไวในการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยวิธี real-time PCR โดยทำการตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus 1 ATCC VR-432 ที่ความเข้มข้นระหว่าง $10^4 - 10^{19}$ TCID₅₀/0.1 ml จำนวนทั้งสิ้น 3 การทดลอง พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจพบสัญญาณการ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้จากการทดลองทั้ง 3 ครั้งคือ 10^{18} TCID₅₀/0.1 ml โดยพบว่าช่วงความ เข้มข้นที่ $10^4 - 10^2$ TCID₅₀/0.1 ml ค่า Ct value มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และ ค่า Ct value เข้าสู่สถานะคงที่ (plateau phase) ตั้งแต่ความเข้มข้น 10^3 TCID₅₀/0.1 ml เป็นต้นไป เมื่อนำค่า Ct value ก่อนระยะ plateau phase ในช่วงความเข้มข้น $10^4 - 10^2$ TCID₅₀/0.1 ml ของการ ทดลองทั้ง 3 ครั้ง มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานจะได้สมการเส้นตรงซึ่งมีสูตร $Y=2.4991x + 31$ มีค่า $r^2 = 0.9922$ แสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรง (linearity) เนื่องจากค่า r เข้าใกล้ 1 และมี precision เนื่องจากค่า Ct value ในแต่ละความเข้มข้นที่กำหนดในกราฟมาตรฐานมีค่า %CV ไม่เกิน 5 (ตารางที่ 6)

เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอจากการศึกษาความไวไปทำการศึกษา melting curve analysis พบว่าการทดลองที่ 1 2 และ 3 มีค่า T_m เท่ากับ 87 °C 86.5 °C และ 86.5 °C ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม

ตาม que ความเข้มข้น 10^{-3} TCID₅₀/0.1 ml เป็นต้นไปจะปรากฏ melt curve peak ในช่วงอุณหภูมิ ประมาณ 74 °C ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเกิดจาก non-specific amplification จากการเกิดปฏิกิริยาไม่ สมบูรณ์ เนื่องจากปริมาณ DNA template ถูกเจือจางจนต่ำกว่าจุดสมดุลของปฏิกิริยาโดยสังเกตจาก จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ซึ่งที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-3} TCID₅₀/0.1ml ลงไป ต้องทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างน้อย 32 รอบจึงจะสามารถตรวจพบสัญญาณการเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรมได้

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus โดยวิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นจะมี limit of quantitation อยู่ที่ 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml และมี limit of detection อยู่ที่ 10^{-18} TCID₅₀/0.1 ml ทั้งนี้หากต้องการใช้วิธีนี้ในการตรวจหาการปนเปื้อนในเชิงคุณภาพ (qualitative) ช่วง Ct value ที่เหมาะสมสำหรับการตัดสินผลคือช่วงระหว่าง 14-32 โดยหากมี Ct value มากกว่า 32 ขึ้นไปควรตรวจสอบ melt curve peak ร่วมกับการรันบน 2% agarose gel ทุก ครั้ง เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดผลบปลอมที่อาจเกิดขึ้นได้กับวิธี real-time PCR ซึ่งมีความไวสูง หาก ต้องการนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาความเข้มข้นของเชื้อในเชิงปริมาณ (quantitative) ช่วงความ เข้มข้นของเชื้อ (range) ที่สามารถคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อได้อย่างมีความแม่นยำคือช่วง $10^4 - 10^{-2}$ TCID₅₀/0.1 ml

หากเปรียบเทียบวิธีการทดสอบทั้ง 3 วิธีในแง่ของความจำเพาะ พบว่าวิธี real-time PCR และ nested PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อได้ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่มโดยไม่เกิด cross-reaction กับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ เนื่องจากวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้ง 2 เทคนิคข้างต้น สามารถจับได้กับบริเวณอนุรักษ์ของ hexon gene จึงสามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenovirus ได้ อย่างครอบคลุม ในขณะที่วิธีเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างจำกัด เนื่องจากเชื้อ Avian adenovirus แต่ละชนิดจะมีความ susceptible ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่นเชื้อใน

กลุ่มที่ 2 ไม่สามารถเจริญได้บนเซลล์เพาะเลี้ยงจาก spleen และ liver ได้เช่นเดียวกับเชื้อในกลุ่มที่ 1 โดยอาจเจริญได้บ้างบนเซลล์ lymphoblastoid (88)

