

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

วิธี duplex RT-PCR-Enzyme-Linked Immunoassay เพื่อตรวจสอบ
การปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบนิตเอและโรตาไวรัสพร้อมกันในหอย

นางรมสด

โดย

ผศ. ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส

นายวรวัฒน์ สุขคำ

นายวิทยา ภูมิภักดิ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ที่เป็นเงินอุดหนุนจากรัฐบาล
ลักษณะงานวิจัยและพัฒนาถ่ายทอดเทคโนโลยี

งบประมาณ ปี 2557

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากการทุ่มเทแรงกายและใจของนายวรวัฒน์ สุขคำ นิสิตสาขาชีวเวชศาสตร์ ที่ช่วยทำการทดลองภายหลังจบการศึกษา และนายวิทยา ภูมิภักดิ์ ศิษย์เก่าที่ให้ความช่วยเหลือทางด้าน bioinformatics และด้านต่างๆ ขอขอบคุณ ดร. สุพรรณณี ลีโทชวลิต ที่ให้ความอนุเคราะห์หอยนางรมตัวอย่าง และท้ายสุดขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2557

อุไรวรรณ อินทมาโส

28 กันยายน 2558

The duplex RT-PCR-Enzyme-Linked Immunoassay for the detection of HAV and rotavirus in oysters

Uraivan Intamaso^{1*}, Woravat Sunkkham¹ and Witthaya Poomipak²

¹Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Bangsaen, Chonburi

²Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok

*Corresponding author: urawani@buu.ac.th

An efficient and rapid virus detection method is required for routine control and risk assessment in food products. In this study, duplex RT-PCR was performed to evaluate the presence of Hepatitis virus (HAV) and rotavirus in harvested oysters. Primers were designed using multiple alignments of target gene sequences (VP4 of HAV and VP7 of rotavirus). Monoplex RT-PCR had more sensitivity in detection of HAV than rotavirus but comparable in detection of both viruses by duplex RT-PCR. DNA-ELISA was shown to confirm the specificity of RT-PCR product but not for increased sensitivity of detection. Overall positive samples, 26 out of 41, were found in oyster samples contaminated with either one or both viruses when detected with duplex-RT-PCR combined with nested PCR. All rotavirus positive samples were found to be group A G1P[8]. Thus duplex RT-PCR combined with DNA-ELISA can be employed to confirm the specificity of RT-PCR product but duplex RT-PCR combined with nested PCR can be used not only as a tool for screening viral contaminations in oysters but also for epidemiological studies.

Key words: Rotavirus, HAV, duplex RT-PCR, DNA-ELISA

วิธี duplex RT-PCR-Enzyme-Linked Immunoassay เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน ของไวรัสตับอักเสบนิดเอและโรตาไวรัสพร้อมกันในหอยนางรมสด

อุไรวรรณ อินทมาโส^{1*} นายวรวัฒน์ สุขคำ¹ และ นายวิทยา ภูมิภักดิ์²

¹คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

²คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก: uraiwani@buu.ac.th

การตรวจหาการปนเปื้อนของไวรัสในอาหารเป็นประจำในอาหารต้องอาศัยวิธีที่มีประสิทธิภาพและความเร็วในการตรวจสอบ การศึกษานี้ได้นำวิธี duplex RT-PCR มาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบนิดเอและโรตาไวรัสพร้อมกันในหอยนางรม โดยมีการออกแบบ primer จากบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้ของไวรัสทั้งสองชนิด (บริเวณ VP4 ของไวรัสตับอักเสบนิดเอและ VP7 ของโรตาไวรัส) ปฏิบัติการ monoplex RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิดเอมากกว่าโรตาไวรัส แต่กลับพอๆ กันใน duplex RT-PCR วิธี DNA-ELISA สามารถใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ได้แต่ไม่สามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสจากวิธี RT-PCR ได้ สำหรับเทคนิค multiplex RT-PCR และ nested PCR สามารถตรวจพบการปนเปื้อนในหอยนางรมด้วยไวรัสโรต้าและไวรัสตับอักเสบนิดเอ เพียงชนิดเดียวหรือทั้งสองชนิดใน 26 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 41 ตัวอย่างโดยสายพันธุ์ของไวรัสโรต้าที่พบทั้งหมดเป็น Genotype G1[8] ดังนั้น เทคนิค duplex RT-PCR-DNA-ELISA สามารถใช้ในการยืนยันความจำเพาะผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ได้ แต่ duplex RT-nested PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองหอยนางรมที่ปนเปื้อนไวรัสเป้าหมายและการตรวจสอบ genotype ของไวรัสที่ปนเปื้อนได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาการระบาดของเชื้อด้วย

คำสำคัญ: โรตาไวรัส, ไวรัสตับอักเสบนิดเอ, ตับเพลกอาร์ทีพีซีอาร์, ดีเอ็นเออีไอซาร์

สารบัญ	หน้า
ประกาศคุณูปการ	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูปภาพ	viii
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	3
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
การออกแบบ primers	7
การสกัด RNA ของอนุภาคของไวรัส	7
การสร้าง artificial templates	8
การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี monoplex PCR และ duplex RT-PCR	9
Digoxigenin (DIG)-labeling PCR	11
การทดสอบผลผลิตจาก RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA	11
การเก็บตัวอย่างหอยนางรม	12
การสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมสด	13
การหาวิเคราะห์หา genotype e ของไวรัสที่พบในหอยนางรม	13
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
การทดสอบ primer ที่ออกแบบเพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR และ nested-PCR	15
การทดสอบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยวิธี monoplex RT-PCR ร่วมกับ DNA-ELISA	15
การทดสอบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของโรตาไวรัส ด้วยวิธี monoplex RT-PCR ร่วมกับ DNA-ELISA	19
การทดสอบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยปฏิกิริยา Duplex RT-PCR	19
การทดสอบความไวในการตรวจสอบ artificial template ของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอด้วยปฏิกิริยา duplex RT-PCR	24
การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบชนิดเอจากตัวอย่าง	24

หอยนางรมจากแหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกโดยวิธี Duplex RT-PCR และ Nested-PCR	
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลผลิตจากปฏิกิริยา Nested-PCR และการวิเคราะห์หา genotype ของไวรัสในหอยนางรม	25
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	32
ปัญหาและอุปสรรค	34
บรรณานุกรม	35

สารบัญตาราง (Table of Contents)

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทำ RT-PCR และ semi-Nested PCR	8
3.2 การทำปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR	10
3.3 Condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Monoplex/duplex RT-PCR	10
3.4 การทำปฏิกิริยา duplex RT-PCR	11
3.5 การทำปฏิกิริยา DIG-labeling PCR	12
3.6 Condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา DIG-labeling PCR	12
3.7 การทำปฏิกิริยา Nested PCR	14
3.8 Condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Nested PCR	14

สารบัญรูปภาพ (List of Illustrations)

รูปที่		หน้า
4.1	ผลผลิตจากปฏิกิริยาการขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเมื่อวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophore	16
4.2	การทดสอบความไวของปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิตเอ	17
4.3	การทดสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิต cDNA ของไวรัสตับอักเสบนิตเอด้วยวิธี DNA-ELISA	18
4.4	การทดสอบความไวของปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของโรตาไวรัส	20
4.5	การทดสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิต cDNA ของโรตาไวรัสด้วยวิธี DNA-ELISA	21
4.6	การทดสอบความไวของวิธี duplex RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิตเอและโรตาไวรัส	22
4.7	การทดสอบความจำเพาะของผลผลิต cDNA ของไวรัสตับอักเสบนิตเอและ/หรือโรตาไวรัสด้วยวิธี DNA-ELISA	23
4.8	การทดสอบความไวในการตรวจสอบ artificial template ของไวรัสตับอักเสบนิตเอและโรตาไวรัสที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่าด้วยวิธี duplex RT-PCR	26
4.9	การทดสอบความจำเพาะของผลผลิต cDNA จาก artificial template ของไวรัสตับอักเสบนิตเอและ/หรือโรตาไวรัสด้วยวิธี DNA-ELISA	27
4.10	วิธี Nested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัสและ HAV ในตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บในเขตจังหวัดชลบุรี	28
4.11	วิธี Nested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัสและไวรัสตับอักเสบนิตเอในตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บจากตลาดหนองมน, จังหวัดชลบุรี	29
4.12	วิธี Nested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัสและไวรัสตับอักเสบนิตเอในตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บอำเภอบางศิลา, จังหวัดชลบุรี	30
4.13	วิธี Nested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัสและไวรัสตับอักเสบนิตเอในตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บจากจังหวัดระยองและจันทบุรี	31

บทที่ 1 บทนำ

อาหารทะเลประเภทหอยสองฝา (bivalve molluscs) ที่คนนิยมบริโภคเป็นอาหารได้แก่ หอยลาย (clam) หอยแมลงภู่ (mussels) และหอยนางรม (oysters) มักมีคนนำมาเพาะเลี้ยงในฟาร์มบริเวณชายฝั่งทะเลน้ำตื้นที่มีสารอาหารอยู่ในระดับสูง โดยหอยทำหน้าที่คอยดักจับอาหาร เช่น พวกสาหร่าย ด้วยการกรองจากน้ำที่รัยล้อมรอบตัวหอย และนำมาย่อยเป็นอาหาร อย่างไรก็ตามบริเวณชายฝั่งทะเลน้ำตื้นที่เพาะเลี้ยงหอย มักปะปนด้วยสิ่งปนเปื้อนจากมนุษย์ที่ไม่ได้ถูกกำจัดอย่างถูกวิธีจากบริเวณใกล้เคียงรวมทั้งน้ำทิ้งจากแหล่งอุตสาหกรรมที่ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ เมื่อถูกน้ำฝนชะสิ่งปนเปื้อนต่างๆ จะไหลมาทับถมกันบริเวณที่เลี้ยงหอย (Jaykas et al, 1994; Shieh et al, 2000) เมื่อหอยดักจับอาหาร เชื้อก่อโรคต่างๆ จากสิ่งปนเปื้อนที่ปะปนอยู่ในน้ำนั้นก็จะถูกดักจับไปด้วย และสะสมไว้ในระบบย่อยอาหารของหอย ซึ่งอาจมีความเข้มข้นสูงถึง 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ (Enriquez et al, 1992) และประกอบกับพฤติกรรมของผู้บริโภคเองที่นิยมบริโภคหอยดิบ หรือที่ปรุงแบบสุก ๆ ดิบ ๆ ซึ่งใช้ความร้อนและระยะเวลาในการปรุงอาหารไม่มากพอ ความร้อนจึงไม่อาจผ่านเปลือกแข็งของหอยเข้าไปทำลายเชื้อโรคซึ่งอยู่ในเนื้อหอยได้ ดังนั้น หอยดังกล่าวเหล่านี้ จึงกลายเป็นแหล่งระบาดของเชื้อก่อโรคหลายชนิด โดยเฉพาะไวรัสชนิดที่ติดต่อผ่านการกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสิ่งปนเปื้อนจากมนุษย์ (fecal-oral route) โดยทั่วไปแล้วไวรัสเหล่านี้จะสามารถคงทนอยู่ได้ในแหล่งน้ำเป็นเวลานาน และไม่สามารถถูกกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพจากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ที่มีอยู่ในปัจจุบัน (Sorber, 1983) นอกจากนี้กระบวนการ depuration ที่ใช้ในการกำจัดแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยการนำหอยที่มีชีวิตมาใส่ลงในภาชนะขนาดใหญ่ ที่มีน้ำทะเลสะอาดอยู่ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้หอยคายของเสียออกมาก่อนนำหอยนั้นไปขาย นั้นก็ไม่สามารถกำจัดไวรัสที่สะสมอยู่ในหอยได้หมด (Lees, 2000)

ไวรัสตับอักเสบนชนิดเอจัดอยู่ใน genus Hepatovirus (Nainan et al., 2006) เป็นไวรัสชนิดที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ติดต่อสู่คนผ่านการกินอาหารโดยเฉพาะหอยที่ปนเปื้อน ไวรัสชนิดนี้มีอนุภาคทรงกลมขนาดประมาณ 27-28 นาโนเมตร ชั้นนอกสุดไม่มีชั้นไขมัน (non-envelope) ห่อหุ้ม มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวก ประวัติศาสตร์การระบาดของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอที่รุนแรงที่สุดเกิดขึ้นที่เมืองเซียงไฮ้ ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1988 มีสาเหตุมาจากการกินหอยลายที่เลี้ยงไว้ในบริเวณที่มีสิ่งปนเปื้อน (Halliday et al, 1991) ในครั้งนั้น มีจำนวนผู้ติดเชื้อถึง 300,000 ราย จากข้อมูลจากองค์การอนามัยโรค (WHO, 2012) ได้ประมาณว่ามีการระบาดของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอเกิดขึ้นทุกปีประมาณ 1.4 ล้านรายทั่วโลกสำหรับประเทศไทย จาก ข้อมูลของกองควบคุมโรค ในปี 2547 พบว่า มีผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดเอ ประมาณ 4.54 % ซึ่งตัวเลขดังกล่าวอาจมีค่าน้อยกว่าที่เกิดขึ้นจริง เพราะเป็นตัวเลขที่บันทึกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเท่านั้น ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักซื้อยามารับประทานเองหรือพักรักษาตัวที่บ้านจึงไม่ได้มีการบันทึกข้อมูลในส่วนนี้ไว้ สำหรับการติดต่อด้วยไวรัสตับอักเสบนชนิดเอนั้นเกิดขึ้นได้ง่ายเพราะไวรัสชนิดนี้สามารถทนต่อความร้อน และ ความแห้งในอาหารได้ดีกว่าไวรัสชนิดอื่น ๆ และสามารถอยู่รอดในน้ำทะเลได้นานหลาย ๆ สัปดาห์ (Crocì et al, 1999; Bosch & Shields, 1987) นอกจากนี้แล้วเมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้วมีระยะฟักตัว เฉลี่ยนานถึง 4 สัปดาห์ (ระหว่าง 2-6 สัปดาห์) ก่อนที่จะแสดงอาการของโรคออกมา (Cromeans et al, 1994) ผู้ป่วย จึงไม่ได้รับแจ้งการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส และถ้าผู้ติดเชื้อนั้นมีการขับถ่ายอุจจาระลงในแหล่งน้ำ เชื้อไวรัสจะออกมาพร้อมกับอุจจาระได้ยาวนาน ถึง 10-14 วัน มีจำนวนมากระหว่าง 10^6 ถึง 10^{11} อนุภาค ต่ออุจจาระหนึ่ง กรัม และอาจพบใน

น้ำทิ้งจาก 10^3 ถึง 10^5 อนุภาคต่อ ลิตร (Rodgers, 1981; Jaykas et al, 1994) ถ้าหากบังเอิญผู้ติดเชื้อทำงานเกี่ยวข้องกับอาหาร โอกาสการถ่ายทอดเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอาหารสามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมากขึ้นโดยเฉพาะในกรณีที่ผู้ติดเชื้อนั้นมีสุขอนามัยที่ไม่ดี เช่นไม่ได้ล้างมือก่อนไปหยิบจับอาหาร ผู้ที่ติดเชื้อหากแสดงอาการรุนแรงจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง หรือ ดีซ่าน และถ้ามีอาการรุนแรงมากและป่วยเป็นระยะเวลานาน อาจมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งตับได้ (Ciocca, 2000)

