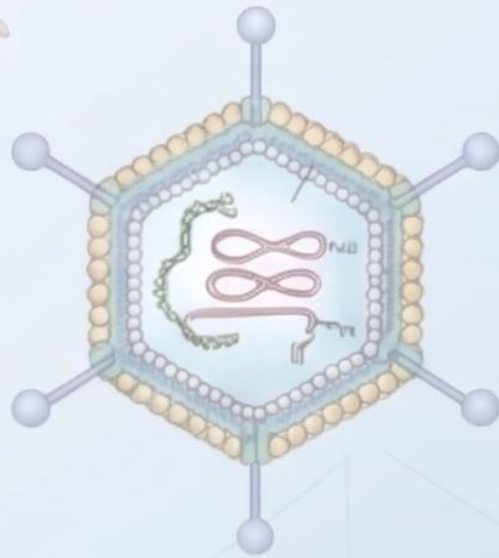


Genomic Characterization of Fowl Adenovirus Isolated from Chickens with Inclusion Body Hepatitis in Thailand using Whole Genome Sequencing



23 กรกฎาคม 2569

สพ.ญ.ดร. นันทพร วันดี
นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ
กลุ่มไวรัสวิทยา สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ

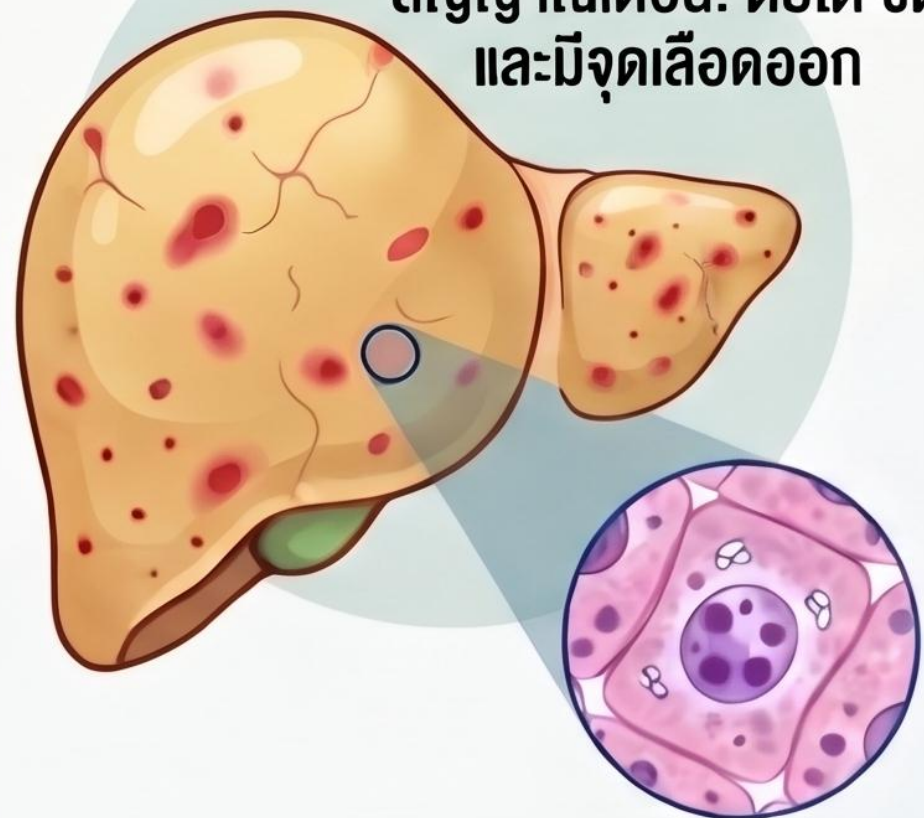
INTRODUCTION

ตับอักเสบในไก่ (IBH) จากเชื้อ FAdV-8b: วิกฤตใหม่ในฟาร์มไทยที่ต้องเฝ้าระวัง

รายงานการตรวจพบเชื้อ Fowl Aviadenovirus (FAdV) สายพันธุ์ 8b (Species E) เป็นครั้งแรกในการระบาดของโรคตับอักเสบ (IBH) ในฟาร์มไก่เนื้อ และไก่พ่อแม่พันธุ์ในหลายจังหวัดของไทย ซึ่งเชื้อมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถแพร่กระจายได้ทั้งทางตรงและจากแม่สู่ลูก

1. อาการและพยาธิสภาพ (Clinical Signs & Pathology)

สัญญาณเตือน: ตับโต ชีด และมีจุดเลือดออก



ร่องรอยพยาธิวิทยา
“Basophilic Inclusion Bodies”
ไก่ซึม หน่วง อ่อนเพลีย

2. ความรุนแรงและการจำแนก (Severity & Classification)

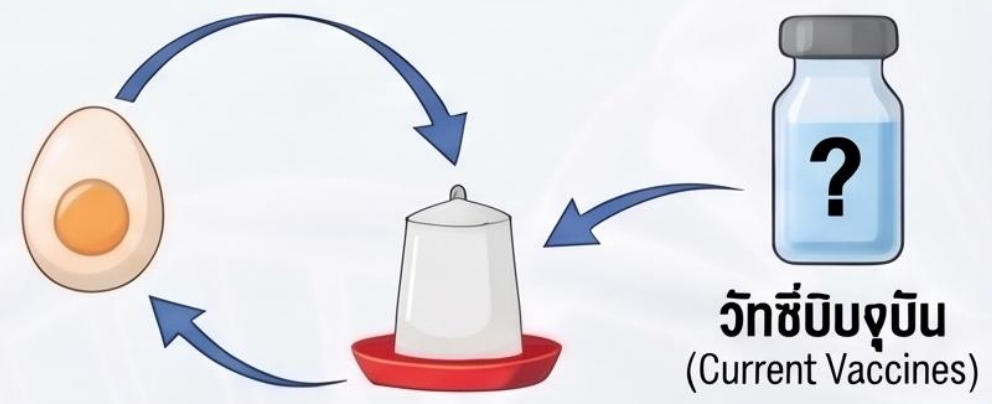


พบอัตราการตายในฝูงไก่ตั้งแต่ 2.5% ถึง 30% โดยเฉพาะในไก่ช่วงอายุ 3-28 วัน

การแบ่งกลุ่มทางพันธุกรรมของเชื้อ FAdV-8b ที่พบในไทย



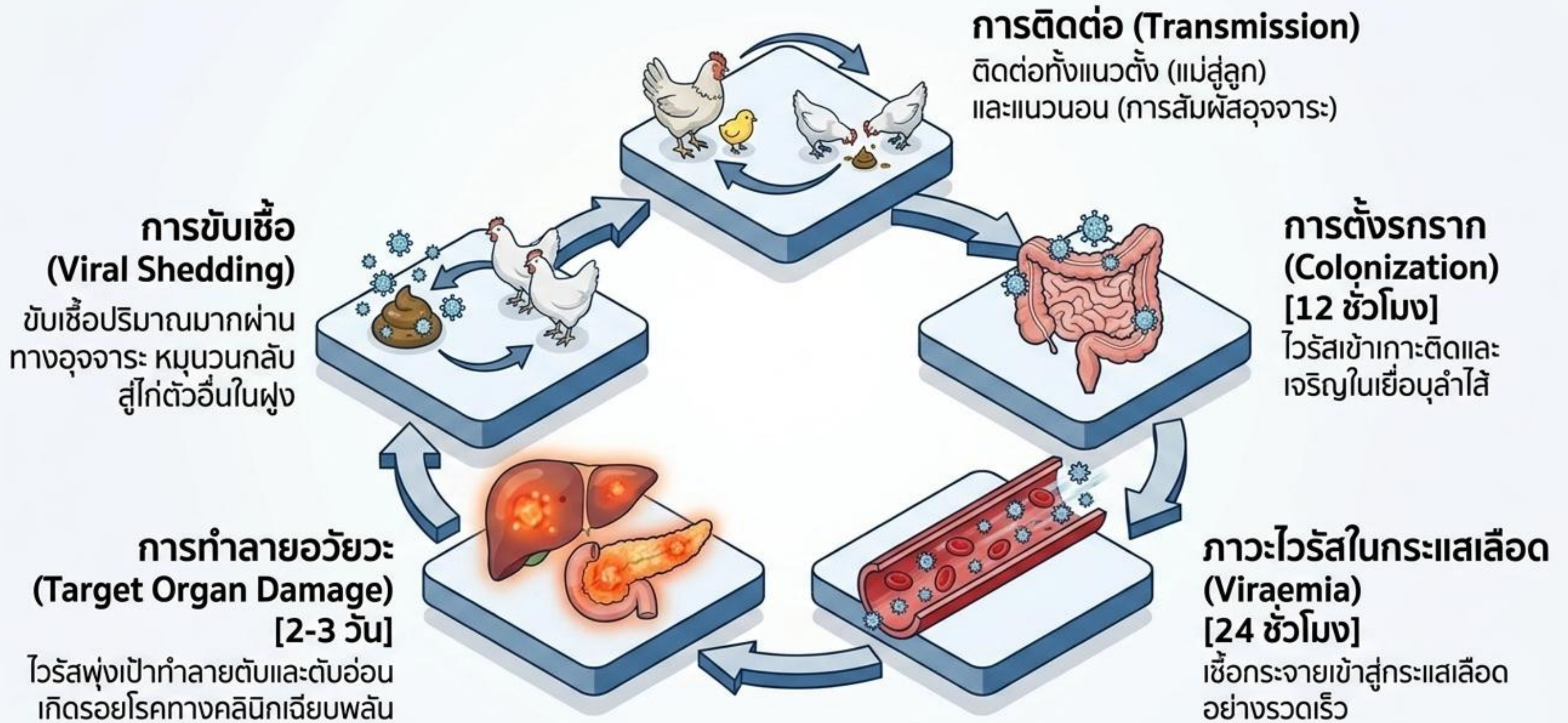
3. การแพร่ระบาดและการป้องกัน (Epidemiology & Prevention)



พบสายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับต่างประเทศ
ผลวิเคราะห์พันธุกรรมในไทยพบเชื้อที่มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ในตุรกีและอินเดีย 100%

การป้องกันด้วยวัคซีนตรงสายพันธุ์
ควรเร่งพัฒนาและใช้วัคซีนตรงสายพันธุ์ (ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์ 8b ในท้องถิ่น) เพื่อประสิทธิภาพสูงสุด

วงจรการแพร่ระบาดและการก่อโรค

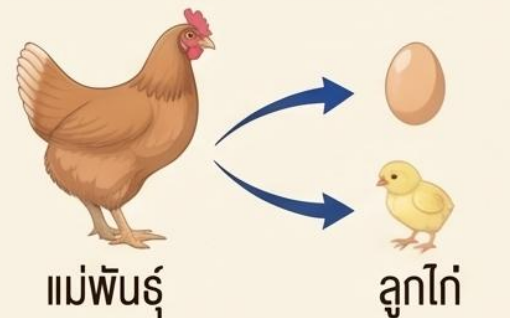


พยาธิกำเนิดของโรคตับอักเสบในไก่ (IBH) จากเชื้อ FAdV-8b

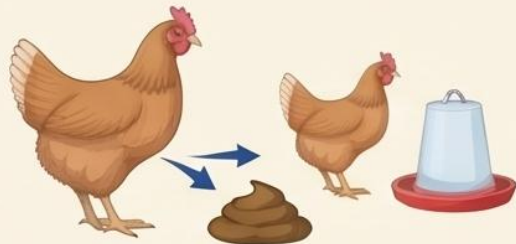
กลไกการติดเชื้อและการดำเนินโรคระดับเซลล์และอวัยวะ

1. การรับเชื้อ

1. การแพร่เชื้อจากแม่สู่ลูก (Vertical Transmission): เชื้อไวรัส FAdV-8b จากแม่ไก่ถ่ายทอดผ่านไข่ไปยังลูกไก่



2. การแพร่เชื้อในแนวนอน (Horizontal Transmission): การติดเชื้อผ่านการกินหรือสัมผัสสิ่งปนเปื้อนในฟาร์ม (Fecal-Oral route)



การแพร่กระจายในร่างกาย

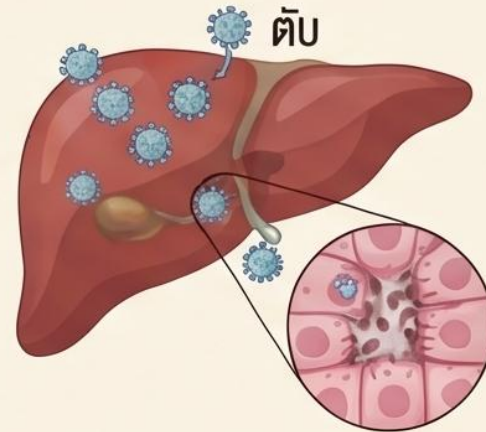
3. การแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด (Viremia):



3. การแพร่กระจายเข้าสู่กระแสเลือด (Viremia): เชื้อไวรัสเข้าสู่กระแสเลือดและเดินทางไปยังอวัยวะเป้าหมายหลัก

การติดเชื้อในอวัยวะเป้าหมาย

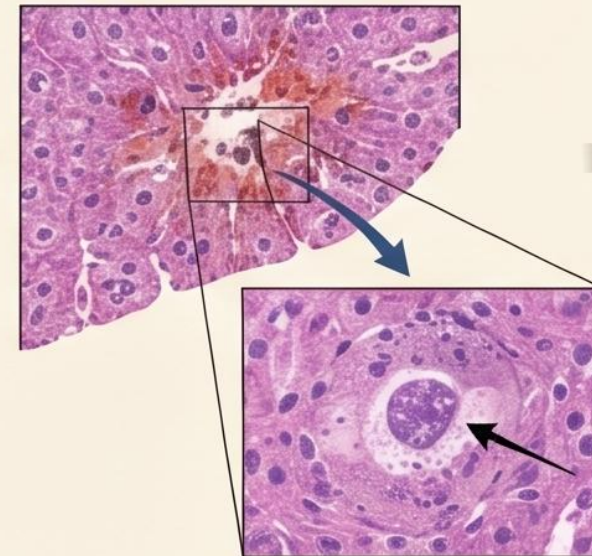
4. การเข้าทำลายเซลล์ตับ (Hepatotropism): ไวรัส FAdV-8b มีความจำเพาะต่อเซลล์ตับ (Hepatocytes) เข้าสู่เซลล์และเริ่มกระบวนการของตัวเองอย่างรวดเร็ว



4. การเข้าทำลายเซลล์ตับ (Hepatotropism): ไวรัส FAdV-8b มีความจำเพาะต่อเซลล์ตับ (Hepatocytes) เข้าสู่เซลล์และเริ่มกระบวนการของตัวเองอย่างรวดเร็ว

ความเสียหายของเซลล์และเนื้อเยื่อ (Tissue Necrosis)

5. การตายของเซลล์ตับ (Hepatocellular Necrosis): การจำลองตัวของไวรัสทำให้เซลล์ตับเสียหาย ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบกลุ่ม (Focal Necrosis) อย่างกว้างขวาง



6. การก่อตัวของ 'Basophilic Inclusion Bodies': รอยโรคจำเพาะทางจุลพยาธิวิทยา เกิดจากการรวมตัวของไวรัสในนิวเคลียสของเซลล์ตับ (Pathognomonic sign)

5. อาการทางคลินิก และความเสียหายรุนแรง

7. ตับวายและภาวะเลือดออก (Liver Failure & Hemorrhage): ตับเสียหายอย่างรุนแรง ส่งผลให้การทำงานของตับล้มเหลว เกิดภาวะเลือดออกง่าย (Hemorrhages) และดีซ่าน (Icterus)



ตับบวม ชีด เปราะ

อัตราการตายสูงถึง

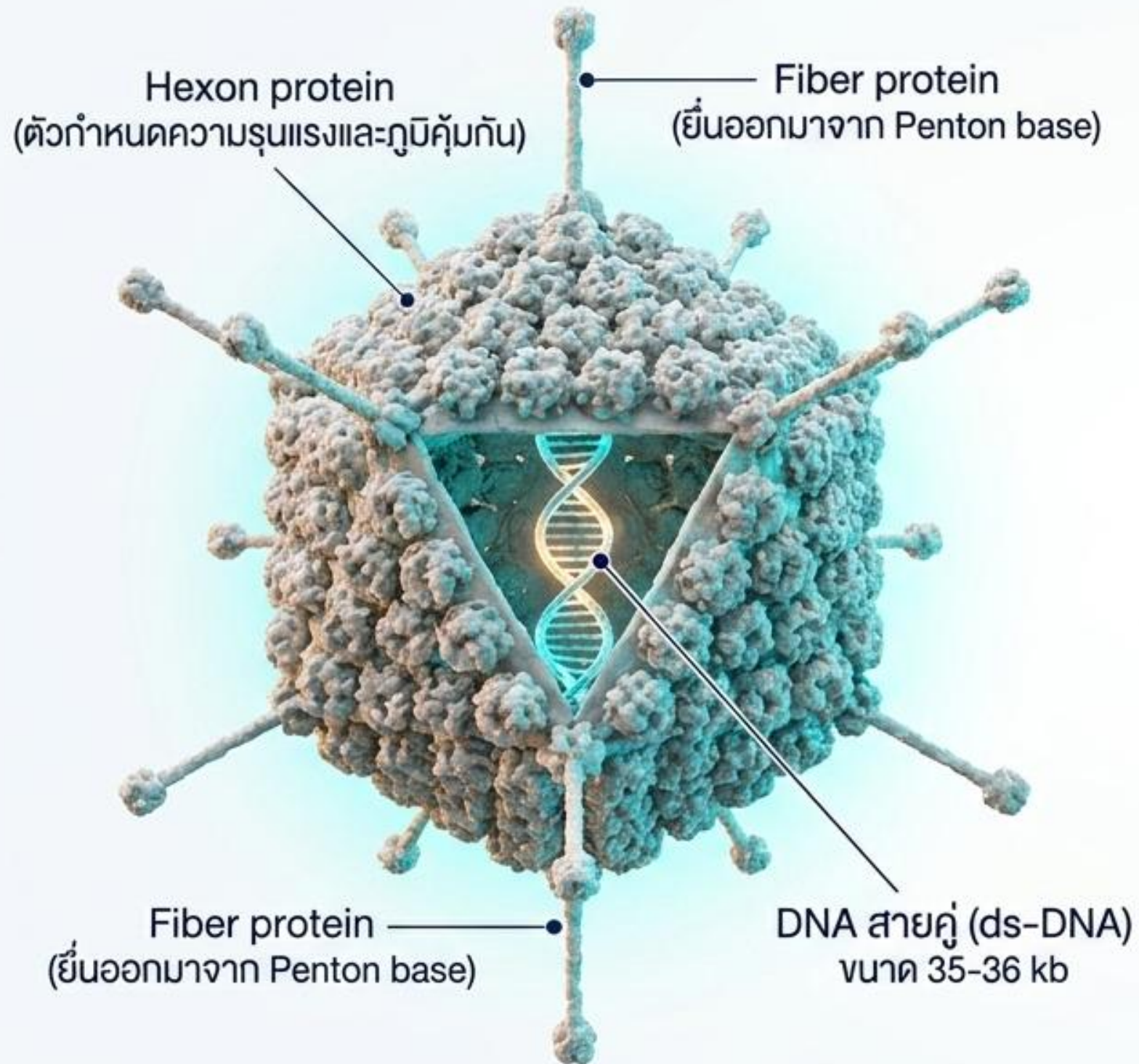


8. การตายเฉียบพลัน (Acute Mortality): ไก่ตายอย่างรวดเร็วภายใน 1-3 วัน อัตราการตายในฝูงสูงถึง 10-30%

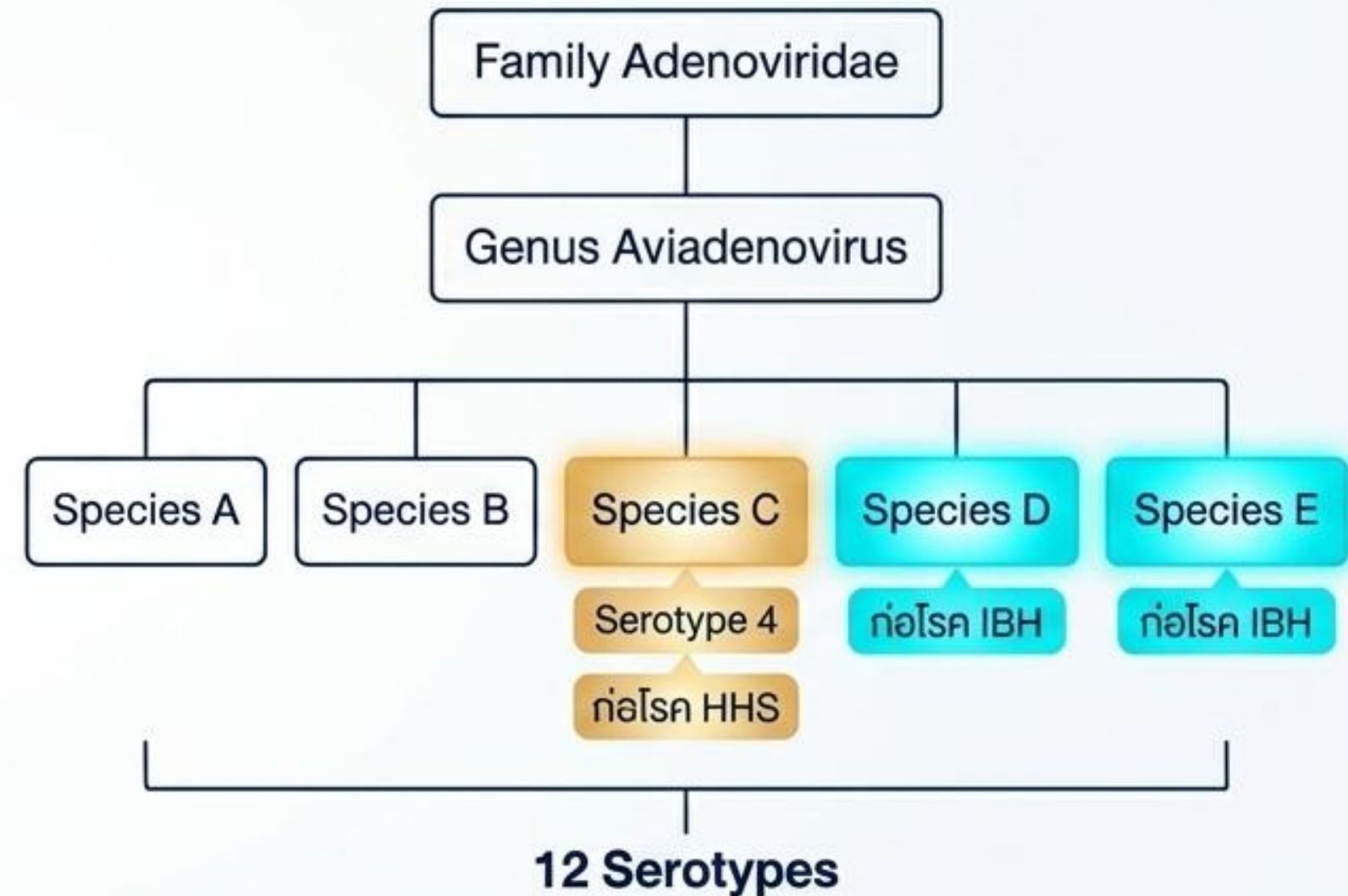
สรุปพยาธิกำเนิด (Pathogenesis Summary)

เชื้อ FAdV-8b เข้าสู่ร่างกาย -> เข้ากระแสเลือด -> เข้าทำลายเซลล์ตับอย่างจำเพาะ -> ก่อให้เกิด Inclusion Bodies -> ตับวาย -> อัตราการตายสูง

ทำความรู้จัก Fowl Adenovirus (FAdV)



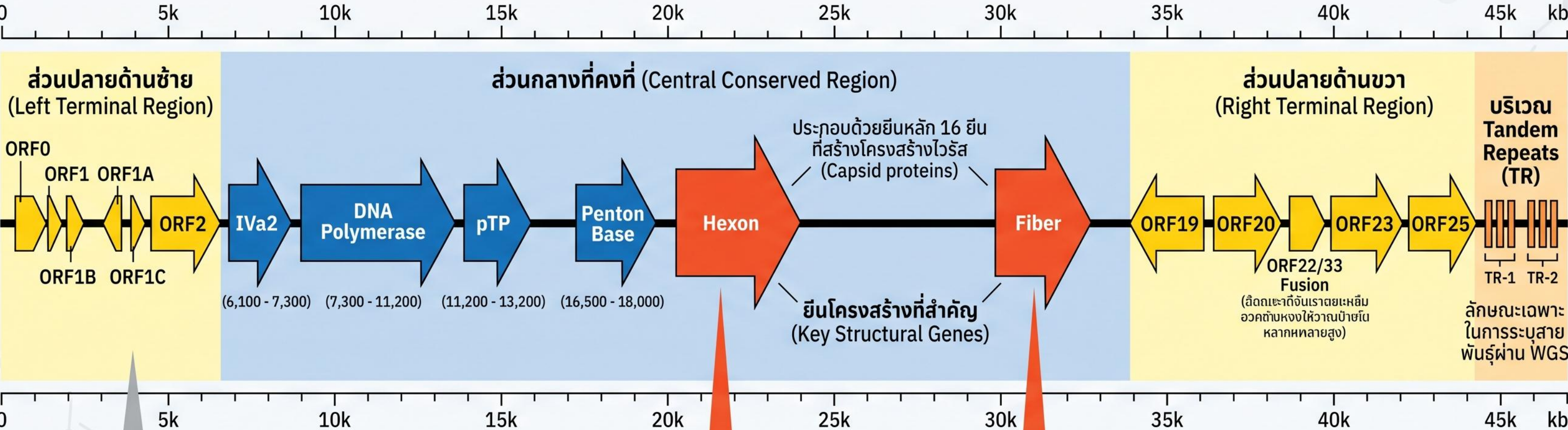
แผนผังทางอนุกรมวิธาน



แผนผังจีโนมและตำแหน่งยีนของเชื้อ Fowl Adenovirus (FAdV) สปีชีส์ E ซีโรไทป์ 8b

โครงสร้างยีนและตำแหน่งบนสายรหัสพันธุกรรม (Nucleotide) จากการหาลำดับเบสทั้งจีโนม

เชื้อ FAdV-8b เป็นสาเหตุของโรค IBH ในสัตว์ปีก จีโนมมีความยาวประมาณ 44,059 - 46,059 คู่เบส และมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ประกอบด้วยส่วนกลางที่คงที่และส่วนปลายที่มีความหลากหลายสูง



ยีนเฉพาะ (Genus-specific genes) มีความแปรผันสูงระหว่างสายพันธุ์

ยีน Hexon
(ตำแหน่งประมาณ 20,000 - 23,000 bp)
ยีนหลักใช้จำแนกซีโรไทป์ โดยเฉพาะบริเวณ L1 Loop

ยีน Fiber
(ตำแหน่งประมาณ 30,000 - 32,000 bp)
มีเพียงอันเดียว (Single fiber) ความยาว 521 amino acids ใช้ยึดเกาะเซลล์โฮสต์

ข้อมูลพื้นฐานของจีโนม

ขนาดจีโนม: ประมาณ 44,059 - 46,059 bp (จาก isolate UPM04217)

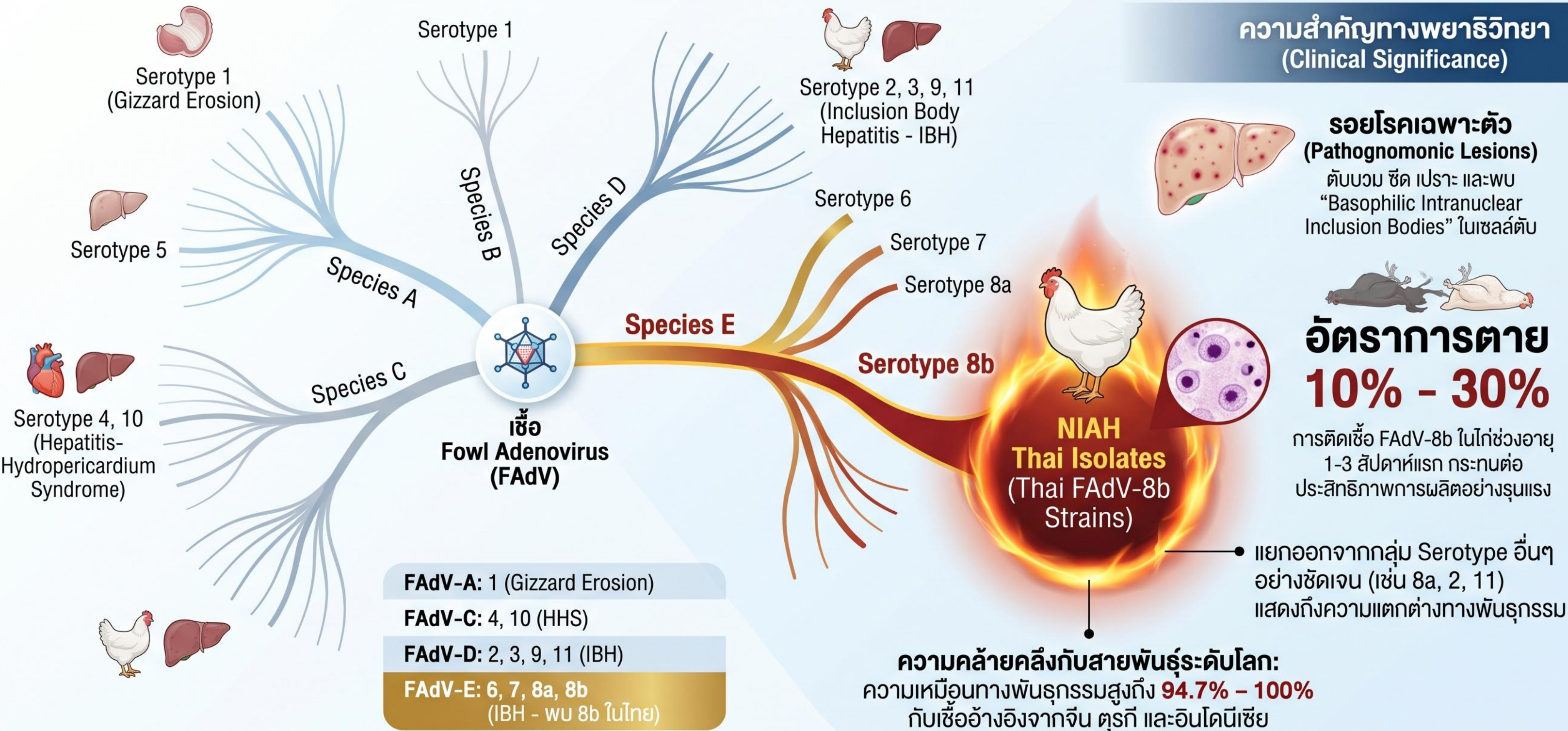
G+C Content: 57.9% - 58%

จำนวนยีนที่คาดการณ์ (ORFs): ประมาณ 39 ยีน

เฉพาะ Species E Serotype 8b

การจำแนกสายพันธุ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส IBH ในประเทศไทย

(Phylogenetic Tree of IBH in Thailand)

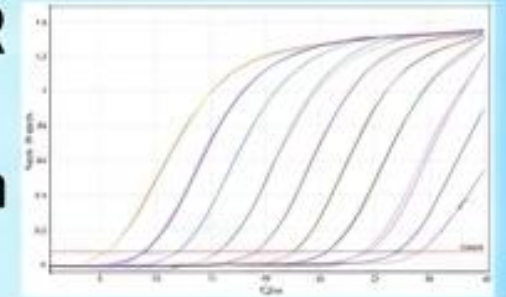


ขีดความสามารถในการวินิจฉัยโรคทางอณูชีววิทยา

เทคโนโลยีปัจจุบันตรวจพบได้รวดเร็ว
แต่ยังขาดข้อมูลลักษณะระดับ **“รหัสพันธุกรรมทั้งจีโนม”**
ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในการป้องกันโรค

SYBR Green Real-Time PCR

ตรวจจับยีน 52K
มีความไวสูงกว่าวิธีดั้งเดิมถึง 10^4 เท่า
ระบุปริมาณไวรัสได้แม่นยำ



Conventional PCR

ตรวจจับยีน Hexon (L1 region)
มีความแม่นยำระดับพื้นฐาน



Virus Isolation (การเพาะแยกเชื้อ)

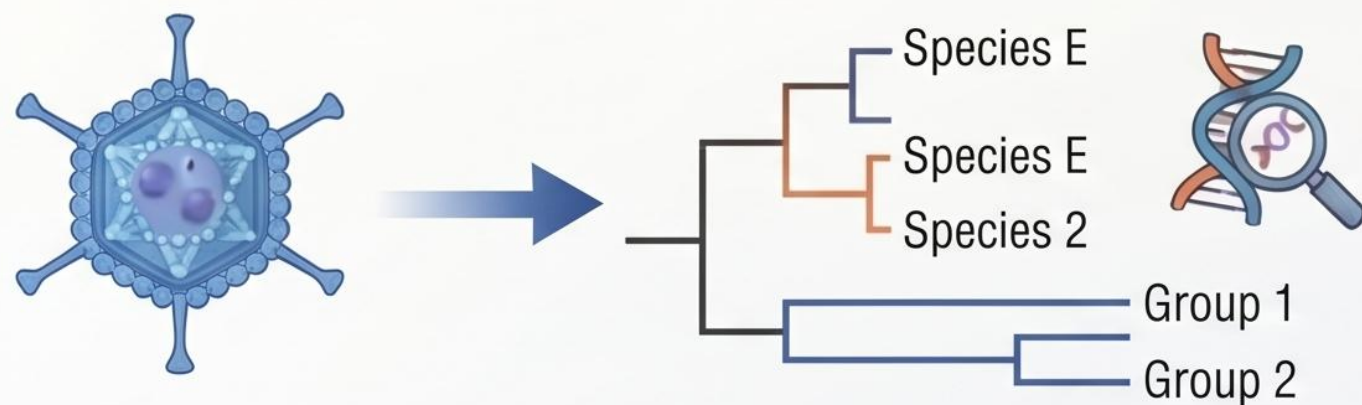
อาศัยเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture) ใช้เวลานาน
ขั้นตอนซับซ้อน แต่จำเป็นต่อการทำวัคซีน

OBJECTIVES

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research Objectives)

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ FAdV-8b ในประเทศไทย

1. การจำแนกและจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Genetic Classification & Grouping)



- เพื่อจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ FAdV-8b ที่แยกได้ในประเทศไทย
- เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเชื้อในพื้นที่ต่างๆ

2. การเปรียบเทียบกับระดับสากล (Global Homology Comparison)



- เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลสากล (GenBank)
- เพื่อประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมกับสายพันธุ์อ้างอิงต่างประเทศ

ผลลัพธ์ที่คาดหวัง (Expected Outcomes)

ข้อมูลที่ได้จะนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่ตรงกับสายพันธุ์ท้องถิ่นเพื่อประสิทธิภาพสูงสุด

3 เป้าหมายหลักของการศึกษา



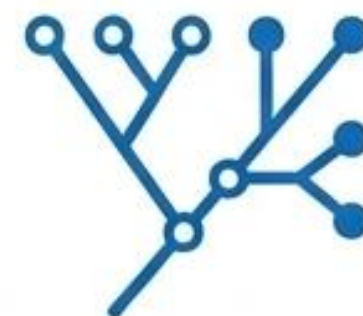
เพาะแยกเชื้อ (ISOLATE)

เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากตัวอย่างในภาค
สนาม โดยใช้เซลล์ตับตัวอ่อนไก่
(Primary chicken embryo liver cells)
ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานสากล



ถอดรหัสพันธุกรรม (SEQUENCE)

ดำเนินการหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม
(Whole Genome Sequencing)
และยีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค
เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างเชิงลึก



วิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (ANALYZE)

สร้างฐานข้อมูลที่ทันสมัย และสร้าง
Phylogenetic tree เพื่อเปรียบเทียบ
ความเชื่อมโยงกับสายพันธุ์ต่าง
ประเทศเพื่อค้นหาต้นกำเนิด



METHODS & MATERIALS

วัสดุและวิธีการ : กรณีศึกษาการระบาดของโรคในไก่กระทาง จังหวัดลพบุรี (2022)



เหตุการณ์การระบาด (The Event)



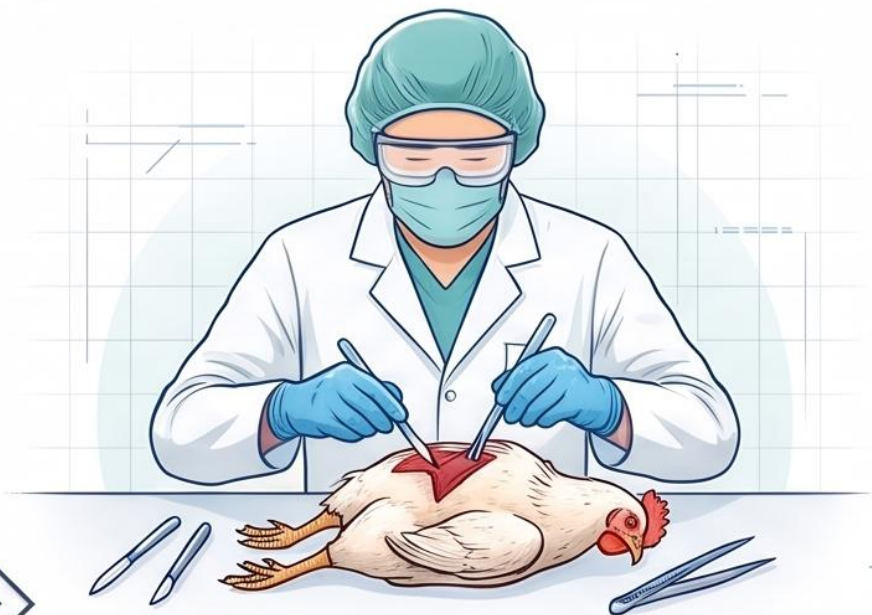
ตุลาคม 2022: การระบาดในฟาร์มไก่กระทาง เกิดเหตุการณ์ไม่ปกติในฝูงไก่เนื้อ ณ อำเภอพัฒนานิคม จังหวัดลพบุรี



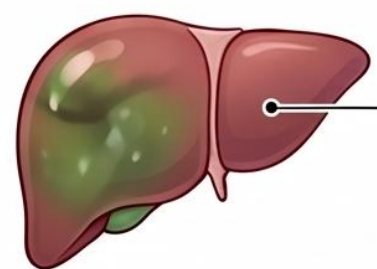
ผลกระทบ: อัตราการตาย 15%
พบการตายเฉียบพลันในสัดส่วนที่สูงร่วมกับปัญหาไก่แคระแกร็นหรือเติบโตช้า (Stunted Growth)



การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับ



✓ **จากการชันสูตรซาก (Necropsy)**
พบภาวะตับอักเสบและมีจุดเลือดออก (Hepatic Hemorrhage)



ตับมีสีเปลี่ยนเป็นสีเขียว
พบลักษณะตับเปลี่ยนสี (Green Discoloration) ซึ่งเป็นรอยโรคสำคัญที่นำไปสู่การวินิจฉัยโรคตับอักเสบ

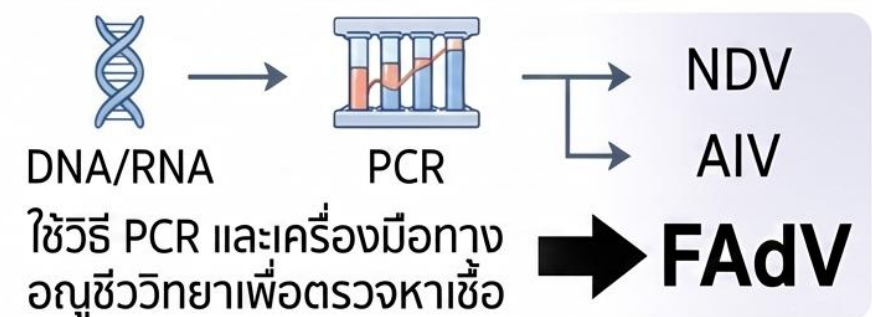


การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (The Lab Analysis)



การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ
เลือกใช้เนื้อเยื่อตับ (Liver Tissues) เป็นตัวอย่างหลักในการตรวจหาเชื้อเนื่องจากเป็นอวัยวะเป้าหมาย

✓ **การตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสเป้าหมาย**



การตรวจวินิจฉัย Fowl Adenovirus (FAdV) ด้วยวิธี PCR

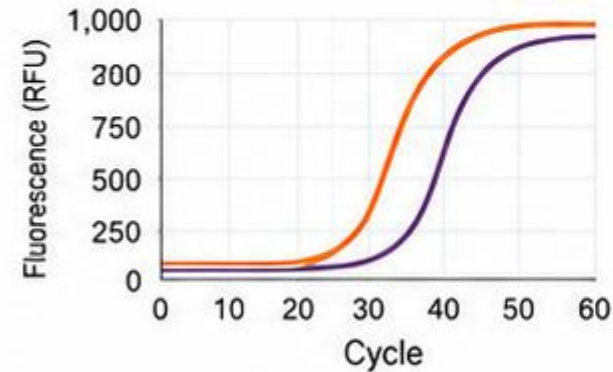
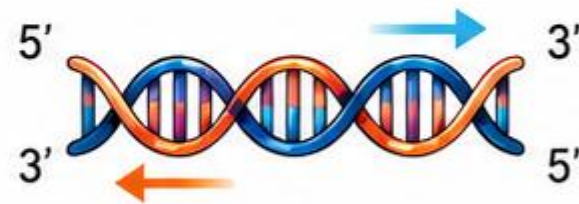
การตรวจวินิจฉัยเชื้อ FAdV ในปัจจุบันอาศัยเทคนิค PCR เป็นหลัก โดยมุ่งเน้นไปที่การตรวจยีน (Conserved genes) เช่น ยีน **Hexon** และยีน **52K** เพื่อความแม่นยำในการระบุเชื้อ

การตรวจด้วยวิธี
Conventional PCR
(อ้างอิง Mase et al., 2009)

การตรวจด้วยวิธี
Real-time PCR / qPCR
(อ้างอิง Niu et al., 2017)

การตรวจเป้าหมายยีน **Hexon**

ใช้ไพรเมอร์จำเพาะเจาะจงกับยีน Hexon เพื่อการตรวจหาเชื้อ FAdV ที่ก่อโรค IBH



การตรวจเป้าหมายยีน **52K**

ใช้เทคนิค qPCR ที่มีความไวสูงในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอต่อยีน 52K

รายละเอียดไพรเมอร์

ไพรเมอร์สำหรับยีน Hexon

IBH_Hex_F:
GAVRGYHGGRTHTBTGGAVATGGG
IBH_Hex_R:
TACTTATCHACRCCYTGRITCCA

ชุด Probe แบบ In-house

ใช้ไพรเมอร์ และโพรบที่ออกแบบและสังเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการ สำหรับการตรวจ **FAM/BHQ1**

เทคนิค In-house

รายละเอียดไพรเมอร์และโพรบ

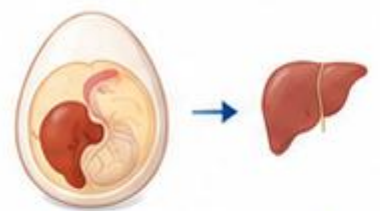
ไพรเมอร์และโพรบสำหรับยีน 52K

FAdV_52K_F:
ATCOCKCAGATGGCYAAGG
FAdV_52K_P:
ACGGC6TC60TCAAAACCGA
FAdV_52K_Pr (Probe):
FAM-S-ACCCGGTBATBBAAGGCCTBT TAB BHQ1

ระเบียบวิธีวิจัย: การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Virus Isolation Workflow)

Phase 1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (Preparation of CEL cells)

1 เก็บตัวอย่างตับไก่ SPF อายุ 13-15 วัน



- เก็บด้วย forceps ปลอดเชื้อ
- ล้างด้วย PBS (pH 7.4) 2 ครั้ง

2 ล้างตับให้เป็นชิ้นเล็ก และย่อยด้วยเอนไซม์



- ย่อยด้วย 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, USA) 10 นาที

3 กรองและปั่นแยกเซลล์



- กรองด้วย 70 μ m cell strainer (Gibco, USA)
- ปั่น 1,500 $\times$ rpm 10 นาที

4 ล้างและแขวนตะกอนเซลล์



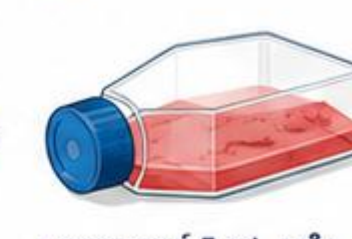
- ทิ้งน้ำยาที่มี trypsin
- แขวนตะกอนเซลล์ใน DMEM + 10% FBS + 1% Pen-Strep

5 นับจำนวนและปรับความเข้มข้นเซลล์



- ปรับความเข้มข้นเป็น 1×10^6 cells/mL

6 เพาะเลี้ยงเซลล์



- หยอดเซลล์ 5 mL ลงในขวดเพาะเลี้ยง 25 cm^2
- บ่มที่ 5% CO_2 จนได้เซลล์แบบ monolayer

Phase 2 การแยกเชื้อไวรัส (Virus Isolation)

1 เตรียมตัวอย่างตัดที่ PCR เป็นบวก



- ทำ homogenate 10% (w/v) ใน PBS + antibiotic mixture

2 ปั่นและกรอง



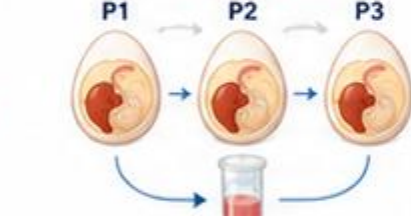
- ปั่น 10,000 $\times$ rpm 10 นาที
- กรองด้วย 0.22 μ m membrane filter (Millipore, USA)

3 เดิมเชื้อในไข่ไก่ SPF (ทางช่อง chorioallantoic)



- เพื่อเพิ่มปริมาณและความแรงของไวรัส

4 ทำ serial passage ในไข่ SPF (3 passages)



- เก็บ Chorioallantoic fluid (CAF) และ liver suspension

5 นำ liver suspension ติดเชื้อในเซลล์ CEL



- ใช้เซลล์ CEL ที่เตรียมจากไข่ไก่ SPF อายุ 14 วัน

6 ฝ้าสังเกต Cytopathic effect (CPE)



- สังเกต CPE ทุกวันเป็นเวลา 3-5 วัน

Phase 3 การยืนยันผลและการวิเคราะห์ (Confirmation & Analysis)

1 การสกัดและคัดกรอง (Extraction)



- สกัด DNA จากตัวอย่างต้น
- ตรวจหาเชื้อด้วย PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะกับโรค IBH

2 การถอดรหัสและการวิเคราะห์ (Nanopore Sequencing)

- ทำ Whole Genome Sequencing (WGS) เพื่ออ่านลำดับพันธุกรรมทั้งหมดของไวรัสอย่างละเอียด



- ดึงข้อมูลเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล (GenBank) และสร้าง Phylogenetic tree เพื่อดูสายวิวัฒนาการทางระบาดวิทยา

อุปกรณ์และสารสำคัญ

- 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, USA)
- PBS (pH 7.4)
- DMEM + 10% FBS + 1% Pen-Strep
- Antibiotic mixture
- 70 μ m cell strainer (Gibco, USA)
- 0.22 μ m membrane filter (Millipore, USA)

หลักการ

การแยกเชื้อไวรัสทำได้โดยเพิ่มปริมาณและความแรงของไวรัสในไข่ไก่ SPF ก่อนนำมาติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง (Chick Embryo Liver: CEL cells) เพื่อสังเกตการเกิด Cytopathic effect (CPE) ซึ่งเป็นหลักฐานของการเพิ่มจำนวนของไวรัส จากนั้นยืนยันและวิเคราะห์ด้วยวิธี PCR และการถอดรหัสพันธุกรรมทั้งจีโนม (WGS)

การนำไปใช้

- ✓ เพื่อแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างสัตว์ปีก
- ✓ เพื่อศึกษาคุณสมบัติและพัฒนาการของไวรัส
- ✓ เพื่อใช้ในการผลิตไวรัสสำหรับการวิจัยและวัคซีน

เอกสารอ้างอิง

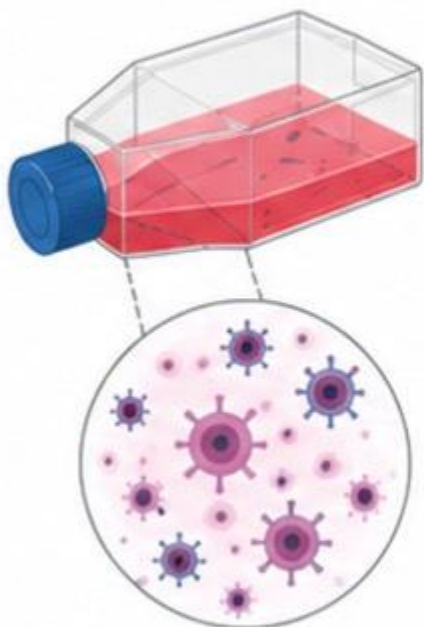
- Sohaimi and Clifford, 2023

WHOLE GENOME SEQUENCING WORKFLOW

SISPA + Native Barcoding Kit on Oxford Nanopore MinION Mk1C (R10.4.1 Flow Cell)

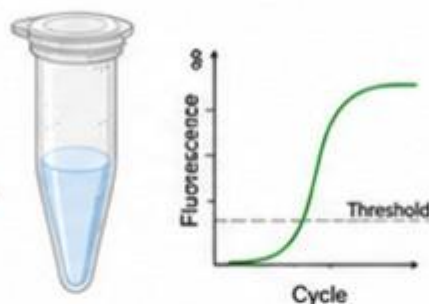
1 CELL CULTURE SAMPLE

Virus isolated in Leghorn male hepatocellular



2 DNA EXTRACTION & qPCR

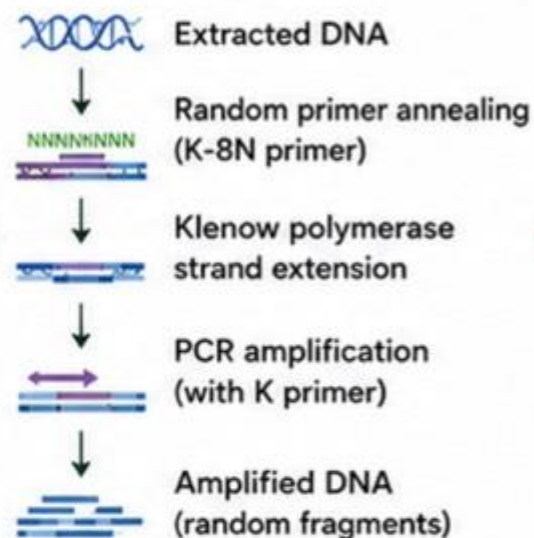
Extract viral DNA and quantify by qPCR



qPCR result
Ct value
28 – 30
Low viral load

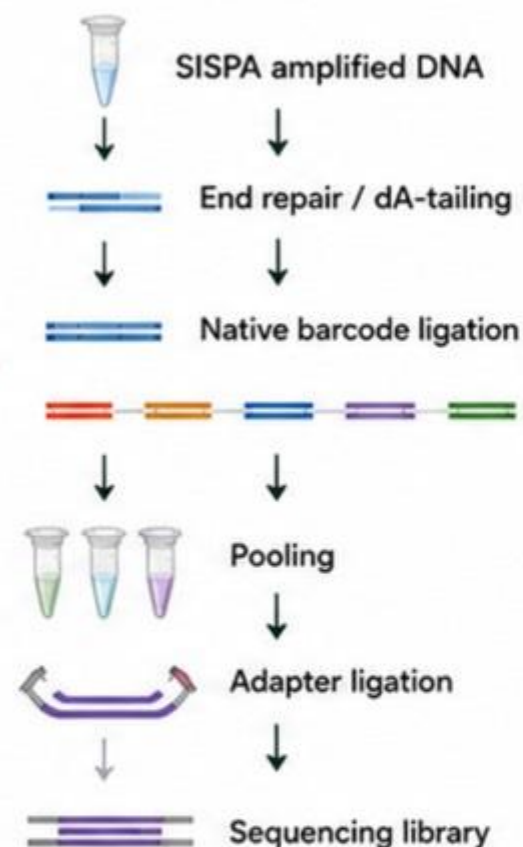
3 SISPA AMPLIFICATION (from DNA)

Sequence-Independent Single-Primer Amplification starting from DNA



Host: Chicken
(Host DNA will be removed during bioinformatics analysis)

4 LIBRARY PREPARATION (NATIVE BARCODE KIT)



5 OXFORD NANOPORE SEQUENCING

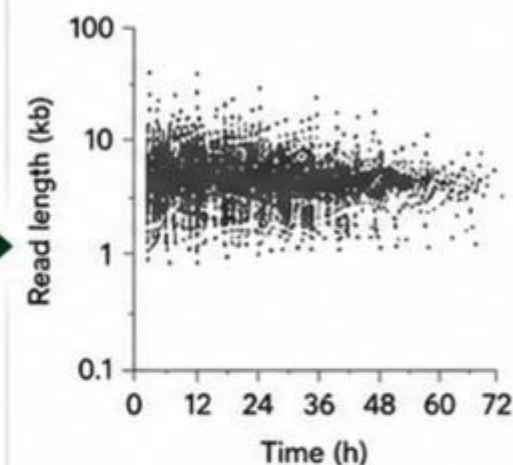
Load library onto R10.4.1 Flow Cell



MiniON Mk1C
Real-time sequencing & basecalling

6 RAW DATA OUTPUT

Multiplexed long reads (FASTQ)



FASTQ
@read0001
ACGTCTGATC...
+
!"#\$%&'()*...

7 BIOINFORMATICS WORKFLOW

Quality control & trimming



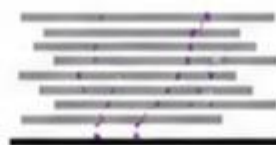
Chopper

Host removal (Chicken)



Minimap2

Reference mapping (viral genome)



Minimap2

Variant calling & polishing



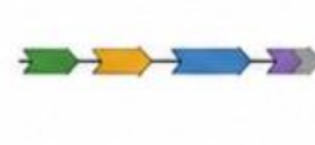
Samtools / BCFtools

Consensus sequence

ATGCTAGCTA

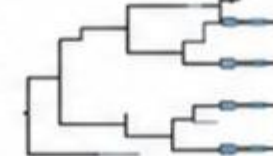
Samtools / BCFtools

Genome annotation



Prokka / VAPiD

Phylogenetic analysis



IQ-TREE

FINAL OUTPUT



High-quality viral genome

ATGCTAGCTAGCTA...

- ✓ Complete / near-complete genome
- ✓ Genome annotation
- ✓ Phylogenetic placement



WORKFLOW SUMMARY:

Cell culture isolate (Ct 28–30) → DNA extraction & qPCR → SISPA (from DNA) → Native barcode library → MiniON Mk1C (R10.4.1) → Bioinformatics analysis → High-quality viral genome

RESULTS

ผลการวิจัย (Results) : การแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างสู่เซลล์เพาะเลี้ยง (Virus Isolation Workflow)

Phase 1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง (Preparation of CEL cells)



การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง
จากตับลูกไก่ปลอดเชื้อ SPF อายุ 13-15 วัน



ตับของลูกไก่ปลอดเชื้อ SPF ที่ติดเชื้อไวรัสในสภาวะทดลองแสดงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ได้แก่ สีเลือดออก (ซ้าย) และสีเขียว (ขวา)

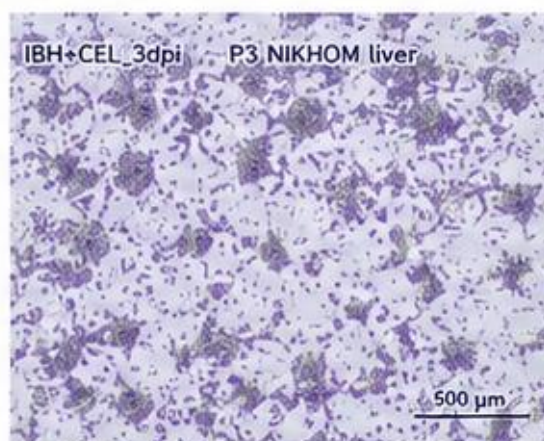
ผลลัพธ์สำคัญ

- ✓ ได้เซลล์ Chick Embryo Liver (CEL cells) ที่มีคุณภาพเหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อไวรัส

Phase 2 การแยกเชื้อไวรัส (Virus Isolation)



การเพาะเลี้ยงเชื้อในไข่ SPF และเพาะเลี้ยงในเซลล์ CEL



หลังเพาะเลี้ยงในเซลล์ CEL เป็นเวลา 3 วัน พบลักษณะ cytopathic effect (CPE) ได้แก่ การสลายของเซลล์ การกลมตัวของเซลล์ การเพิ่มการหักเหแสง และการหลุดลอกออกจากชั้นเซลล์

ผลลัพธ์สำคัญ

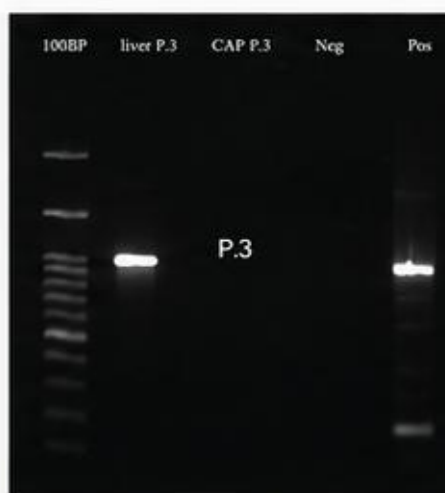
- ✓ สามารถแยกเชื้อไวรัสและเพิ่มปริมาณในเซลล์ CEL ได้สำเร็จ โดยพบ CPE ชัดเจนภายใน 3-5 วัน

Phase 3 การยืนยันผลและการวิเคราะห์ (Confirmation & Analysis)



การสกัดและตัดกรอง,
การถอดรหัสและการวิเคราะห์

1 การสกัดและตัดกรอง (Extraction)



ผลการตรวจด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 1 ที่จำเพาะต่อยีน hexon ได้ขึ้น ส่วนขนาดประมาณ 900 bp ตัวอย่าง P3 (from Nikhom liver) ให้ผลบวก

ผลลัพธ์สำคัญ

- ✓ ยืนยันการมีเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR ให้ผลบวก
- ✓ ได้ลำดับพันธุกรรมของไวรัสอย่างละเอียด สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล

2 การถอดรหัสและการวิเคราะห์ (Nanopore Sequencing)



ทำการหาลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนม (Whole Genome Sequencing; WGS) ด้วยเทคโนโลยี Nanopore Sequencing และวิเคราะห์ข้อมูลโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล (GenBank) และสร้าง Phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ



สรุปผลการวิจัย

สามารถแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างตับลูกไก่ปลอดเชื้อ SPF ได้สำเร็จ โดยพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในตับ ตรวจสอบยืนยันด้วย PCR ให้ผลบวก และถอดรหัสลำดับพันธุกรรมทั้งจีโนมด้วย Nanopore Sequencing เพื่อความแม่นยำในการจำแนกและวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัส



ตัวอย่างตับลูกไก่ SPF



เตรียมเซลล์ CEL



เพาะในไข่ SPF



เพาะในเซลล์ CEL พบ CPE



ตรวจด้วย PCR ให้ผลบวก



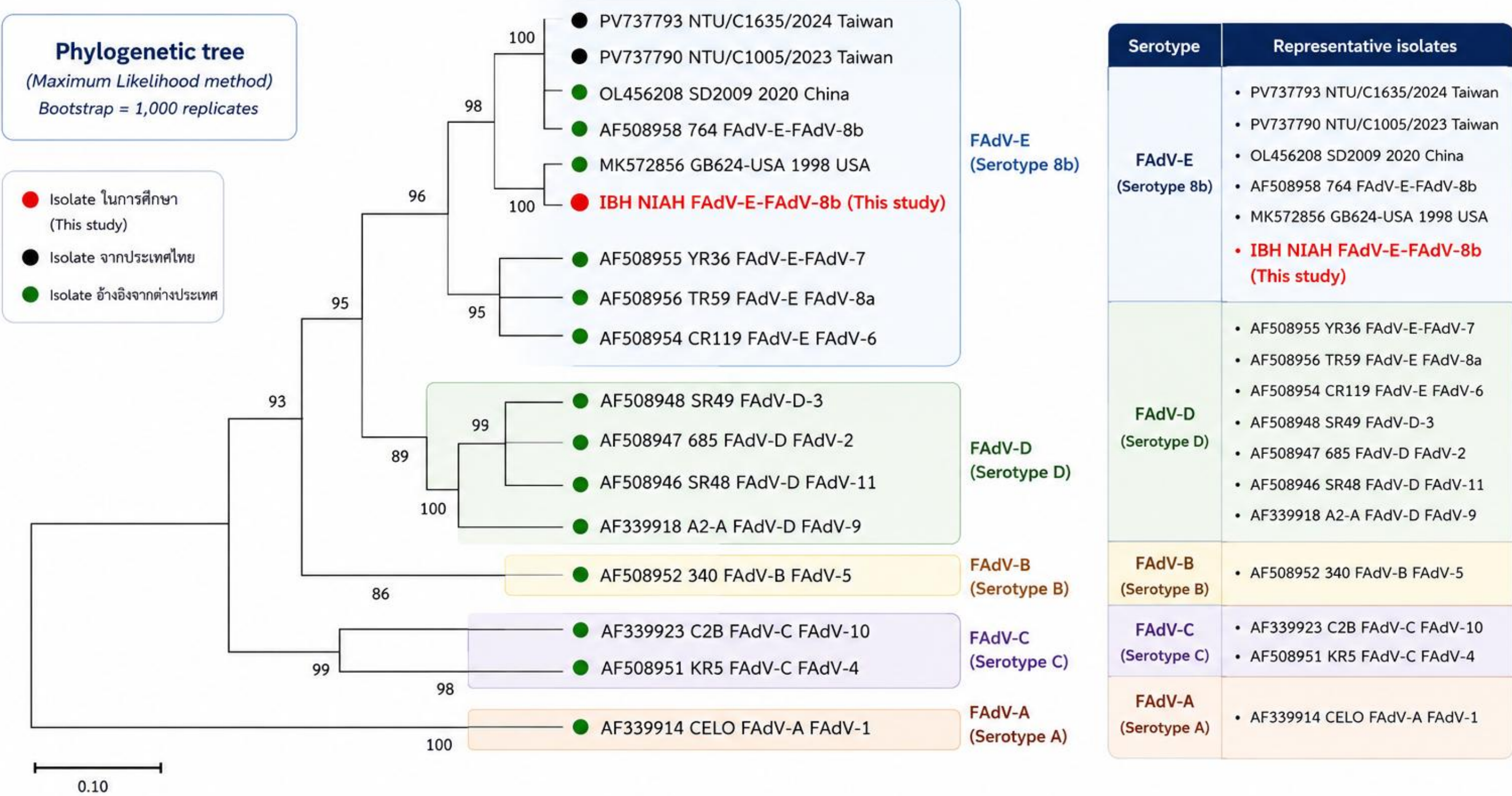
ถอดรหัสพันธุกรรม Nanopore Sequencing



วิเคราะห์ข้อมูล (Phylogenetic tree)

ผลการศึกษา : การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ Fowl Adenovirus

(Phylogenetic analysis based on hexon gene)



ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่า isolate “**IBH NIAH FAdV-E-FAdV-8b**” (จุดสีแดง) อยู่ในกลุ่มเดียวกับ FAdV-E serotype 8b โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ isolates จากประเทศไทยและจีนในกลุ่มเดียวกัน (bootstrap support $\geq 95\%$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ Fowl Adenovirus
(Multiple Sequence Alignment ของยีน Hexon)

แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์สำคัญที่ใช้จำแนกซีโรไทป์ (คาดการณ์ยีนสำคัญสำหรับการจำแนก)

Isolate / Strain	Serotype	Origin / Year	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide position)										Identity (%) *
			250	402	582	651	879	1050	1215	1437	1683	1890	
● PV737793 NTU/C1635/2024 Taiwan	8b	Taiwan / 2024	A	T	G	C	T	A	G	C	T	G	100
● PV737790 NTU/C1005/2023 Taiwan	8b	Taiwan / 2023	A	T	G	C	T	A	G	C	T	G	99.8
● OL456208 SD2009 2020 China	8b	China / 2020	A	T	G	C	T	A	G	C	T	G	99.6
● AF508958 764 FAdV-E-FAdV-8b	8b	China / 2019	A	T	G	C	T	A	G	C	T	G	99.4
● MK572856 GB624-USA 1998 USA	8b	USA / 1998	A	T	G	C	T	A	G	C	T	G	98.9
● IBH NIAH FAdV-E-FAdV-8b (This study)	8b	Thailand / 2022	A	T	G	C	T	A	G	C	T	G	99.6
● AF508955 YR36 FAdV-E-FAdV-7	7	China / 2016	G	C	A	T	C	G	A	T	C	A	95.1
● AF508956 TR59 FAdV-E FAdV-8a	8a	Thailand / 2016	A	C	A	T	C	G	A	T	C	A	94.7
● AF508954 CR119 FAdV-E FAdV-6	6	Thailand / 2016	G	T	A	C	T	G	A	T	C	G	93.9
● AF508948 SR49 FAdV-D-3	D-3	China / 2016	C	A	–	T	G	A	C	C	G	T	89.8
● AF508947 685 FAdV-D FAdV-2	D-2	Thailand / 2016	C	A	–	T	G	A	C	C	G	T	89.3
● AF508946 SR48 FAdV-D FAdV-11	D-11	Thailand / 2016	C	A	–	T	G	A	C	C	G	T	89.6
● AF508952 340 FAdV-B FAdV-5	B	Thailand / 2016	T	G	–	C	A	T	T	A	G	C	88.1
● AF339923 C2B FAdV-C FAdV-10	C	Thailand / 2007	G	A	T	G	C	G	C	T	C	A	87.4
● AF508951 KR5 FAdV-C FAdV-4	C	Thailand / 2016	G	A	T	G	C	G	C	T	C	A	87.6
● AF339914 CELO FAdV-A FAdV-1	A	Brazil / 2013	T	A	C	A	G	T	C	G	C	T	86.2
● AF339918 A2-A FAdV-D FAdV-9	D-9	Thailand / 2006	C	A	–	T	G	A	C	C	G	T	88.7

คาดการณ์ยีนสำคัญ (ยีน Hexon)

ตำแหน่ง	บทบาท/ความสำคัญ
250, 402	จำแนก Genus (Mastadenovirus)
582, 651, 879	จำแนก Serotype หลัก (A–E)
1050, 1215	จำแนก Subtype ภายใน Serotype
1437, 1683, 1890	ใช้สนับสนุน Phylogenetic resolution

สรุปผลการศึกษา

- ✓ Isolate "IBH NIAH FAdV-E-FAdV-8b" (จุดสีแดง) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับกลุ่ม FAdV-E serotype 8b (ไทย-จีน-ไต้หวัน) อย่างมีนัยสำคัญ (Identity 99.6–100%)
- ✓ จัดอยู่ใน Clade เดียวกับเชื้อ FAdV-E serotype 8b
- ✓ สามารถใช้ยีน Hexon ในการจำแนกซีโรไทป์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำอธิบายสัญลักษณ์

- Isolate อ้างอิงในกลุ่ม FAdV-E
- Isolate ที่ศึกษานี้ (IBH NIAH)
- Isolate อ้างอิงต่างซีโรไทป์

รหัสนิวคลีโอไทด์

- A = Adenine
- T = Thymine
- C = Cytosine
- G = Guanine
- = Gap

* % Identity คำนวณเทียบกับ isolate ที่ศึกษานี้ (IBH NIAH FAdV-E-FAdV-8b) โดยใช้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดในตาราง

CONCLUSION



LIMITATIONS AND FUTURE DIRECTIONS

Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of FAdV-8b in Thailand

การวิเคราะห์ข้อมูลจากยีน Hexon ด้วย Multiple Sequence Alignment และ Phylogenetic Analysis



⚠ LIMITATIONS

Although this study provides valuable insights into the molecular epidemiology and genetic diversity of FAdV-8b in Thailand, the **relatively small sample size** may limit the generalizability of our findings.



1. LIMITED GEOGRAPHIC COVERAGE

- Samples were collected from specific regions in Thailand.
- Results may not represent the genetic diversity of FAdV across all regions and poultry systems.



2. RELATIVELY SMALL SAMPLE SIZE

- A limited number of isolates were included in the study.
- This may reduce the statistical power and generalizability of the findings.



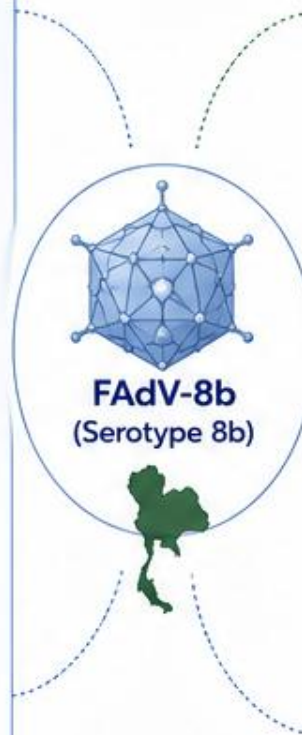
3. PARTIAL GENOME ANALYSIS (HEXON GENE)

- Only the hexon gene was analyzed.
- Recombination events and evolutionary dynamics across the whole genome may not be fully captured.



4. SINGLE TIME FRAME

- Samples were collected within a limited period (2006–2024).
- Temporal dynamics and long-term evolutionary trends could not be fully assessed.



🎯 FUTURE DIRECTIONS

Future studies should incorporate **broader geographic sampling** and **complete genome sequencing** to comprehensively understand the evolutionary dynamics and pathogenic mechanisms of FAdV.

1

BROADER GEOGRAPHIC SAMPLING



- Expand surveillance to additional provinces and neighboring countries.
- Increase sample size from different poultry farms and production systems.

2

COMPLETE GENOME SEQUENCING



- Perform whole genome sequencing (WGS).
- Identify recombination events, virulence genes, and evolutionary hotspots.

3

LONGITUDINAL MONITORING



- Track temporal changes in FAdV strains.
- Understand evolutionary dynamics during epidemic events.

4

PATHOGENICITY & FUNCTIONAL STUDIES



- Investigate virulence factors and host-virus interactions.
- Clarify pathogenic mechanisms of FAdV in poultry.



To mitigate future outbreaks, it is imperative that poultry farmers implement robust **disease monitoring** programs and **track molecular changes** in FAdV strains during epidemic events.



DATA & METHODS IN THIS STUDY



SAMPLES

Liver samples from infected chickens in Lopburi, Thailand (2022)



TARGET GENE

Hexon gene (L1 region)
~900 bp amplicon
Mase et al., 2009
Niu et al., 2017



ANALYSES

PCR, sequencing,
Multiple Sequence
Alignment, Phylogenetic
Analysis



KEY FINDING

IBH NIAH FAdV-E-
FAdV-8b (This study)
clusters within FAdV-E
serotype 8b

SEROTYPES IDENTIFIED IN THIS STUDY

FAdV-E
(Serotype 8b)
5 isolates

FAdV-D
(Serotype D)
6 isolates

FAdV-B
(Serotype B)
1 isolate

FAdV-C
(Serotype C)
2 isolates

FAdV-A
(Serotype A)
1 isolate



The majority of Thai isolates belong to FAdV-E serotype 8b.



KEY TAKEAWAY

This study provides the first comprehensive molecular characterization of FAdV-8b in Thailand using hexon gene analysis. While limitations exist, **continued surveillance**, **whole genome sequencing**, and **functional studies** are essential to understand FAdV evolution and to support effective **prevention and control strategies** in the poultry industry.





สรุปผลงานวิจัย

การจำแนกและวิเคราะห์เชิงโมเลกุลของเชื้อ Fowl Adenovirus Serotype 8b จากประเทศไทย

✓ สรุป (CONCLUSION)



ยืนยันการแยกเชื้อ FAdV-8b สายพันธุ์ไทยได้สำเร็จ
จากตัวอย่างตับไก่ป่วย (Lopburi, 2022) โดยตรวจพบเชื้อด้วย PCR/qPCR และจำแนกยีน Hexon (L1 region)



เชื้อจัดอยู่ใน FAdV-E serotype 8b
มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์จากไทย-จีน (Clade เฉพาะของ 8b) ด้วยความเหมือนทางพันธุกรรม 99.6%



ก่อให้เกิดรอยโรคที่ตับ และก่อให้เกิด CPE ใน CEL cell
แสดงถึงความสามารถในการเพิ่มจำนวนและก่อโรคในระบบทดลอง



ข้อมูลนี้เป็นฐานสำคัญในการเฝ้าระวังและควบคุมโรค IBH ในประเทศไทย และสนับสนุนการป้องกันการสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมสัตว์ปีก

🎯 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (APPLICATIONS)

01



การวินิจฉัยและเฝ้าระวัง

- ใช้ชุดตรวจ PCR/qPCR (Hexon gene) สำหรับการตรวจพบเชื้ออย่างรวดเร็ว
- เฝ้าระวังการระบาดในฟาร์มและพื้นที่เสี่ยงอย่างต่อเนื่อง

02



การควบคุมและป้องกันโรค

- ใช้วัคซีน Autogenous vaccine ที่ตรงกับสายพันธุ์ท้องถิ่น (FAdV-8b ไทย)
- วางมาตรการสุขาภิบาลและ biosecurity เพื่อลดการแพร่เชื้อ

03



การบริหารจัดการฟาร์ม

- ลดอัตราการตายและความเสียหายทางเศรษฐกิจ
- เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและความยั่งยืนของอุตสาหกรรมสัตว์ปีกไทย

04



การวิจัยต่อยอด

- ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อ FAdV อย่างต่อเนื่อง
- ศึกษากลไกการก่อโรคและการตอบสนองต่อวัคซีน

05



ประโยชน์ต่อประเทศ

- สนับสนุนข้อมูลวิทยาศาสตร์ในการเฝ้าระวังและควบคุมโรคสัตว์ปีกของประเทศ
- สร้างความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ และการส่งออกสัตว์ปีกของไทย



ความรู้นี้คือเกราะป้องกันโรคในวันนี้ เพื่อสัตว์ปีกไทยแข็งแรง ปลอดภัย และอนาคตที่ยั่งยืนของอุตสาหกรรมสัตว์ปีกของไทย



ค้นหาและเข้าใจเชื้อ



ป้องกันและควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพ



สัตว์ปีกแข็งแรง ผลิตมันคง



อุตสาหกรรมสัตว์ปีกไทย เติบโตอย่างยั่งยืน



ขอบคุณ

สำหรับความสนใจและการรับฟัง

“ ความรู้วันนี้...คือเกราะป้องกันโรคในวันหน้า
เพื่อสัตว์ปีกไทยแข็งแรง ปลอดภัย
และอนาคตที่ยั่งยืนของอุตสาหกรรมสัตว์ปีกของไทย ”