หากเปรียบเทียบในแง่ของความไวในการตรวจหาเชื้อ Fowl adenovirus 1 พบว่าวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่มีความไวมากที่สุด โดยมีความไวเท่ากับ 10^{-18} TCID₅₀/0.1 ml ซึ่งมีความไวมากกว่าวิธี nested PCR อยู่ 10 Log (10^{-8} TCID₅₀/0.1 ml) โดยทั้งวิธี real-time PCR และ nested PCR มีความไวสูงกว่าวิธี cross-priming amplification (CPA) ของ Niczyporuk ซึ่งความไวเท่ากับ 10^{-6} TCID₅₀/0.1 ml (103) มีความไวสูงกว่าวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งมีความไวเท่ากับ 10^{-5} TCID₅₀/0.1 ml (126) โดยวิธีที่มีความไวต่ำที่สุดคือวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งมีความไวเท่ากับ 10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml

วิธีเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นวิธีที่ใช้แรงงานและเวลาในการทดสอบนานที่สุด โดยต้องใช้เวลาในการทดสอบอย่างน้อย 2 อาทิตย์ โดยต้องใช้เวลาในการทดสอบถึง 12 วันจึงจะสามารถตรวจหาเชื้อที่จุดต่ำสุดของการตรวจพบ (10^{-2} TCID₅₀/0.1 ml) ได้ ใช้น้ำยาในการทดสอบเช่น DMEM ในปริมาณมาก ใช้พื้นที่และเครื่องมือหลายชนิด เช่น CO₂ Incubator Biosafety Cabinet กล้อง Inverted Microscope เป็นต้น วิธี nested PCR สามารถทำการทดสอบได้จบภายในวันเดียวกันโดยใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 6-8 ชั่วโมง ใช้แรงงานน้อย น้ำยาและเครื่องมือราคาค่อนข้างสูงแต่ถูกกว่าวิธี real-time PCR วิธี real-time PCR เป็นวิธีที่ใช้เวลาการทดสอบสั้นที่สุด (2-3 ชั่วโมง) ใช้แรงงานน้อย แต่ค่าใช้จ่ายในการทดสอบค่อนข้างสูง เนื่องจากน้ำยาทดสอบ และ เครื่อง real-time PCR มีราคาแพง

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่มีความเหมาะสมในการนำมาทดสอบเพื่อตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ในตัวอย่างวัคซีนไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูง เป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ อีกทั้งยังสามารถตรวจพบเชื้อที่ไม่มีชีวิต

แล้วซึ่งเป็นข้อจำกัดของวิธีเซลล์เพาะเลี้ยง จึงช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดผลลบปลอมในผลิตภัณฑ์วัคซีนได้ สำหรับห้องปฏิบัติการที่ยังไม่มีเครื่อง real-time PCR และ มีงบประมาณจำกัด สามารถพิจารณาเลือกใช้วิธี nested PCR เนื่องจากเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีความไวเพียงพอในการตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ที่ปนเปื้อนอยู่ในวัคซีนได้ สำหรับวิธีเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นวิธีที่มีความไวจำกัดซึ่งอาจตรวจเชื้อปนเปื้อนในปริมาณที่ต่ำมากไม่พบ และเกิดผลลบปลอมได้ หากเลือกใช้วิธีนี้ควรพัฒนาเพิ่มความไวของวิธีทดสอบโดยการเพิ่มจำนวน/ปริมาตรตัวอย่าง หรือ เพาะเลี้ยงแบบ passage จะช่วยเพิ่มความไวในการทดสอบได้ โดยหากต้องการเลือกใช้วิธีเซลล์เพาะเลี้ยงควรพิจารณาจำนวนบุคลากร และ เวลาที่ใช้ในการทดสอบรวมด้วย เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการตรวจปล่อยผ่านมีจำกัดโดยปกติไม่เกิน 1 เดือนหลังจากทำการผลิตเสร็จสิ้น ทั้งนี้เพื่อให้สามารถจัดจำหน่ายได้ทันก่อนถึงฤดูกาลของการระบาด