นอกจากไวรัสตับอักเสบชนิดเอแล้ว ยังมีโรตาไวรัส (Rotaviruses) อีกชนิดหนึ่งที่ติดต่อผ่านทางอาหารและก่อให้เกิดอาการอักเสบเฉพาะที่ระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) โรตาไวรัส จัดอยู่ในตระกูล Reoviridae เป็นไวรัสทรงกลม มีขนาดประมาณ 72 นาโนเมตร ประกอบด้วยโปรตีน (capsid) 2 ชั้น ที่ล้อมรอบ อาร์เอ็นเอสายคู่ (double stranded RNA) จำนวน 11 ชิ้น ไวรัสในอนุภาค โรตาไวรัส ที่พบ แบ่งเป็น หลาย ๆ serotype จากกลุ่ม A ถึง G แต่ มีเพียง serotype A, B และ C เท่านั้น ที่เกี่ยวข้องกับอาการโรคในคน (Lees, 2000) โดย serotype A ส่วนใหญ่ ก่อให้เกิดการระบาดใน เด็กทารกและเด็กเล็กและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ในประเทศ ที่กำลังพัฒนาป่วย จากอาการท้องเสียอย่างรุนแรงจนต้องได้รับการรักษาในโรงพยาบาล และ เป็นสาเหตุของการตาย ได้สูงถึง 20% ส่วน non-serotype A Rotaviruses ที่พบมีการระบาด เป็นระยะ ๆ ในครอบครัว หรือชุมชนผ่านทางภาชนะอาหารทะเลโดยเฉพาะหอยนางรม ที่แม้ไม่ค่อยได้พบบ่อยนัก แต่การระบาดบางครั้ง ทำให้เกิดอาการระบบทางเดินอาหารอักเสบที่รุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้ (Bridger, 1994) อย่างไรก็ตามแม้โรตาไวรัส serotype A มีการระบาดที่พบได้บ่อย มักเป็นสาเหตุหลักในการก่อให้เกิดโรคในเด็ก และไม่ก่อโรครุนแรงในผู้ใหญ่ แต่ผู้ใหญ่เมื่อได้รับเชื้อจากการรับประทานหอยนางรมที่ปนเปื้อนด้วยไวรัส จะกลายเป็นแหล่งแพร่กระจายโรค โดยสามารถขับถ่ายอนุภาคของไวรัสออกมาจำนวนมากกว่า 10^{12} อนุภาค ต่ออุจจาระ 1 กรัม ลงไปในแหล่งน้ำ (Gajardo et al., 1995; Dubois et al., 1997) เมื่อคนนำน้ำที่ปนเปื้อนเหล่านั้นกลับไปใช้ในการปรุงอาหาร หรือใช้มือที่ไม่สะอาดหยิบจับอาหารปนเปื้อนใส่ปากเด็กก็สามารถทำให้เกิดการแพร่ระบาดไปสู่เด็กเล็กได้ ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่สามารถป้องกันโรตาไวรัสที่มีประสิทธิภาพพร้อมๆกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากธรรมชาติของ โรตาไวรัส ที่มีจีโนม เป็นอาร์เอ็นเอ เส้นคู่ ชั้น สั้น ๆ ถึง 11 ชั้น ภายในอนุภาค ทำให้สามารถเกิดการกลายพันธุ์แบบ genetic reassortment ได้ง่าย หากโรตาไวรัส สองสายพันธุ์ติดเชื้อ พร้อมกัน ภายในเซลล์เดียวกัน เหมือนกับที่เกิดกับ influenza virus

ดังนั้นการตรวจหาไวรัส ในหอยนางรมให้ได้ถูกต้อง รวดเร็ว จึงเป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส ด้วยการตัดวงจรการแพร่ระบาด โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่ต่อยอดมาจากโครงการวิจัยเดิมที่ใช้ วิธี RT-PCR-ELISA ในการตรวจหาเชื้อไวรัสได้เพียงชนิดเดียวมาเป็น duplex RT-PCR-ELISA ที่สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้ 2 ชนิดพร้อมกัน ผลการวิจัยที่ได้จะนำไปใช้พัฒนาต่อยอดผลิตเป็นชุดตรวจสอบไวรัสเชิงพาณิชย์สำหรับผู้บริโภคและผู้ประกอบการเพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสในหอยนางรมสด ที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความไว และ ความจำเพาะในโอกาสต่อไป นอกจากนี้ยังทำให้ทราบถึง genotype ของไวรัส เหล่านี้ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดเพื่อนำมาเป็นข้อมูลในการพัฒนาวัคซีนป้องกันติดเชื้อไวรัส โดยเฉพาะกับ genotype ชนิดที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อประเมินความไวและความจำเพาะของวิธี duplex-RT-PCR-ELISA ในการตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอและโรตาไวรัสพร้อมกัน

2. ตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงและจำหน่ายในภาคตะวันออก

3. ตรวจสอบถึง genotype ของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสที่พบปนเปื้อนในหอยนางรมสดในธรรมชาติ

ทฤษฎี สมมติฐาน

วิธี duplex RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไว รวดเร็วในการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของไวรัส 2 ชนิดได้พร้อมกัน หากใช้ร่วมกับ ELISA แล้วจะทำให้การทดสอบมีความสะดวก รวดเร็ว และมีความจำเพาะมากขึ้น

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีการประเมินความไวของวิธีทดสอบความไวของวิธี duplex-RT-PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสพร้อมกันในหอยนางรมสดด้วยวิธี duplex-RT-PCR และตรวจสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิต DNA ที่ได้ด้วยวิธี ELISA นอกจากนี้ยังนำวิธี duplex RT-PCR –nested PCR ไปตรวจสอบหาการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสที่เพาะเลี้ยงและจำหน่ายในภาคตะวันออก ส่วนผลผลิตของ DNA ที่ได้จากปฏิกิริยานested PCR ถูกนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบ genotype ของไวรัสทั้งสองชนิดด้วย

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบค่าความไวและความจำเพาะของวิธี duplex-RT-PCR-ELISA ที่ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสพร้อมกันได้ และวิธีนี้ยังสามารถนำมาใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดที่ปนเปื้อนในธรรมชาติได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยอาจนำไปพัฒนาต่อยอดสู่การผลิตชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้ ข้อมูลจากการตรวจหา genotype ของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสที่พบปนเปื้อนในหอยนางรมสดในธรรมชาติสามารถใช้เป็นข้อมูลจากการระบาดมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อด้วยการผลิตวัคซีนต่อต้าน genotype ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้

สามารถนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Food control, Applied and Environmental Microbiology, Molecular and Cellular Probes, Journal of virological methods เป็นต้น และหน่วยงานที่ใช้ประโยชน์ได้แก่และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ คือ กระทรวงสาธารณสุข

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แต่เดิมวิธีการตรวจหาไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารนิยมนำของเหลวที่สกัดจากอาหาร (food extract) ที่ต้องสงสัยว่าอาจปนเปื้อนด้วยไวรัสมาเจริญในเซลล์เพาะเลี้ยงที่จำเพาะและตรวจหาร่องรอยการติดเชื้อของเซลล์ (cytopathic effect) (Jaykas et al, 1994) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้กับ ไวรัสทุกชนิด โดยเฉพาะ ไวรัสตับอักเสบบชนิดเอสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบชนิดเอไม่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายในเซลล์เพาะเลี้ยงและต้องอาศัยระยะเวลาการปรับตัวที่ยาวนานก่อนที่จะสามารถเจริญได้และไม่ทำให้เกิด cytopathic effect ด้วย (De Chastonay & Siegel, 1987; Lemon & Robertson, 1993) ปัจจุบันวิธีการทดสอบชนิดนี้จึงไม่เป็นที่นิยม เพราะมีความยุ่งยากและใช้เวลานาน สำหรับทางเลือกอื่นในการตรวจหาไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นใช้ วิธีการส่องดู ขนาด รูปร่าง ลักษณะ อนุภาคไวรัสผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (EM) แต่วิธีนี้มีความไวต่ำต้องมีอนุภาคปริมาณมากถึง 10^9 - 10^{11} ต่อมวลสารหนึ่งกรัมจึงจะสามารถตรวจพบได้และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการใช้ EM ที่สามารถจำแนกลักษณะของไวรัสได้ วิธีนี้อาจใช้ได้ดีกับสิ่งส่งตรวจพวกอูจจาระของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ไม่มีความไวพอกับสิ่งส่งตรวจพวก food extract ซึ่งมีอนุภาคไวรัสอยู่ในปริมาณน้อยมาก

วิธี immunological method ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสชนิดที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงโดยอาศัยปฏิกิริยาการจับจำเพาะระหว่างของแอนติบอดี ที่ถูกยึด (immobilized) ไว้กับคอลัมน์ (column) กับโปรตีนชั้นเปลือกนอก (coat protein) ของไวรัส ใน food extract วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจหาจำนวนที่แท้จริงของ infectious viral particles ใน food extract ได้เพราะแอนติบอดีจะสามารถจับได้กับไวรัสที่มีอนุภาคสมบูรณ์เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยเช่นกันเพราะตามการตรึงแอนติบอดีไว้กับคอลัมน์อาจทำให้แอนติบอดีไม่อยู่ในสภาพเป็นอิสระทำให้จับกับแอนติเจนได้ไม่ดี และวิธีนี้อาจจะต้องใช้เวลานานถึง 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการจับกันแน่นระหว่างแอนติบอดีที่ถูกตรึงไว้กับแอนติเจน ดังนั้นได้มีการพัฒนาให้ แอนติบอดีจับกับแอนติเจนได้ดีขึ้นด้วยการตรึงแอนติบอดีไว้กับเม็ด bead (Monceyron & Grinde, 1994) หรือบน magnetic particle โดยตรง (Safarik et al., 1995) หรือใช้ปฏิกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin มาช่วยในการตรึงแอนติบอดีไว้บน magnetic particle อีกชั้นหนึ่ง (Lopez-Sabater et al., 1997) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจาก มีความไวต่ำและต้องการอนุภาคของไวรัสที่ปนเปื้อนเป็นจำนวนมากพอจึงจะสามารถตรวจพบไวรัสได้ จึงไม่สามารถใช้ในการตรวจหาไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารได้โดยตรง ดังนั้นจึงมักใช้ เป็นวิธีในการ concentrate ไวรัสใน food extract ก่อนนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นต่อไป

วิธี RT-PCR เป็นวิธีที่นิยมมากในการตรวจหาไวรัสชนิดที่มี RNA เป็น genome ซึ่งมักพบปนเปื้อนจำนวนน้อยในอาหาร เพราะมีความไวสูง โดยใช้ enzyme reverse transcriptase ในการขยายเพิ่มจำนวนสร้างผลผลิตเป็น complementary DNA จำนวนมากในเวลาสั้น ๆ แต่วิธีนี้เพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ตรวจหาไวรัสได้โดยตรงใน food extract เพราะในอาหารมักมีส่วนประกอบต่าง ๆ ที่ยับยั้งการทำงานของ enzyme ในปฏิกิริยา RT-PCR ทำให้เกิดผลเป็น false negative ได้ (Rossen et al, 1992; Dix & Jaykus, 1998; Green et al, 1998; Shiel et al, 1999) ดังนั้นจำเป็นต้องมีขั้นตอนการกำจัด RT-PCR inhibitor ต่าง ๆ, การ concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract และ purify อนุภาคของไวรัสออกมาก่อนแล้วนำไปสกัด RNA genome เพื่อนำมาทำ RT-PCR ต่อไป

โดยทั่ว ๆ ไปสามารถแบ่งการ concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract ออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ 1) extraction-concentration 2) adsorption-elution-concentration โดยทั้งสองวิธีมีจุดมุ่งหมายในการแยกไวรัสออกจากอาหารโดยพยายามให้ไวรัสยังคงอยู่ในรูป infectious form เช่น ผ่านการกรอง การตกตะกอน polyelectrolyte flocculation และ solvent extract หรือใช้ Sephadex (De Leon et al, 1992) cellulose (Wilde et al, 1990) Chelex (Straub et al, 1994) เป็นต้น เพื่อกำจัดเกลือหรือโปรตีนขนาดเล็ก หรือใช้ CTAB (Jiang et al, 1992) เพื่อกำจัด polysaccharide หรืออาจนำ magnetic poly (dT) bead (Kingsley et al, 2001) หรือ silica gel membrane (Shiel et al, 1999) มาใช้ร่วมในการ purify RNA ด้วย สำหรับวิธีการ concentrate viral particle อีกวิธีที่นำมาใช้คือ immunocapture โดยใช้แอนติบอดีมาจับเพื่อแยกอนุภาคไวรัสออกจากอาหารตามด้วยความร้อนเพื่อให้ viral RNA หลุดออกจาก capsid protein ก่อนเข้าสู่กระบวนการ PCR ต่อไป ซึ่งวิธี magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) ที่อาศัยหลักการดังกล่าวนี้ (Lopez et al, 1997) สามารถลดปริมาณของ food extract ได้ 10-100 เท่าและมี yield ที่ได้ 10-90% เมื่อใช้วิธีนี้ตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอ ในเนื้อหอยนางรมจำนวน 20 g สามารถตรวจพบอนุภาคของไวรัสได้ต่ำสุด (detection limit) 10 PFU แต่วิธีการสกัดไวรัสเหล่านี้ อาจมีความไวไม่พอในการตรวจหาไวรัสที่มีจำนวนน้อยมาก ๆ ที่ปนเปื้อนใน อาหารได้และอาจยังคงมี RT-PCR inhibitor ปะปนอยู่ (Drebot&Lee, 1997) ตามปกติวิธี RT-PCR ใช้ primer เพียง 1 คู่ ในการตรวจหา RNA genome ของไวรัสเป้าหมายได้เพียง 1 ชนิดต่อหนึ่งปฏิกิริยาเท่านั้น แต่ วิธี duplex และ duplex RT- PCR มีการใช้ primer สองคู่หรือหลายคู่ โดยที่แต่ละคู่จำเพาะต่อ template เป้าหมายต่างชนิดกัน จึงสามารถใช้ตรวจหา template เป้าหมายสองหรือมากกว่าสองชนิดได้พร้อมกันในหนึ่งปฏิกิริยา ดังนั้นจึงมีการนำ duplex RT- PCR มาใช้ในการตรวจหาไวรัสก่อโรคมกมายทางคลินิกเนื่องจากการตรวจสอบมีสะดวก รวดเร็ว ลดค่าใช้จ่าย ลดการสูญเสียทั้งเวลาและแรงงานอีกด้วย (Poddar et al., 2002; Zoll at al, 1992) และนำมาใช้ตรวจหาไวรัสก่อโรคในน้ำหรืออาหารบ้าง (Coelho, at al, 2003; Tsai et al., 1994; Kou, et al., 2008; Rayas et al, 2010)

แม้ RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ในทางกลับกันความไวที่สูงมาก ๆ นี้ อาจเพิ่มโอกาสในการขยายเพิ่มจำนวน nucleic acid อื่นที่อาจปนเปื้อนในปฏิกิริยาได้ วิธีที่ใช้ยืนยันผลที่ได้ซึ่งกระทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ คือนำ ผลผลิต cDNA ที่ได้ไปแยก ด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย Southern blot hybridization โดยใช้ internal oligonucleotide ที่มีการติดฉลาก (Hardy et al, 1997; Honma et al, 2000, Intamaso and Withaya, 2011) เมื่อนำ RT-PCR มาใช้ร่วมกับ dot blot hybridization สามารถเพิ่มความไวในการตรวจหา enteric viruses ได้ 100-1000 เท่า (Jung and Chae, 2005)

อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลานานและยุ่งยากและต้องใช้เวลาประมาณ 2 วัน วิธีที่เชื่อถือได้มากที่สุดคือนำ ผลผลิต cDNA ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งนอกจากใช้เป็นวิธียืนยันผลที่ได้ว่าเป็นผลผลิตที่ได้มาจากการขยายเพิ่มจำนวนของ viral genome เป้าหมายจริง ๆ แล้วยังสามารถติดตามการระบาดของเชื้อไวรัสก่อโรคได้ถึงระดับ genotype ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการติดต่อในมนุษย์หรือมาจากมูลของสัตว์ที่ปนเปื้อนในอาหารหรือเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงหรือไม่ด้วย อย่างไรก็ตามแม้วิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ผลผลิตจะเป็นวิธีมาตรฐานแต่ไม่สามารถทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่เนื่องจากใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง

มีผู้คิดค้นวิธีการตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA enzyme immunoassay (DEIA) โดยอาศัยหลักการ hybridization assay ผสมกับ immunoassay ชนิด ELISA ที่

