Thesis Title Comparative Assessment of Avian influenza Virus Isolation and Identification Using Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Embryonated Eggs and Cell Culture

Author Ms. Mayuree Potima

Degree Master of Veterinary Public Health

Thesis Advisory Committee Prof.Dr.Hafez Mohamed Hafez Chairperson (FU Berlin)

Asst.Prof.Pawin Padungtod Chairperson (CMU)

ABSTRACT

The study was conducted to compare analytical sensitivity of three diagnostic methods and between two types of sample and to determine the minimum detectable of virus concentration of the assay for avian influenza virus isolation and identification. Cloacal swab and lung organ samples from specific pathogen free chickens were divided into three groups. The various concentrations of avian influenza virus were added to the suspension of samples. First analyzed by chorioallantoic sac inoculation of embryonated chicken eggs and alternatively, by haemagglutination (HA) and antigenic analysis (subtyping) by haemagglutination inhibition (HAI) using selected reference antisera Newcastle disease virus, then identification by using direct vet smart. Second method of analysis was done by inoculation on Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells and alternatively, by haemagglutination (HA) and antigenic analysis (subtyping) by haemagglutination

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

inhibition (HAI) using selected reference antisera Newcastle disease virus, then identification by using direct vet smart. Last method of identification use reverse transcriptase-polymerase chain reaction. The assay developed from this study indicates that all three methods are specific for the H5N1 influenza virus.

The virus isolation and identification by using embryonated chicken eggs and MDCK cells yield similar minimum detectable virus concentration. Virus isolation and identification by using RT-PCR had yield highest detectable virus concentration when compared with other diagnostic methods. Cloacal swabs and lung organs analysis result were not significantly different ($p<0.05$). This assay would be highly useful as a diagnostic tool to help identify of H5 Avian Influenza A virus isolate from poultry specimens. and control influenza epidemics.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การประเมินเปรียบเทียบผลการแยกและจำแนกเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยวิธีรีเวอร์ส- ทรานคริปเตสร่วมกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ไข่ไก่ฟักและเซลล์เพาะเลี้ยง

ผู้เขียน นางสาวมยุรี โพธิมา

ปริญญา สัตวแพทย์สาธารณสุขศาสตรมหาบัณฑิต

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ.ดร. ฮาเฟซ โมฮาเม็ด ฮาเฟซ ประธานกรรมการ(FU-Berlin)
ผศ. ดร. ภาวิน ผดุงทศ ประธานกรรมการ (CMU)

บทคัดย่อ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการทำโดย การแยกเชื้อโดยการฉีดไข่ไก่ฟัก หรือการใช้ เนื้อเยื่อเซลล์เพาะเลี้ยง หรือการตรวจพันธุกรรม ชนิด H5N1 โดยวิธี รีเวอร์ส - ทรานคริบเตส ร่วมกับปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส (RT-PCR) และหาชนิดเชื้อโดยวิธีการ Haemagglutination (HA) และวิธี Haemagglutination Inhibitiion (HI) ร่วมกับการตกตะกอนในวุ้น (Agar gel immuno diffusion) จากการทดลองในการศึกษา เพื่อทำการประเมินเปรียบเทียบผลการแยก และจำแนกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยวิธี รีเวอร์ส-ทรานคริบเตส ร่วมกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสไข่ไก่ฟัก และเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเซลล์ที่นำมาใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด Mardin Darby Canine Kidney cells (MDCK cells) แบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง 2 กลุ่ม จากการสวอปทวารไก่ (cloacal swab) และปอด จากไก่ที่ปลอดจากโรค และใส่ปริมาณไวรัสไข้หวัดนก แต่ละความเข้มข้นในกลุ่มตัวอย่างโดยกลุ่มแรก ทำการฉีดตัวอย่าง ผ่านผนังของไข่ฟัก (chorioallantoic sa)และทำการตรวจหาไวรัส โดยวิธีการตกตะกอน ด้วยเม็ดเลือดแดง แล้วทำการแยก ชนิดของเชื้อด้วย วิธีการยับยั้งการตกตะกอนโดย การทดสอบ ด้วยแอนติบอดี้ของโรค Newcastle หลังจากนั้นทำการตรวจแยกกลุ่มของโรค โดยวิธีการตรวจแอนติเจนโดยตรง (direct vet smart®) กลุ่มการทดลองที่สอง ทำการตรวจ โดยใส่กลุ่มตัวอย่าง ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง ชนิด Mardin Darby Canine Kidney cells และทำการตรวจหาไวรัส โดยวิธีการตกตะกอนด้วยเม็ดเลือดแดง แล้วทำการแยกชนิดของเชื้อด้วยวิธีการยับยั้งการตกตะกอนโดยการทดสอบด้วย แอนติบอดี้ของโรค Newcastle หลังจากนั้นทำการตรวจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกกลุ่มของโรค โดยวิธีการตรวจแอนติเจนโดยตรง (direct vet smart®) กลุ่มการทดลองที่สาม โดยทำการตรวจหาสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยวิธีรีเวอร์ส – ทรานคริบเตสร่วมกับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะพบว่าวิธีการแยก และจำแนกเชื้อไวรัสไข้หวัดนกโดยการฉีดไข่ไก่ฟัก และเซลล์เพาะเลี้ยง จะให้ผลในการตรวจที่คล้ายกัน ในการตรวจหาปริมาณ ไวรัส ที่ความเข้มข้นที่ต่ำสุด ส่วนวิธีการแยก และจำแนกเชื้อไวรัสไข้หวัดนก โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมจากตัวอย่างโดยวิธี รีเวอร์ส-ทรานคริบเตส ร่วมกับ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจะตรวจพบปริมาณไวรัส ที่ความเข้มข้นสูงสุด ในตัวอย่างจากปอด และการสวอปทวารไก่ (cloacal swab) จะได้ผลการ ตรวจ ที่คล้ายกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากการทดลอง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ ในการวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5 จากตัวอย่างในสัตว์ปีก และช่วยในการควบคุมโรคไข้หวัดนกได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved