

## การพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ Chicken Anemia Virus ในซีรัมด้วยเทคนิค Direct Real Time-Loop Mediated Isothermal Amplification

ศรุต หวังอนุรักษ์กุล<sup>1\*</sup>, กัญญ์ณิศา ลิ้มวิบูลพงษ์<sup>1</sup>, มุทิตะ ชลามาตย์<sup>1</sup>,  
จิระวุฒิ จันทรงาม<sup>1</sup>, เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล<sup>1</sup>, วันชัย อัสวลาณสกุล<sup>2</sup>

### บทคัดย่อ

**ที่มาของการศึกษา:** ไวรัสก่อโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ (chicken anemia virus, CAV) เป็นสาเหตุของโรคโลหิตจางชนิดรุนแรงและภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในไก่ การติดเชื้อ CAV โดยไม่แสดงอาการมักพบในไก่ที่มีอายุมากกว่า 2-3 สัปดาห์ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ วิธี PCR เป็นวิธีหนึ่งที่ยิยมในการตรวจหาเชื้อ CAV แต่ต้องใช้ระยะเวลานานและอาศัยหลายขั้นตอนทั้ง DNA extraction และ gel electrophoresis

**วิธีการ:** การศึกษานี้จึงได้พัฒนาการตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมไก่ด้วยวิธี direct real time-loop mediated isothermal amplification (direct real time-LAMP) โดยประยุกต์ด้วยการต้มตัวอย่างซีรัมเป็นเวลา 10 นาที และแยกส่วนสไลด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไวรัสจากส่วนสไลตัวอย่างที่ต้มแล้วด้วยไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะต่อยีน vp2 และตรวจวัดความขุ่นในปฏิกิริยา LAMP โดยแสดงผลทันทีด้วยเครื่องตรวจวัดความขุ่น (LAMP turbidimeter) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที

**ผล:** วิธี direct real time-LAMP ใช้เวลาในการตรวจไม่เกิน 1 ชั่วโมง 45 นาที และปริมาณไวรัสน้อยสุดที่ตรวจพบคือ  $10^{3.2}$  TCID<sub>50</sub> ต่อมิลลิลิตร โดยไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสก่อโรคในสัตว์ปีกชนิดอื่น ๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ นิวคาสเซิลกัมโบโร หลอดลมอักเสบติดต่อในไก่ และฝีดาษในไก่ นอกจากนี้วิธีนี้มีความสอดคล้องกับผลทดสอบของวิธี PCR ที่ระดับการสอดคล้องดีมาก (ค่า kappa = 0.823) และมีค่าความไวและค่าความจำเพาะของทดสอบเท่ากับ 100% และ 94.20% ตามลำดับ

**สรุป:** ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าวิธี direct real time-LAMP ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมไก่เป็นวิธีที่มีขั้นตอนง่ายให้ผลเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมไก่ที่ฟาร์มได้

**คำสำคัญ:** ไวรัสก่อโรคโลหิตจางติดต่อในไก่, direct real time-LAMP, ซีรัม

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก 844 หมู่ 9 ตำบลคลองกาว อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี 20220
  2. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
- \* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์และโทรสาร 038 742116 038 742120 อีเมล saruda\_ku61@yahoo.co.th

## Development of Direct Real Time-Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of Chicken Anemia Virus in Serum

Saruda Wanganurakkul<sup>1\*</sup>, Kanthanis Limwibulpong<sup>1</sup>, Mutita Chalamaat<sup>1</sup>,  
Jirawut Chan-ngam<sup>1</sup>, Lerdchai Chintapitaksakul<sup>1</sup>, Wanchai Assavalapsakul<sup>2</sup>

### Abstract

**Background:** Chicken anemia virus (CAV) causes severe infectious anemia and immunodeficiency in chicken. Subclinical CAV infection usually appears in the chicken older than 2-3 weeks. Therefore, the laboratory testing is necessary for diagnosis. PCR is a common assay for CAV detection but it is time-consuming and requires several steps including DNA extraction and gel electrophoresis.

**Methods:** This study, we developed method for CAV detection in chicken serum by direct real time-loop mediated isothermal amplification (direct real time-LAMP). This method was applied with sample boiling for 10 minutes and then separated boiled supernatants by centrifugation for 5 minutes. The supernatants were used to amplify viral DNA with vp2 specific LAMP primers. The turbidity in LAMP reaction was measured in real-time by LAMP turbidimeter at 65 °C for 90 minutes.

**Results:** The direct real time-LAMP could detect CAV in serum less than 1 hour 45 minutes and showed viral detection limit to be  $10^{3.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL with no cross-reaction with other 4 poultry viruses including Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus and fowl pox virus. In addition, this method showed the results correlated with PCR test at very good agreement (kappa value = 0.823). The diagnostic sensitivity and specificity were 100% and 94.20%, respectively.

**Conclusions:** These results indicated that the evaluated direct real time-LAMP for CAV detection in chicken serum was simple, rapid, high sensitivity and specificity that can be applied as an alternative technique to detect the presence of CAV in chicken serum at farm level.