5.2 สรุปผลการทดลอง

วิธี real-time PCR เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงที่สุดในทั้ง 3 วิธี ใช้ตรวจได้ทั้งเชิงปริมาณ และ เชิงคุณภาพ โดยมีความไวเท่ากับ 10^{-18} TCID₅₀/0.1 ml สามารถตรวจหาเชิงปริมาณได้อย่างมีความแม่นยำในช่วง 10^4 - 10^2 TCID₅₀/0.1 ml สามารถเกิดปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับเชื้อ Fowl adenovirus 1 Fowl adenovirus 2 Fowl adenovirus 4 ในกลุ่มที่ 1 Egg drop syndrome virus ในกลุ่มที่ 3 และ Hemorrhagic enteritis virus ในกลุ่มที่ 2 อย่างไรก็ตามการตรวจหาเชื้อ Hemorrhagic enteritis virus ในกลุ่มที่ 2 ยังคงพบ non-specific product ซึ่งต้องพัฒนาสถานะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ต่อไป ทั้งนี้ไม่พบการไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นในไก่ที่นำมาใช้เปรียบเทียบ อีกทั้งยังใช้เวลาในการทดสอบ และ ใช้กำลังคนน้อยที่สุดในการทดสอบ

จึงมีความเหมาะสมสำหรับตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses ในวัคซีนป้องกันโรค
ไขหวัดใหญ่ชนิดเชื้อตายได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยสร้างความปลอดภัยของวัคซีนก่อนนำไปใช้
ในประชาชน

ข้อเสนอแนะ

วิธี real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาเชื้อ Avian adenoviruses ที่ปนเปื้อนอยู่
ในวัคซีนไขหวัดใหญ่ได้อย่างมีความไวและความจำเพาะ โดยวิธีการทดสอบดังกล่าวสามารถนำไป
ประยุกต์ใช้ในการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ Avian adenoviruses ในวัคซีนสำหรับใช้ในมนุษย์
หรือวัคซีนสำหรับสัตว์ที่วางอยู่ในท้องตลาดเพื่อเป็นการเฝ้าระวังคุณภาพของวัคซีนได้ในอีกทางหนึ่ง
โดยเฉพาะวัคซีนสำหรับสัตว์เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีกฎหมายควบคุมในการผลิตให้เป็นไปตาม
มาตรฐาน GMP (Good Manufacturing Practice) และมีงานวิจัยหลายชิ้นที่บ่งชี้ว่าวัคซีนสำหรับ
สัตว์ มีการปนเปื้อนของ extraneous agents (127) รวมถึงสามารถนำวิธีทดสอบนี้มาต่อยอดเป็น
Multiplex PCR เพื่อให้สามารถตรวจหา Avian adenovirus ร่วมกับเชื้อปนเปื้อนแฝงชนิดอื่นเช่น
Avian leukosis virus Mycobacterium และ Mycoplasma ได้ในคราวเดียวกัน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. TIMELINE: The Dengvaxia controversy: CNN Philippines; 2018 [Available from: <http://cnnphilippines.com/news/2017/12/09/The-Dengvaxia-controversy.html>].
2. Dobbelaer R. CT, Grohmann G., Kistner O., Levandowski R., Medunitsin N.V. et al. WHO Technical Report Series. In: WHO, editor. Recommendation for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Geneva: WHO press; 2005. p. 134.
3. Plotkin S. A. OWA, Offit P. A. Vaccines. 6th ed: Elsevier Saunders; 2013.
4. Nikfarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell Journal (Yakhteh). 2012;13(4):203-12.
5. Wang J, Johnson S, Brown M, Lute S, Agarabi C, Dabrazhynetskaya A, et al. Mycoplasma clearance and risk analysis in a model bioprocess. PDA J Pharm Sci Technol. 2017;71(2):99-114.
6. Europe Co. European Pharmacopoeia Influenza vaccine (surface antigen, inactivated): European Directorate for the Quality of Medicine & Health Care; 2005. p. 673.
7. Otsuki K, Tsubokura M, Yamamoto H, Imamura M, Sakagami Y. Some properties of avian adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan. Avian Dis. 1976;20(4):693-705.
8. Weir JP, Gruber MF. An overview of the regulation of influenza vaccines in the United States. Influenza Other Respir Viruses. 2016;10(5):354-60.
9. Primerdesign. Genesig Avian Adenovirus EDS76 Egg Drop Syndrome [Available from: <http://www.genesig.com/products/9230-avian-adenovirus-eds76-egg-drop-syndrome>].
10. Kylt. PCR detection kits 2017 [Available from: <https://www.kylt.eu/en/pages/show/products>].
11. Biocheck. Poultry ELISA 2018 [Available from: <https://www.biocheck.com/poultry-elisa/>].
12. Franci G, Palomba L, Falanga A, Zannella C, D'Oriano V, Rinaldi L, et al. Chapter 1 - Influenza virus infections: clinical update, molecular biology, and therapeutic

- options A2 - Kon, Kateryna. In: Rai M, editor. *The Microbiology of Respiratory System Infections*. 1: Academic Press; 2016. p. 1-32.
13. Nayak D. Influenza virus infections. *Reference Module in Biomedical Sciences*: Elsevier; 2014.
 14. Aljohani M, Horning GD, Cheh AI. Chapter 148 - Influenza virus attack A2 - Ciottone, Gregory R. *Ciottone's Disaster Medicine (Second Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 771-3.
 15. Taubenberger JK. The origin and virulence of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Proceedings of the American Philosophical Society*. 2006;150(1):86-112.
 16. Chapter 8 - Planning for pandemics A2 - Hopkins, Phil. *Security Leader Insights for Business Continuity*. Boston: Elsevier; 2015. p. 29-31.
 17. World Health Organization, Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018- 2019 northern hemisphere influenza season, (2018).
 18. Administration USFaD. approved product: U.S. Food and Drug Administration; 2018 [Available from: <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm094047.htm>].
 19. WHO biosafety risk assessment and guidelines for the production and quality control of human influenza pandemic vaccines: Update (2009).
 20. Kommareddy S, Bonificio A, Gallorini S, Baudner B, Singh M, O'Hagan D. Preparation of highly concentrated influenza vaccine for use in novel delivery approaches. *J Pharm Sci*. 2013;102(3):866-75.
 21. Kon TC, Onu A, Berbecila L, Lupulescu E, Ghiorgisor A, Kersten GF, et al. Influenza vaccine manufacturing: effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0150700.
 22. Reimer CB, Baker RS, vanFrank RM, Newlin TE, Cline GB, Anderson NG. Purification of large quantities of influenza virus by density gradient centrifugation. *Journal of Virology*. 1967;1(6):1207-16.

23. Vaccine analysis: strategies, principles, and control. 1 ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015.
24. Dang-Tan T, Mahmud SM, Puntoni R, Franco EL. Polio vaccines, Simian virus 40, and human cancer: the epidemiologic evidence for a causal association. *Oncogene*. 2004;23(38):6535-40.
25. Cutrone R, Lednicky J, Dunn G, Rizzo P, Bocchetta M, Chumakov K, et al. Some oral poliovirus vaccines were contaminated with infectious SV40 after 1961. *Cancer Res*. 2005;65(22):10273-9.
26. Martini F, Corallini A, Balatti V, Sabbioni S, Pancaldi C, Tognon M. Simian virus 40 in humans. *Infectious Agents and Cancer*. 2007;2:13-.
27. Moody EE, Trousdale MD, Jorgensen JH, Shelokov A. Bacteriophages and endotoxin in licensed live-virus vaccines. *J Infect Dis*. 1975;131(5):588-91.
28. Milch H, Farnosi F. Bacteriophage contamination in live poliovirus vaccine. *Journal of Biological Standardization*. 1975;3(3):307-10.
29. Petricciani JC, Chu FC, Johnson JB, Meyer HM, Jr. Bacteriophages in live virus vaccines. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1973;144(3):789-92.
30. Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol*. 2010;84(12):6033-40.
31. Dubin G, Toussaint J-F, Cassart J-P, Howe B, Boyce D, Friedland L, et al. Investigation of a regulatory agency enquiry into potential porcine circovirus type 1 contamination of the human rotavirus vaccine, Rotarix™: Approach and outcome. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013;9(11):2398-408.
32. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 65th report, Scientific principles for regulatory risk evaluation on finding an adventitious agent in a marketed vaccine, (2015).
33. Council of Europe, European Pharmacopoeia 10, Test for extraneous agents in vaccine for human Use (2019).
34. US FDA, Center for Biologics Evaluation and Research, Guidance for Industry, Characterization and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications, (2010).