สามารถทำได้ใน microtiter plate โดยการใช้ biotin -labeled probe ที่มีความจำเพาะคอยดักจับ digoxigenin-labeled PCR products ที่ผ่านการ denature เป็น DNA สายเดี่ยวกลายเป็น DNA hybrid ก่อนนำไปใส่ในหลุมที่มี streptavidin เคลือบไว้ที่ก้นหลุม DNA hybrid จะถูกตรึงไว้ที่ก้นหลุมเพราะมีการยึดจับกันระหว่าง streptavidin และ biotin ที่ติดฉลากไว้บน probe หลังจากเติม anti- digoxigenin enzyme conjugate และ substrate ตามลำดับ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นและเปลี่ยนสารตั้งต้น เป็นผลผลิตที่มีสี วิธีนี้มีความไวพอ ๆ กับวิธี hybridization แบบดั้งเดิมแต่ทำได้ในง่ายกว่าเพราะทำการทดสอบใน microtiter plate และใช้เวลาสั้นกว่าแค่ประมาณ 4 ชั่วโมง เท่านั้น (Schwab et al, 2001) วิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบได้ทั้งไวรัส (Metzger-Boddien and Kehle, 2005; Musiani et al, 2007), แบคทีเรีย (Hong et al, 2003; Fach et, 2002), โพรโตซัว (Sow et al, 2006) และเชื้อรา (Scotter and Chambers 2005) เมื่อทดสอบหาการปนเปื้อนของ adenovirus ใน shellfish พบว่ามีความไวสูง มีค่า detection limit 10-100 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) ต่อ shellfish 1 กรัม (Milne et al, 2007) และสามารถตรวจพบ pancreatic necrosis virus (IPNV) ที่ปนเปื้อนจำลองในไตของปลา trout ได้ต่ำสุดเพียงแค่ 1.5×10^4 pfu IPNV เท่านั้น (Milne et al, 2006) และได้มีผู้รายงานไว้ว่าผลของการทดสอบมีความไวพอ ๆ กับ real time PCR (Musiani et al., 2007)

วิธี duplex หรือ multiplex RT-PCR ได้ถูกนำพัฒนาเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อก่อโรคที่ระบบหายใจ พร้อมๆ กัน 9 ชนิด (Puppe et al., 2004) สามารถใช้จำแนก avian influenza virus subtype ต่างๆ (Chaharaein et al., 2009) รวมทั้งจำแนก genotype ของ human group A rotavirus ได้ด้วย (Santos et al., 2008) นอกจากนี้มีการนำมาใช้ตรวจหาการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบนิดเอและชนิดอี พร้อมๆ กันในสารตัวอย่างอุจจาระด้วย (Tahk et al., 2011) แม้ duplex หรือ multiplex RT-PCR มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อก่อโรคได้หลายชนิดพร้อมๆ กันแต่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยโรค การใช้วิธี duplex หรือ multiplex RT-PCR-ELISA ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคในอาหารยังมีข้อจำกัดอยู่ จำเป็นต้องมีการพัฒนาให้สามารถนำมาใช้ได้ในการตรวจคัดกรองอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในอาหารได้ จะมีประโยชน์อย่างยิ่ง

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การออกแบบ primers

Primer ทั้งหมดผ่านการออกแบบด้วยโปรแกรม package Bioedit โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีนต่างๆ ภายในจีโนมของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอหรือโรตาไวรัส genotype ต่างๆ ที่มีอยู่ใน GenBank database มา alignment เพื่อหาบริเวณภายในยีนของไวรัสที่มีการอนุรักษ์สูงมาก (highly conserved region) โดยใช้หลักเกณฑ์ของ GC content, melting temperature ที่ใกล้เคียงกัน และข้อควรคำนึงถึง คือ primer คู่ที่ใช้อย่างเพิ่มจำนวนจีโนมของไวรัสตับอักเสบบีควรให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวของ นิวคลีโอไทด์แตกต่างจากผลผลิตจากการขยายเพิ่มจำนวนจีโนมของโรตาไวรัสทั้งนี้เพื่อให้สามารถตรวจสอบ ได้ด้วย agarose gel electrophoresis

สำหรับ primer ที่ใช้อย่างสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาได้ออกแบบให้สามารถจับจำเพาะต่อยีน VP7 ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนโครงสร้างของ capsid และให้ amplicon ประมาณ 952 bp ส่วนไพรเมอร์ สำหรับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีความจำเพาะต่อยีน VP4 ซึ่งเป็น capsid ของเชื้อไวรัส โดยมีขนาดของ amplicon ประมาณ 762 bp แสดงดังในตารางที่ 3.1

3.2 การสกัด RNA ของอนุภาคของไวรัส

RNA ถูกสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany) โดย นำ supernatant ปริมาตร 140 µl ผสมกับ buffer AVL ปริมาตร 560 µl ที่มี carrier RNA 5.6 µl ใน 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วบ่มที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 560 µl ผสมส่วนผสม ทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที spin down จากนั้นดูดส่วนผสมปริมาตร 630 µl ลง ใน spin column ที่ให้มาในชุดสกัด ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็น ระยะเวลา 1 นาที ที่ถังของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทำซ้ำอีกครั้งจนส่วนผสมใน 1.5 ml microcentrifuge tube หมด จากนั้นดูด buffer AW1 ที่ผสม ethanol แล้ว ปริมาตร 500 µl ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ถังของเหลวที่อยู่ใน collection tube ต่อมา เติม buffer AW2 ที่ผสม ethanol แล้ว ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่ถังของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทำการปั่นซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด ethanol ที่ยังคงค้างอยู่ ทำการเปลี่ยน collection tube เป็น 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม buffer AVE ปริมาตร 40 µl และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่มี RNA แบ่ง ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดละ 5 µl เก็บใน -80 °C จนกว่าจะนำมาใช้ทำการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.1: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ของ primers สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR และ Nested-PCR

Target	Primers สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR			
	Name	Sequences	Position	Amplicon size
External primers				
Rotavirus	VP7-F1	5'-ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC-3'	1-23	952 bp
	VP7-R952	5'-CTA ACG ATC TCG ATC TTT TGG-3'	932-952	
Hepatitis A Virus	HAV-F230	5'-TGT AGG AGT CTA AAT TGG GGA-3'	230-249	762 bp
	HAV-R991	5'-CTT CAT GGA AAA GAG CAT GTG-3'	971-991	
Internal primers สำหรับปฏิกิริยา Nested-PCR				
Rotavirus	VP7-F1	5'-ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC-3'	1-23	397 bp
	VP7-R397	5'-ACT GAT CCT GTT GGC CAW CC-3'	378-397	
Hepatitis A Virus	HAV-F354	5'-GCT ACG GGT GAA ACC TCT TA-3'	354-373	321 bp
	HAV-R674	5'-GGA AAA ACC TAA ATG CCC CTG-3'	654-674	

3.3 การสร้าง artificial templates

เนื่องจากไม่สามารถหาความเข้มข้นของโรตาไวรัสได้ด้วยวิธี plaque assay ได้จำเป็นต้องสร้าง artificial templates ขึ้นมาเพื่อเทียบเคียงกับอนุภาคของไวรัสแทน สำหรับการสร้าง artificial template ต้องกระทำใน 3 ขั้นตอนได้แก่ 1) การสร้าง plasmids หรือ DNA ที่ขยายเพิ่มจำนวนจากปฏิกิริยา PCR ที่มี T7 promoter อยู่ที่ปลาย 5' ของสาย DNA 2) การทำปฏิกิริยา *in vitro* transcription เพื่อสร้าง RNA molecules และ 3) การทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยการทดลองถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วนได้แก่การสร้าง plasmid DNA ของไวรัสตับอักเสบนิตเอดด้วยทำปฏิกิริยาขยายเพิ่มจำนวนของ HAV RNA ด้วยคู่ของ HAV-F354 and HAV-R674 ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 1xTag buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dATP, and 1U of Tag polymerase (Thermo-Scientific Fermentas, USA) ปริมาตร 50 μ l หลังจากนั้น

ผลผลิตที่ได้จะถูกนำมาสกัดให้บริสุทธิ์ ด้วย Hiyield™ PCR DNA fragments extraction kit (RBC Bioscience)แล้วนำไปเชื่อมต่อกับ RBC TA cloning vector kit (RBC Bioscience) ที่อุณหภูมิ 4°C โดยบ่มไว้นาน 1 ชั่วโมง ด้วยวิธีที่แนะนำมาที่ชุดทดสอบ เมื่อ ligated plasmid ถูก transform เข้าไปใน *E. coli* JM109 และนำไปเจริญบน LB medium ที่ประกอบด้วย 100 µg/ml ampicillin และ 20 µg/ml X-Gal แล้ว plasmid DNA ที่ถูกคัดเลือกไว้จากโคโลนีที่มีสีขาวจะถูกสกัดออกจากเซลล์ด้วย Hiyield™ Plasmid mini kit (RBC Bioscience) และยืนยันผลด้วย DNA sequencing (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Malaysia) สำหรับ plasmid DNA ที่ได้รับการยืนยันแล้วว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องจะถูกนำมาขยายเพิ่มจำนวนต่อไปด้วย M13 forward และ reverse primers ได้ขึ้นส่วนของสาย DNA ที่ประกอบด้วย T7 promoter อยู่ที่ปลาย 5' เพื่อพร้อมทำปฏิกิริยา *in vitro* transcription ต่อไปสำหรับการสร้าง artificial templates ของโรตาไวรัสไม่สามารถกระทำได้ด้วยการสร้าง plasmid DNA เหมือนกับ ไวรัสตับอักเสบนชนิดเอจึงจำเป็นต้องลดขั้นตอนด้วยการขยายเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คู่ของ rota-T7 forward primer ที่ประกอบด้วย T7 promoter ที่ปลาย 5' และ VP7-R952 ได้ขึ้นส่วนของ DNA ที่พร้อมในการทำปฏิกิริยา *in vitro* transcription ต่อไป

ปฏิกิริยา *in vitro* transcription ประกอบด้วย 3 µl ของชิ้นส่วนของ DNA ของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอ หรือ โรตาไวรัสที่สร้างไว้ข้างต้น ในปริมาณ 50 µl ที่ประกอบด้วย 1x transcription buffer (USB corporation), 4mM ของแต่ละ NTP (ATP, CTP, GTP and UT, Promega, USA), 10 U RNase inhibitor (Promega, USA), และ 4 U of T7 RNA polymerase (USB corporation, USA) หลังจากบ่มปฏิกิริยาที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้ว DNA template จะถูกกำจัดออกด้วย 5 U of DNase (Sigma-Aldrich, USA) โดยบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น inactivate DNase enzyme ที่ 75°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้วความเข้มข้นของแต่ละ RNA transcript จะถูกวัดด้วยเครื่อง spectrophotometry (µg/ml) แล้วนำคำนวณจำนวนของ RNA transcript (pmol of ssRNA) เพื่อหาค่า RNA molecules (molecules/µl) (Morales-Rayas et al, 2010) ดังนั้นจำนวนของ RNA transcript ของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสเริ่มต้นที่ยังไม่ได้รับการเจือจางจึงเป็น ไวรัสตับอักเสบนชนิดเอและโรตาไวรัสเท่ากับ 6.946×10^{10} และ 4.335×10^{10} molecules/reaction)

3.4 การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี monoplex PCR และ duplex RT-PCR

นำคู่ต่างๆ ของ primer ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบนชนิดเอหรือโรตาไวรัสมาประเมินประสิทธิภาพทางด้านความไวเมื่อใช้ในปฏิกิริยา monoplex- หรือ duplex RT-PCR โดยใช้ template เป้าหมายเพียงหนึ่งชนิดในปฏิกิริยาที่มี primer คู่ที่จำเพาะ 1 คู่ หรือ ใช้ template ที่เป็นสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิดพร้อมกันในปฏิกิริยาที่มี primer คู่ที่จำเพาะ 2 คู่ ตามลำดับและผันแปรความเข้มข้นของ RNA ของไวรัสแต่ละชนิดที่บริสุทธิ์ ด้วยการเจือจาง 10 เท่าจากความเข้มข้นของสารพันธุกรรมเริ่มต้น และนำมาทดสอบในปฏิกิริยา monoplex RT-PCR (ตารางที่ 3.2) หรือ duplex RT-PCR (ตารางที่ 3.4) ด้วยสภาวะที่แนะนำมาพร้อมกับชุดทดสอบ (SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq, Invitrogen, USA) (ตารางที่ 3.3) โดยการทดลองทั้งหมดใช้ dH₂O เป็น negative control สำหรับผลที่ได้จากปฏิกิริยาถูกวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบความยาวของนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA)

ตารางที่ 3.2: การทำปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR

Components	1 reaction (25 µl)	Final conc.
DEPC (RNase-Free water)	5.5	-
2X reaction mix	12.5	1X
5 mM MgSO ₄	2.0	2 mM
10 µM External forward primer ของเชื้อไวรัส โรตาไวรัส (VP7-F1) หรือ Hepatitis A virus (HAV-F230)	1.0	0.4 µM
10 µM External reverse primer ของโรตาไวรัส (VP7-R952) หรือไวรัสตับอักเสบชนิดเอ (HAV-R674)	1.0	0.4 µM
SuperScript [®] III RT-PCR/ with Platinum [®] Taq mix	1.0	-
RNA template ของเชื้อโรตาไวรัสหรือ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ	2.0	-

ตารางที่ 3.3: Condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Monoplex/duplex RT-PCR

Condition	Temperature	Time	Cycles
Reverse transcription	50 °C	30 min	
Initial denature	94 °C	2 min	
Denature	94°C	15 Sec	30 cycles
Annealing	55 °C *	30 Sec	
Extension	68 °C	1 min **	
Final Extension	68 °C	5 min	
Cool	4 °C		

*Annealing temperature = T_m primer – 5 °C

** Extension time: 1 min / kb

ตารางที่ 3.4: การทำปฏิกิริยา duplex RT-PCR

Components	rotavirus	HAV	Final concentration
DEPC (RNase-Free water)	3.5	6.0	-
2X reaction mix	12.5	12.5	1X
5 mM MgSO ₄	2.0	2.0	2 mM
10µM External forward primer (VP7-F)	1.5	-	0.6 µM
10µM External reverse primer (VP7-R)	1.5	-	0.6 µM
10µM External forward primer (HAV-F230)	-	1.0	0.4 µM
10µM External reverse primer (HAV-R991)	-	1.0	0.4 µM
SuperScript [®] III RT-PCR/ with Platinum [®] Taq mix	1.0	1.0	-
RNA template (Rota)	3.0	1.5	-

3.5 Digoxigenin (DIG)-labeling PCR

ทำการติดฉลาก cDNA ของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย digoxigenin-dUTP เข้าไปในสาย DNA (internal labeling dUTP) โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ตาม condition ที่มีการปรับเปลี่ยนบ้างเล็กน้อยจากข้อแนะนำที่แนบมากับชุดน้ำยา PCR DIG labeling kit (Roche, Germany) (ตารางที่ 3.5 และ 3.6) หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป mini Quick Spin DNA Columns (Roche, Germany)

3.6 การทดสอบผลผลิตจาก RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA

นำ cDNA มาทำการยีนย่นผลด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป PCR-ELISA (DIG detection) (Roche, Germany) ด้วยการนำ PCR sample ที่ได้มา ปริมาตร 5 µl ผสมกับ denature solution ปริมาตร 20 µl แล้วบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นเติม B-HAV probe (5'-GATTGATCTGTGCTATGGTTCCTGGTG-3') หรือ degenerated rota-probe ที่ละลายใน hybridization buffer ความเข้มข้นอย่างละ 15 pmol ในปริมาตร 225 µl ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปเติมลงใน 96 well plate ปริมาตรหลุมละ 200 µl ปิดด้วย parafilm เพื่อป้องกันการระเหยของของเหลวในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่อง shaker incubator นานประมาณ 3 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้ DNA จะอยู่ในสภาพที่เป็นเส้นเดี่ยว ทำให้ probe ที่ conjugate ด้วย biotin เข้ามาจับด้วยพันธะ hydrogen bond ระหว่าง complementary bases กลายเป็น DNA เส้นคู่ ที่จะตรึงไว้ที่ก้นหลุมของ microtiter plate ที่เคลือบด้วย streptavidin จากนั้นล้างด้วย washing solution ปริมาตรหลุมละ 250 µl จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติม anti-DIG-POD antibody (ความเข้มข้น 1:100) ปริมาตรหลุมละ 200 µl

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืด เขย่าเบาๆด้วยเครื่อง shaker incubator เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม ABTS solution ปริมาตรหลุมละ 200 μ l แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืดด้วยเครื่อง shaker incubator เป็นเวลา 30 นาที สุดท้ายนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้คลื่นความยาวอ้างอิง 492 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

การวิเคราะห์ผลของเทคนิค DNA-ELISA นั้นให้เปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{405/492} ของ negative control (dH₂O) จากการทำซ้ำ 4 ครั้งและบวก 0.2 (mean negative+0.2) หากค่าใดมีค่าที่สูงกว่าค่า cut-off value จัดว่าเป็นค่าที่มีผลบวก