**Keyword:** chicken anemia virus, direct real time-LAMP, serum

1.Veterinary Research and Development Center (Eastern Region), 844, Moo 9, Klaungkeiw, Banbung, Chonburi 20220

2.Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Pathumwan, Bangkok, 10330

\* Corresponding author: Tel. & Fax. 038 742116, 038 742120; email: saruda\_ku61@yahoo.co.th

## บทนำ

โรคโลหิตจางติดต่อนไก่เกิดจากการติดเชื้อ chicken anemia virus (CAV) เป็นไวรัสอยู่ในวงศ์ Anelloviridae สกุล Gyrovirus (Rosario et al., 2017) ทำให้ไก่อายุน้อยกว่า 2-3 สัปดาห์ แสดงอาการ เช่น ซีด แคระแกร็น ต่อมไทมัสและเบอร์ซา ฝ่อ มีภาวะโลหิตจางชนิดรุนแรงและตายในที่สุด (Yuasa et al., 1979) และทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันทำงานบกพร่องในไก่อายุมากกว่า 2-3 สัปดาห์ โดยไม่แสดงอาการ ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อแทรกซ้อนได้ง่าย จึงพบอัตราการป่วยและตายสูงเนื่องจากการติดเชื้อชนิดอื่น นอกจากนี้ยังส่งผลให้ไก่มีน้ำหนักและให้ผลผลิตลดลง CAV จึงเป็นไวรัสสำคัญที่สร้างความเสียหายต่ออุตสาหกรรมเลี้ยงไก่ (de Herdt et al., 2001) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ CAV ในฟาร์มไก่เนื้อและไก่พ่อแม่พันธุ์ในปี 2542 และ 2543 โดยพบมีฟาร์มไก่เนื้อที่พบการติดเชื้อคิดเป็น 78.38% และ 88.89% ในขณะที่ฟาร์มไก่พ่อแม่พันธุ์ที่พบการติดเชื้อคิดเป็น 70.83% และ 88.71% (นัดดีและคณะ, 2544)

ปัจจุบันการตรวจหาเชื้อ CAV สามารถตรวจได้ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสจากอวัยวะ เช่น ต่อมไทมัส ม้ามและตับ เป็นต้น (Tham and Stanislawek, 1992) โดยมีเซลล์เป้าหมายของไวรัสเป็นเซลล์ hemocytoblast และ T lymphocyte precursor (Adair, 2000) อย่างไรก็ตามการเก็บตัวอย่างอวัยวะเหล่านี้จำเป็นต้องทำลายสัตว์ ดังนั้นสัตว์ติดเชื้อ CAV ที่ไม่มีการแสดงออกของโรคจึงยากต่อการซึบเพื่อทำลายและเก็บตัวอย่างอวัยวะเพื่อตรวจหาไวรัส ซึบจึงเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายจากสัตว์ที่มีชีวิตและยังพบว่ามีการวิจัยที่สามารถตรวจพบเชื้อ CAV ได้ (Tham and Stanislawek, 1992; Oluwayelu and Todd, 2008) รวมถึงไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่น hepatitis B virus (Kaneko et al., 1990) และ canine distemper virus (Frisk et al., 1999) ก็สามารถตรวจพบในซึบได้โดยใช้วิธี PCR เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามแม้วิธี PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงแต่ยังต้องอาศัยเครื่องมือจำเพาะที่มีราคาแพง มีขั้นตอนซับซ้อนและต้องอาศัยผู้ทดสอบที่มีความชำนาญ รวมถึงใช้ระยะเวลาตรวจนาน 3-4 ชั่วโมง (Dhama et al., 2014) จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตรวจในภาคสนาม เพื่อให้รู้ผลเร็วและดำเนินการควบคุมโรคได้ทันที

เทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อที่สนใจ เช่นเดียวกับวิธี PCR แต่อาศัยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอย่างรวดเร็วด้วยอุณหภูมิเดียวภายใน 1 ชั่วโมงและอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 6-8 บริเวณ จึงมีความจำเพาะสูง นอกจากนี้ยังสามารถอ่านผลได้รวดเร็วและใช้เครื่องมือตรวจอย่างง่ายจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจโรคในภาคสนามได้ (Notomi et al., 2000) อีกทั้งหลายการศึกษา ยังพบว่าเทคนิค LAMP มีความไวสูงกว่า PCR (Parida et al., 2004; Huang et al., 2010) เทคนิค LAMP จึงได้ถูกนำมาพัฒนาวิธีในครั้งนี้ โดยอาศัยการตรวจวัดแบบ real - time ด้วยการตรวจวัดความขุ่นในขณะเกิดปฏิกิริยา LAMP ด้วยเครื่องตรวจวัดความขุ่น (turbidimeter) และอ่านผลทันที (Mori et al., 2004) อีกทั้งได้นำข้อดีของเทคนิค LAMP ที่สามารถตรวจจากตัวอย่างโดยตรงได้โดยไม่ต้องสกัดสารพันธุกรรม (Abdullahi et al., 2015) มาพัฒนาวิธีเป็นวิธี direct real time - LAMP ขึ้น นอกจากนี้ยังนำวิธีการต้มตัวอย่างก่อนเติมลงในปฏิกิริยา LAMP โดยตรง (Nie et al., 2012) มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความไวของวิธีด้วยการพัฒนาวิธีในครั้งนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน *vp2* ของเชื้อ CAV ซึ่งเป็นยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น dual-specificity protein phosphatase (DSP) มีบทบาทในการควบคุมการเพิ่มจำนวนและการก่อโรคของไวรัส (Peter et al., 2002) อีกทั้งยีน *vp2* ยังมีลำดับเบสอนุรักษ์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับยีน *vp1* ซึ่งแปลรหัสเป็นแคปซิดโปรตีนของเชื้อ CAV (Li et al., 2016)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ CAV ในซึบด้วยเทคนิค direct real time-LAMP เพื่อให้ได้วิธีตรวจหาไวรัสที่มีขั้นตอนง่ายและให้ผลเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