35. World Health Organization, Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Sect. A.3.1.5.2 & A.3.3.2 (2005).
36. Gombold J, Karakasidis S, Niksa P, Podczasy J, Neumann K, Richardson J, et al. Systematic evaluation of in vitro and in vivo adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products. *Vaccine*. 2014;32(24):2916-26.
37. Motitschke A, Ottiger HP, Jungback C. Evaluation of the sensitivity of PCR methods for the detection of extraneous agents and comparison with in vivo testing. *Biologicals*. 2010;38(3):389-92.
38. Maroudam Veerasami CK, Mohana Subramanian B, et al. Individual and multiplex PCR assays for the detection of adventitious bovine and porcine viral genome contaminants in the commercial vaccines and animal derived raw materials. *Journal of Veterinary Science & Technology*. 2014;5:179.
39. Li Y, Fu J, Chang S, Fang L, Cui S, Wang Y, et al. Isolation, identification, and hexon gene characterization of fowl adenoviruses from a contaminated live Newcastle disease virus vaccine. *Poult Sci*. 2017;96(5):1094-9.
40. Li PH, Zheng PP, Zhang TF, Wen GY, Shao HB, Luo QP. Fowl adenovirus serotype 4: epidemiology, pathogenesis, diagnostic detection, and vaccine strategies. *Poult Sci*. 2017;96(8):2630-40.
41. BECKER Y. *Molecular Virology : Molecular and medical aspects of disease-causing viruses in man and animals*. Hadar J, editor: martinus Nijhoff Publishes; 1983.
42. Hess M, Cuzange A, Ruigrok RW, Chroboczek J, Jacrot B. The avian adenovirus penton: two fibres and one base. *J Mol Biol*. 1995;252(4):379-85.
43. Norrby E. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3: IV. Immunological complexity of soluble components. *Virology*. 1969;37(4):565-76.
44. Saif Y.M. *FAM, Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan K.N., Swayne D.E. Disease of Poultry*. 12th ed: Blackwell publishing; 2008.
45. *Diseases of Poultry*. 13th ed: John Wiley & Sons; 2013.
46. McFerran JB, Smyth JA. Avian adenoviruses. *Rev Sci Tech*. 2000;19(2):589-601.

47. Hess M. Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathol.* 2000;29(3):195-206.
48. Zsak L, Kisary J. Grouping of fowl adenoviruses based upon the restriction patterns of DNA generated by *Bam*HI and *Hind*III. *Intervirology.* 1984;22(2):110-4.
49. *Virus Taxonomy : Classification and Nomenclature of Viruses.* USA: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2012.
50. Dawson GJ, Chang PW, Yates VJ, Fry DE. Neutralizing antibodies to CELO and avian adenovirus-associated viruses in the albumen of chicken eggs. *Avian Dis.* 1980;24(4):890-5.
51. Grgic H, Philippe C, Ojkic D, Nagy É. Study of vertical transmission of fowl adenoviruses. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 2006;70(3):230-3.
52. Ono M, Okuda Y, Shibata I, Sato S, Okada K. Reproduction of adenoviral gizzard erosion by the horizontal transmission of fowl adenovirus serotype 1. *J Vet Med Sci.* 2007;69(10):1005-8.
53. Hafez HM. Avian adenoviruses Infections with special attention to inclusion body hepatitis/ hydropericardium syndrome and egg drop syndrome. *Pakistan Veterinary Journal.* 2011;31:85-92.
54. Niu YJ, Sun W, Zhang GH, Qu YJ, Wang PF, Sun HL, et al. Hydropericardium syndrome outbreak caused by fowl adenovirus serotype 4 in China in 2015. *J Gen Virol.* 2016;97(10):2684-90.
55. Ye J, Liang G, Zhang J, Wang W, Song N, Wang P, et al. Outbreaks of serotype 4 fowl adenovirus with novel genotype, China. *Emerging Microbes & Infections.* 2016;5(5):e50.
56. Suresh M, Sharma JM. Pathogenesis of type II avian adenovirus infection in turkeys: in vivo immune cell tropism and tissue distribution of the virus. *Journal of Virology.* 1996;70(1):30-6.
57. Suresh M, Sharma JM. Hemorrhagic enteritis virus induced changes in the lymphocyte subpopulations in turkeys and the effect of experimental immunodeficiency on viral pathogenesis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;45(1-2):139-50.
58. Rautenschlein S, Sharma JM. Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis

- virus (HEV) in turkeys. *Dev Comp Immunol.* 2000;24(2-3):237-46.
59. Domermuth CH, Weston CR, Cowen BS, Colwell WM, Gross WB, DuBose RT. Incidence and distribution of "avian adenovirus group II splenomegaly of chickens". *Avian Dis.* 1980;24(3):591-4.
60. Veit HP, Domermuth CH, Gross WB. Histopathology of avian adenovirus group II splenomegaly of chickens. *Avian Dis.* 1981;25(4):866-73.
61. Domermuth CH, van der Heide L, Faddoul GP. Pulmonary congestion and edema (marble spleen disease) of chickens produced by group II avian adenovirus. *Avian Dis.* 1982;26(3):629-33.
62. Adair BM, McFerran JB, Connor TJ, McNulty MS, McKillop ER. Biological and physical properties of a virus (strain 127) associated with the egg drop syndrome 1976. *Avian Pathol.* 1979;8(3):249-64.
63. Smyth JA, Platten MA, McFerran JB. A study of the pathogenesis of egg drop syndrome in laying hens. *Avian Pathol.* 1988;17(3):653-66.
64. Van Eck J, Davelaar FG, Van Den Heuvel-Pllesman AM, Van kol N, Kouwenhoven B and Guldie FHM. Dropped egg production, soft-shelled and shell less eggs associated with appearance of precipitins to adenovirus in flocks of laying fowls. *Avian Pathology.* 1976;5:261-72.
65. JB M. *Diseases of Poultry.* Iowa: Iowa State University Press; 1997.
66. Egg Drop Syndrome 1976 Institute for International cooperation in animal biologics: Iowa State University; 2017 [Available from: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/egg_drop_syndrome.pdf].
67. Higashihara M, Hiruma M, Houdatsu T, Takai S, Matumoto M. Experimental infection of laying chickens with egg-drop syndrome 1976 virus. *Avian Dis.* 1987;31(1):193-6.
68. McFerran JB, Rowley HM, McNulty MS, Montgomery LJ. Serological studies on flocks showing depressed egg production. *Avian Pathol.* 1977;6(4):405-13.
69. T S. Inclusion body hepatitis. *J Kaset Vet.* 2007:97-102.
70. Witoonsatian K LP, Munkong S, Pathanakulanun S, Jam-on R, Pariyothorn N, Moonjit P, Upragarin N, Songserm T. Inclusion body hepatitis in broiler. *J Thai Vet Med Assoc.* 2008;59:110-3.

71. เจ้าหน้าที่ปศุสัตว์เผย "ไข่เหี่ยว" มาจากแม่ไก่ไม่แข็งแรง: ข่าวสด; 2558 [Available from: https://www.khaosod.co.th/view_newsonline.php?newsid=TVRReU1URTBOeLV6TkE9PO.
72. หนาวสะท้าน! ไก่เชียงใหม่อ่อนแอ ออกไขรูปร่างผิดปกติ: PPTV; 2558 [Available from: <https://www.pptvhd36.com/news/ประเด็นร้อน/3269>.
73. Nakamura K, Mase M, Yamamoto Y, Takizawa K, Kabeya M, Wakuda T, et al. Inclusion body hepatitis caused by fowl adenovirus in broiler chickens in Japan, 2009-2010. *Avian Dis.* 2011;55(4):719-23.
74. Balamurugan V, Kataria JM. The hydropericardium syndrome in poultry--a current scenario. *Vet Res Commun.* 2004;28(2):127-48.
75. Ruan S, Zhao J, He Z, Yang H, Zhang G. Analysis of pathogenicity and immune efficacy of fowl adenovirus serotype 4 isolates. *Poult Sci.* 2018.
76. Liu Y, Wan W, Gao D, Li Y, Yang X, Liu H, et al. Genetic characterization of novel fowl aviadenovirus 4 isolates from outbreaks of hepatitis-hydropericardium syndrome in broiler chickens in China. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(11):e117.
77. Zhang T, Jin Q, Ding P, Wang Y, Chai Y, Li Y, et al. Molecular epidemiology of hydropericardium syndrome outbreak-associated serotype 4 fowl adenovirus isolates in central China. *Virology.* 2016;13(1):188.
78. Kim JN, Byun SH, Kim MJ, Kim J, Sung HW, Mo IP. Outbreaks of hydropericardium syndrome and molecular characterization of Korean fowl adenoviral isolates. *Avian Dis.* 2008;52(3):526-30.
79. Park HS, Lim IS, Kim SK, Kim TK, Park CK, Yeo SG. Molecular analysis of the hexon, penton base, and fiber-2 genes of Korean fowl adenovirus serotype 4 isolates from hydropericardium syndrome-affected chickens. *Virus Genes.* 2017;53(1):111-6.
80. Gallina AM, Winterfield RW, Fadly AM. Adenovirus infection and disease. II. histopathology of natural and experimental disease. *Avian Diseases.* 1973;17(2):343-53.
81. Saifuddin M, Wilks CR. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect and quantify adenovirus in chicken tissues. *Avian Dis.* 1990;34(2):239-45.
82. Saifuddin M, Wilks CR, Birtles MJ. Development of an immunocytochemical procedure to detect adenoviral antigens in chicken tissues. *J Vet Diagn Invest.* 1991;3(4):313-8.
83. Hess M, Prusas C, Monreal G. Growth analysis of adenoviruses isolated from