ตารางที่ 3.5 การทำปฏิกิริยา DIG-labeling PCR

Components	1 reaction (25 μ l)	Final conc. (25 μ l)
Sterile water	16.625	-
10X PCR reaction buffer without MgCl ₂	2.5	1X
MgCl ₂ –stock solution (1.5mM)	1.5	0.09 mM
PCR DIG labeling mix	2.5	-
10 μ M forward primer (HAV-F230)		2.5nM
10 μ M reverse primer (HAV-F991)		2.5 nM
10 μ M forward primer (VP7-F)		0.25 μ M
10 μ M reverse primer (VP7-R)		0.25 μ M
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.125	-
cDNA sample from RT-PCR	0.5	-

ตารางที่ 3.6 Condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา DIG-labeling PCR

Conditions	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	5 min	} 30 cycles
Denaturation	95 °C	45 sec	
Hybridization	60 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min	
Final elongation	72 °C	10 min	
Cool	4 °C	∞	

3.7การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

หอยนางรมปากจیب (*Saccostrea commercialis*) ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงในชายฝั่งภาคตะวันออกทั้งหมด 3 แหล่ง จำนวนทั้งหมด 41 ตัวอย่าง คือ จังหวัดชลบุรี จำนวน 32 ตัวอย่าง, จังหวัดจันทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง และจังหวัดระยอง จำนวน 4 ตัวอย่างเป็นเวลาทั้งหมด 4 เดือนตั้งแต่ช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2556 โดยหอยนางรมที่เก็บมา

จะถูกแยกเอาส่วนทางเดินอาหารของหอยนางรม (gastrointestinal tract) แยกเก็บไว้เป็นหลอดทดลอง น้ำหนักหลอดละ 1.5 กรัมจากหอยจำนวน 3-5 ตัวที่คิดเป็น 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้เพิ่มโอกาสในการหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส โดยเก็บตัวอย่างหอยไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะนำมาทำการสกัดของเหลวเพื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

3.8 การสกัดเชื้อไวรัสจากหอยนางรมสด

การสกัดไวรัสจากหอยนางรมสดจากที่มีการจำลองการปนเปื้อนหรือหอยตามธรรมชาตินั้นใช้วิธีตกตะกอนด้วย Glycine-Arginine-PEG ที่ดัดแปลงมาจากวิธีเดิมบ้างเล็กน้อย (Intamaso U. and Ketkhumthod, 2014) โดยนำตัวอย่างหอยนางรมสดที่ได้ทำการปนเปื้อนจำลองหรือจากธรรมชาตินำมาล้างด้วยไนโตรเจนเหลวจนกลายเป็นของแข็ง ทำการบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว และทำ homogenize ต่อด้วยเครื่องhomogenizer เป็นเวลา 1 นาที โดยเติม 0.05 M glycine-0.14 M NaCl buffer (pH 7.5) ปริมาตร 15 ml ในภาชนะที่วางอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นนำสารผสมที่ได้ไป centrifuged ที่ 5000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C เก็บ supernatant (S1) ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และนำ pellet มาละลายใน 0.5 M arginine-0.15 M NaCl buffer (pH 7.5) ปริมาตร 15 ml เขย่าส่วนผสมทั้งหมดด้วย vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป centrifuged ที่ 5000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C เก็บ supernatant (S2) มารวมกันกับ supernatant (S1) ที่เก็บไว้ จากนั้นเติม 12% PEG 8000-0.3 M NaCl ปริมาตร 15 ml โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ตลอดทั้งคืน จากนั้นนำไป centrifuged ที่ 6,700xg เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C ทิ้ง supernatant และเก็บส่วน pellet ที่เหลือมาละลายใน PBS (pH 7.5) ปริมาตร 15 ml จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 15 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex mixer และนำไป centrifuged ที่ 1,900xg เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C ทิ้ง supernatant และนำ pellet ที่ได้มาเติม 6 M guanidine thiocyanate solution ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำส่วนผสมไป centrifuged ที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำ supernatant ที่ได้เก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำไปสกัด RNA เพื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

3.9 การหาวิเคราะห์หา genotype ของไวรัสที่พบในหอยนางรม

นำ 1 μ l ของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา duplex PCR หรือ monoplex PCR มาทำ ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 25 μ l ด้วยสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ internal primer ที่ออกแบบไว้(ตารางที่ 3.1)ในการทดสอบใช้ dH₂O เป็น negative control ผลที่ได้จากปฏิกิริยาทั้ง nested PCR จะถูกวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ ความยาวของนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA) และจะถูกนำสกัดให้บริสุทธิ์โดยใช้ PureLink™ Quick Extraction kit ก่อนนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการของบริษัท First base laboratories เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดใน GenBank และ EMBL โดยใช้ PubmedNCBI BLAST programโดยนำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์โดยเริ่มจากการ BLAST ในเว็บไซต์ NCBI เพื่อตรวจสอบขั้นต้นว่าข้อมูลเป็นเชื้อโรตาไวรัสหรือไวรัสตับอักเสบชนิดเอ นำข้อมูลที่เป็นเส้น Forward และ Reverse นำไปการแก้ไข sequence ในส่วนของลำดับเบสที่ไม่สามารถอ่านค่าได้ และทำการ assembly ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องมากขึ้น จากนั้นนำข้อมูลมาทำการ BLAST ในเว็บไซต์ NCBI เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส โดยดูจากค่าต่อไปนี้ คือ max score คือ คะแนนการจัดตำแหน่งสูงสุดระหว่างลำดับเบสกับลำดับเบสของ

ฐานข้อมูล, total score คือ ผลรวมของคะแนนการจัดตำแหน่งของ segments ทั้งหมดจากลำดับ
 ฐานข้อมูล, query value คือ ร้อยละของความยาวของข้อมูลที่สอดคล้องกับลำดับเบสของฐานข้อมูล,
 ident คือ ร้อยละของลำดับเบสที่เหมือนกับฐานข้อมูล โดยค่า cut off อยู่ที่ค่า ident ร้อยละ 80 – 10

ตารางที่ 3.7: การทำปฏิกิริยา Nested PCR

Components	1 RX (25 µl)	Final conc.
Nuclease-Free water	6.5	-
10X <i>Taq</i> buffer	2.5	1X
2 mM dNTPs mix	2.5	0.2 mM
25 mM MgCl ₂	2.0	2.0 mM
10 µM internal forward primer (VP7-F)	2.5	1.0 µM
10 µM Rotavirus internal reverse primer (VP7-R397)	2.5	1.0 µM
10 µM Hepatitis A virus internal forward primer (HAV-F354)	2.5	1.0 µM
10 µM Hepatitis A virus internal reverse primer (HAV-R674)	2.5	1.0 µM
<i>Taq</i> DNA polymerase (500 U) 5U/µl	0.5	2.5
DNA template (Purified RT-PCR product)	1.0	-

ตารางที่ 3.8: Condition ของเครื่อง Thermocycler ในการทำปฏิกิริยา Nested PCR

Conditions	Temperature	Time	Cycles
Initial denature	95 °C	3 min	
Denature	95 °C	30 sec	} 30 cycles
Annealing	55 °C	30 sec	
Extension	72 °C	25 sec*	
Final Extension	72 °C	15 min	
Cool	4 °C	-	

* Extension time 1min/kb

บทที่ 4 ผลการวิจัย

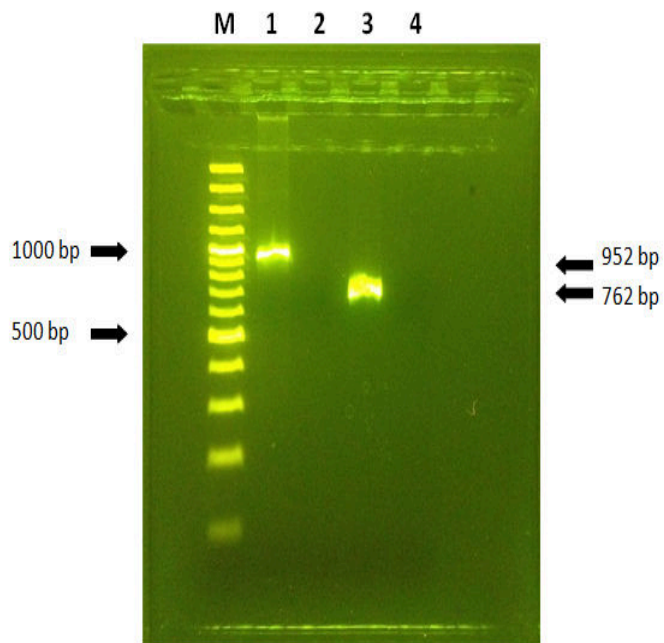
4.1 การทดสอบ primer ที่ออกแบบเพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR และ nested-PCR

Primer ที่ได้รับการออกแบบเพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR จะถูกนำมาทดสอบถึงความสามารถในการจับจำเพาะกับ genomic RNA เป้าหมาย ผลจากการวิเคราะห์ขนาดของ cDNA ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาพบว่า คู่ของ primer VP7-F1 และ VP7-R952 ที่ใช้จับกับ genomic RNA ของโรตาไวรัสให้ขนาดแถบของ DNA ประมาณ 952 bp (รูปที่ 4.1A, lane 1) และ คู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 ใช้จับกับ genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบนิตเอให้ขนาดแถบของ DNA ประมาณ 762 bp (รูปที่ 4.1A, lane 3) ซึ่งมีขนาดตามที่คาดไว้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า external primer ทั้งสองคู่สามารถนำมาใช้ปฏิกิริยา RT-PCR ได้ ส่วน primer คู่ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานested-PCR ที่จับเข้ามาภายในชิ้นส่วนของผลผลิต cDNA เพื่อใช้ในการทดสอบ genotype ของไวรัสชนิดนั้นให้ผลผลิตตามที่คาด โดยคู่ของ primer VP7 และ VP7-R397 ที่ขยายเพิ่มจำนวน cDNA ของโรตาไวรัสให้ผลผลิตประมาณ 397 bp (รูปที่ 4.1B, lane 1) และ คู่ของ primer F354 และ R 674 ที่ขยายเพิ่มจำนวน cDNA ของไวรัสตับอักเสบนิตเอได้ผลผลิตประมาณ 321 bp (รูปที่ 4.1B, lane 3)

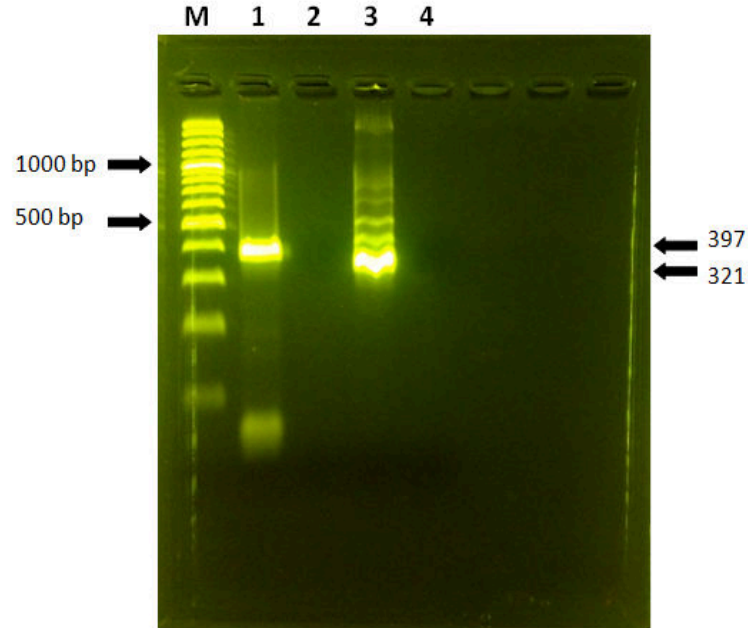
4.2 การทดสอบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิตเอด้วยวิธี monoplex RT-PCR ร่วมกับ DNA-ELISA

Primer ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถจับจำเพาะกับ genomic RNA เป้าหมาย ได้ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา monoplex RT-PCR เพื่อทดสอบหาความไวในการเพิ่มขยายปริมาณ RNA เป้าหมายที่ละชนิดจากผลการทดลองพบว่า คู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 มีความสามารถในการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิตเอที่ถูกเจือจางสูงสุดที่ 2.349 pg (10^{-4}) (รูปที่ 2A, lane 6) เมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR ไปพิสูจน์ความจำเพาะของด้วยวิธี DNA-ELISA โดยกำหนดให้เปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยจากค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{405/492}$ ของ negative control (dH_2O) จากการทำซ้ำ 4 ครั้ง และบวก 0.2 (mean negative + 0.2) หากค่าใดมีค่าที่สูงกว่าค่า cut-off value จะแปลผลเป็นผลบวก จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (23.49 ng) และที่ได้รับการเจือจางแบบ serial dilution 10 เท่า จาก 10^{-1} (2.349 ng), 10^{-2} (234.9 pg), 10^{-3} (23.49 pg) และ 10^{-4} (2.349 pg) ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก (รูปที่ 4.3) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA-ELISA ซึ่งอาศัยหลักการ hybridization ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมนอกจากใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ได้ที่ 2.349 pg (10^{-4}) แต่ไม่สามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมบริสุทธิ์จากวิธี RT-PCR ได้

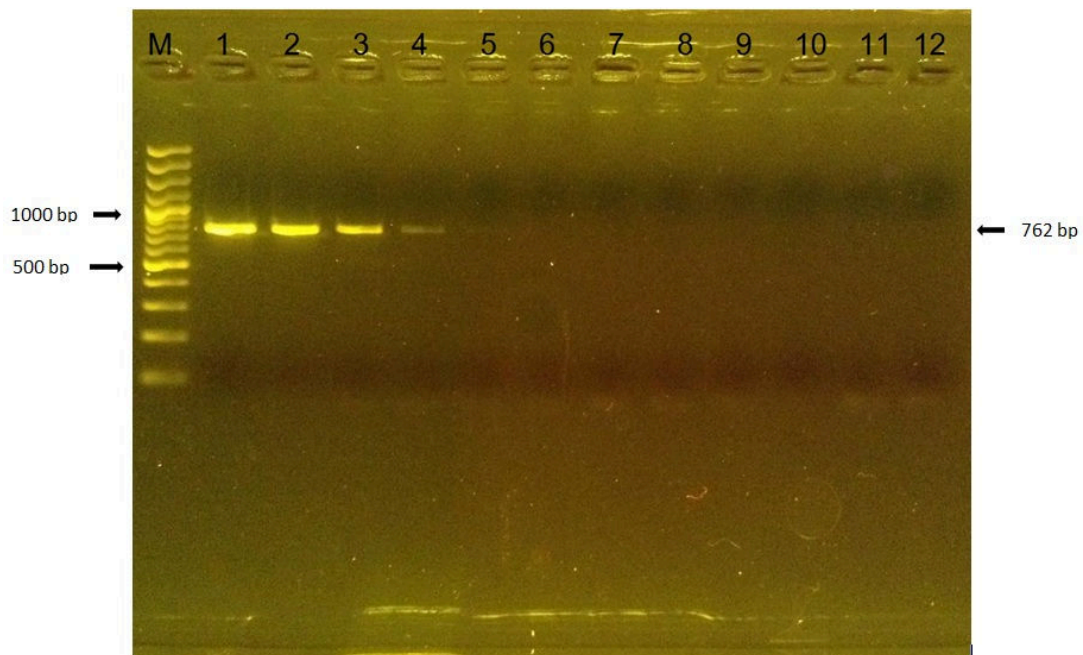
1A.



1B.



รูปที่ 4.1 ผลผลิตจากปฏิกิริยาการขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสเมื่อวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis(A) monoplex RT-PCR และ (B) nested PCR
M, 100 bp ladder marker; Lane 1 และ 3; โรตาไวรัสและไวรัสตับอักเสบนชนิดเอ, ตามลำดับ; Lane 2 และ 4 negative control ที่ใช้น้ำแทน RNA template.



รูปที่ 4.2 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัส ตับอักเสบนิดเอด้วยความเข้มข้นต่างๆ ที่ผ่านการเจือจางแล้ว 10 เท่า

Lane 1 : 100 bp marker

Lane 2 :23.49 ng (undiluted)

Lane 3 :2.349 ng (10^{-1})

Lane 4 :234.9 pg (10^{-2})

Lane 5 :23.49 pg (10^{-3})

Lane 6 :2.349 pg (10^{-4})

Lane 7 : 234.9 fg (10^{-5})

Lane 8 : 23.49 fg (10^{-6})

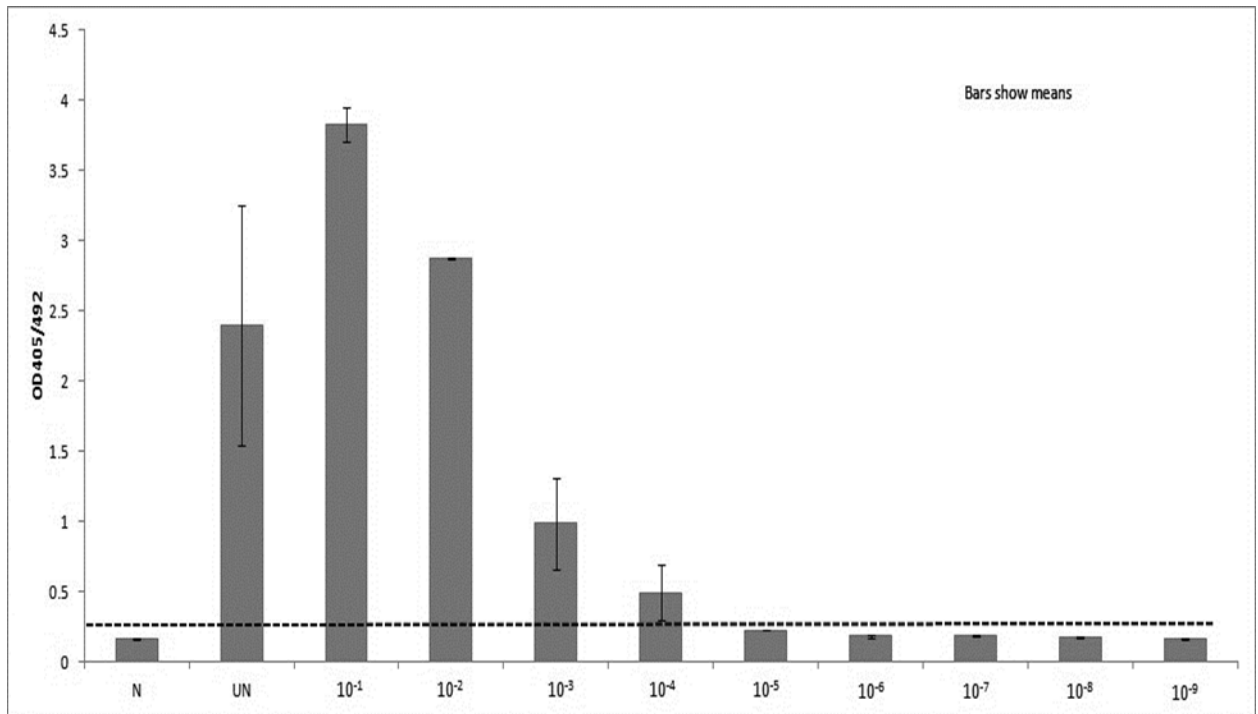
Lane 9 : 2.349 fg (10^{-7})

Lane 10 : 234.9 ag (10^{-8})

Lane 11 : 23.49 ag (10^{-9})

Lane 12 : 2.349 ag (10^{-10})

Lane 13 : dH₂O (Negative control)



รูปที่ 4.3 การทดสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิต cDNA ของไวรัสตับอักเสบนชนิดเอด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่า โดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-offvalue เท่ากับ 0.356 (N = negative control, UN = undiluted)

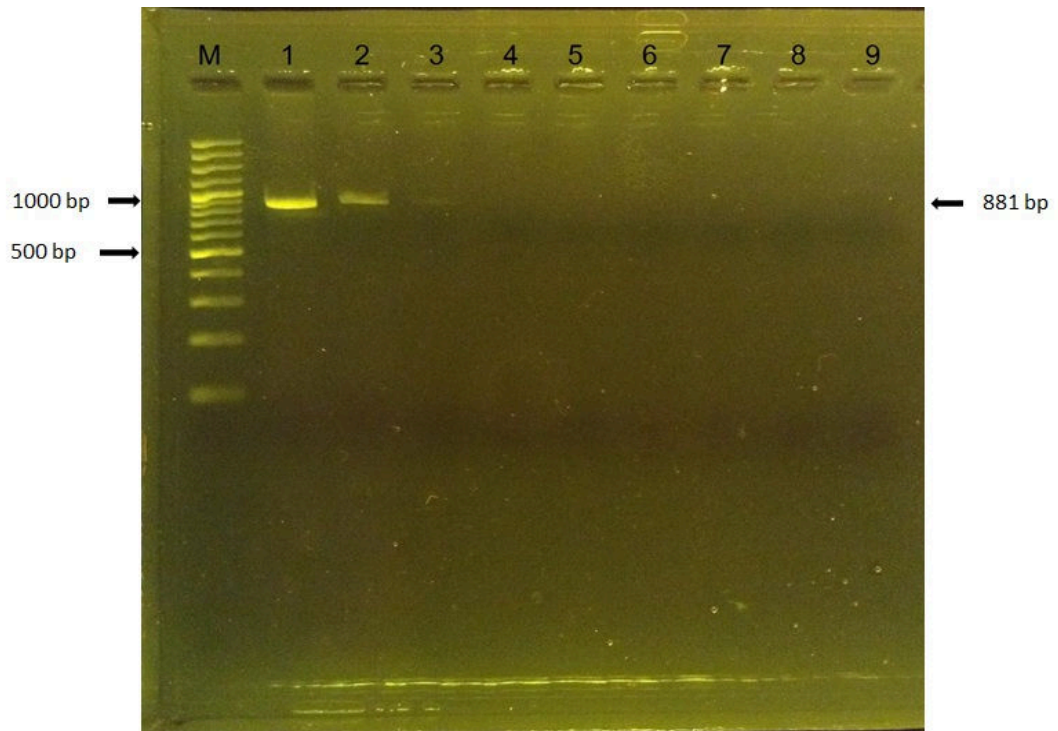
4.3 การทดสอบความไวและความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสด้วยวิธี monoplex RT-PCR ร่วมกับ DNA-ELISA

คู่ของ primer VP7-F1 และ VP7-R952 ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถจับจำเพาะกับ genomic RNA ของโรตาไวรัส ได้ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา monoplex RT-PCR เพื่อทดสอบความไวในการเพิ่มขยายจำนวน จากผลการทดลองพบว่า primer คู่ดังกล่าวมีความสามารถในการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสที่ถูกเจือจางสูงสุดที่ $82.8 \text{ pg} (10^{-2})$ (รูปที่ 4.4, lane 4) เมื่อผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR ไปพิสูจน์ความจำเพาะของด้วยวิธี DNA-ELISA โดยใช้ค่า cut off เท่ากับ $0.38075 (0.16075+0.2)$ ผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาที่มีความเข้มข้นของสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (8.28 ng) เท่านั้นที่ให้ผลเป็นบวก (รูปที่ 4.5) ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA-ELISA สามารถใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ได้แต่ไม่สามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมบริสุทธิ์จากวิธี RT-PCR

4.4 การทดสอบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบีด้วยปฏิกิริยา Duplex RT-PCR

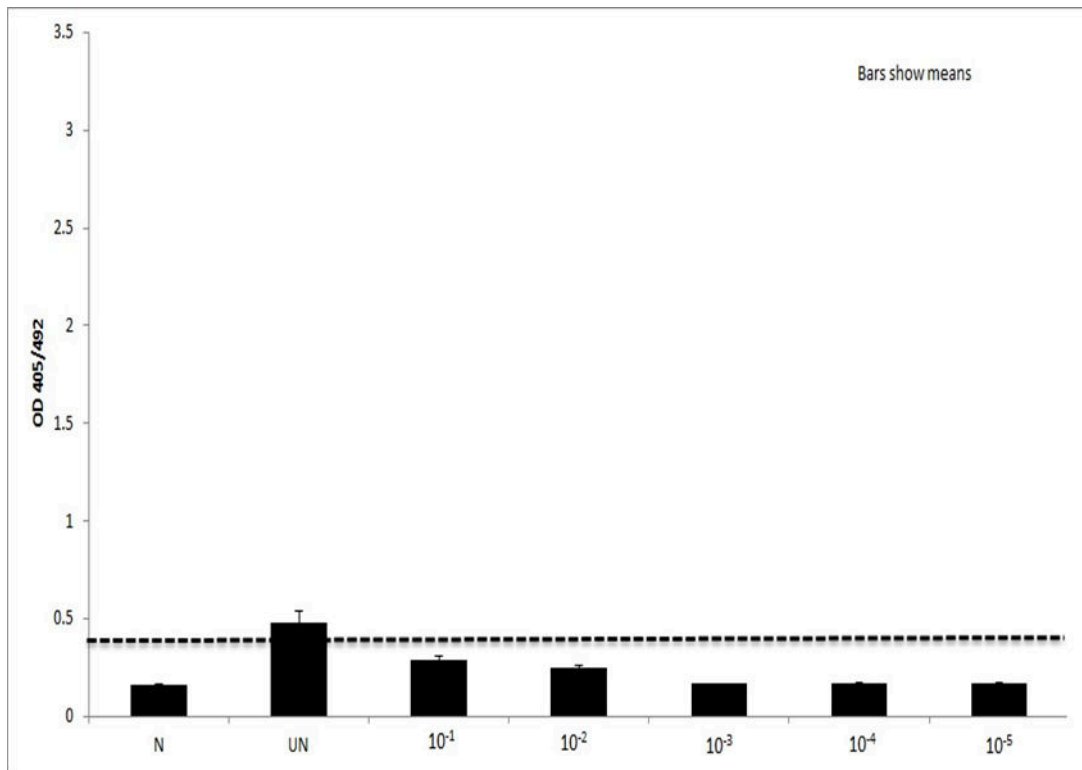
การทดสอบความไวในปฏิกิริยา duplex RT-PCR ด้วยการใส่ primer ของโรตาไวรัสมากกว่าไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอ 2 เท่าและปรับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของไวรัสโรตาให้เท่ากันจากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยา duplex RT-PCR สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิดได้ความเข้มข้นของแถบ cDNA ใกล้เคียงกันและความเข้มของแถบ DNA ลดลงเมื่อถูกเจือจางเพิ่มขึ้น จนพบแถบ DNA จางๆ ด้วยปริมาณของ viral RNA เท่ากันสุดท้ายที่ 10^{-2} (ไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอ 90 pg : โรตาไวรัส 90 pg) (รูปที่ 4.6, lane 4) และหลังจากเจือจาง DNA ต่อไปจะไม่สามารถสังเกตแถบของ DNA ของไวรัสทั้งสองชนิดได้อีก

เมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR การพิสูจน์ความจำเพาะของด้วยวิธี DNA-ELISA นั้นโดยใช้ค่า cut off เท่ากับ $0.1725+0.2= 0.3725$ จากผลการทดลองพบว่าไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอและโรตาไวรัสให้ผลบวกเมื่อมีการเจือจางสูงสุดที่ $900 \text{ pg} (10^{-1})$ และ $90 \text{ pg} (10^{-2})$ ตามลำดับโดยผลการทดสอบได้แสดงความจำเพาะเพราะ HAV probe ให้ผลบวกเฉพาะกับ HAV cDNA เป้าหมายเท่านั้นและให้ผลลบกับ cDNA ของโรตาไวรัส และทำนองเดียวกับโรตาไวรัสที่ให้ผลบวกกับ cDNA ของโรตาไวรัสเท่านั้น แต่ไม่เกิดผลบวกกับ HAV cDNA (รูปที่ 4.7)

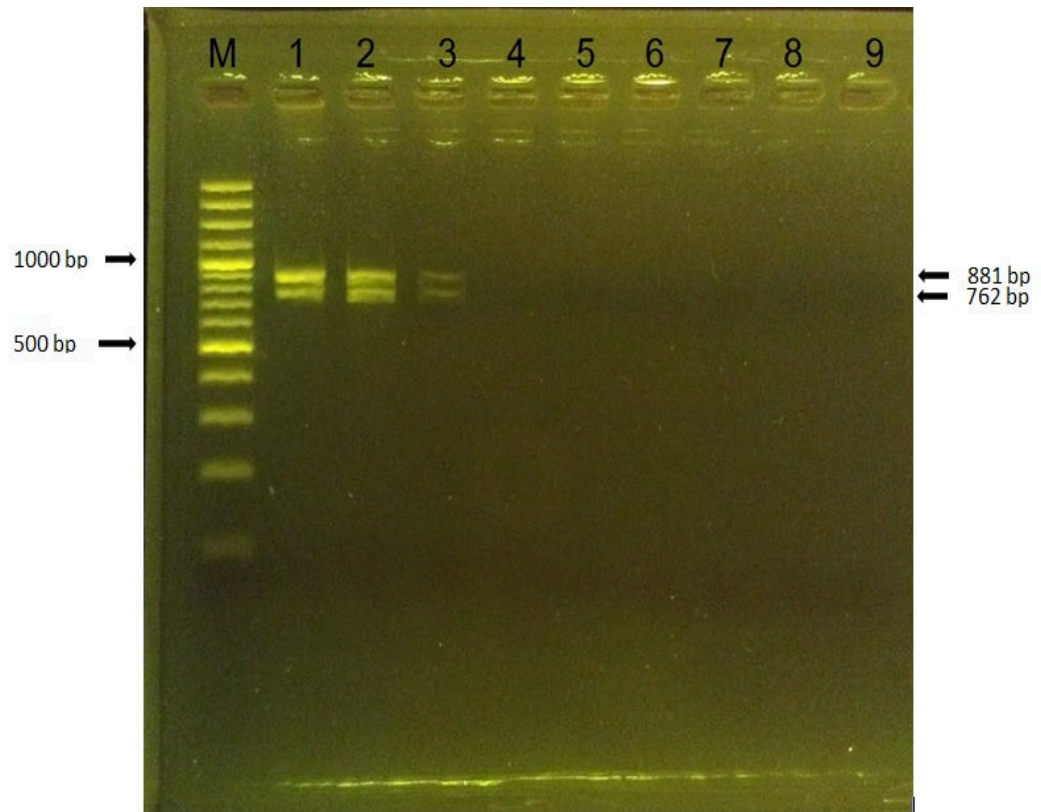


รูปที่ 4.4 การทดสอบความไวของปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสด้วยความเข้มข้นต่างๆ ที่ผ่านการเจือจางแล้ว 10 เท่า

- Lane 1 : 100 bp marker
- Lane 2 :8.28 ng (undiluted)
- Lane 3 :828 pg (10^{-1})
- Lane 4 :82.8 pg (10^{-2})
- Lane 5 :8.28 pg (10^{-3})
- Lane 6 :828 fg (10^{-4})
- Lane 7 :82.8 fg (10^{-5})
- Lane 8 : dH₂O (Negative control)



รูปที่ 4.5 การทดสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิต cDNA ของโรตาไวรัสด้วยวิธี DNA ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อโรตาไวรัสที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่าโดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-offvalue เท่ากับ 0.38075 (N = negative control, UN = undiluted)



รูปที่ 4.6 การทดสอบความไวของวิธี duplex RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิตเอและโรตาไวรัส

Lane 1 : 100 bp marker

Lane 2: โรตาไวรัส: ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (9 ng : 9 ng) (undiluted)

Lane 3 :โรตาไวรัส : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (900 pg : 900 pg) (10^{-1})

Lane 4 :โรตาไวรัส : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ(90 pg : 90 pg) (10^{-2})

Lane 5 :โรตาไวรัส : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (9 pg : 9 pg) (10^{-3})

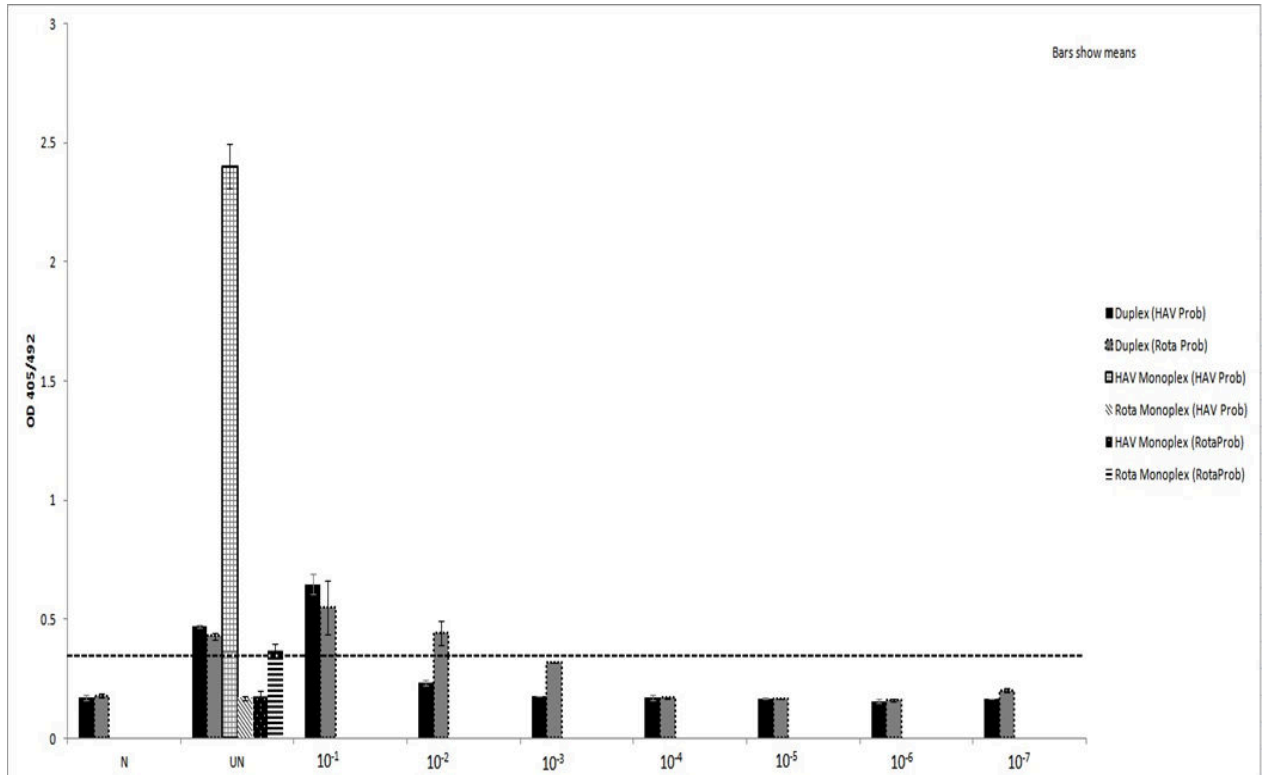
Lane 6 :โรตาไวรัส : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (900 fg : 900 fg) (10^{-4})

Lane 7 :โรตาไวรัส : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (90 fg : 90 fg) (10^{-5})

Lane 8 :โรตาไวรัส: ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (90 fg : 90 fg) (10^{-6})

Lane 9 :โรตาไวรัส : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ (90 fg : 90 fg) (10^{-7})

Lane 10 : dH₂O (Negative control)



รูปที่ 4.7 การทดสอบความจำเพาะของผลผลิต cDNA ของไวรัสตับอักเสบนิตเอและ/หรือโรตาไวรัส เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่าโดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-offvalue เท่ากับ 0.3725 (N = negative control, UN = undiluted)

4.5 การทดสอบความไวในการตรวจสอบartificial template ของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบีด้วย ปฏิกิริยา duplex RT-PCR

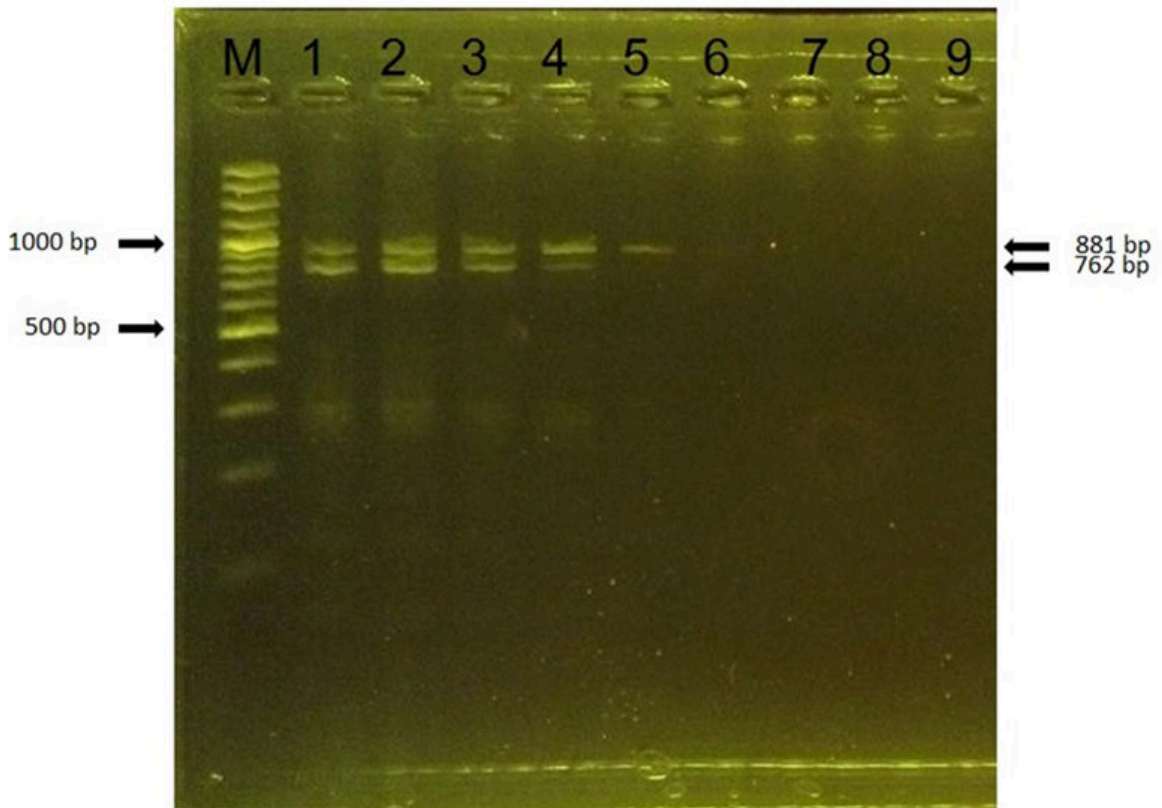
จากการทดสอบความไวในการตรวจสอบartificial template ของเชื้อไวรัสทั้งสองพบว่า ปฏิกิริยา duplex RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอที่ 6.946×10^7 และโรตาไวรัส ที่ 4.335×10^6 molecules/reaction(รูปที่ 4.8)และเมื่อนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR ไปพิสูจน์ ความจำเพาะต่อ DNA-ELISA พบว่า artificial template ของ ไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอเท่านั้นที่ให้ผลบวก ที่ 6.946×10^8 molecules/reactionแต่ไม่พบสัญญาณจากโรตาไวรัส (รูปที่ 4.9)

4.6 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอจากตัวอย่างหอยนางรมจาก แหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกโดยวิธี Duplex RT-PCR และ Nested-PCR

จากผลการวิเคราะห์หอยนางรมที่ถูกเก็บมาจากแหล่งต่างๆ ของชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก โดยมีการจัดเก็บเป็น 2 ชุดจำนวนหอยนางรมทั้งสิ้น 41 ตัวอย่าง ด้วยปฏิกิริยา duplex RT-PCR ผลการทดลองพบว่าทุกๆ ตัวอย่างของที่ไม่พบแถบ cDNA เกิดขึ้น แต่พบเพียง smear band (ไม่แสดงภาพ)เมื่อนำผลผลิตที่ได้ไปทำปฏิกิริยา nested PCR ต่อไปเพื่อยืนยันว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสด้วยวิธี nested PCR (รูปที่4.10-4.13) พบว่าบางตัวอย่างเกิดแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 397 bp จำนวน 1 แบน ในตัวอย่างที่เก็บชุดที่ 1 ได้แก่ จากจังหวัดชลบุรี 1, 2, 3, 4, และ 5 ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตา และแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 321 bp จำนวน 1 แบน ในตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี 7 และจังหวัดระยอง 2ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และไม่พบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี 6, 8 จังหวัดระยอง 1, 3, 4 และจากจังหวัดจันทบุรีเลย สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของไวรัสในหอยที่เก็บจากตัวอย่างหอยนางรมชุดที่ 2 พบก็ให้เป็นไปในทำนองเดียวกัน โดยพบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 397 bp จำนวน 1 แบนในตัวอย่างจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี 2, 3, 9 และจากสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี 2 ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตาและแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 321 bp จำนวน 1 แบนในตัวอย่างจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี 1, 11, 12 และสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เอ และพบแบนดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 2 แบน ในตัวอย่างจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี 4, 5, 6 แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีการปนเปื้อนทั้งเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบีเอ ส่วนตัวอย่างที่เหลือไม่พบแถบของดีเอ็นเอเป้าหมาย จากการตรวจสอบทั้งหมดจากตัวอย่างหอยนางรม 2 ชุด รวมทั้งหมด 41 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสโรตาเท่านั้นคิดเป็น 21.95% (9/41 ตัวอย่าง), ผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเอเท่านั้นคิดเป็น 34.15% (14/41 ตัวอย่าง)และผลการทดสอบบวกทั้งเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบี เอ 7.32% (3/41 ตัวอย่าง) และผลการทดสอบลบ 36.58% (15/40 ตัวอย่าง)

4.7 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตจากปฏิกิริยา Nested PCR และวิเคราะห์หา genotype ของไวรัสที่พบในหอยนางรม

เมื่อนำแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดไปสกัดออกจาก agarose gel และนำไปทดสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสทั้งสองชนิดจริงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยโรตาไวรัสเป็น genotype G1[8] ทั้งหมด (ไม่ได้แสดงภาพ) แต่ไม่สามารถบอก genotype ของไวรัสตัวอีกเสบชนิดนี้ได้เนื่องจากบริเวณที่เพิ่มขยายสารพันธุกรรมไม่ใช่บริเวณที่ใช้แยก genotype ของไวรัส



รูปที่ 4.8 การทดสอบความไวในการตรวจสอบ artificial template ของไวรัสตับอักเสบนิตเอและโรตาไวรัสที่ผ่านการเจือจาง 10 เท่าด้วยวิธี duplex RT-PCR

Lane 1 : 100 bp marker

Lane 2 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ:โรตาไวรัส (6.946×10^{10} : 4.335×10^{10} molecules/reaction)

Lane 3 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ:โรตาไวรัส (6.946×10^9 : 4.335×10^9 molecules/reaction)

Lane 4 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ:โรตาไวรัส (6.946×10^8 : 4.335×10^8 molecules/reaction)

Lane 5 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ :โรตาไวรัส (6.946×10^7 : 4.335×10^7 molecules/reaction)

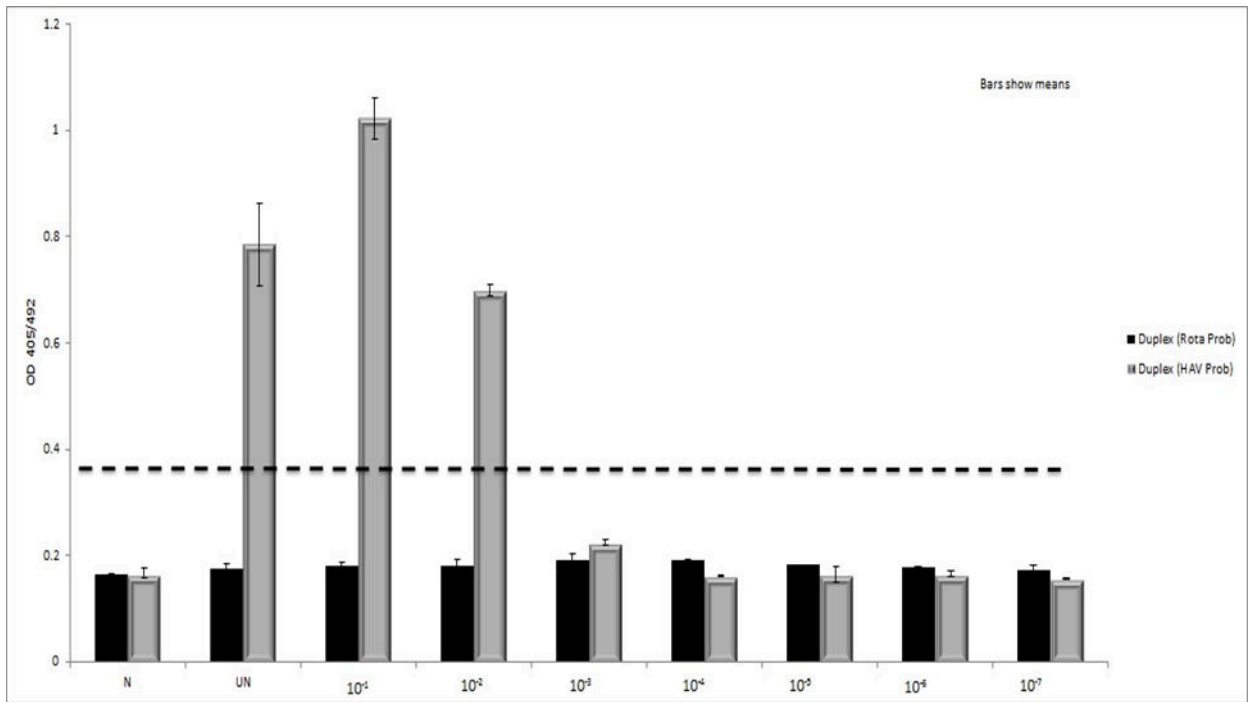
Lane 6 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ:โรตาไวรัส (6.946×10^6 : 4.335×10^6 molecules/reaction)

Lane 7 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ:โรตาไวรัส (6.946×10^5 : 4.335×10^5 molecules/reaction)

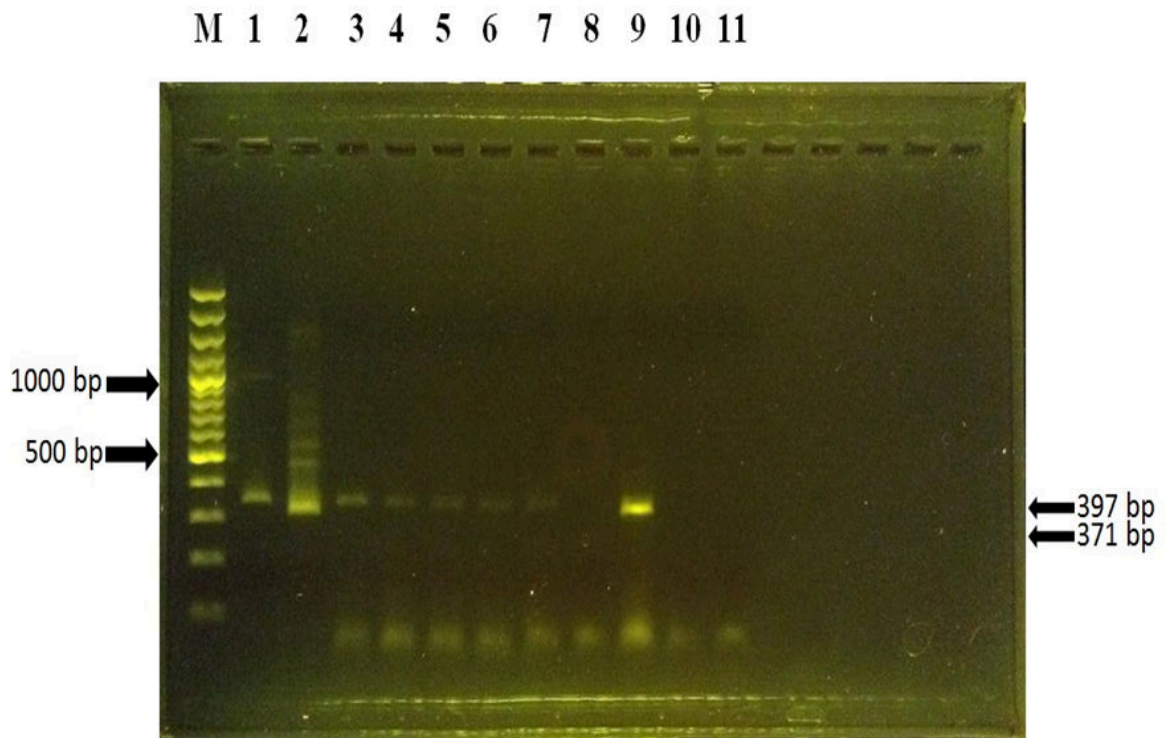
Lane 8 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ:โรตาไวรัส (6.946×10^4 : 4.335×10^4 molecules/reaction)

Lane 9 : ไวรัสตับอักเสบนิตเอ: โรตาไวรัส (6.946×10^3 : 4.335×10^3 molecules/reaction)

Lane 10 : dH₂O (Negative control)

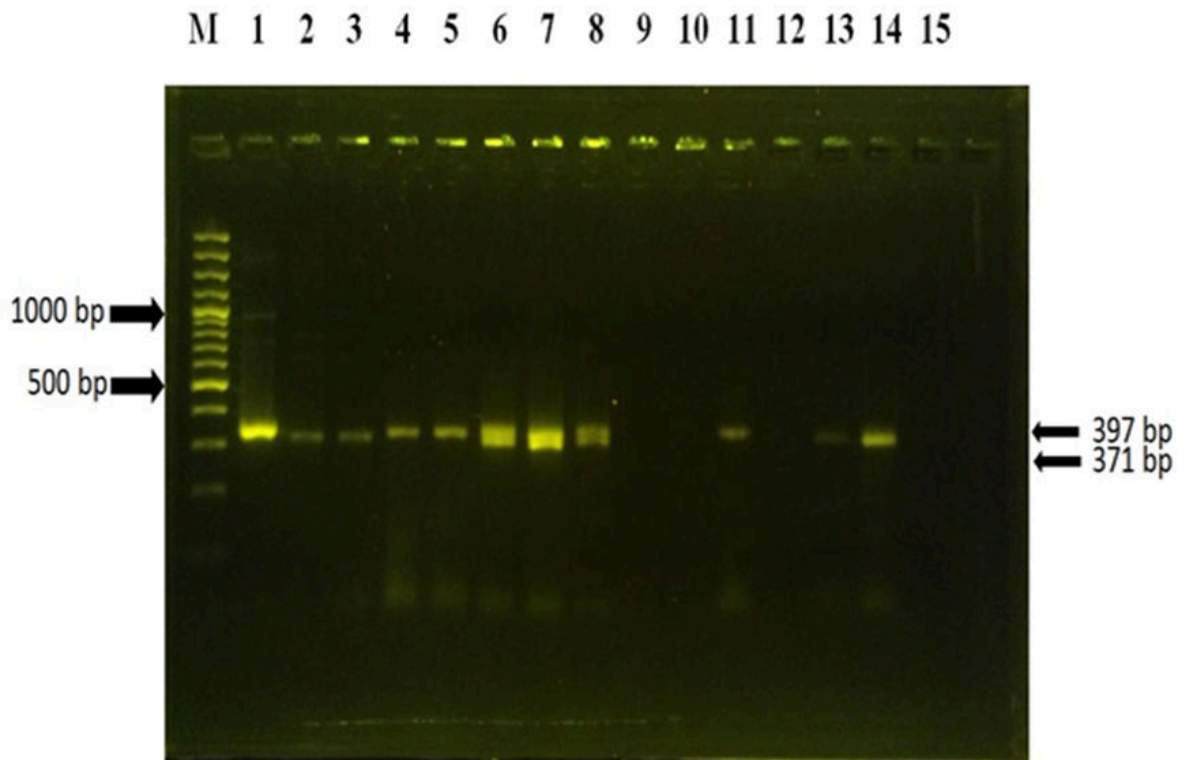


รูปที่ 4.9 การทดสอบความจำเพาะของผลผลิต cDNA จาก artificial template ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอและ/หรือโรตาไวรัสด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือ ที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่า โดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-off value เท่ากับ 0.3655 (N = negative control, UN = undiluted)



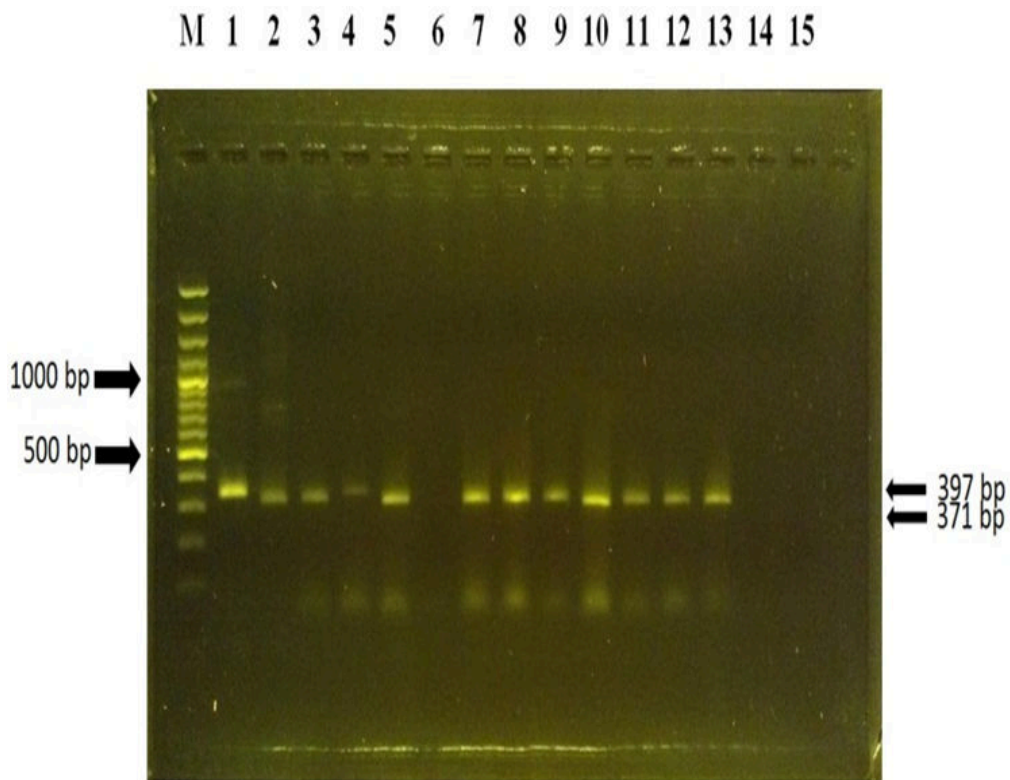
รูปที่ 4.10 วิธีNested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัส และ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บในเขตจังหวัดชลบุรี

Lane 1, rotavirus positive control; Lane 2, HAV positive control; Lane 3-10, ตัวอย่างที่ 1-8; Lane 11, N. โดยที่ M; 100 bp ladder marker, N, Negative control ที่ใช้น้ำแทน template



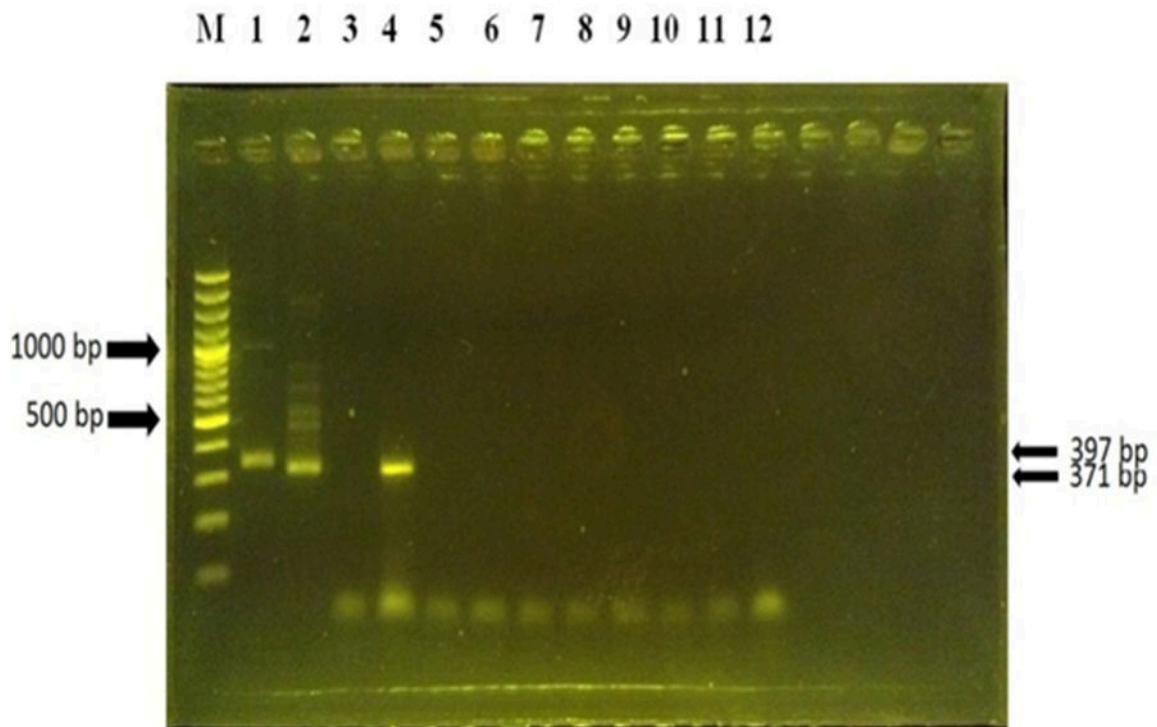
รูปที่ 4.11 วิธี Nested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัส และ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ใน ตัวอย่างหอยนางรมที่เก็บจากตลาดหนองมน, จังหวัดชลบุรี

Lane 1: Rotavirus positive control; Lane 2, HAV positive control, Lane3-14, ตัวอย่างที่1-12;
Lane 15, N. โดยที่ M; 100 bp ladder marker, N, Negative control ที่ใช้น้ำแทน template



รูปที่ 4.12 วิธีNested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ โรตาไวรัส และ ไวรัสตับอักเสบบชนิดเอ ใน ตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บอำเภอลำสนธิ, จังหวัดชลบุรี

Lane 1, Rotavirus positive control; Lane 2, HAV positive control; 3-14, ตัวอย่างที่1-12; Lane 15, N. โดยที่ M; 100 bp ladder marker, N, Negative control ที่ใช้น้ำแทน template



รูปที่ 4.13 วิธี Nested PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของโรตาไวรัส และ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอในตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บจากจังหวัดระยองและจันทบุรี

Lane 1, Rotavirus positive control; Lane 2, HAV positive control; Lane 3-6, จังหวัดระยอง ตัวอย่างที่ 1-4; Lane 7-11, จากจังหวัดจันทบุรี ตัวอย่างที่ 1-5; Lane 12, N. โดยที่ M; 100 bp ladder marker, N, Negative control ที่ใช้น้ำแทน template

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบี เป็นเชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารต่างๆ โดยเฉพาะหอยนางรมสดที่มีวิธีการกินอาหารด้วยกรงคักอาหารที่อยู่ในน้ำในแหล่งเพาะเลี้ยงและสะสมไว้ในกระเพาะอาหาร หอยนางรมจึงอาจเป็นแหล่งสะสมของเชื้อก่อโรคได้หากมีการเพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสิ่งปนเปื้อนจากมนุษย์ การที่เชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารมีความคงทนในธรรมชาติเป็นเวลานาน ประกอบกับพฤติกรรมการบริโภคหอยนางรมแบบสดๆ หรือแบบดิบๆสุกๆ ที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสจากการบริโภคหอยนางรมสดได้

การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในหอยนางรมสดก่อนถึงผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการตรวจหาการปนเปื้อนยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในหอยนางรมอาจมีปริมาณที่น้อยมากวิธีที่ใช้ตรวจจึงต้องมีความไวสูงจึงจะสามารถตรวจพบได้ ปัจจุบัน วิธี RT-PCR เป็นวิธีที่นิยมมากเพราะเป็นวิธีที่ง่ายและใช้เวลารวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้โดยตรงจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมก่อนทั้งนี้เพื่อ concentrate อนุภาคของไวรัสที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดและเพื่อกำจัดสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของ RT-PCR ที่อาจให้ผลการตรวจเป็นผลลบปลอมได้และในทางตรงข้ามปฏิกิริยาของ RT-PCR อาจให้ผลบวกปลอมได้เช่นกันเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก จึงอาจมีการขยายเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมอื่นที่ปนเปื้อนมากถ้า primer ที่ออกแบบมาไม่มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมเป้าหมาย หรืออาจเกิด cross-contamination สารตัวอย่างด้วยสารพันธุกรรมชนิดเดียวกันได้ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR จึงควรยืนยันผลด้วยวิธีอื่นเสมอ

จากการทดสอบ primer ที่ออกแบบมาพบว่า External Primer คู่ของ primer VP7-F1 และ VP7-R952 ที่ใช้จับกับ genomic RNA ของไวรัสโรตาและ HAV-F230 และ HAV-R991 ใช้จับกับ genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอให้ขนาดแถบของ DNA เป็นไปตามที่คาดไว้ประมาณ 952 bp และ 762 bp ตามลำดับ (รูปที่ 4.1A) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า external primer ทั้งสองคู่มีความจำเพาะกับ genomic RNA เป้าหมายเนื่องจากถูกออกแบบให้จับที่บริเวณเอกลักษณ์ของยีนของไวรัสทั้งสองและได้มีการตรวจสอบผ่านการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI database แล้วว่าไม่จับกับไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารชนิดอื่นและสามารถใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ได้ อย่างไรก็ตามการที่จะสามารถยืนยันว่า primer ทั้งคู่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสเป้าหมายจริงๆ ควรมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบนำ primer ทั้งคู่ไปจับกับ food-borne virus ชนิดอื่นด้วย

จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา monoplex RT-PCR ในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมพบว่าคู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 ที่ใช้มีความสามารถในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 2.49 pg (รูปที่ 4.2, lane 6) และเมื่อใช้คู่ของ primer VP7-F1 และ VP7-R952 สามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสความเข้มข้นสุดท้ายที่ 82.8pg (รูปที่ 4.4, lane 4) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า คู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 มีความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอได้ดีกว่าคู่ของ primer VP7-F1 และ VP7-R952 ที่ใช้จับกับสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสประมาณ 35 เท่า ส่วนปฏิกิริยา duplex RT-PCR มีความไวในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสและไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอปริมาณน้อยที่สุดพอๆกันที่ 90 pg (รูปที่ 4.6, lane 4) เมื่อใช้ปริมาณ

ของสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองเริ่มต้นเท่ากัน อย่างไรก็ตามผลการทดสอบความไวของ duplex-RT PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมแบบ artificial template ของไวรัสทั้งสองชนิดกลับพบว่า duplex RT-PCR ตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิดเอได้น้อยกว่าโรตาไวรัส 10 เท่า (6.946×10^7 vs 4.335×10^6 molecules/reaction) (รูปที่ 4.8, lane 6 และ 7, ตามลำดับ) จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยา duplex PCR ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิด, ปริมาณของ primer และ ชนิดของ template เป็นต้น โดยในการทดสอบจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของคู่ primer ที่จับสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสมากกว่าของไวรัสตับอักเสบนิดเอ ($0.6 \mu\text{M}$ vs $0.4 \mu\text{M}$) เพราะสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสมีความผันแปรสูงกว่ามาก นอกจากนี้ยังขึ้นกับตัวแปรอื่นๆ ด้วย เช่น การตรวจวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ที่มีการส่องดูแถบของผลผลิตภายใต้แสง fluorescence ยังขึ้นกับความไวของสารที่ใช้ย้อม DNA ด้วย

เมื่อนำผลผลิตของ cDNA ทั้งหมดไปทดสอบความจำเพาะด้วยวิธี DNA-ELISA โดยเปรียบเทียบกับค่า cut-off value จากผลการทดลองพบว่าผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มีความจำเพาะ แต่ความไวมีความแตกต่างกันตามชนิดของสารพันธุกรรมของไวรัส โดยการตรวจสอบผลผลิตจาก monoplex RT-PCR สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิดเอได้ที่ 2.349 pg ซึ่งดีกว่าของโรตาไวรัสที่ 8.28 ng (รูปที่ 4.3 และ 4.5, ตามลำดับ) แต่เมื่อทดสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา duplex RT-PCR พบว่าความไวในการทดสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบนิดเอลดลงเป็น 900 pg ส่วนโรตาไวรัสที่ความไว 90 pg (รูปที่ 4.7) แต่เมื่อนำผลผลิตจาก artificial template ไปทดสอบหาความจำเพาะกลับไม่พบสัญญาณจากโรตาไวรัส พบเพียงความไวในการตรวจสอบไวรัสอักเสบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 6.946×10^6 molecules/reaction (รูปที่ 4.9) จากข้อสังเกตพบว่าค่าการดูดกลืนแสงในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิดพร้อมกันมีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้เมื่อใช้พันธุกรรมทีละชนิดหรือผลผลิตจาก monoplex RT-PCR และค่าการดูดกลืนแสงเมื่อใช้สารพันธุกรรมทั้งสองชนิดที่ยังถูกเจือจางมีค่าน้อยกว่าค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เมื่อเจือจางสารพันธุกรรมลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิดที่ยังไม่ได้รับการเจือจางมีปริมาณสารพันธุกรรมมากเกินไปและสารพันธุกรรมจาก nontarget อาจไปรบกวนปฏิกิริยา hybridization ที่เกิดจากการที่ probe ไปจับสารพันธุกรรมเป้าหมายทำให้สัญญาณจาก hybridization ลดลง แต่เมื่อเจือจางแล้วจะมีการรบกวน hybridization ลดลง ทำให้สัญญาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ปฏิกิริยา DNA-ELISA ยังขึ้นกับชนิดของ probe ที่ใช้ด้วย โดยในการทดลองนี้ต้องใช้ probe ที่จับจำเพาะกับ cDNA ของโรตาไวรัสที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงมาก ดังนั้น probe จึงถูกออกแบบเป็น degenerate probe ที่สามารถจับกับ cDNA ของโรตาไวรัสได้ แต่กลับได้สัญญาณที่มีค่าต่ำกว่าของไวรัสตับอักเสบนิดเอมาก (8.28 ng Vs 82.8 pg) (รูปที่ 4.3 และ 4.5 ตามลำดับ)

วิธี duplex RT-PCR และ nested PCR ได้ถูกนำมาใช้จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบนิดเอจากการตัวอย่างหอยนางรม จากแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง และจังหวัดจันทบุรี รวมทั้งสิ้น 41 ตัวอย่างจาก 2 ชุดตัวอย่าง พบว่าเกิดแถบของ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ในลักษณะ smear band (ไม่แสดงภาพ) แต่เมื่อนำไปทดสอบต่อด้วยวิธี Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไวรัสแต่ละชนิด พบว่าปรากฏแถบของ DNA ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบนิดเอ มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 397 bp และ 321 bp ตามลำดับ โดยพบว่าในบางตัวอย่างปรากฏแถบของ

DNA เพียง 1 แถบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหอยทะเลตามธรรมชาติอาจมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสโรตาหรือไวรัสตับอักเสบบี ชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสโรตาคิดเป็น 21.95% (9/41 ตัวอย่าง) และผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 34.15% (14/41 ตัวอย่าง) สำหรับมีบางตัวอย่างที่ปรากฏแถบของ DNA ทั้ง 2 แถบ น่าจะมีการปนเปื้อนของทั้งเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบี จากการทดสอบคิดเป็น 7.32% (3/41 ตัวอย่าง) ซึ่งจากรายงานการระบาดของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอจากฟาร์มและตลาดในประเทศไทย (Namsai et al, 2011) ที่พบว่ามีการปนเปื้อนด้วยไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอ ในตัวอย่างหอยนางรมที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง 3.8 % และในหอยแมลงภู่ 6.5% และยังมีรายงานว่า พบความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบีในหอยนางรมจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี อยู่ที่ 3.3% และ 0.9% ตามลำดับ (Kittigul et al, 2008) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระบบการเลี้ยงและความสะอาดของน้ำที่แตกต่างกันจึงทำให้หอยนางรมในภาคตะวันออกมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสมากกว่า สำหรับตัวอย่างหอยที่ไม่ปรากฏแถบ DNA ใดๆ เลย มีความเป็นไปได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในหอย หรือมีความเป็นไปได้ว่าการสกัดยังมีการปนเปื้อนของ RT-PCR inhibitor ที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา RT-PCR ดังนั้นจึงควรยืนยันว่าเป็นผลลบจริงด้วยการใช้ internal control primer ซึ่งเป็น primer ที่จะจับกับ Housekeeping gene มาทำปฏิกิริยากับตัวอย่างหอย เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว

การทำปฏิกิริยา Nested-PCR อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมขึ้นได้ โดยอาจจะเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงที่มีการเตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยารวมถึงการดูแลห้องสำหรับทำปฏิกิริยา แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบการปนเปื้อนระหว่างการทำปฏิกิริยา โดยพิจารณาจากหลอดควบคุม (Negative control) ซึ่งไม่ปรากฏแถบของ cDNA และการปรากฏ pattern ของ DNA band ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีความแตกต่างกัน การนำผลผลิตจากปฏิกิริยา nested PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing จะเป็นการยืนยันผลการปนเปื้อนได้ จากผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปเทียบกับฐานข้อมูล สามารถยืนยันได้ว่าสารพันธุกรรมที่พบในหอยนางรมธรรมชาติเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบบี จริงโดยโรตาไวรัสทั้งหมดที่ปนเปื้อนมี genotype G1[8] แต่ไม่สามารถบอก genotype ของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอได้เนื่องจากบริเวณที่เพิ่มขยายสารพันธุกรรมไม่ใช่บริเวณที่ใช้แยก genotype ของไวรัสชนิดนี้

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการทำ DNA-ELISA แม้มีข้อดีที่ในการตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา monoplex RT-PCR แต่ความไวอาจไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้จากผลผลิตของปฏิกิริยา duplex RT-PCR เพราะสารพันธุกรรมจาก nontarget อาจไปรบกวนการปฏิกิริยา hybridization ทำให้การวัดปริมาณมีความคลาดเคลื่อนได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบ genotype ของไวรัสที่ปนเปื้อนได้ หากต้องการตรวจสอบ genotype แล้วจำเป็นต้องใช้วิธี duplex RT-PCR ร่วมกับวิธี Nested-PCR ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาการระบาดของเชื้อด้วย

ปัญหาและอุปสรรค

การทำปฏิกิริยา DNA-ELISA จำเป็นต้องใช้ชุดทดสอบที่มีราคาแพงมากทำให้เป็นอุปสรรคในการทำสารตัวอย่างหลายๆ ครั้ง นอกจากนี้ต้องการผู้ทำการทดลองที่มีทักษะสูงเพื่อให้ผลมีความผันแปรต่ำ

บรรณานุกรม

1. Bosch, A., Shields, P.A. Survival of hepatitis A virus and poliovirus in seawater and marine sediments. *Abstr Ann Mtg Am Soc Microbiol.* 1987; p295.
2. Bridger, J.C. 1994. Non-group A rotaviruses. In: Kapikian, A.Z. (E.d.) *Viral infections of the Gastrointestinal Tract.* Marcel Dekker, New York, pp. 369-407.
3. Chaharaein, B., Omar, A.R., Aini, I., Yusoff, K., Hassan, S.S. Detection of H5, H7 and H9 subtypes of avian influenza viruses by multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Microbiol. Res.* 2009; 164: 174-179.
4. Ciocca, M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* 2000; 18: Suppl 1: S71-4.
5. Coelho, C., Vinatea, CEB, Heinert, A.P., Simoes, CMO and Barardi, CRM. Comparison between specific and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for detection of hepatitis avirus, poliovirus and rotavirus in experimentally seeded oysters. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,* 2003; 98: 465-468.
6. Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A., Toti, L. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 87: 884:888
7. Cromeans, T., Nainan, O.V., Fields, H.A., Favorov, M.O., Margolis, H.S.. Hepatitis A and E viruses. In "Foodborne Disease handbook: Vol 2. Diseases caused by viruses, parasites, and fungi," eds. Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell, and D.O. Cliver, 1994. pp 1-56. Marcel Dekker, New York.
8. De Chastonay, J., and Siegel, G. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* 1987; 157: 268-275.
9. De Leon, R., Matsui, S.M., Baric, R.S., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., Sobsey, M.D. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:3151-3157.
10. Dix, A.B., and Jaykus, L.A. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. *J. Food. Prot.* 1998; 61:458-465
11. Drebot, M.A., Lee, S.H. RT-PCR detection of RNA viruses in stool specimens. *Biotechniques.*1997; 23: 616-618.
12. Dubois, E., Leguyader, F., Haugarreau, L., Koecka, H., Cormier, M., Pommerpuy, M. 1997. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1794-1800.

13. Enriquez, R. Frosner, G.G., Hochstein-Mintzel, V., Riedemann, S., Reinhardt, G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J. Med. Virol.* 1992; 37: 174-179.
14. Fach , Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaigharatz C, Botella L, Gourreau JM, Carlin F, Popoff MR,4 and Broussolle V. Detection by PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of *Clostridium botulinum* in Fish and Environmental Samples from a Coastal Area in Northern France. *Appl. Env. Microbiol.* 2002; 68: 5870-5876
15. Gajardo, R., Bouchriti, N., Pinto, R.M., Sato, T., Bosch, A., 1995. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3460-3462.
16. Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G., Lees, D.N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 858-863
17. Halliday, M.L., Kang, L.Y., Zhou, T.K., Hu, M.D., Pan, Q.C., Fu, T.Y., Huang, Y.S., and Hu, S.L.. 1991. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in changhai, China. *J. Infect. Dis.* 164; 852-859.
18. Hardy, M.E., Kramer, S.F., Treanor, J.J., Ester M.K. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype snow mountain agent. *Ach Virol.* 1997; 142: 197-202.
19. Hong Y, Berrang ME, Liu T, Hofacre CL, Sanchez S, Wang L, and Maurer JJ. Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enteric* on Poultry Carcasses by Using PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Appl. Env Microbiol.* 2003; 69: 3492-3499.
20. Honma, s., Nakata, S., Kinoshita-Numata K., Kogawa, K., Chiba, S. Evaluation of 9 sets of PCR primers in the RNA dependent RNA polymerase region for detection and differentiation of members of the family Caliciviridae, Norwalk virus and Sapporo virus. *Microbiol. Immunol.* 2000; 44: 411-419.
21. Hye-Jin K and Cho JC. Rapid and Sensitive Detection of *Listeria monocytogenes* Using a PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008;18: 1858–1861.
22. Intamaso U. and Withaya P. Rapid detection of hepatitis A viruses in the eastern coast of Thailand. *J. Science Technology and Humanities* 2011; 9: 9-17.
23. Intamaso U. and Ketkhunthod S. Evaluation of a sensitive reverse transcription PCR-enzyme linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A virus in oysters (*Saccostrea glomerata*) on the east coast of the Gulf of Thailand. *Journal of Food Protection.* 2014; 77:859-63.

24. Jaykas, L.A., Hemard M.T., Sobsey, M.D. Human enteric pathogenic viruses. In: Hackney C.R., Pierson M.D., editors. Environmental indicators and shellfish safety. New York: Chapman and Hall. 1994. P92-153.
25. Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Esters M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 1992; 66: 6527-6532.
26. Jung, K. and Chae, C. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe. *J. virol. Methods* 2005; 123: 141-146.
27. Kingsley, D.H., and Richards, G.P. Rapid and efficient extraction methods for reverse transcription-PCR detection of Hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67; 4152-4157.
28. Kittigul L, Pombubpa K, Rattanatham T, Diraphat P, Utrarachkij F, Pungchitton S, et al. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol.* 2008; 122:204-10.
29. Kou, X., Wu, Q., Wang, D., and Zhang, J. Simultaneous detection of norovirus and rotavirus in oysters by multiplex PCR RT-PCR. *Food control* 2008; 19: 722-726.
30. Lees, D. Viruses and bivalve shellfish. *Inter. J. Food Microbiol.* 2000; 81-116.
31. Lemon, S.M., and Robertson, B.H. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Semin. Virol.* 1993; 4: 285-295.
32. Lopez-Sabater, E.I., Deng, M.Y., and Cliver, D.O. Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) for detection of hepatitis A virus (HAV) in American oyster (*Crassostrea virginica*). *Letters in Applied microbiology.*1997; 24: 101-104.
33. Metzger-Boddien C and Kehle J. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA for Detection of Adenoviruses in Feces. *Intervirology* 2005;48:297-300.
34. Milne SA, Gallacher S, Cash P, Porter AJ. A reliable RT-PCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *J Virol Methods.* 2006;132:92-6.
35. Milne SA, Gallacher S, Cash P, Lees DN, Henshilwood K, Porter AJ. A sensitive and reliable reverse transcriptase PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human pathogenic viruses in bivalve molluscs. *J. Food Prot.* 2007;70:1475-82.
36. Monceyron, C. and Grinde, B. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J. Virol. Methods.* 1994; 6: 157-166.

37. Morales-Rayas R, Wolffs PFG, and Griffiths MW. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 139, 48-55.
38. Musiani, M. Venturoli, S., Gallinella, G., Zerbini, M. Quantitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. *Nat. Protoc.* 2007; 2: 2502-2510.
39. Nainan, OV., Xia, GL., Vanghan, G., Margolis, HS. Diagnostic of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 63-79.
40. Namsai A, Louisirochanakul S, Wongchinda N, Siripanyaphinyo U, Virulhakul P, Puthavathana P, Myint KS, Gannarong M, Ittapong R. Surveillance of hepatitis A and E viruses contamination in shellfish in Thailand. *Letter Applied Microbiology* 2011 ;53:608-13.
41. Poddar, S.K., Espina, R., Schnurr, D.P., Evaluation of a single-step multiplex RT-PCR for influenza virus type and subtype detection in respiratory samples. *J. Clin. Lab. Anal.* 2002; 16: 163-166.
42. Puppe, W., Weigl, J.A., Aron, G., Grondahl. B., Schmitt, H.J., Niesters, H.G., Groen, J. Evaluation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of nine respiratory tract pathogens. *J. Clin. Virol.* 2004; 30: 165-174.
43. Rayas, RM., Wolffs, PFG, and Griffiths, MW. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *Inter. J. Food. Microbiol.* 2010; 139:48-55.
44. Rodgers, F.G. Concentration of viruses in faecal samples from patients with gastroenteritis. In: Goddard M, Buttler M, editors. *Viruses and wastewater treatment.* New York: Pergamon Press. 1981. P 15-18.
45. Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 1992; 17: 37-45
46. Safarik, I., Safarikava, M., and Forsythe, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology.* 1995; 78: 575-585.
47. Santos, N., Honma, S., Timenetsky Mdo., C., Linhares, A.C., Ushijima, H., Armah, G.E., Gentsch, .R., Hoshino, Y. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46: 462-469.
48. Schwab, K.J., Neill, F.H., Guyader, F.L., Esters, M.K., and Atmar, R.L. Development of a reverse transcriptase-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:742-749.
49. Scotter JM and Chambers ST. Comparison of Galactomannan Detection, PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Real-Time PCR for Diagnosis of Invasive

- Aspergillosis in a Neutropenic Rat Model and Effect of Caspofungin Acetate. *Clin. Diag. Lab Immunol.* 2005; 12: 1322-1327.
50. Shieh , Y.C., Calci, K.R., and Baric, R.S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 4709-4714.
 51. Shieh, Y.C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, III W., Baric, R.S. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J. Infect. Dis.* 2000; 181(S2): S360-366.
 52. Sorber, C.A. 1983. Removal of viruses from waste water and effluent by treatment processes. In Berg, G., (Ed.), *Viral pollution of the Environment.* CRC press, Boca Raton, FL, pp. 39-52.
 53. Sow, A, Sidibé, I, Desquesnes, M, Bengaly, Z. and Pangui, L.J The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma congolense* type savannah (TCS) in bovine blood samples. *Tropical Biomedicine* 2006; 23: 123-129.
 54. Straub, T.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 1994; 40: 884-888.
 55. Tahk, H., Lee, M.H., Lee, K.B., Cheon, D.S. and Choi, C. Development of duplex RT-PCR-ELISA for the detection of hepatitis A virus and hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 2011; 175: 137-140.
 56. Tsai, Yu-Li, Tran, B., Sangermano, L.R., and Palmer, C. Detection of poliovirus, hepatitis virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 1994; 60: 2400-2407.
 57. Wilde, J., Eiden, J., Yolken, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1300-1307.
 58. Zoll, G.J., Melchers, W., Kopecka, H., ambroesm G., van der Poel, H., Galama, J.M. General primer-mediated opolymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *Clin. Microbiol.* 1992; 30:160-165.
 59. World Health Organization (WHO). Hepatitis A Fact sheet 28 July 2012
 60. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/>