ไวรัส: เชื้อ CAV มาจากวัคซีนเชื้อเป็นสายพันธุ์ Del-Ros (Circomune, USA) มีปริมาณเชื้อ CAV จำนวน  $1 \times 10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL ตามที่ผู้ผลิตระบุ ไวรัส Newcastle (NDV), infectious bronchitis (IBV), infectious bursal disease (IBDV) และ fowl pox (FPV) จากวัคซีนเชื้อเป็น (Zoetis, USA)

ตัวอย่าง: ชีรึมโกไข่ เพศเมีย คละพันธุ์และอายุ เก็บจาก ฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดปราจีนบุรี ที่ไม่มีประวัติการทำวัคซีน แต่มีประวัติการพบเชื้อ CAV ส่งมายังศูนย์วิจัยและพัฒนาการ สัตวแพทย์ภาคตะวันออกเพื่อชันสูตรโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ ในระหว่างปี พ.ศ. 2553–2555 รวมจำนวน 161 ตัวอย่าง ชีรึม ควบคุมกลับเป็นชีรึมให้ผลทดสอบลบด้วยวิธี PCR จากฟาร์มไก่ ที่ไม่มีประวัติการพบเชื้อไวรัสและการทำวัคซีนป้องกันเชื้อ CAV สำหรับชีรึมควบคุมบวกเป็นชีรึมควบคุมลบที่เดิมเชื้อ CAV ใน ปริมาณ  $1 \times 10^{6.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL

สารเคมี: ไพรมเมอร์ LAMP จำนวน 6 เส้น ออกแบบด้วยซอฟต์แวร์ primer explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) ให้จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน vp2 ของเชื้อ CAV จำนวน 57 สายพันธุ์และไพรมเมอร์ PCR จำนวน 2 เส้น (Iwata et al., 1998) ดังแสดงในตารางที่ 1 สาร dNTPs (Qiagen, Germany), thermopol buffer, MgSO<sub>4</sub> และ Bst 2.0 warm start DNA Polymerase (New England Biolabs, UK), betaine และ mineral oil (Sigma-Aldrich, USA) และชุดสกัด Quick-gDNA Mini Prep (Zymo research, USA)

เครื่องมือ: เครื่องตรวจวัดความขุ่นสำหรับปฏิกิริยา LAMP (Innosence, Thailand) ตั้งอุณหภูมิที่ 65 °C และวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตรโดยตรวจวัดทุก ๆ 1 วินาที เป็นเวลา 90 นาที และเครื่อง UV transilluminator (Syngene, UK)

#### การพัฒนาและทดสอบหาความเหมาะสมของวิธี direct real time-LAMP

ทดสอบหาระยะเวลาในการสกัดสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคการต้มที่เหมาะสมโดยนำชีรึมควบคุมบวกซึ่งเตรียมจากชีรึมลบที่เดิมเชื้อ CAV ซึ่งเก็บจากต่างพื้นที่ จำนวน 3 ตัวอย่าง (P1, P2 และ P3) และชีรึมควบคุมลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง ปิเปตใส่ลงในหลอดทดสอบ ปริมาตรละ 200 µL จำนวน 7 หลอด/ตัวอย่าง แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่เวลา 0 (ไม่ได้ทำการต้ม), 1, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกส่วนใสที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 2 µL ทดสอบในปฏิกิริยา LAMP

ทดสอบหาปริมาตรตัวอย่างที่เหมาะสมหลังผ่านการต้ม โดยนำชีรึมควบคุมบวกซึ่งเตรียมจากชีรึมลบที่เดิมเชื้อ CAV ที่เก็บจากต่างพื้นที่ จำนวน 3 ตัวอย่าง (P1, P2 และ P3) และชีรึมควบคุมลบ จำนวน 1 ตัวอย่าง ปิเปตใส่ลงในหลอดทดสอบ

ตารางที่ 1 แสดงไพรมเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

| ชื่อไพรมเมอร์   | Sequence 5'-3'                                           | ขนาด (เบส) |
|-----------------|----------------------------------------------------------|------------|
| CAV_F3_LAMP     | TCC GAG TAC AGG GTA AGC                                  | 18         |
| CAV_B3_LAMP     | AGC TCG TCT ACB ATA CCG                                  | 18         |
| CAV_FIP_LAMP    | GCT CGT CTT GCC ATC TTA CAG TTT<br>ACC ACT ACT CCC AGC C | 40         |
| CAV_BIP_LAMP    | GCC TTC AGA AGA GGA CGG TGT<br>GTC TCC TCC GAT GTC G     | 37         |
| CAV_Loop F_LAMP | ACC TTC TTG CGG TTC GG                                   | 17         |
| CAV_Loop B_LAMP | CAC CAS CTC AAG CGA CTT                                  | 18         |
| VP2.1-For_PCR   | GGG TGG ATG CAC GGG AAC GG                               | 20         |
| VP2.1_Rev_PCR   | GCC TTA CAC TAT ACG TAC CG                               | 20         |

ปริมาตรละ 200 µL แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดตามระยะเวลาการต้มที่เหมาะสมที่ได้จากการทดสอบ จากนั้นนำไปปั่นแยกส่วนใสที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำเฉพาะส่วนใสทดสอบปฏิกิริยา LAMP ในปริมาตรที่แตกต่างกันดังนี้คือ 1, 2, 3, 4 และ 5 µL

ปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้สำหรับทดสอบมีปริมาตรรวม 25 µL ประกอบด้วย ไพรมเมอร์ FIP และ BIP ความเข้มข้นละ 0.8 µM, ไพรมเมอร์ F3, B3, Loop F และ Loop B ความเข้มข้นละ 0.1 µM, 1x thermopol buffer, Betaine ความเข้มข้น 0.8 M, dNTPs ความเข้มข้น 1 mM, MgSO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 8 mM, Bst 2.0 warm start DNA polymerase ปริมาณ 8 U และส่วนใสของตัวอย่างหลังผ่านการต้ม ตัวอย่างทดสอบ ผสมให้เข้ากันแล้ว ปิดทับด้วย mineral oil ปริมาตร 30 µL จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจวัดด้วยเครื่องวัดความขุ่น (LAMP turbidimeter) ซึ่งแสดงผลในรูปกราฟ โดยแกน x คือ เวลา และแกน y คือ ค่าความขุ่น ผลบวกจะปรากฏเส้นกราฟโค้งขึ้นและแสดงค่า threshold time (Tt) ซึ่งเป็นเวลาเริ่มต้นที่ให้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.005 การตรวจสอบยืนยันผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา LAMP โดยนำผลผลิต DNA ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel และอ่านผลด้วยเครื่อง UV transilluminator ผลบวกจะปรากฏเป็นแถบ DNA คล้ายขั้นบันได (ladder band)

#### การทดสอบความไวและความจำเพาะของวิธี direct real time-LAMP

ความไวของวิธีทดสอบโดยเจือจางชีรึมควบคุมบวกด้วยชีรึมควบคุมลบในรูปแบบ ten-fold serial dilution จำนวน

7 ระดับความเข้มข้น ให้ได้ความเข้มข้นดังนี้ คือ  $10^{6.2}$ ,  $10^{5.2}$ ,  $10^{4.2}$ ,  $10^{3.2}$ ,  $10^{2.2}$ ,  $10^{1.2}$  และ  $10^{0.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL แล้วนำแต่ละตัวอย่างมาทดสอบด้วยวิธี direct real time-LAMP โดยใช้ปริมาตรตัวอย่างละ 200  $\mu$ L มาต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ปั่นแยกส่วนใสที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 2  $\mu$ L ทดสอบในปฏิกิริยา LAMP จากนั้นนำตัวอย่างชุดเดียวกัน ปริมาตรละ 200  $\mu$ L ไปสกัด DNA ด้วยชุดสกัด Quick-gDNA Mini Prep ตามวิธีการของผู้ผลิต แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ ปริมาตร 2  $\mu$ L ทดสอบด้วยวิธี PCR ตามวิธีการของ Iwata et al. (1998) ผลบวกจะปรากฏแถบ DNA ของ PCR product ซึ่งมีขนาด 660 bp ส่วนความจำเพาะของวิธีทดสอบโดยนำซีรัมควบคุมลบที่เติมเชื้อ NDV, IBV, IBV, FPV และ CAV มาทดสอบด้วยวิธี direct real time-LAMP โดยนำแต่ละตัวอย่าง ปริมาตรละ 200  $\mu$ L มาต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที ปั่นแยกส่วนใสที่ความเร็ว 12,000 rpm 5 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 2  $\mu$ L ทดสอบในปฏิกิริยา LAMP

**การทดสอบหาเชื้อ CAV จากตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี direct real time-LAMP และเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการทดสอบกับวิธี PCR**

ทดสอบตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกและลบจากวิธี PCR จำนวน 161 ตัวอย่างด้วยวิธี direct real time-LAMP คำนวณค่า % diagnostic sensitivity และ % diagnostic specificity ด้วยโปรแกรม MedCalc (Belgium) แล้วคำนวณค่า kappa ( $\kappa$ ) ด้วยโปรแกรม GraphPad (USA) เพื่อประเมินระดับความสอดคล้องระหว่างผลทดสอบของวิธี direct real time-LAMP กับ PCR ตามเกณฑ์ของ Landis and Koch (1997)

### ผลและวิจารณ์

**การพัฒนาและทดสอบหาความเหมาะสมของวิธี direct real time-LAMP**

ผลการพัฒนาและทดสอบหาความเหมาะสมของวิธี direct real time-LAMP เพื่อตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมโดยต้มตัวอย่างซีรัมซึ่งประยุกต์วิธีการมาจากการศึกษาของ Nie et al. (2012) แล้วนำเฉพาะส่วนใสตัวอย่างหลังผ่านการต้มมาทดสอบในปฏิกิริยา LAMP พบว่า การต้มตัวอย่างซีรัมก่อนนำตัวอย่างไปทดสอบในปฏิกิริยา LAMP โดยตรงที่เวลาตั้งแต่ 10 นาที ขึ้นไปให้ค่า Tt น้อยกว่า แสดงถึงปฏิกิริยา LAMP สามารถเกิดได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ 5, 1 และ 0 (ไม่ได้ทำการต้ม) นาที จึงเลือกระยะเวลาการต้มที่ 10 นาทีเป็นระยะเวลาการต้มตัวอย่างที่เหมาะสม (ตารางที่ 2) ซึ่งวิธีการต้ม

ในระยะเวลาดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Urlings et al. (1993) ที่พบว่าอุณหภูมิ 100°C ระยะเวลา 10 นาที สามารถทำลายอนุภาคเชื้อ CAV ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารพันธุกรรมของไวรัส เมื่อนำมาทดสอบในปฏิกิริยา LAMP โดยตรงจึงเกิดปฏิกิริยาได้ดี

ส่วนปริมาตรส่วนใสซีรัมหลังผ่านการต้มในเวลา 10 นาที สำหรับใช้ทดสอบในปฏิกิริยา LAMP โดยตรงนั้นพบว่า 2  $\mu$ L เป็นปริมาตรที่เหมาะสม โดยผลทดสอบให้ค่า Tt น้อยที่สุด แสดงว่าปฏิกิริยา LAMP เกิดได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตรอื่น ๆ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ผลทดสอบยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณส่วนใสของตัวอย่างหลังผ่านการต้มมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา LAMP เมื่อใช้ปริมาณน้อยเกินไปโอกาสตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสจะลดลงหรือใช้ปริมาณมากเกินไป เกือบต่าง ๆ ที่อยู่ในส่วนใสของตัวอย่างอาจไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ Bst DNA polymerase แม้ว่าเอนไซม์ชนิดนี้จะมีความทนทานต่อสารหรือตัวยับยั้งต่าง ๆ ในตัวอย่างชีวภาพได้ดีก็ตาม (Nie et al., 2012) จึงทำให้ปฏิกิริยา LAMP เกิดขึ้นได้ดีเท่าที่ควร

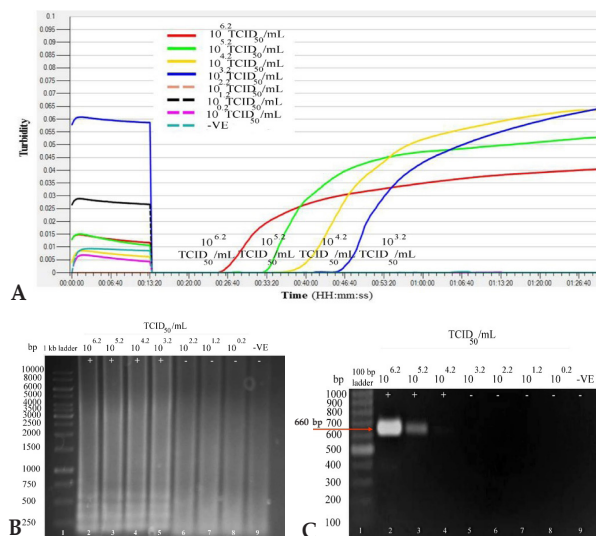
**ตารางที่ 2** แสดงผลการทดสอบหาระยะเวลาในการต้มตัวอย่างซีรัม

| เวลาในการต้ม<br>(นาที) | Threshold time (Tt) (นาที) |       |       |                |
|------------------------|----------------------------|-------|-------|----------------|
|                        | ซีรัมควบคุมบวก             |       |       |                |
|                        | P1                         | P2    | P3    |                |
| 0 (ไม่ได้ทำการต้ม)     | 40.88                      | 44.18 | 39.84 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 1                      | 37.18                      | 40.53 | 35.57 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 5                      | 36.37                      | 37.15 | 33.32 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 10                     | 30.52                      | 29.29 | 26.38 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 15                     | 30.03                      | 29.67 | 27.37 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 20                     | 29.82                      | 30.09 | 27.04 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 30                     | 29.53                      | 30.64 | 27.82 | ตรวจไม่พบเชื้อ |

**ตารางที่ 3** แสดงผลการทดสอบหาปริมาณส่วนใสตัวอย่างหลังผ่านการต้มเป็นเวลา 10 นาทีสำหรับใช้เติมในปฏิกิริยา LAMP โดยตรง

| ปริมาตรส่วนใส<br>ตัวอย่างหลังผ่าน<br>การต้ม (μL) | Threshold time (Tt) (นาที) |       |       |                |
|--------------------------------------------------|----------------------------|-------|-------|----------------|
|                                                  | ซีรัมควบคุมบวก             |       |       |                |
|                                                  | P1                         | P2    | P3    |                |
| 1                                                | 40.98                      | 38.33 | 39.67 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 2                                                | 26.95                      | 26.87 | 28.01 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 3                                                | 27.67                      | 28.65 | 31.17 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 4                                                | 57.38                      | 55.28 | 49.21 | ตรวจไม่พบเชื้อ |
| 5                                                | 57.48                      | 58.01 | 53.15 | ตรวจไม่พบเชื้อ |

จากการพัฒนาวิธี direct real time-LAMP ครั้งนี้ จึงทำให้ได้วิธีที่ไม่จำเป็นต้องใช้ชุดสกัดหรือสารเคมีทำให้ช่วยลดต้นทุนในการสกัดสารพันธุกรรม อีกทั้งช่วยลดระยะเวลาและความยุ่งยากในการตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมโดยอาศัยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างซีรัมด้วยวิธีต้มไ้ระยะเวลารวม 15 นาที และขั้นตอนการตรวจวัดความขุ่นในปฏิกิริยา LAMP ใช้ระยะเวลาภายใน 15-90 นาที ทั้งนี้ความเร็วในการอ่านผลขึ้นอยู่กับปริมาณของไวรัส วิธีนี้จึงใช้เวลาการตรวจไม่เกิน 1 ชั่วโมง 45 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR ซึ่งจำเป็นต้องสกัดสารพันธุกรรมและตรวจวัดสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยวิธี gel electrophoresis จึงใช้ระยะเวลาในการตรวจนาน 3-4 ชั่วโมง (Dhama et al., 2014) ดังนั้นวิธี direct real time-LAMP ที่พัฒนาขึ้นนี้จึงมีขั้นตอนง่ายและให้ผลเร็วกว่าวิธี PCR อย่างไรก็ตามวิธี direct real time-LAMP และวิธี PCR ต่างสามารถให้ผลบวกต่อไวรัสจากธรรมชาติและไวรัสจากวัคซีนเชื้อเป็น ดังนั้นวิธีดังกล่าวจึงเหมาะกับฟาร์มที่ไม่มีประวัติการทำวัคซีน CAV เท่านั้นและควรชักประวัติการใช้วัคซีนก่อนนำวิธีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค



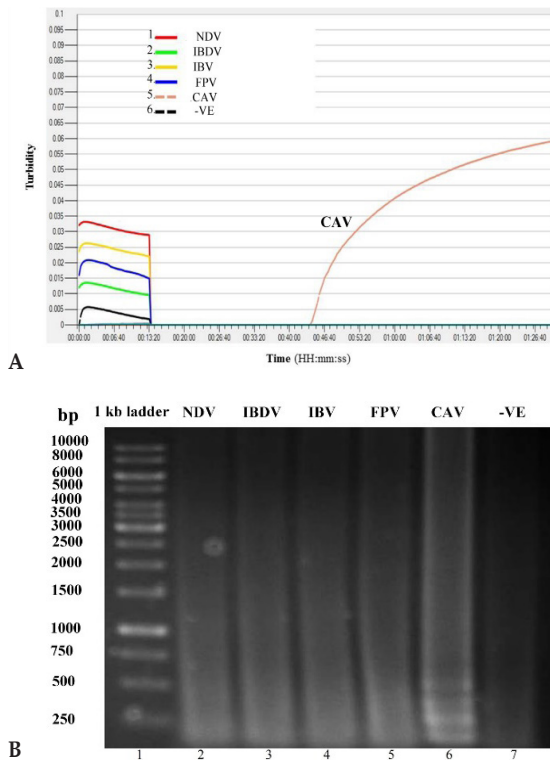
**รูปที่ 1** ผลการทดสอบหาความไวของวิธี direct real time-LAMP และวิธี PCR โดยรูป A และ B แสดงผลการทดสอบหาความไวของวิธี direct real time-LAMP ด้วยเครื่องตรวจวัดความขุ่น และตรวจสอบยืนยันผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis ตามลำดับ ส่วนรูป C แสดงผลการทดสอบหาความไวของวิธี PCR โดยเส้นที่ 1-8 (A) และเส้นที่ 2-9 (B และ C) แสดงถึง  $10^{6.2}$ ,  $10^{5.2}$ ,  $10^{4.2}$ ,  $10^{3.2}$ ,  $10^{2.2}$ ,  $10^{1.2}$ ,  $10^{0.2}$  CAV TCID<sub>50</sub>/mL และตัวอย่างซีรัมควบคุมลบ (-VE) ตามลำดับ ส่วนเส้นที่ 1 (B และ C) แสดงถึง 1kb และ 100 bp DNA ladder ตามลำดับ

## ความไวและความจำเพาะของวิธี direct real time-LAMP

ผลทดสอบความไวของวิธี direct real time-LAMP ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ พบว่าปริมาณเชื้อ CAV น้อยสุดที่สามารถตรวจพบอยู่ที่  $10^{3.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL (รูปที่ 1A และ 1B) กรณีถ้าไวรัสในซีรัมมีปริมาณน้อยกว่า limit of detection ดังกล่าวจะไม่สามารถตรวจพบได้อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับความไวของวิธี direct real time-LAMP กับวิธี PCR ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อ CAV น้อยสุดที่  $10^{4.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL โดยเกิดแถบ PCR product มีขนาด 660 bp (รูปที่ 1C) พบว่าวิธี direct real time-LAMP มีความไวสูงกว่าวิธี PCR 10 เท่า ส่วนผลทดสอบความจำเพาะของวิธี direct real time-LAMP พบว่า ให้ผลบวกต่อเชื้อ CAV เท่านั้น ส่วนผลการทดสอบด้วยไวรัสในสัตว์ปีกชนิดอื่น ๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ NDV, IBDV, IBV และ FPV ให้ผลลบทั้งหมด (รูปที่ 2A และ 2B) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ LAMP ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการศึกษานี้มีความจำเพาะต่อยีน *vp2* ของเชื้อ CAV สูงโดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ ทั้งเชื้อ NDV, IBDV, IBV และ FPV

## การทดสอบหาเชื้อ CAV จากตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี direct real time-LAMP และเปรียบเทียบความสอดคล้องของผลการทดสอบกับวิธี PCR

จากการนำวิธี direct real time-LAMP ไปทดสอบหาเชื้อ CAV ในตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกและลบด้วยวิธี PCR ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิงสำหรับการศึกษานี้ จำนวน 161 ตัวอย่าง พบวิธี direct real time-LAMP ให้ผลบวกจำนวน 31 ตัวอย่าง และผลลบจำนวน 130 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี PCR ให้ผลบวกจำนวน 23 ตัวอย่าง และผลลบจำนวน 138 ตัวอย่าง โดยพบวิธี direct real time-LAMP ให้ผลบวกสูงกว่าวิธี PCR จำนวน 8 ตัวอย่าง ซึ่งอาจเป็นผลจากความไวของวิธี direct real time-LAMP ที่สูงกว่าวิธี PCR จึงทำให้สามารถตรวจพบไวรัสในปริมาณต่ำได้ดีกว่าวิธี PCR และจากผลการทดสอบสามารถแสดงค่า diagnostic sensitivity และ diagnostic specificity ของวิธี direct real time-LAMP ได้เท่ากับ 100% และ 94.20% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังแสดงความสอดคล้องระหว่างผลทดสอบกับผลทดสอบของวิธี PCR อยู่ในระดับดีมาก โดยพิจารณาจากค่า *k* ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 0.823 ดังแสดงในตารางที่ 4 จึงแสดงให้เห็นว่าวิธี direct real time-LAMP มีความไวและความจำเพาะสูงรวมทั้งให้ผลทดสอบสอดคล้องกับวิธี PCR



**รูปที่ 2** ผลการทดสอบหาความจำเพาะของวิธี direct real time-LAMP ต่อเชื้อ CAV และไวรัสในสัตว์ปีกชนิดอื่น ๆ ด้วยเครื่องตรวจวัดความขุ่น (A) และตรวจสอบยืนยันผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธี gel electrophoresis (B) โดยเส้นที่ 1-6 (A) และเลนที่ 2-7 (B) แสดงถึงแสดงถึงสารพันธุกรรมของเชื้อ NDV, IBDV, IBV, FPV, CAV และตัวอย่างซีรัมควบคุมลบ (-VE) ตามลำดับส่วนเลนที่ 1 (B) แสดงถึง 1 kb DNA ladder

การศึกษานี้จึงเป็นการศึกษาหนึ่งที่พบว่าเชื้อ CAV สามารถตรวจพบได้ในซีรัมด้วยวิธี direct real time-LAMP นอกเหนือจากการศึกษาของ Tham and Stanislawek (1992) ที่ตรวจพบเชื้อ CAV ด้วยวิธี PCR จากซีรัมไก่ที่ให้ผลลบเมื่อตรวจด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา โดยการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบเชื้อ CAV คิดเป็น 19.25% (31/161) ในฟาร์มไก่ไข่ที่ไม่พบประวัติการทำวัคซีนแสดงถึงสัตว์มีการติดเชื้อโดยธรรมชาติและมีการแพร่กระจายเชื้อ CAV ภายในฝูงสัตว์ การตรวจพบเชื้อ CAV ในครั้งนี้จึงช่วยบ่งชี้สัตว์ที่เป็นพาหะทำให้สามารถคัดแยกสัตว์ติดเชื้อออกจากฝูงได้ นอกจากนี้หากมีการตรวจเชื้อ CAV ในซีรัมควบคู่กับการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ CAV จะสามารถบอกถึงการติดเชื้อไวรัสที่อยู่ในระยะ persistent viremia เพิ่มเติมได้ ในกรณีที่ตรวจพบทั้งเชื้อ CAV และภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ CAV พร้อมกันจากตัวอย่างซีรัม (Oluwayelu and Todd, 2008)

**ตารางที่ 4** แสดงผลการตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมด้วยวิธี direct real time-LAMP เปรียบเทียบกับผลทดสอบของวิธี PCR

| วิธี                    | PCR      |          | รวม |
|-------------------------|----------|----------|-----|
|                         | ผลบวก    | ผลลบ     |     |
| direct real time - LAMP | ผลบวก 23 | ผลลบ 8   | 31  |
|                         | ผลลบ 0   | ผลลบ 130 | 130 |
| รวม                     | 23       | 138      | 161 |

diagnostic sensitivity: 100% (23/23); 95%CI, 85.18%-100%  
diagnostic specificity: 94.20% (130/138); 95%CI, 88.90%-97.46%  
kappa value (k): 0.823 “very good agreement”  
poor (k<0.20), fair (k: 0.21-0.40), moderate (k:0.41-0.60), good (k: 0.61-0.80), very good (k: 0.81-1.00) (Landis and Koch,1977)

## สรุปและข้อเสนอแนะ

การพัฒนาเทคนิค direct real time-LAMP ในครั้งนี้ทำให้ได้วิธีตรวจหาเชื้อ CAV ในซีรัมไก่ที่ง่ายและไม่สิ้นเปลืองให้ผลเร็วไม่เกิน 1 ชั่วโมง 45 นาที มีความไวสูงกว่าวิธี PCR 10 เท่า และมีความจำเพาะต่อเชื้อ CAV สูง จึงเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งสำหรับตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อ CAV ในภาคสนามที่ฟาร์มหรือพื้นที่เกิดโรคช่วยให้รู้โรคเร็วทำให้การควบคุมโรคเป็นไปอย่างทัน่วงที อย่างไรก็ตามวิธี direct real time-LAMP ยังมีข้อจำกัดที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับฟาร์มที่ไม่มีประวัติการทำวัคซีน CAV ได้เท่านั้น สำหรับการศึกษาในอนาคตผู้วิจัยอาจนำเทคนิค direct real time-LAMP ไปประยุกต์ใช้พัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อก่อโรคในสัตว์ที่สำคัญชนิดอื่น ๆ ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณนิภาพร กอแก้ว และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออกทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยจนลุล่วงประสบความสำเร็จด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- นาคี แซ่เฮง นรินทร์ อุประกรินทร์ ปรีดา เลิศวัชรสารกุล วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์ อรรถธรณ บุตระดี ภัทรา มูลจิตร ธีระพล ศิริณฤมิตร และวรวิทย์ วัชวัลลค์. 2544. การสำรวจการติดเชื้อ subgroup J Avian leucosis virus ร่วมกับ chicken anemia virus ในฝูงไก่เนื้อและฝูงไก่พ่อแม่พันธุ์, ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. หน้า 420-426.
- Abdullahi, U.F., Naim, R., Wan Taib, W.R., Saleh, A., Muazu, A., Aliyu, S. and Baig, A.A. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), an innovation in gene amplification:

- bridging the gap in molecular diagnostics; a review. *Indian J. Sci. Technol.* 8(17): 1-12.
- Adair, B.M. 2000. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev. Comp. Immunol.* 24(2-3): 247-255.
- de Herdt, P., van de Bosch, G., Ducatelle, R., Uyttebroek, E. and Schrier, C. 2001. Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances. *Avian Dis.* 45(3): 706-708.
- Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A. and Prasad, T. 2014. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): A new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: A review. *Pak. J. Biol. Sci.* 17(2): 151-166.
- Frisk, A.L., Konig, M., Moritz, A. and Baumgartner, W. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37(11): 3634-3643.
- Huang, C.H., Lai, G.H., Lee, M.S., Lin, W., Lien, Y.Y., Hsueh, S.C., Kao, J.Y., Chang, W.T., Lu, T.C. and Lin, W.N. 2010. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anemia virus. *J. App. Microbiol.* 108: 917-924.
- Iwata, N., Fujino, M., Tuchiya, A. K., Iwata, A., Otaki, Y. and Ueda, S. 1998. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant chicken anaemia virus proteins expressed in a baculovirus vector system. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 175-180.
- Kaneko, S., Miller, R.H., di Bisceglie, A.M., Feinstone, S.M., Hoofnagle, J.H. and Purcell, R.H. 1990. Detection of Hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction. *Gastroenterology.* 99(3): 799-804.
- Landis, J.R. and Koch, G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33: 159-174.
- Li, Y., Wang, Y., Fang, L., Fu, J., Cui, S., Zhao, Y., Cui, Z., Chang, S. and Zhao, P. 2016. Genomic analysis of the chicken infectious anemia virus in a specific pathogen-free chicken population in China. *BioMed. Res. Inter.* 2016: 1-5.
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N. and Notomi, T. 2004. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Met.* 59(2): 145-157.
- Nie, K., Qi, S.X., Zhang, Y., Luo, L., Xie, Y., Yang, M.J., Zhang, Y., Li, J., Shen, H., Li, Q. and Ma, X.J. 2012. Evaluation of a direct reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method without RNA extraction for the detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 in nasopharyngeal swab specimens. *PLoS One.* 7: 1-5.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids Res.* 28(12): 1-7.
- Oluwayelu, D.O. and Todd, D. 2008. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *Afr. J. Biotechnol.* 7(3): 2008.
- Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of west Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 42(1): 257-263.
- Peter, M.A., Jackson, D.C., Crabb, B.S. and Browning, G.F. 2002. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277(42): 39566-39573.
- Rosario, K., Breitbart, M. and Harrach, B. 2017. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. *Archiv. Virol.* 162: 1447-1463.
- Tham, K.M. and Stanislawek, W.L. 1992. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera. *Avian Dis.* 36(4): 1000-1006.
- Urlings, H.A.P., de Boer, G. F., van Roozelaar, D. J. and Koch, G. 1993. Inactivation of chicken anaemia virus in chickens by heating and fermentation. *Vet. Quart.* 15(3): 85-88.
- Yuasa, N., Taniguchi, T. and Yoshida, I. 1979. Isolation and characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.* 23: 366-385.