- pigeons in chicken cells and serological characterization of the isolates. *Avian Pathol.* 1998;27(2):196-9.
84. Taharaguchi S, Fukazawa R, Kitazume M, Harima H, Taira K, Oonaka K, et al. Biology of fowl adenovirus type 1 infection of heterologous cells. *Archives of Virology.* 2012;157(11):2223-6.
85. Cowen BS. Chicken embryo propagation of type I avian adenoviruses. *Avian Dis.* 1988;32(2):347-52.
86. McFerran JB, Clarke JK, Connor TJ. Serological classification of avian adenoviruses. *Archiv für die gesamte Virusforschung.* 1972;39(1):132-9.
87. Grimes TM, King DJ. Serotyping avian adenoviruses by a microneutralization procedure. *Am J Vet Res.* 1977;38(3):317-21.
88. Nazerian K, Fadly AM. Propagation of virulent and avirulent turkey hemorrhagic enteritis virus in cell culture. *Avian Dis.* 1982;26(4):816-27.
89. van den Hurk JV. Propagation of group II Avian adenoviruses in turkey and chicken leukocytes. *Avian Diseases.* 1990;34(1):12-25.
90. Domermuth CH, Gross WB, DuBose RT, Douglass CS, Reubush CB. Agar gel diffusion precipitin test for hemorrhagic enteritis of turkeys. *Avian Diseases.* 1972;16(4):852-7.
91. Silim A, Thorsen J. Hemorrhagic enteritis: virus distribution and sequential development of antibody in turkeys. *Avian Dis.* 1981;25(2):444-53.
92. McFerran JB, Adair BM. Avian adenoviruses--a review. *Avian Pathol.* 1977;6(3):189-217.
93. Darbyshire JH, Peters RW. Studies on EDS-76 virus infection in laying chickens. *Avian Pathology.* 1980;9(3):277-90.
94. Swain P, Kataria JM, Verma KC. Biological characterisation of an Indian isolate of egg drop syndrome-76 virus. *Research in Veterinary Science.* 1993;55(3):396-7.
95. Raue R, Hess M. Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *J Virol Methods.* 1998;73(2):211-7.
96. Xie Z, Fadl AA, Girshick T, Khan MI. Detection of avian adenovirus by polymerase

chain reaction. *Avian Dis.* 1999;43(1):98-105.

97. Jiang P, Ojkic D, Tuboly T, Huber P, Nagy E. Application of the polymerase chain reaction to detect fowl adenoviruses. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 1999;63(2):124-8.

98. Drago L, Lombardi A, De Vecchi E, Giuliani G, Bartolone R, Gismondo MR. Comparison of nested PCR and real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infectious Diseases.* 2004;4:55-.

99. Romanova N, Corredor JC, Nagy É. Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods.* 2009;159(1):58-63.

100. Gunes A, Marek A, Grafl B, Berger E, Hess M. Real-time PCR assay for universal detection and quantitation of all five species of fowl adenoviruses (FAdV-A to FAdV-E). *J Virol Methods.* 2012;183(2):147-53.

101. Wang J, Wang J, Chen P, Liu L, Yuan W. Development of a TaqMan-based real-time PCR assay for rapid and specific detection of fowl aviadenovirus serotype 4. *Avian Pathol.* 2017;46(3):338-43.

102. Xie Z, Tang Y, Fan Q, Liu J, Pang Y, Deng X, et al. Rapid detection of group I avian adenoviruses by a loop-mediated isothermal amplification. *Avian Dis.* 2011;55(4):575-9.

103. Niczyporuk JS, Wozniakowski G, Samorek-Salamonowicz E. Application of cross-priming amplification (CPA) for detection of fowl adenovirus (FAdV) strains. *Arch Virol.* 2015;160(4):1005-13.

104. Pray LA. *The Biotechnology Revolution: PCR and the use of reverse transcriptase to clone expressed genes: Nature Education*; 2008 [Available from: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/the-biotechnology-revolution-pcr-and-the-use-553>].

105. Clewley JP. *The polymerase chain reaction (PCR) for human viral diagnosis: Taylor & Francis*; 1994.

106. Kary B, Mullis FF, Richard A, Gibbs, James D, Watson. *The polymerase chain reaction. Birkhauser Boston: Springer Science+Business Media, LCC*; 1994.

107. Bustin SA. *The PCR revolution: basic technologies and applications: Cambridge*

University Press; 2010.

108. Das S, Dash HR. Microbial biotechnology- a laboratory manual for bacterial systems: Springer India; 2014.

109. ICH. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology 2005.

110. Agency EM. Guideline on influenza vaccines-quality module. Process validation. United Kingdom 2013. p. 8.

111. American Type Culture Collection (ATCC). LMH-(ATCC CRL-2117). 2018.

112. Petricciani J, Sheets R, Griffiths E, Knezevic I. Adventitious agents in viral vaccines: lessons learned from 4 case studies. *Biologicals*. 2014;42(5):223-36.

113. River C. Technical guidelines-SPF eggs. North Franklin, USA 2014.

114. Chen L, Yin L, Peng P, Zhou Q, Du Y, Zhang Y, et al. Isolation and characterization of a novel fowl Adenovirus serotype 8a strain from China. *Virologica Sinica*. 2019.

115. Du D, Zhang P, Li X, Tian H, Cheng Y, Sheng D, et al. Cell-culture derived fowl adenovirus serotype 4 inactivated vaccine provides complete protection for virus infection on SPF chickens. *Virusdisease*. 2017;28(2):182-8.

116. Yu X, Wang Z, Chen H, Niu X, Dou Y, Yang J, et al. Serological and pathogenic analyses of fowl Adenovirus serotype 4 (FAV-4) strain in Muscovy ducks. *Front Microbiol*. 2018;9:1163-.

117. Wang K, Sun H, Li Y, Yang Z, Ye J, Chen H. Characterization and pathogenicity of fowl adenovirus serotype 4 isolated from eastern China. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):373-.

118. Beladi S, Ghoreyshi S, Morshedi D. Using nested-PCR for detection of avian Influenza virus. *Acta Veterinaria Brno*. 2005;74:581-4.

119. Hatai H, Ochiai K, Tomioka Y, Toyoda T, Hayashi K, Anada M, et al. Nested polymerase chain reaction for detection of the avian leukosis virus causing so-called fowl glioma. *Avian Pathology*. 2005;34(6):473-9.

120. Desingu PA, Singh SD, Dhama K, Kumar OR, Singh R, Singh RK. A rapid method of accurate detection and differentiation of Newcastle disease virus pathotypes by demonstrating multiple bands in degenerate primer based nested RT-PCR. *J Virol Methods*. 2015;212:47-52.

121. Kasantikul T. Detection of serotype 2 Fowl Adenovirus from field infected tissues by immunohistochemistry and *In Situ* hybridization. In: Univeristy K, editor. Kasetsart University2010. p. 300-8.
122. Chen L, Yin L, Zhou Q, Peng P, Du Y, Liu L, et al. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018. BMC Vet Res. 2019;15(1):271.
123. Wang Z, Zhao J. Pathogenesis of hypervirulent fowl adenovirus serotype 4: the contributions of viral and host factors. Viruses. 2019;11(8):741.
124. Schachner A, Matos M, Grafl B, Hess M. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control - a review on the current global situation. Avian pathology : journal of the WSPA. 2018;47(2):111-26.
125. Mase M, Mitake H, Inoue T, Imada T. Identification of group I-III avian adenovirus by PCR coupled with direct sequencing of the hexon gene. The Journal of veterinary medical science. 2009;71(9):1239-42.
126. Niczyporuk JS. Molecular characteristic on occurrence of fowl adenovirus field strains and effect of efficiency on prophylactic vaccinations against Marek's disease. Pulawy2014.
127. Pastoret P-P. Human and animal vaccine contaminations. Biologicals. 2010;38(3):332-4.

ภาคผนวก

วิธีการเตรียม 1X TBE buffer

TBE buffer 10 X	100 ml
Purified Water	900 ml
ปริมาตรรวม	100 ml

วิธีการเตรียม 1.5 % agarose gel

ผง Agarose 1.5 กรัม

เทสารละลาย 1X TBE buffer จนมีปริมาตร 100 ml

อุ่นด้วยเครื่องไมโครเวฟ เป็นเวลา 1-2 นาที จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงบนแท่นรองที่เสียบหวีไว้แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นาย ศรารุณี ยอดทอง
วัน เดือน ปี เกิด	30 มกราคม 2527
สถานที่เกิด	แพร่
วุฒิการศึกษา ที่อยู่ปัจจุบัน	วิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ 1333/254 เดอะไลน์วงค์สว่าง ถนน กรุงเทพ-นน แขวงวงค์สว่าง เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลงานวิจัยคุณภาพ ภาคโปสเตอร์ ระดับดีเด่น สาขาวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม และความหลากหลายทางชีวภาพ การประชุมวิชาการ ระดับชาติ ครั้งที่ 16 วันที่ 3-4 ธันวาคม 2562 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน