

อัญญรัตน์ ต้นธีรวงศ์: การพัฒนาชุดตรวจ one step multiplex RT-PCR เพื่อวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ H5, H7 และ H9 (THE DEVELOPMENT OF ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY FOR H5, H7 AND H9 AVIAN INFLUENZA A VIRUS DETECTION) อ.ที่ปรึกษา: รศ.น.สพ.ดร.คณิตศักดิ์ อรวีระกุล อ.ที่ปรึกษาร่วม: ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ 74 หน้า. ISBN: 974-17-3704-1

เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 และ H7 มักทำให้เกิดโรครุนแรงในสัตว์ปีกหลายชนิด นอกจากนี้เชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 มีรายงานว่าสามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้อีกด้วย ในงานวิจัยครั้งนี้ได้มีการพัฒนาวิธี one step multiplex RT-PCR เพื่อประกอบการตรวจวินิจฉัย avian influenza A virus สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 ในตัวอย่างที่แยกได้จากสัตว์ปีกที่มีประวัติอาการสงสัยการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ชุด primers ที่ได้ทำการออกแบบนั้นให้ผลผลิตขนาดต่างกันดังนี้คือ 157 คู่เบส (H5), 326 คู่เบส (H7) และ 231 คู่เบส (H9) วิธี one step multiplex RT-PCR นี้มีความไวและความจำเพาะสูงเนื่องจากให้ผลลบต่อเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจที่สำคัญในไก่และในมนุษย์รวมถึงเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์อื่นๆด้วย และความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR เมื่อทำการทดสอบแยกปฏิกิริยากันสำหรับ H5 H7 และ H9 RNA transcripts คือ  $10^3$  copies/ $\mu$ L นอกจากนี้ความไวของวิธี one step multiplex RT-PCR เมื่อทำการทดสอบ H5 H7 และ H9 RNA transcripts ในปฏิกิริยาเดียวกันคือ  $10^4$  copies/ $\mu$ L ดังนั้นวิธี one-step multiplex RT-PCR นี้จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ avian influenza A virus สายพันธุ์ที่สามารถติดต่อสู่มนุษย์ได้แก่ สายพันธุ์ H5 H7 และ H9 ในตัวอย่างจากสัตว์ปีกได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ทำให้มีความเหมาะสมที่สำหรับใช้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังและเป็นสัญญาณเตือนก่อนที่จะมีการแพร่ระบาดไปยังคน

## 4689193920 : MAJOR Medical Microbiology

KEYWORDS: H5, H7 AND H9 AVIAN INFLUENZA VIRUSES, ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY AUNYARATANA THONTIRAVONG: THE DEVELOPMENT OF ONE STEP MULTIPLEX RT-PCR ASSAY FOR H5, H7 AND H9 AVIAN INFLUENZA A VIRUS DETECTION. THESIS ADVISOR: KANISAK ORAVEERAKUL Ph.D., THESIS COADVISOR: YONG POOVORAWAN, 74 PP. ISBN: 974-17-3704-1

Avian influenza A virus subtype H5 and H7 have caused severe diseases in domestic poultry. Moreover, H5, H7 and H9 avian influenza A viruses have been proven capable of infecting humans. In the present study, we report the development of a one-step multiplex RT-PCR assay for detecting H5, H7 and H9 avian influenza A viruses. Three-subtype specific primer sets capable of producing PCR products of 157, 326 and 231 base pairs corresponding to avian influenza A virus H5, H7 and H9 subtypes, respectively, were utilized together in a one-step, one-tube, reaction. The one-step multiplex RT-PCR assay developed in this study was found to be sensitive and specific. These primer sets did not amplify genomic DNA or RNA from other human and avian respiratory viruses or other subtypes of avian influenza A virus in one-step multiplex RT-PCR assays performed as a control. The sensitivity of this assay was  $10^3$  RNA copies/ $\mu$ L each for H5, H7 and H9 subtypes. In addition, the one-step multiplex RT-PCR assay allowed for simultaneous detection of  $10^4$  copies/ $\mu$ L of *in vitro* transcribed RNA of the H5, H7 and H9 subtypes. Taken together, these findings clearly indicated that this novel one-step multiplex RT-PCR is a simple assay with high potential for rapid, sensitive, specific and cost effective laboratory diagnosis of H5, H7 and H9 avian influenza A virus isolates from clinical specimens of poultry.