การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ จากหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*) ในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

(Detection of Viral Genome of Hepatitis A Virus from Oyster (*Saccostrea commercialis*) in Angsila, Chonburi Province by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

มนสิชา บุญศิริ

โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีการศึกษา 2551

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การป้องกันและการควบคุม 17
การรักษา 17
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับหอยนางรม 18
การดำรงชีวิตของหอยนางรม 19
การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 20
การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงและดู CPE 20
การตรวจหาจำนวนอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบ 21
Plaque assay 21
เทคนิคทางอนูชีววิทยา 22
Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 22
การวิเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis 23
เทคนิค Southern blot hybridization 23
3. วิธีดำเนิน 26
การเพาะเลี้ยง Fetal rhesus monkey kidney (Frhk-4) cells 26
การนับเซลล์ 26
การเตรียมเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (Stock HAV) 27
การสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ด้วยวิธี Acid-adsorption alkaline elution 27
การสกัด RNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 28
Reverse Transcription-Polymerase Chain 29
การวิเคราะห์ Nucleotide ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR 32
เตรียม 1.2% agarose gel 32
ตรวจสอบความยาวของ Nucleotide ของ cDNA band 32
วิธี Southern blot hybridization 34
การทดสอบประสิทธิภาพการโอนย้าย cDNA 36
โดยการย้อมสี agarose gel ด้วย syber gold 36
การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบในหอยนางรมสดตามธรรมชาติ (ชลบุรี) 36
การเตรียมตัวอย่างหอยนางรมสด 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบในหอยนางรมสดจาก ต.อ่างศิลา จ.ชลบุรี 36

4. ผลการวิจัย 37

1. Pure HAV genome 37

ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (A) 38

แสดงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (B) 39

2. การตรวจสอบขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR ที่น้อยที่สุดที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด 40

ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (1,10,100 ul) 41

แสดงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (B) 42

ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (1:10,1:100,1:1000) 42

3. ตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบในหอยนางรมสดตามธรรมชาติ (จ.ชลบุรี) 43

ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (เนื้อหอย) 44

ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR (digestive tract) 45

5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 46

อภิปรายผลการทดลอง 46

สรุป 47

ข้อเสนอแนะ 48

เอกสารอ้างอิง 49

ภาคผนวก 52

ประวัติย่อของผู้วิจัย 61

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2-1 แสดงอัตราส่วนอาการที่พบในผู้ป่วยโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลัน ในช่วงการระบาด ที่ จ.นครศรีธรรมราช 14

3-1 แสดงส่วนประกอบในแต่ละ Reaction สำหรับการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR................. 30

3-2 แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม RT-PCR...................................... 31

สารบัญภาพ

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงรูปร่างและลักษณะทั่วไปของ hepatitis A virus 8
2.2 แสดงยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ 10
2.3 แสดงประเทศที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ 16
2.4 แสดงลักษณะโครงสร้างของเปลือกหอยนางรม 18
2.5 แสดงทิศทางการเคลื่อนที่เข้าและออกของอาหารหลังจากที่มีการกรองเข้าในตัวหอยขณะอ้าปากกินแพลงตอนน้ำ 19
2.6 (a) แสดงโครงสร้างอวัยวะภายในของหอยสองฝา (b) แสดงโครงสร้างของท่อทางเดินอาหาร 20
2.7 แสดง BS-C1 cell ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ 21
2.8 แสดงลักษณะ hepatitis A virus plaque assay 22
2.9 แสดงกระบวนการ denaturation และ renaturation ของ DNA 24
2.10 แสดงกระบวนการ Southern blot hybridization 25
2.11 Petroff – Hausser counting chamber 27
2.12 แสดงวิธีการเตรียม agarose gel 32
2.12 แสตงวิธี load DNA ลงใน agarose gel 32
3.4 แสดงการแยก DNA โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis 33
3.5 แสดงวิธีตรวจสอบความจำเพาะของ cDNA band โดยเทคนิควิธี Southern blot hybridization 35
4.1 แสดงผลผลิด cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ pure HAV genome 38
4.2 แสดงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization เมื่อใช้ pure HAV genome 39
4. 3 แสดงผลผลิด cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR และแสดงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค Southern blot hybridization จากเนื้อหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย HAV viruses ที่ปริมาณต่าง ๆ 41
4.4 แสดงผลผลิต cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ที่สกัดได้จากเนื้อหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่ถูกทำให้ปนเปื้อน

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

ด้วย HAV viruses ที่เจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ 42
4.5 แสดงผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ที่สกัดจากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือน 44
4.6 แสดงผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ที่สกัดจากส่วนเนื้อของหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรีในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือนและตรวจสอบ.......... 45

อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และคณะกรรมการสอบปากเปล่า ได้พิจารณาแล้ว มีความเห็นสมควรรับโครงงานวิจัยดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานวิจัย

..........อุไรวรรณ อินทมาโส.......... ประธาน

(ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..........อุไรวรรณ อินทมาโส.......... ประธาน

(ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส)

.... กรรมการ

(ดร. วิฑูร ขาวสุข)

.... กรรมการ

(อาจารย์กุลวรา พูลผล)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พิจารณาโครงงานวิจัยดังกล่าวแล้ว เห็นสมควรอนุมัติให้โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.... หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

(ดร. วิโรจน์ อรุณนพรัตน์)

วันที่....22.........เดือน....พฤษภาคม..............................พ.ศ. 2552

ประกาศคุณูปการ

โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส ซึ่งเป็นที่ปรึกษาโครงงานวิจัยฉบับนี้ โดยท่านได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมาก ในการแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างทำการวิจัยรวมทั้งแนะนำเทคนิคในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และการทำวิจัยทุกขั้นตอนอย่างละเอียด อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ทั้งทักษะที่ถูกต้องในการทำงานวิจัย การวางแผนงานการวิจัย ความซื่อสัตย์ต่อการเป็นนักวิจัย แนะนำและแก้ไขแนวการเขียนโครงงานวิจัยให้ถูกต้องสมบูรณ์ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยได้รับแนวทางและประสบการณ์อย่างกว้างขวางในการทำโครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้ ทำให้สามารถตัดสินใจแก้ปัญหาเฉพาะหน้าได้เป็นอย่างดี จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ ดร.วิทูร ขาวสุข และ อ.กุลวรา พูลผล ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษาแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนเป็นคณะกรรมการสอบปากเปล่าโครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้ให้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.วีรชัย เอื้อสิทธิชัย อาจารย์ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ เพื่อนๆนิสิตชั้นปีที่ 4 รุ่นที่ 6 รุ่นพี่และรุ่นน้อง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุก ๆ คน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือรวมทั้งเป็นกำลังใจให้สามารถผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้อง และท่านผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุก ๆ เรื่องและเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

มนสิชา บุญศิริ
19 เมษายน 2552

48034861: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์การแพทย์; วท.บ. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)
คำสำคัญ: RT-PCR/ HAV/ *Saccostrea commercialis*

มนสิชา บุญศิริ: การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสดับอักเสบเอ จากหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*) ในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (DETECTION OF VIRAL GENOME OF VIRAL OF HEPATITIS A VIRUS FROM OYSTER (*SACCOSTREA COMMERCIALIS*) IN ANGSILA, CHONBURI PROVINCE BY REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION) อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานวิจัย: อุไรวรรณ อินทมาโส, Ph.D. 61 หน้า. ปี พ.ศ. 2551

บทคัดย่อ

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ใช้ในการตรวจหา ribonucleic acid (RNA) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนในอาหาร แต่เทคนิคนี้ไม่สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสดับอักเสบเอ ได้โดยตรงเนื่องจากในอาหารมักประกอบไปด้วยสิ่งที่เป็น RT-PCR inhibitor ซึ่งอาจทำให้ไม่เกิดผลหรือเกิดเป็นผลลบปลอม (false negative) ได้ดังนั้นจึงต้องกำจัด RT-PCR inhibitor โดยการแยกเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ออกมาจากอาหารด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method และทำให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น แล้วจึงค่อยนำมาสกัด nucleotide ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ จากนั้นนำไปทำ RT-PCR ต่อไป งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อตรวจหาขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) และเมื่อทราบขีดความสามารถของเทคนิค RT-PCR แล้วจึงนำไปใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสดที่วางขายในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้เทคนิค RT-PCR แล้วตรวจสอบความจำเพาะของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization จากผลการทดลองพบว่า เทคนิค RT-PCR สามารถใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่ถูกทำให้เข้มข้นด้วยวิธี acid-adsorption alkaline elution ได้น้อยที่สุดที่ปริมาตร 1 µl และเมื่อนำไปตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่เก็บจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี พบว่าไม่พบ cDNA band ใดเลยทั้งส่วนที่เป็นเนื้อและส่วน digestive tract ของหอยนางรมสด แต่อย่างไรก็ตามไม่ได้หมายความว่า ไม่มีเชื้อไวรัสดับอักเสบเอ ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรมสดที่ตรวจสอบ แต่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสดับอักเสบเอ อยู่ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 µl ดังนั้นจึงตรวจไม่พบ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ .... ก
สารบัญ .... ข
สารบัญตาราง .... จ
สารบัญภาพ .... ฉ
- 1. บทนำ 1
  - ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
  - วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
  - สมมติฐานของการวิจัย 3
  - ขอบเขตการวิจัย 3
  - ผลที่คาดว่าจะได้รับ 4
  - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
- 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5
  - ความรู้ทั่วไปโรคตับอักเสบ 5
    - โรคตับอักเสบ 5
  - ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคตับอักเสบ เอ (Hepatitis A Disease) และ (HAV) 5
    - โรคตับอักเสบ เอ 5
    - ประวัติการค้นพบเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 6
    - คุณสมบัติของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 7
    - ลักษณะโครงสร้างและโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อไวรัส 8
    - องค์ประกอบของ Genome ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 9
    - การแบ่งตัว (Mode of replication) 11
    - ลักษณะและกลไกลการเกิดโรคของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 12
    - อาการและอาการแสดง 13
    - การแพร่ระบาดของไวรัสตับอักเสบเอผ่านหอยนางรม 15
    - ภูมิคุ้มกันของร่างกาย 17

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไวรัสในกลุ่ม enterovirus ที่ติดต่อผ่านทางอาหาร ซึ่งเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขทั่วโลก (Koopmans and Duizer, 2004) เพราะการติดเชื้อไวรัสในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมของผู้บริโภคที่ชอบบริโภคหอยแบบสุก ๆ ดิบ ๆ เช่น หอยนางรม หอยลาย หอยแมลงภู่ และหอยแครง (Sanchez et al., 2002; Le Guyader et al., 2006) สำหรับ Hepatitis A virus (HAV) เป็นไวรัสที่สำคัญในกลุ่มนี้ซึ่งอยู่ใน Family Picornaviridae Genus Hepatovirus และมียีโนมเป็น single stranded RNA ที่มีขนาดอนุภาคเส้นผ่าศูนย์กลาง 27 ถึง 32 นาโนเมตร ไม่มีชั้นไขมันห่อหุ้ม (non-enveloped virus) ซึ่งพบการแพร่กระจายเป็นครั้งแรกในปี 1955 ที่ประเทศสวีเดน (Sanchez et al., 2002) พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร

จากข้อมูลของภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รายงานว่า เชื้อไวรัสตับอักเสบเอ สามารถก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ถึง 69% ซึ่งผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อไวรัสนี้จะมีอาการ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้อาเจียน และอาจมีไข้ ปัสสาวะสีเข้ม ปวดท้องบริเวณชายโครงขวา ตัวเหลือง ตาเหลือง อุจจาระในผู้ป่วยบางคนมีสีซีดเมื่อตรวจร่างกายพบว่า มีดีซ่าน ตับโต และเจ็บ ซึ่งอาการเหล่านี้เกิดขึ้น เนื่องจากการรับประทานอาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคหอยนางรมแบบสุก ๆ ดิบ ๆ โดยเชื้อไวรัสนี้สามารถปนเปื้อนในหอยได้ทุกขั้นตอนตั้งแต่ การเพาะเลี้ยง การเก็บ การปรุงแต่ง ไปจนถึงการบริโภคเนื่องจากหอยนางรมจะคอยดักอาหารและเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนมากับแหล่งน้ำ ซึ่งไวรัสจะเข้าไปสะสมอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารของหอยเป็นจำนวนมาก เมื่อนำหอยนางรมเหล่านี้มาปรุงเป็นอาหารที่ไม่สุกหรือให้ความร้อนที่ไม่เพียงพอเชื้อไวรัสจะแพร่กระจายเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของคน จากนั้นเชื้อไวรัสจะเข้าไปเจริญเพิ่มจำนวนในลำไส้และตับของคน จากนั้นถูกขับออกมาทางอุจจาระเพื่อแพร่เข้าสู่สิ่งแวดล้อมต่อไป ด้วยคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาวะแวดล้อมและอุณหภูมิสูงได้ดี โดยสามารถคงทนในหอยนางรมที่ปนเปื้อนได้นาน 671 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและ 25 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Melnick et al., 1980) และมีระยะฟักตัวยาวนานถึง 4 สัปดาห์ก่อนปรากฏอาการออกมา จึงทำให้สามารถติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ง่าย เนื่องจากผู้ประกอบอาหารที่ติดเชื้อไวรัสแต่อาการยังไม่ปรากฏ และมีสุขลักษณะในการขับถ่ายที่ไม่ถูกต้อง โดยไม่ได้ล้าง

มือหลังจากการใช้ส้วมแล้วมาหยิบจับอาหาร ทำให้ไวรัสที่ติดตามซอกเล็บหรือนิ้วมือปะปนลงไปในอาหารและแพร่ไปยังผู้อื่นได้ (Bidawid et al., 2000)

สำหรับในประเทศไทยพบการระบาดของ HAV ครั้งใหญ่ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายน ในปี 2535 และยังตรวจพบ HAV ในแหล่งน้ำต่าง ๆ อีกมากมาย (Kittigul et al., 2000, 2005) ซึ่งหมายความว่า ประชากรในประเทศไทยมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อ อันเนื่องมาจากการบริโภคอาหารและน้ำที่มีการปนเปื้อนไวรัสชนิดนี้อยู่ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจหาไวรัสที่ปนเปื้อนมากับอาหาร โดยเฉพาะในหอยนางรมซึ่งในอดีตสามารถตรวจหาไวรัสได้โดยการใช้ cell culture โดยดูจาก Cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้นแต่เป็นวิธีที่มีความไวต่ำต้องมีไวรัสจำนวนมากจึงจะสามารถตรวจพบได้และ HAV เพิ่มจำนวนได้ยากใน cell culture และไวรัสไม่ก่อให้เกิด Cytopathic effect (CPE) (Coelho et al., 2003) ดังนั้นวิธีการตรวจทางอณูชีววิทยาที่เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหายีโนมของ HAV จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการตรวจหาไวรัสในหอยนางรมตัวอย่างเพราะเป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อยและมีความไวสูงมาก

ในปัจจุบันการตรวจทางอณูชีววิทยามีได้หลายวิธีแต่วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจหายีโนมของ HAV ได้แม้มีปริมาณน้อย ซึ่งวิธีนี้สามารถเพิ่มจำนวนยีโนมของไวรัสได้ในปริมาณมากในช่วงเวลาสั้น ๆ ทำให้ตรวจพบได้ง่าย แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้เพียงอย่างเดียว เนื่องจากในหอยมักมีการปนเปื้อนของส่วนประกอบอื่น ๆ จำนวนมาก ซึ่งมักมีผลยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR ทำให้การตรวจเกิดผลลบปลอมได้ จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนแยกสารยับยั้งเหล่านั้นออกก่อนนำไปทำปฏิกิริยา นอกจากนี้การปนเปื้อนด้วยยีโนมของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารอื่นอาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธี hybridization ร่วมด้วย ซึ่งวิธีนี้เป็นการนำ probe ที่จำเพาะต่อ HAV มาจับกับผลผลิตที่ได้จาก RT-PCR เพื่อเป็นการยืนยันผลบวกที่ได้จาก RT-PCR อีกขั้นหนึ่งด้วย จากโครงงานวิจัยนี้จึงเป็นการใช้วิธี RT-PCR ร่วมกับ hybridization ในการตรวจหาการปนเปื้อนของ HAV ในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงการระบาดของ HAV ในหอยนางรมสดที่วางจำหน่ายอยู่ เพื่อเป็นการป้องกันการระบาดของ HAV อย่างไรก็ตามการป้องกันการติดเชื้อ HAV ที่ดีที่สุดคือ การระมัดระวังสุขนิสัยในการขับถ่าย การล้างมือให้สะอาดก่อนรับประทานอาหาร หรือปรุงอาหารรวมทั้งการรับประทานอาหารที่ผ่านการปรุงให้สุกก่อน เพื่อลดอัตราเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อตรวจสอบขีดความสามารถ (detection limit) ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method และเทคนิค RT-PCR

2.เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้การสกัดหอยด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method และเทคนิค RT-PCR

3.ตรวจสอบความจำเพาะของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization

สมมติฐานของการวิจัย

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดน่าจะทราบขีดความสามารถของเทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสปริมาณน้อยที่สุดที่ปนเปื้อนได้ และเมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับเทคนิค Southern blot hybridization ก็น่าจะพิสูจน์ความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสด (*S. comercialis*) ที่อาจปนเปื้อนจากแหล่งเพาะเลี้ยงในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ได้

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสด โดยเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ FrhK-4 cell แล้วนำเชื้อไวรัสไปใส่ในหอยนางรมสดในปริมาณที่แตกต่างกัน เพื่อหาขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดและใช้เทคนิค RT-PCR ร่วมกับเทคนิค Southern blot hybridization ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ที่สะสมในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม-ตุลาคม พ.ศ. 2551

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงขีดความสามารถของการสกัดหอยนางรมด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method และเทคนิค RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมปริมาณที่น้อยที่สุดที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดได้ และสามารถนำเทคนิค RT-PCR นี้ไปตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสดจากแหล่งเพาะเลี้ยงได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ปนเปื้อนมากับอาหารให้สะดวก รวดเร็วขึ้น เพื่อควบคุมคุณภาพของหอยนางรมก่อนนำมาบริโภคและใช้เป็นแนวทางควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมได้

บทที่ 2

เอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคตับอักเสบ

โรคตับอักเสบ (Hepatitis Disease)

โรคตับอักเสบ (Hepatitis Disease) ถือเป็นโรคติดเชื้อที่รุนแรงและเรื้อรัง สามารถพบได้ทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ซึ่งเป็นปัญหาทางสุขภาพที่สำคัญของโลกโดยพบว่า มีประชากรจำนวนหลายร้อยล้านคนที่ป่วยเป็นโรคนี้ สาเหตุของโรคตับอักเสบที่พบบ่อยที่สุดมาจากการติดเชื้อไวรัส ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบอยู่ 6 ชนิด ได้แก่ A, B, C, D, E, G (Melnick et al., 1980)

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคตับอักเสบเอและไวรัสตับอักเสบเอ

โรคไวรัสตับอักเสบเอ (Hepatitis A Disease)

โรคไวรัสตับอักเสบเอ เป็นกลุ่มอาการเจ็บป่วยที่เกิดจากการที่ร่างกายได้รับเชื้อ Hepatitis A Viruses (HAV) ที่อยู่ในตระกูล *Picornaviridae* (Picornaviruses) เชื้อไวรัสชนิดนี้จะทำให้เกิดการติดเชื้อเฉียบพลันเท่านั้นแต่จะไม่พบตับอักเสบเรื้อรังในผู้ป่วยโรคตับอักเสบเอ ซึ่งในอดีตมักพบค่อนข้างสูงในเด็กอายุระหว่าง 5-14 ปี โดยเด็กที่ป่วยมักไม่มีอาการหรืออาการไม่รุนแรงแต่ทำให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อคนเมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ แต่ปัจจุบันการสาธารณสุขดีขึ้นจำนวนเด็กที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ มีน้อยลง จึงส่งผลให้เมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ก็จะไม่มีภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้ ซึ่งผู้ใหญ่ที่ป่วยเป็นโรคไวรัสตับอักเสบเอ จะมีอาการรุนแรงกว่าผู้ป่วยเด็กอย่างเห็นได้ชัด เมื่อได้รับเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายไวรัสจำนวนมากจะไปสะสมอยู่ในน้ำดี (bile) และจะไปเกิดพยาธิสภาพโดยตรงต่อเซลล์ตับซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายสำคัญของเชื้อไวรัสชนิดนี้ โดยมีระยะฟักตัวประมาณ 4 สัปดาห์ มีการเพิ่มสูงขึ้นของ hepatocellular enzyme เกิดพยาธิวิทยาต่อเนื้อเยื่อตับ ซึ่งเรียกว่า hepatocellular necrosis และส่งผลให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบได้ (ยง ภู่วรวรรณ, 2529) ในช่วงที่มีการฟักตัวก่อนเริ่มที่จะแสดงอาการทางคลีนิค ปริมาณของไวรัสเกือบทั้งหมดจะถูกปล่อยออกมากับอุจจาระ (Cromeans et al., 1994) โรคไวรัสตับอักเสบเอ มักไม่ค่อยรุนแรงและมีอัตราการตายค่อนข้างต่ำ แต่ก็ทำให้ผู้ป่วยมีร่างกายอ่อนแอจนทำให้ต้องพักรักษาตัวผู้ป่วยจะมีอาการไม่สบายเล็กน้อยก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ เช่น เบื่ออาหาร มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียน ต่อมามีปัสสาวะสีเข้ม มีบิลิรูบินในปัสสาวะ อุจจาระสีจางหรือสีดิน ผิวเหลืองขึ้น และอาจพบตับโต มีผื่นที่ผิวหนัง ซึ่งอาการต่าง ๆ จะ

ทุเลาและหายไปใน 3-4 สัปดาห์และอาจมีอาการแทรกซ้อนคือ มีอาการเหลืองเป็นเวลานาน บางรายมีลักษณะของโรคตับอักเสบซ้ำอีก หลังจากที่มีอาการดีแล้ว (relapsing disease) นอกจากนี้อาจมีอาการทางหัวใจ ตับอ่อน ไตร่วมด้วย ส่วนการติดเชื้อจนถึงขั้น fulminant hepatitis ซึ่งเป็นขั้นที่มีอาการรุนแรงซึ่งจะทำให้เซลล์ตับถูกทำลายจนเกือบหมดและส่งผลต่อสมองทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า “Hepatic encephalopathy” และเสียชีวิตในที่สุด โดยมากมักพบในผู้ป่วยสูงอายุและในผู้ป่วยที่มีอาการ jaundice อย่างรุนแรงจะส่งผลทำให้หน้าที่ของตับเสียไปและเข้าสู่ระยะโคม่าได้ในที่สุด (ยง ภู่วรวรรณ, 2529)

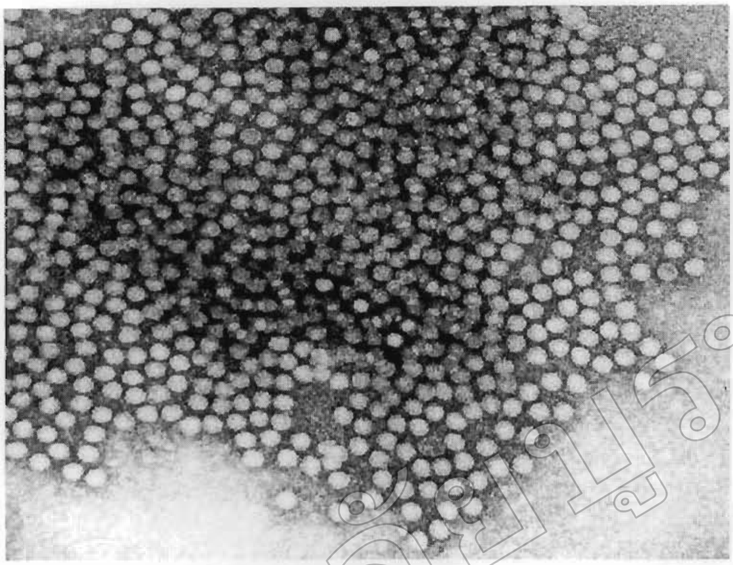
ประวัติการค้นพบ

จากประวัติศาสตร์ได้บันทึกไว้ว่า มีการค้นพบผู้ป่วยที่มีอาการตาเหลือง ตัวเหลือง โดยมีลักษณะการติดต่อและอาการคล้ายกับโรคไวรัสตับอักเสบเอ ทั้งในทวีปยุโรปและเอเชียในช่วงดังกล่าวซึ่งยังไม่ทราบว่าโรคนี้ติดต่อ โดยการติดเชื้อกลุ่มใด แต่มีรายงานของผู้ป่วยอาการเหมือนกับโรคตับอักเสบบันทึกในประวัติศาสตร์ประเทศจีน ในช่วง พ.ศ. 2455 เริ่มมีความเชื่อที่ว่าเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบโดย Cockayne เสนอว่า โรคนี้เกิดจากการติดเชื้อที่ตับโดยเชื้อจะมาจากกระแสเลือดและได้บัญญัติคำว่า infections hepatitis ด้วย (Cockayne et al., 1912) รวมทั้งในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 1 และสงครามโลกครั้งที่ 2 ซึ่งพบว่ามีผู้ป่วยโรคตับอักเสบจำนวนมากทั้งในทหารและประชาชนทั่วไป โดยพบโรคตับอักเสบอยู่ 2 ชนิดคือ ชนิดที่มีระยะฟักตัวสั้นและระยะฟักตัวยาวเรียกว่า โรคตับอักเสบเอ (hepatitis A) และ โรคตับอักเสบบี (hepatitis B) ตามลำดับ ในเวลาต่อมาองค์การอนามัยโลกได้ยอมรับให้เป็นคำที่ใช้เรียกโรคตับอักเสบดังกล่าว ต่อมานักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพยายามศึกษาความแตกต่างของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคไวรัสตับอักเสบเอ และโรคตับอักเสบบี จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2510 Deinhardt และคณะ (Deinhardt et al., 1967) ได้ใช้ลิงเป็น animal model ของโรคตับอักเสบเอ พบว่ามีเชื้อไวรัสที่ตั้งชื่อตอนแรกว่า MS-1 ทำให้เกิดโรคในลิงที่คล้ายกับโรคตับอักเสบเอ ในคนมากคือ สามารถติดต่อทางการกิน (fecal-oral) มีอัตราการติดต่อสูงและมีระยะฟักตัวประมาณ 4 สัปดาห์ เมื่อทดลองในเวลาต่อมาพบว่า เชื้อสายพันธุ์ MS-1 ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (HAV) ก่อให้เกิดการติดเชื้อในอาสาสมัครจริง ในปี พ.ศ. 2516 Feinstone และคณะ (Feinstone et al., 1973) ได้รายงานว่า พบเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวในอุจจาระของอาสาสมัครเป็นครั้งแรก โดยมีขนาดประมาณ 27 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสดังกล่าวจับกลุ่มได้เมื่อเติมซีรั่มของผู้ที่เคยติดเชื้อลงไป (convalescent serum) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีโดยเฉพาะ anti-HAV-specific IgM antibody เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแยกการติดเชื้อครั้งแรกและการติดเชื้อซ้ำ ในปี พ.ศ. 2522 Provost และ Hillcman (Provost and

Hileman, 1979) สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้สำเร็จ ซึ่งนับว่าเป็นก้าวสำคัญสำหรับการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโครงสร้างทางโมเลกุล ต่อมานักวิทยาศาสตร์สามารถแยกยีโนมของเชื้อไวรัสนี้ แยกยีน และอ่านรหัสพันธุกรรม รวมทั้งสามารถพัฒนาวัคซีนด้วยระยะเวลาประมาณ 20-25 ปี หลังจากตรวจพบเชื้อไวรัสนี้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวัคซีนตัวตายที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับมนุษย์แล้ว

คุณสมบัติทั่วไปของเชื้อไวรัสอักเสบเอ

ในปี พ.ศ. 2516 มีรายงานรูปร่างลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนไว้ว่า มีลักษณะเหมือนไวรัสในกลุ่ม picornavirus อื่น ๆ คือ มีขนาด 27-32 นาโนเมตร รูปร่างทรงกลม ไม่มี envelope (รูปที่ 2.1) และมีลักษณะ icosahedral symmetry ที่ประกอบด้วย capsomeres ขนาด 8-12 นาโนเมตร เชื้อไวรัสตับอักเสบเอสามารถทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่าเชื้อ picornavirus อื่น ๆ ซึ่งทนต่ออุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที สามารถอยู่ในที่แห้งได้หลายสัปดาห์ และสามารถเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ได้นานหลายปี อาจพบเชื้อไวรัสนี้ในน้ำ ดิน หรือในหอยในบริเวณที่มีการระบาดได้นานหลายวันจนถึงสัปดาห์หลังเกิดการระบาดขึ้น นอกจากนี้เชื้อไวรัสตับอักเสบเอยังมีความทนทานต่อกรด โดยสามารถอยู่ใน pH 3 ได้นานถึง 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องทนต่อสาร detergent หลายชนิดเช่น NPO_4 , deoxycholate และ organic solvent เช่น diethyl ether, chloroform และ trichlorotrifluoroethane และถูกทำลายได้เมื่อต้มเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีหรือ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือเมื่ออยู่ในสารละลาย hypochlorite ในความเข้มข้น 1.5–2.5 mg/L 15 นาที, 3% formalin ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้นาน 5 นาที และถูกทำลายได้โดยรังสีอุลตราไวโอเลต (Chao et al., 1990)



รูปที่ 2.1: แสดงรูปร่างและลักษณะทั่วไปของ hepatitis A virus (Richard, 2007)

ลักษณะโครงสร้างและโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเชื้อไวรัสอักเสบเอ

1. P1 region เป็นส่วน capsid encoding ซึ่งส่วนนี้จะเป็นส่วนที่สร้างโปรตีนโครงสร้างประกอบไปด้วย 4 ส่วนได้แก่

VP1 (peptide 1D) น้ำหนักโมเลกุล 30-33 กิโลดัลตัน

VP2 (peptide 1B) น้ำหนักโมเลกุล 24-30 กิโลดัลตัน

VP3 (peptide 1C) น้ำหนักโมเลกุล 21-28 กิโลดัลตัน

VP4 (peptide 1A) น้ำหนักโมเลกุล 2-7 กิโลดัลตัน

โปรตีน VP1 เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและเป็นโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับ HAV neutralizing และเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด neutralizing antibody ดังนั้นโปรตีนชนิดนี้จึงเป็นส่วนที่สำคัญในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ และมีบทบาทป้องกันด้วยวัคซีนเนื่องจากต้องอาศัยโปรตีนส่วนนี้เป็นแอนติเจนให้ร่างกายสร้างภูมิต้านทานป้องกันการติดเชื้อ

นอกจากนี้ยังมี VP0 ซึ่งถูกตัดออกเป็น VP2 และ VP4 โดย VP0 สามารถพบได้ในอนุภาคที่ยังไม่สมบูรณ์เต็มที่ (immature virion) ซึ่งเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหนึ่งอนุภาคจะประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างแต่ละอย่างจำนวนอย่างละ 60 ชิ้น (copy) ถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสนี้จะมีหลาย genotype แต่ก็คล้ายคลึงกันมากและมีเพียง serotype เดียว

2. P2 region เป็นส่วน non-structural protein เป็นส่วนที่สร้างโปรตีน 2A, 2B, 2C genome โปรตีน 2A ประกอบด้วย กรดอะมิโนจำนวน 189 ตัว ทำหน้าที่เป็น proteinase โปรตีน 2B มีขนาด 107 อะมิโน แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แท้จริง ส่วนโปรตีน 2C มีขนาด 335 อะมิโน ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ RNA replication โปรตีน ในส่วน P2 นี้มีบทบาทในการเกิดความรุนแรงของโรคโดยไวรัสที่ attenuate แล้วโดยในส่วนนี้จะมีการ mutation มากซึ่งการผลิตวัคซีนชนิดเป็น (attenuated vaccine) จำเป็นต้องให้ความสำคัญต่อโปรตีนในส่วนนี้

3. P3 region จะประกอบไปด้วย โปรตีน 3A, 3B, 3C และ3D โปรตีน 3A (ขนาดกรดอะมิโน 74 ตัว) และ 3B (ขนาดกรดอะมิโน 23 ตัว) มีความเกี่ยวข้องกับ RNA replication

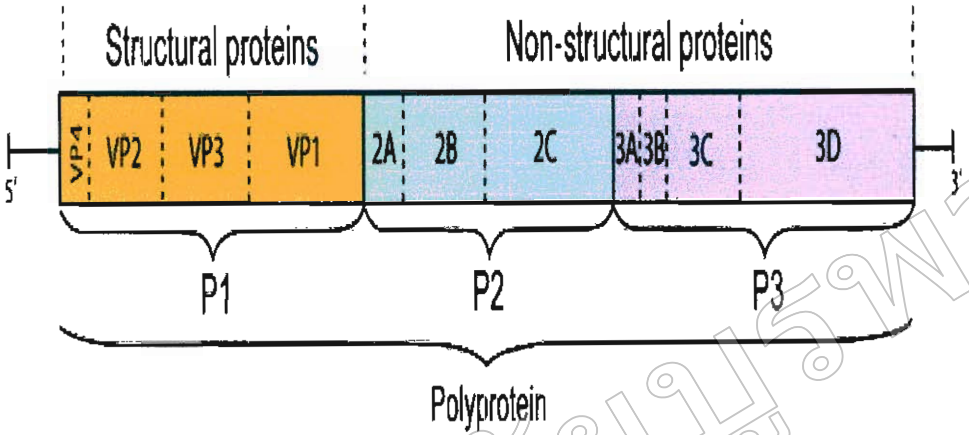
องค์ประกอบของ genome ของเชื้อไวรัส

ยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ส่วนของ capsid มีโปรตีนเป็นส่วนสำคัญคือ VP1-VP4 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 8,000-33,000 โมเลกุล ไวรัสตับอักเสบเอ มี genome เป็นเส้นตรงสายเดี่ยวเส้นบวก (positive polarity, single-stranded linear RNA) ขนาดประมาณ 7.5 กิโลเบส (7, 47-7,478 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งจะประกอบไปด้วย (รูปที่ 2.2)

1. 5′ nontranslated region (5′-UTR) ประกอบด้วย 735 nucleotides ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ translation และ infectivity ของไวรัส

2. Single open reading frame ไวรัสตับอักเสบเอ มีส่วนที่ใช้แปลรหัสในการสร้างโปรตีน frame เดียวและมีความยาวของเบส 6,681 nucleotides หรือโปรตีนที่เป็น peptide มีกรดอะมิโนยาว 2,227 ตัว

3. 3′ nontranslated region (3′-UTR) เป็นส่วนของ RNA ที่เป็น noncoding ยาวประมาณ 63 nucleotides



รูปที่ 2.2: แสดงยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

(Nainan et al., 2006)

ยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ทำหน้าที่เป็นทั้ง mRNA และ template ในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ ส่วนยีโนมนี้มีปริมาณ G+C ค่อนข้างต่ำคือ ประมาณร้อยละ 38 เท่านั้น แม้ว่าความยาวของยีโนมของเชื้อนี้จะใกล้เคียงกับยีโนมของ piconarvirus อื่น ๆ แต่มีรหัสพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ซึ่งในปัจจุบันได้มีผู้ศึกษารหัสพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ หลายสายพันธุ์รวมทั้ง mutant หลายตัวของสายพันธุ์ MH175 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันแล้วพบว่า เชื้อไวรัสที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อทั่วโลกมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังที่กล่าวแล้วข้างต้นว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ทั้งหมดที่พบในคนและลิงแบ่งได้เป็น 7 genotype โดยที่ทุก genotype มี immunodominant epitope ตำแหน่งหลักเพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งมีความแปรปรวนของรหัสพันธุกรรมน้อยมากและ epitope นี้สามารถกระตุ้นให้เกิด neutralizing antibody ได้ต่อเชื้อทุก genotype การที่เชื้อไวรัสนี้มีลักษณะของยีโนมและแอนติเจนเกือบเหมือนกันหมดในทุกสายพันธุ์ ชี้ให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของยีโนมและโปรตีน อาจมีผลต่อตัวเชื้อซึ่งรวมไปถึงการเพิ่มจำนวนในเซลล์ตับ (ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, 2550)

การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Mode of replication)

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เป็นเชื้อไวรัสก่อโรคตับอักเสบชนิดเดียวในปัจจุบันที่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่า เชื้อนี้จะมีลักษณะการเรียงตัวของยีโนมและลำดับขั้นตอนการเพิ่มจำนวนเหมือนเชื้อ picornavirus ทั่วไป แต่การศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับการ

เพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบเอทำได้ลำบากและใช้เวลานานหลายสัปดาห์ไม่เหมือน piconarvirus ทั่วไปที่เลี้ยงง่าย เนื่องจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสนี้จะไม่แสดงลักษณะ CPE ให้เห็น เมื่อเซลล์ติดเชื้อแล้วจะพบ กลุ่มของไวรัสอยู่ใน vesicle ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์พร้อมกับการสะสมของเมมเบรนหลายชั้น (สิริฤกษ์ ทรงศิวิลัย, 2543)

ในปี พ.ศ. 2522 ได้มีผู้ศึกษาการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบเอ ในเซลล์เพาะเลี้ยงและประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยสามารถเพิ่มจำนวน marmoset-adapted HAV ได้ใน primary explant culture ของตับลิงมาร์โมเสท (marmoset) และในเซลล์ไตลิงชนิด FRhK6 ได้ (Deinhardt et al., 1975) แต่ก็ยังต้องใช้เวลาหลายวันถึงหลายสัปดาห์เพื่อที่จะได้จำนวนเชื้อไวรัสสูงสุด โดยทั่วไปถ้าต้องการเชื้อไวรัสจำนวน 10^6-10^9 $TCID_{50}$/ml ต้องทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแตกด้วยวิธี mechanical lysis เพราะเชื้อไวรัสที่ได้จากการเพิ่มจำนวนส่วนใหญ่มักอยู่ในเซลล์ เชื้อไวรัสตับอักเสบเอสามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ด้วยแต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน ดังนั้นจึงต้องอาศัยวิธีทางอ้อมเช่น วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแอนติเจนของเชื้อ, วิธี hybridization assay เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมของ HAV หรือวิธี radioimmunofocus assay เพื่อวัดปริมาณ infectious virus เป็นต้น

ลักษณะและกลไกลการเกิดโรคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอ สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อเฉียบพลันได้เท่านั้นโดยพบว่า ผู้ที่ป่วยเป็นโรคไวรัสตับอักเสบเอ นี้จะไม่มีอาการติดเชื้อเรื้อรังตามมาแต่อาจมีอาการตาเหลืองหรือไม่ก็ได้ ซึ่งอัตราส่วนของผู้ติดเชื้อที่ไม่เหลือง (anicteric) กับที่เหลือง (icteric) พบได้ตั้งแต่ 12:1 จนถึง 1:3.5 ขึ้นอยู่กับอายุของผู้ติดเชื้อ สำหรับการติดเชื้อในผู้ป่วยสูงอายุจะมีสัดส่วนผู้ที่มีอาการเหลืองขึ้นด้วย ส่วนการติดเชื้อในเด็กมักไม่ทำให้เกิดอาการตาเหลือง ตัวเหลือง ทำให้ทราบได้ยากเมื่อผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสชนิดนี้แล้ว อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2528-2529 ได้มีรายงานการระบาดครั้งใหญ่ที่เมือง Hubei ประเทศจีน พบเด็กอายุเฉลี่ย 4.5 ปี มีการติดเชื้อเป็น subclinical infection ซึ่งเป็นการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการป่วยแต่สามารถขับเชื้อไวรัสออกมาจากร่างกายได้ ในขณะที่เด็กอายุเฉลี่ย 5.9 ปี จะมีการแสดงอาการเหลืองเกิดขึ้น โดยมากแล้วโรคไวรัสตับอักเสบเอ เฉียบพลันมักไม่ค่อยรุนแรงและมีอัตราการตายค่อนข้างต่ำประมาณร้อยละ 0.1-0.4 ผู้ป่วยที่เสียชีวิตมักจะเป็นผู้ใหญ่และไม่ทราบสาเหตุการเสียชีวิตที่แน่ชัด (ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, 2550) ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบเอ มักมีอาการไม่สบายเล็กน้อยก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ เช่น เบื่ออาหารมีไข้ ปวดเมื่อย คลื่นไส้ อาเจียน ต่อมามีปัสสาวะสีเข้ม ซึ่งผู้ป่วยมักมาพบแพทย์ในระยะนี้ มีบิลิรูบินในปัสสาวะ อุจจาระสีจางหรือสีดิน ผิวเหลืองขึ้น อาจพบตับโต มีผื่นขึ้นที่ผิวหนัง อาการต่าง ๆ จะทุเลาและหายไปใน 3-4 สัปดาห์ สำหรับกลไกและตัวรับจำเพาะบนผิวเซลล์ (receptor) ของเชื้อไวรัสชนิดนี้ เมื่อเข้าเซลล์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ได้มีผู้พยายามศึกษาถึง receptor บนผิวเซลล์ไตลิงที่เรียกว่า HAVcrl ซึ่งมีลักษณะเป็น mucin-like glycoprotein ที่อาจจะเป็น receptor ต่อเชื้อไวรัสซึ่งพบว่า non-permissive cell ที่สามารถแสดง HAVcrl บนผิวเซลล์จะจับกับเชื้อไวรัสและยอมให้เชื้อไวรัสชนิดนี้ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ และมีโมโนโคลนัลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ที่จำเพาะต่อ HAVcrl ซึ่งจะสามารถหยุดยั้งการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสนี้ได้ และเนื่องจากเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ไม่ก่อให้เกิด cytopathic effect ในเซลล์ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ดังนั้นลักษณะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบของเซลล์เพาะเลี้ยงจึงมักอยู่ในรูป persistent infection มีการศึกษาการติดเชื้อในเซลล์ BSC-1 หรือ BGMK (เป็น cell line ที่พัฒนามาจาก African green monkey kidney cell) โดยดูการเพิ่มจำนวนของไวรัสในลักษณะ one-step growth condition พบว่า หลังการ inoculation สามารถแบ่งช่วงการเพิ่มจำนวนของไวรัสเป็น 3 ช่วง คือ

1) ช่วงวันที่ 2-8 พบ viral RNA ทั้งสายบวกและสายลบและอัตราการสร้าง infective HAV สูงสุด
2) ช่วงวันที่ 9-14 พบแอนติเจนของไวรัสถูกสร้างในปริมาณสูงสุด RNA สายบวก และ infective HAV ยังคงระดับสูงขณะที่เริ่มไม่พบ viral RNA สายลบ

3) หลังวันที่ 14 ระดับเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ของเชื้อไวรัสลดลงต่ำสุด อนุภาคของไวรัสตับอักเสบเอ เกือบทั้งหมดยังคงอยู่ภายในเซลล์ (ยง ภู่วรวรรณ, 2529)

ต่อมาได้มีรายงานว่า เชื้อไวรัสเกือบทั้งหมดที่ใส่ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงจะจับกับเซลล์อย่างรวดเร็ว แต่มีเพียงจำนวนน้อยที่เข้าสู่วงจรการเพิ่มจำนวนและแม้จะมีการปล่อยเชื้อออกนอกเซลล์ได้ ในระยะที่มีการเพิ่มจำนวนสูงสุดแต่เชื้อไวรัสประมาณร้อยละ 80 ยังคงอยู่ภายในเซลล์เชื้อไวรัสที่ถูกปล่อยออกจากเซลล์อาจเป็นแบบที่ยังอยู่ใน vesicle เนื่องจากสามารถตรวจพบอนุภาคของเชื้อไวรัสในลักษณะดังกล่าวได้ในน้ำเลี้ยงเซลล์และในน้ำจากลำไส้ของผู้ติดเชื้อ ซึ่งในปัจจุบันมีหลักฐานสนับสนุนว่า กลไกอย่างน้อย 2 กลไก ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการปรับตัวของไวรัสให้สามารถเจริญได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยงคือ

1. กลไกการกลายพันธุ์บริเวณ 5’ untranslated RNA segment (5’-UTR หรือ 5’-NTR) และภายในยีน 2B และ 2C ทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสสูงขึ้น

2. กลไกที่เกี่ยวข้องกับ viral translation โดยพบการกลายพันธุ์บริเวณ 5’-UTR ซึ่งทำให้เชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนมากขึ้น เนื่องจากมี enhancing cap-independent translation กลไกนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งแสดงว่า โปรตีนของเซลล์มีส่วนเกี่ยวข้องด้วย

เนื่องจากเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้มักมีลักษณะเป็น attenuated strain ซึ่งไม่ก่อโรคในคนและสัตว์ ดังนั้นกลไกเหล่านี้จึงนำไปสู่การผลิตวัคซีนชนิดตัวเป็น (live attenuated virus vaccine) ซึ่งจะมีราคาถูกกว่าและประสิทธิภาพเทียบเท่าวัคซีนชนิดตัวตาย (inactivated whole virus vaccine) ที่มีอยู่ในปัจจุบัน (เฟื่องเพชร เกียรติเสวี, 2537)

อาการ

ในช่วงแรกผู้ป่วยจะมีอาการไข้ซึ่งอาจจะเป็นไข้สูงฉับพลันร่วมกับอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีอาการปวดแน่นท้องบริเวณใต้ชายโครงขวา ปวดเมื่อยตามตัว และปวดตามข้อหรือกระดูกได้ จากข้อมูลการสำรวจผู้ป่วยโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันทั้งหมด 36 รายในช่วงที่มีการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบเอ ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่าผู้ป่วยแต่ละรายมีการแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน (ตารางที่ 2-1) แต่โดยทั่วไปแล้วผู้ป่วยจะมีอาการไข้อยู่นานประมาณ 4-7 วัน หลังจากนั้นจะสังเกตเห็นปัสสาวะมีสีชาเข้ม แล้วตามมาด้วยอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ที่เรียกว่า ดีซ่าน ซึ่งอาจมีตั้งแต่เหลืองเพียงเล็กน้อยจนถึงตัวเหลืองตาเหลืองมากอย่างชัดเจน ในช่วงที่ผู้ป่วยมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง อาการไข้จะลดลงหรือหายไปภายใน 1-2 เดือน แต่ในผู้ป่วยบางรายที่มีอาการคันร่วมด้วยจะมีอาการอยู่นาน 3-4 เดือน แต่สำหรับเด็กที่ติดเชื้อไวรัสตับ

อักเสบเอ อาจจะไม่มีอาการแสดงออกมาเลยต่างกับในผู้ป่วยที่เป็นผู้ใหญ่ซึ่งมักจะแสดงอาการของโรคและอาการดีซ่านอย่างชัดเจน

ตารางที่ 2-1: อาการที่พบในผู้ป่วยโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันในช่วงการระบาดที่นครศรีธรรมราช

อาการแสดง	จำนวนผู้ป่วย (36 ราย)	%
ไข้	33	97.2
เพลีย	16	50
ปวดเมื่อย	20	50
คลื่นไส้ อาเจียน	19	52.8
ไม่สบายท้อง	15	41.7
ตัวเหลือง ตาเหลือง	29	80.6

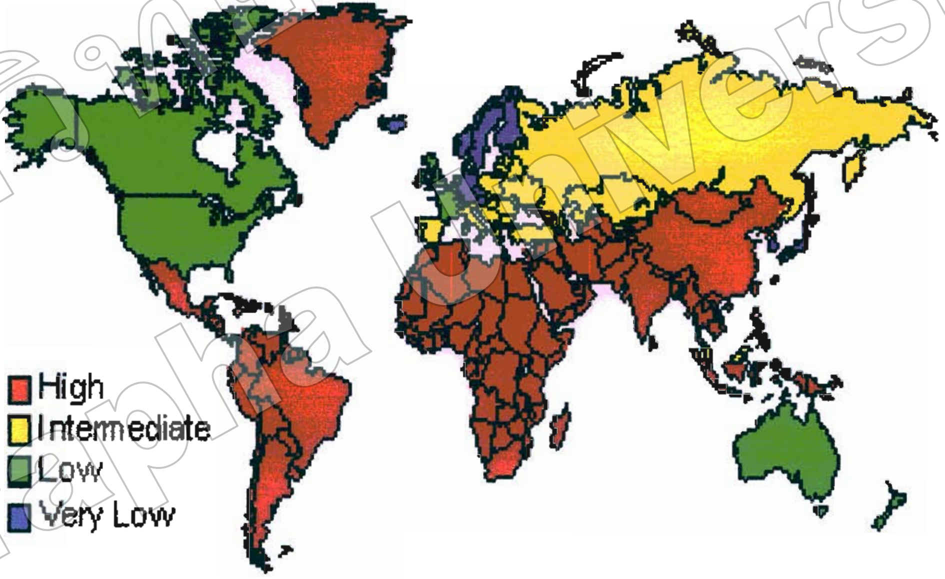
อัตราส่วนผู้ป่วยที่มีอาการตัวเหลือง : ไม่เหลือง; 4:1 (ยง ภู่วรวรรณ, 2529)

นอกจากนี้ยังอาจพบ อาการแทรกซ้อนเกิดขึ้นได้คือ บางรายมีอาการเหลืองเป็นเวลานาน บางรายมีลักษณะของโรคตับอักเสบซ้ำอีกหลังจากที่มีอาการดีแล้ว (relapsing disease) อาการอื่น ๆ ที่พบได้แต่ไม่บ่อยคือ อาจมีอาการทางหัวใจ ตับอ่อน ไตร่วมด้วย ส่วนการติดเชื้อรุนแรงจนถึงขั้น fulminant hepatitis พบได้น้อยมาก โดยมักพบในผู้ป่วยสูงอายุ, ผู้ป่วยมีอาการ jaundice อย่างรุนแรง ส่งผลให้หน้าที่ของตับเสียไปและเข้าสู่ระยะโคม่าในที่สุด ประมาณร้อยละ 0.1-0.4 ของผู้ป่วยจะเสียชีวิต

การแพร่ระบาดของไวรัสตับอักเสบเอผ่านหอยนางรม

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ มักจะเกิดจากการสัมผัสกับอุจจาระที่มีเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ แพร่จากคนสู่คน โดยมากมักมาจากคนที่มีสุขอนามัยไม่ดีซึ่งมีแหล่งกำเนิดของการระบาดมาจากการถ่ายอุจจาระไม่เป็นที่เป็นทางหรือเกิดจากการกินอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวก ปู กุ้ง และหอยต่าง ๆ เช่น หอยนางรม หอยกาบ ที่อาศัยในบริเวณที่น้ำทะเลปนเปื้อนกับอุจจาระและสิ่งปฏิกูลจะมีเชื้อไวรัสนี้อยู่ ถ้านำมาปรุงอาหาร ไม่สุกพอก็จะก่อให้เกิดโรคได้ การแพร่ระบาดของไวรัสตับอักเสบเอ จะแตกต่างกันออกไปในทั่วโลก ซึ่งขึ้นอยู่กับมาตรฐานทางสุขอนามัยของแต่ละพื้นที่ โดยมากมักมีการระบาดชุกที่สุดในพื้นที่ที่มีฐานะทางเศรษฐกิจและสังคมต่ำ (รูปที่ 2.3) สำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา ชีวิตความเป็นอยู่ให้ดีขึ้นจะมีการแพร่ระบาดของไวรัสตับอักเสบเอ เฉพาะในพื้นที่ที่มีคนติดเชื้อปนอยู่ (endemic) โดยส่วนมากประชากรมักติดเชื้อตั้งแต่ยังเด็กจึงทำให้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเมื่อโตขึ้น ประชากรส่วนใหญ่จึงมีภูมิคุ้มกันที่เกิดโดยธรรมชาติ ทำให้โรคตับอักเสบเอ ปรากฏให้เห็นน้อยในผู้ใหญ่จึงไม่ค่อยเป็นปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศเหล่านี้ ส่วนประเทศที่พัฒนาแล้ว การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอ มักพบไม่ค่อยบ่อยนัก เพราะมีระบบสุขอนามัยที่ดี ในเด็กจะตรวจไม่พบภูมิต้านทานต่อไวรัสตับอักเสบเอเลยแต่จะค่อย ๆ ตรวจพบได้ใน วัยผู้ใหญ่ เด็กโต และวัยรุ่นที่ยังไม่มีภูมิต้านทานจะมีความไว (susceptible) ต่อการติดเชื้อ ซึ่งอาจเกิดได้ผ่านทางนักท่องเที่ยวที่ติดเชื้อไวรัสมาจากแหล่งที่มีการแพร่ระบาดของโรคชนิดนี้สูง เพราะกลุ่มคนเหล่านี้ยังไม่เคยสัมผัสเชื้อมาก่อน จึงพบการระบาดของไวรัสตับอักเสบเอ เกิดขึ้นและมีแนวโน้มที่จะเป็นปัญหาทางสาธารณสุขเพิ่มขึ้น แต่สำหรับประเทศไทย ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีการเปลี่ยนแปลงทางเศรษฐกิจและสังคมอย่างรวดเร็วทั้งในเขตเมืองและชนบท ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เกิดขึ้นมีผลกระทบต่อการสาธารณสุขและการเปลี่ยนแปลงในด้านระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อต่าง ๆ อย่างเห็นได้ชัด รวมทั้งระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบเอ ได้มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างมากและรวดเร็ว มีรายงานการระบาดครั้งใหญ่ในประเทศไทย เกิดขึ้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนกันยายน ในปี 2535 มีผู้ป่วยเกิดขึ้นนับพันรายและจากการศึกษาในโรงเรียนประถมอายุ 6-12 ปี ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงการระบาด โดยทำการตรวจเลือดนักเรียนแบบสุ่มตัวอย่าง 1 ใน 3 ราย จำนวน 89 ราย โดยตรวจทั้ง anti HAV IgM และ anti HAV IgG ในกลุ่มดังกล่าว พบว่ามีผู้ป่วยที่มีอาการและไม่มีอาการของโรคในอัตราส่วน 1.3 ต่อ 1 และมีผู้ที่มีอาการป่วยทั้งสิ้น 36 ราย ใน 89 รายที่ทำการศึกษานี้ มีผู้ป่วยที่มีอาการชนิดตัวเหลืองและไม่เหลือง (icteric และ anicteric) โดยมีอัตราส่วนเป็น 4:1 และเมื่อทำการศึกษาถึงปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อจะพบว่า การที่มีผู้ป่วยอยู่ในครอบครัวแล้วมี

สุขลักษณะที่ไม่ดี โดยไม่ขับถ่ายลงส้วมเป็นปัจจัยเสี่ยงที่พบในผู้ที่ติดเชื้อได้สูง หลังการระบาดแล้ว พบว่าเด็กร้อยละ 79 จะตรวจพบภูมิต้านทานต่อไวรัสเอ เกิดขึ้น ต่อมาในปี พ.ศ. 2547 ได้มีรายงานจากกองควบคุมโรคติดต่อพบว่า มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ประมาณ 4.54% และในปี พ.ศ. 2550 มีผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบเอทั้งสิ้น 305 คน คิดเป็น 0.49 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน ซึ่งตัวเลขดังกล่าวอาจมีค่าน้อยกว่าที่เกิดขึ้นจริง เพราะเป็นตัวเลขที่บันทึกเฉพาะจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากการระบาดเท่านั้น แต่ไม่ได้บันทึกจำนวนผู้ป่วยที่ไม่ได้มารักษาตัวที่โรงพยาบาล ส่วนสาเหตุอื่นอาจเป็นเพราะ ไม่สามารถค้นพบไวรัสต้นเหตุที่ปนเปื้อนในอาหารได้ เนื่องจากขาดวิธีตรวจที่มีความไวในการตรวจหาไวรัสในอาหารหรือไม่ได้เก็บอาหารที่ปนเปื้อนเพื่อใช้ในการตรวจ เนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีระยะฟักตัวที่ยาวนานจึงไม่ได้สงสัยว่า อาหารนั้นอาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อ (Cliver, 1995)



รูปที่ 2.3: แสดงประเทศที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

(Safer.healthier.people, 1997)

ภูมิคุ้มกันของร่างกาย

หลังจากได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ผู้ป่วยจะสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส (anti-HAV) ซึ่งสามารถตรวจหาได้หลายวิธีด้วยกันคือ immune electron microscopy, complement fixation, immuneadherence, hemagglutination, radioimmunoassay, enzyme-linked immunosorbent assays และ viral neutralization ภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นสามารถตรวจหาได้ทั้งชนิด IgG และ IgM ภูมิต้านทาน IgM จะสูงสุดเมื่อผู้ป่วยมีอาการตัวเหลือง ระดับ IgM จะเริ่มลดลงในระยะฟื้นจากโรค ส่วน IgG จะขึ้นช้ากว่าและจะสูงสุดในช่วงระยะฟื้นจากโรคและอยู่เป็นเวลานานตลอดชีวิต จึงจะสามารถป้องกันการติดเชื้อได้และไม่พบรายงานการติดเชื้อซ้ำ (Carmen et al., 1989)

การป้องกันและการควบคุม

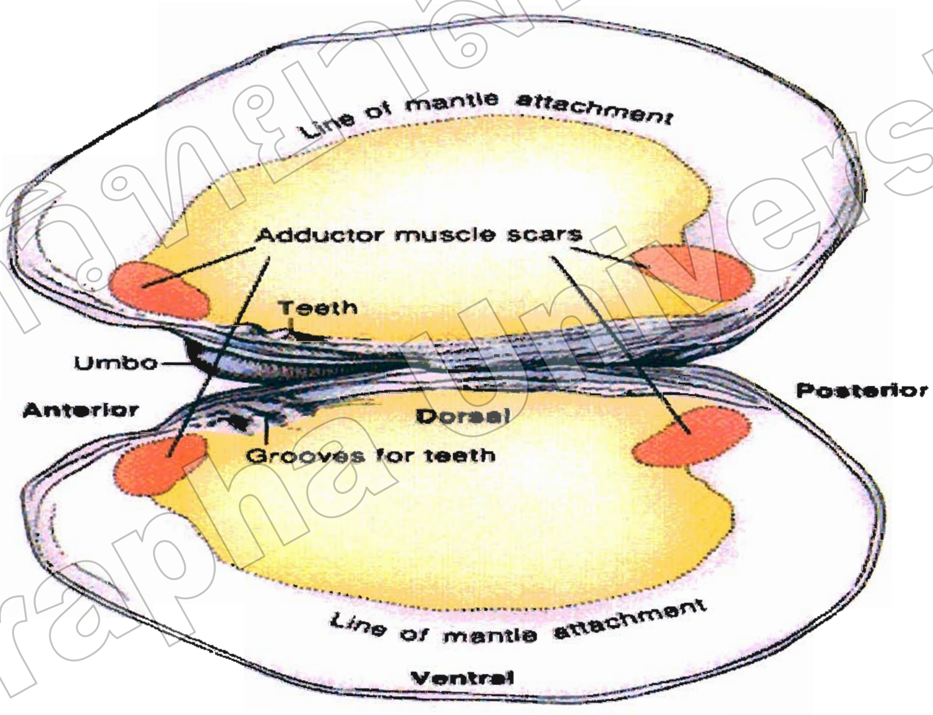
ในปัจจุบันมีการติดเชื้อโรคตับอักเสบเอ ในประเทศไทยลดลงมาก เนื่องจากมาตรฐานทางสาธารณูปโภคและการดูแลสุขภาพอนามัยดีขึ้น ดังนั้นการปรับปรุงด้านสาธารณูปโภคสำหรับประชาชน เช่น มีน้ำสะอาด กำจัดขยะอย่างเหมาะสม มีส้วมที่ถูกสุขลักษณะรวมถึงมาตรฐานการกินอยู่ ล้วนมีส่วนโดยตรงในการช่วยลดอุบัติการณ์การเกิดโรคตับอักเสบเอ นักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้าไปในประเทศกำลังพัฒนา ได้รับคำแนะนำให้กินอาหารที่ปรุงสุกแล้วและหลีกเลี่ยงการกินผักสด นอกจากนี้สามารถป้องกันได้โดยการฉีดวัคซีนและการให้อิมมูโนโกลบุลินในผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ เช่น ผู้ที่ไม่มีภูมิคุ้มกัน, ผู้ที่เดินทางเข้าเขตระบาดของโรค, ผู้ที่มีอาชีพเสี่ยงต่อการติดเชื้อ, ชายรักร่วมเพศ, ผู้ติดยาเสพติด และผู้ป่วยที่มีอาการตับอักเสบเรื้อรัง เป็นต้น (นุสนธิ์ กลัดเจริญ, 2532)

การรักษา

ในปัจจุบันยังไม่มีการรักษาเฉพาะสำหรับผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบเอ การรักษาทั่วไปใช้วิธีรักษาตามอาการ ผู้ป่วยจะหายได้เองโดยไม่มีอาการเรื้อรังตามมา ไม่จำเป็นต้องให้อยู่รักษาตัวที่โรงพยาบาล ยกเว้นแต่ ในผู้ที่มีอาการรุนแรงมาก เช่น มีภาวะ fulminant hepatitis ทำให้เซลล์ตับถูกทำลายจนเกือบหมดและส่งผลต่อสมองทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า “Hepatic encephalopathy” จึงจำเป็นต้องรักษาตัวที่โรงพยาบาล (Bordier et al., 2002)

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับหอยนางรม

หอยนางรมเป็นหอยทะเลกาบ 2 ฝา มีกาบหนาและกาบแข็งโดยมีขนาดและสีแตกต่างกัน กาบบนจะใหญ่กว่ากาบล่าง ภายในมีเนื้อหอยติดอยู่ลักษณะลำตัวแบนทางด้านข้างและมีเปลือกด้านหลังของเปลือกประกอบกันด้วนเอ็นยึดฝา (hinge ligament) ทำหน้าที่เหมือนบานพับเปิดปิดฝา ส่วนเท้าแบนเช่นเดียวกับลำตัว หัวลดขนาดลงมาก โพรงแมนเทิลขนาดใหญ่ และมีเหงือกขนาดใหญ่มาก มีหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแก๊ส รวบรวมอาหารเข้าปาก โดยการกินอาหารเป็นแบบการกรองจึงไม่มีแรดูลา ด้านที่มีเนื้อหอยติดอยู่จะเว้าลึกลงไปคล้ายรูปถ้วย (รูปที่ 2.4) และมักยึดติดกับวัตถุแข็งเช่น ก้อนหิน ไม้หลัก (Miller and Harley, 2002)

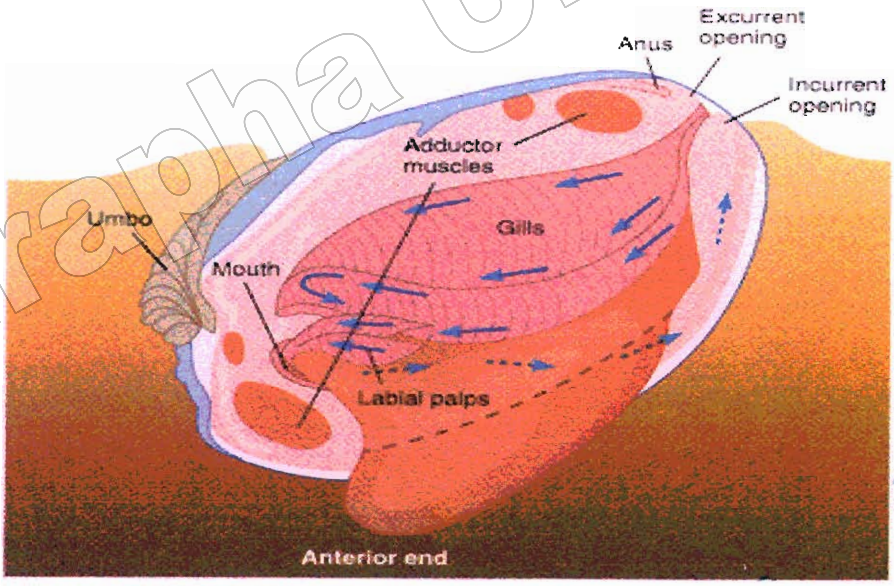

Line of mantle attachment
Adductor muscle scars
Teeth
Umbo
Anterior
Dorsal
Posterior
Grooves for teeth
Line of mantle attachment
Ventral

รูปที่ 2.4: แสดงลักษณะโครงสร้างของเปลือกหอย

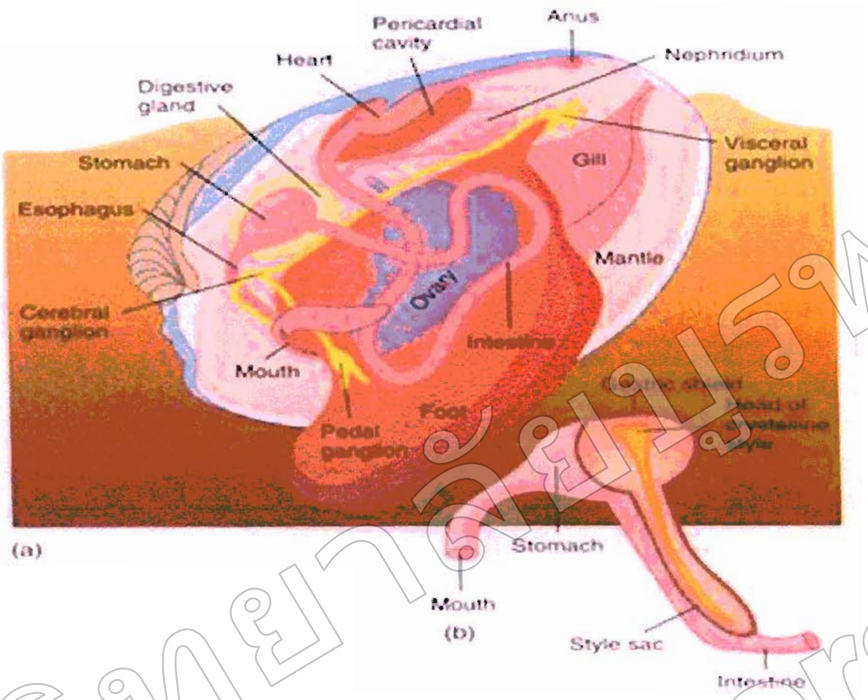
(Invertebrates zoology for fisheries, 2002)

การดำรงชีวิตของหอยนางรม

หอยนางรมดำรงชีวิตโดยการกินอาหารแบบกรอง (filter feeder) ที่ผิวแมนเทิลของหอยจะสร้างเมือกมาจับอาหารแล้วดูดอาหาร ก๊าซออกซิเจน และน้ำรอบ ๆ ตัวเข้าไปทางด้านหนึ่ง (รูปที่ 2.5) อาหารชิ้นใหญ่ที่ถูกคัดออกจากการกรองจะถูกส่งเข้าโพรงแมนเทิล และกล้ามเนื้อยึดฝาจะหดตัวอย่างรวดเร็วเพื่อขับอาหารชิ้นใหญ่ออกทางน้ำเดิมที่น้ำเข้าเรียกของที่คัดออกว่า ซูโดฟีซี (pseudofeces) ส่วนอาหารหรือสิ่งเจือปนที่มีขนาดเล็กจะถูกส่งไปยังท่อทางเดินอาหารแบ่งเป็น 3 ส่วน (รูปที่ 2.6 b) คือ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ ส่วนลำไส้แบ่งเป็น ตอนหน้า ตอนกลาง และเรคทัม และยังมีแขนงแยกออกมาจากกระเพาะอาหาร แขนงนี้คือต่อมน้ำย่อยและเมือกที่จับตัวกันแน่นเป็นแท่งยาว คือ crytalline style ซึ่งประกอบด้วยสารโปรตีน จะทำหน้าที่ดูดซับน้ำย่อยที่ถุงสไทล์ (style sac) สร้างออกมา ซึ่งสามารถย่อยแป้ง ไกลโคเจน และเซลลูโลสได้ โดยมีองค์ประกอบในการควบคุม pH และ ทำให้ไขมันแตกตัวออก และจะแยกแบคทีเรียกับอาหารขนาดเล็กออกจากเมือก และไปยังท่อต่อมน้ำย่อยเพื่อดูดซับอาหารที่ผ่านการกรองแล้วเข้าสู่เส้นเลือด การดูดซับบางส่วนเกิดที่ลำไส้ตอนต้น ส่วนลำไส้ตอนกลางจะทำหน้าที่ดูดซับน้ำกลับทำให้กากอาหารเป็นก้อน



รูปที่ 2.5: แสดงทิศทางการเคลื่อนที่เข้าและออกของอาหารหลังจากที่มีการกรองเข้าในตัวหอยขณะอ้าปากกินแพลงตอนน้ำ (Invertebrates zoology for fisheries, 2002)


Pericardial cavity
Anus
Heart
Nephridium
Digestive gland
Visceral ganglion
Stomach
Gill
Esophagus
Mantle
Ovary
Cerebral ganglion
Intestine
Mouth
Gastric shield
Head of crystalline style
Foot
Pedal ganglion
(a)
Stomach
Mouth
(b)
Style sac
Intestine

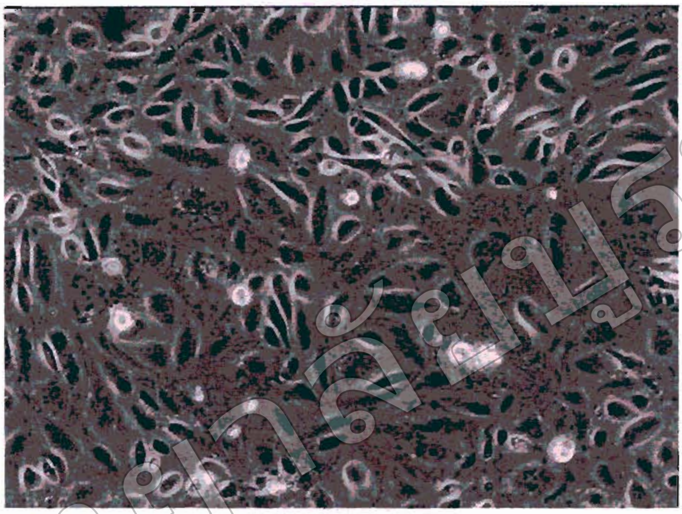
รูปที่ 2.6: (a) แสดงโครงสร้างอวัยวะภายในของหอยสองฝา, (b) แสดงโครงสร้างของท่อทางเดินอาหาร (Invertebrates zoology for fisheries, 2002)

การทดสอบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงและดู CPE ที่เกิดขึ้นในเชื้อไวรัสตับอักเสบเอสายพันธุ์ HM 175

ในปี ค.ศ. 1979 Provost และ Hilleman (Provost and Hilleman, 1979) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน primary cell culture และ continuous cell line ได้แก่ african green monkey kidney (AGMK) culture, fetal rhesus monkey kidney (FrhK-4) cells (รูปที่ 2.7), continuous AGMK cells (BSC-1), human embryonic fibroblast และ hepatoma cell line แต่ในเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) นั้นไม่ทำให้เกิด CPE ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ cell ภายหลังการติดเชื้อเช่น มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงนี้จะมีลักษณะจำเพาะต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้นจึงปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เป็น HAV สายพันธุ์ HM 175 ซึ่งเจริญได้รวดเร็วและทำให้เกิด CPE ได้ในเซลล์ FrhK-4 และสามารถตรวจหาจำนวนของอนุภาคไวรัส

โดยตรงหรือการตรวจหาเชื้อไวรัสทางอ้อมด้วย วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาหรือวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ได้



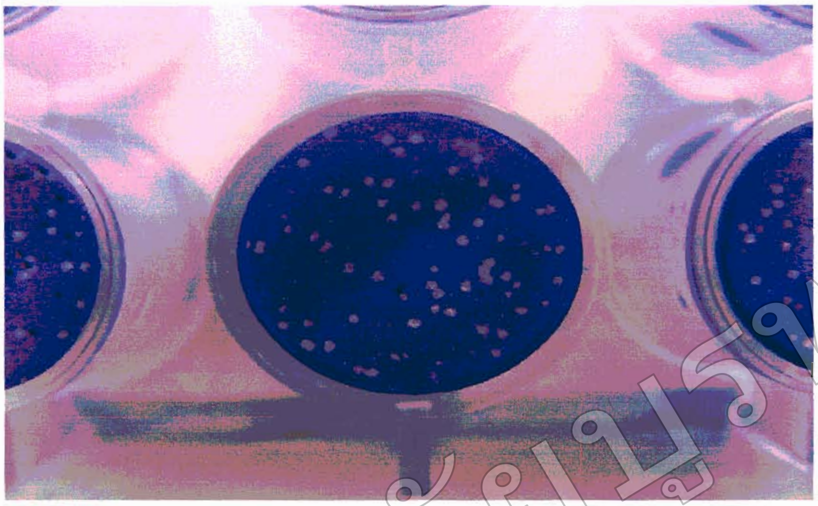
รูปที่ 2.7: แสดง BS-C1 cell ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

(Hopps et al., 1963)

การตรวจหาจำนวนอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบ

Plaque assay

เป็นวิธีการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสใน cell monolayer ของเซลล์เพาะเลี้ยงในภาชนะ เช่น tissue culture dish หรือ plate ที่มีหลายหลุม (multiwell) ซึ่งเมื่อเชื้อไวรัสได้เข้าไปในเซลล์ (monolayer) แล้วจะเกิด CPE แล้วทำให้เซลล์ตายได้ ถ้าเราทำการเจือจาง virus ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกันลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง (monolayer) หลังจาก incubate นำไปย้อมสีที่ติดเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตจะเห็นวงสีขาวที่ไม่ติดสีเรียกว่า Plaque ซึ่งเป็นบริเวณที่เซลล์ตายจากการติดเชื้อ (รูปที่ 2.8) (plaque อาจย้อมด้วยสีที่ติดเฉพาะ cell ที่ตายก็ได้) นับจำนวน plaque ซึ่งมีค่าเป็นจำนวนอนุภาคของ virion ในหนึ่งหน่วยปริมาตร คำนวณมีหน่วยเป็น plaque forming unit (PFU)/ml



รูปที่2.8: แสดงลักษณะ hepatitis A virus plaque assay

(Daily, 2007)

เทคนิคทางอนูชีววิทยา

เทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เทคนิค Polymerase chain reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคดั้งเดิมที่นิยมใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารแม้มีปริมาณน้อยมากได้ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถเพิ่มจำนวน nucleotide ตั้งต้นได้อย่างเฉพาะเจาะจง ทำให้ได้ผลผลิตเป็นล้านโดยมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากและใช้เวลาน้อย โดยอาศัยปฏิกิริยาการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างยีโนมของไวรัสกับ PCR primer

ในปี ค.ศ. 1990 Jansen และคณะ (Jansen et al., 1990) ได้ใช้วิธี Antigen Capture PCR โดยนำ antibody มาจับกับ antigen ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอก่อนทำการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Chaves และคณะ (Chaves et al., 1994) ได้พัฒนาเทคนิค PCR เป็น RT-PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงใช้ในการตรวจหา ribonucleic acid (RNA) เพราะต้องใช้ reverse transcriptase enzyme ในการสังเคราะห์ DNA จาก RNA ต้นแบบ จากนั้นใช้ DNA ที่สร้างได้เป็นแม่แบบเพื่อเพิ่มผลผลิตเป็น cDNA ให้ได้จำนวนมาก (Hartland and Jones., 1999) ซึ่งเทคนิคนี้อาจใช้ในการตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในอาหารที่ปนเปื้อนได้ โดยการสกัด RNA จากเชื้อไวรัสออกจากอาหารที่ปนเปื้อนแล้วแยกส่วน RNA ออกเพื่อใช้เป็นสารพันธุกรรมต้นแบบในปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสังเคราะห์ cDNA จาก RNA ต้นแบบที่แยกได้ แต่เทคนิคนี้อาจไม่สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ได้โดยตรงเนื่องจากในอาหารมักประกอบไปด้วยสิ่งที่เป็นตัวยับยั้ง (RT – PCR inhibitor) การทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ทำให้ไม่เกิดผลหรือ

เกิดเป็นผลลบปลอม (false negative) ได้หากมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อย (Rossen et al., 1992; Dix and Jaykus, 1998; Green et al., 1998; Shiel et al., 1999) จึงต้องกำจัด RT– PCR inhibitor โดยการแยกเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ออกจากอาหารซึ่งใช้ขั้นตอน extraction-concentration และ adsorption-elution-concentration เพื่อให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการสกัด nucleotide ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ และทำ RT-PCR ต่อไป

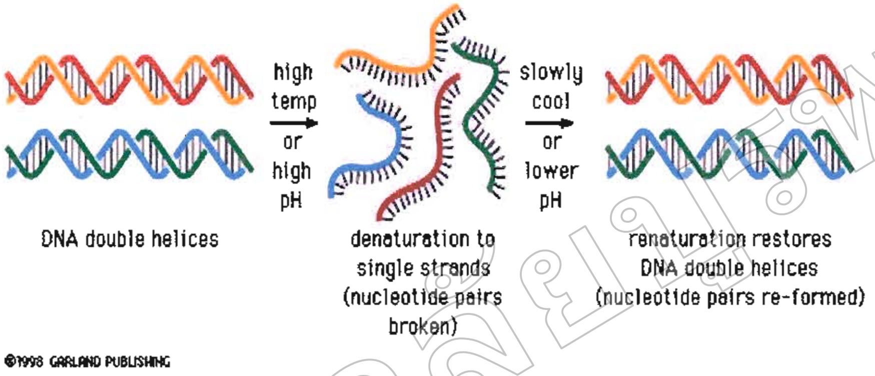
การวิเคราะห์ cDNA ผลผลิตที่ได้โดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis

Agarose gel electrophoresis เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ cDNA โดยการนำ DNA มาแยกบนตัวกลางที่มีกระแสไฟฟ้า เนื่องจาก cDNA มีประจุเป็นลบจึงสามารถเคลื่อนไปยังขั้วบวกในสนามไฟฟ้าได้โดยผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้น(agarose gel) และเมื่อแยก cDNA แล้วนำแผ่นวุ้นไปวางไว้ใต้แสงอุลตราไวโอเลตแถบ cDNA ที่ได้จะเรืองแสง ถึงแม้เทคนิคนี้จะเป็นเทคนิคที่มีความไวสูงแต่ผลที่ได้อาจเป็นผลบวกปลอม (false positive) โดยอาจเกิดจากการเพิ่มจำนวนของ nucleotide อื่นที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร ดังนั้นจึงต้องมีวิธีตรวจสอบความจำเพาะของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอหรือไม่ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ได้แก่ การนำผลผลิตที่ได้จาก PCR (amplicon) ไปหาลำดับเบส แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการตรวจหาตัวอย่างเป็นจำนวนมากๆได้เพราะมีราคาแพงมาก จึงนิยมใช้วิธี gel electrophoresis เพื่อใช้ตรวจสอบความยาวของ nucleotide เท่านั้น

เทคนิค Southern blot hybridization

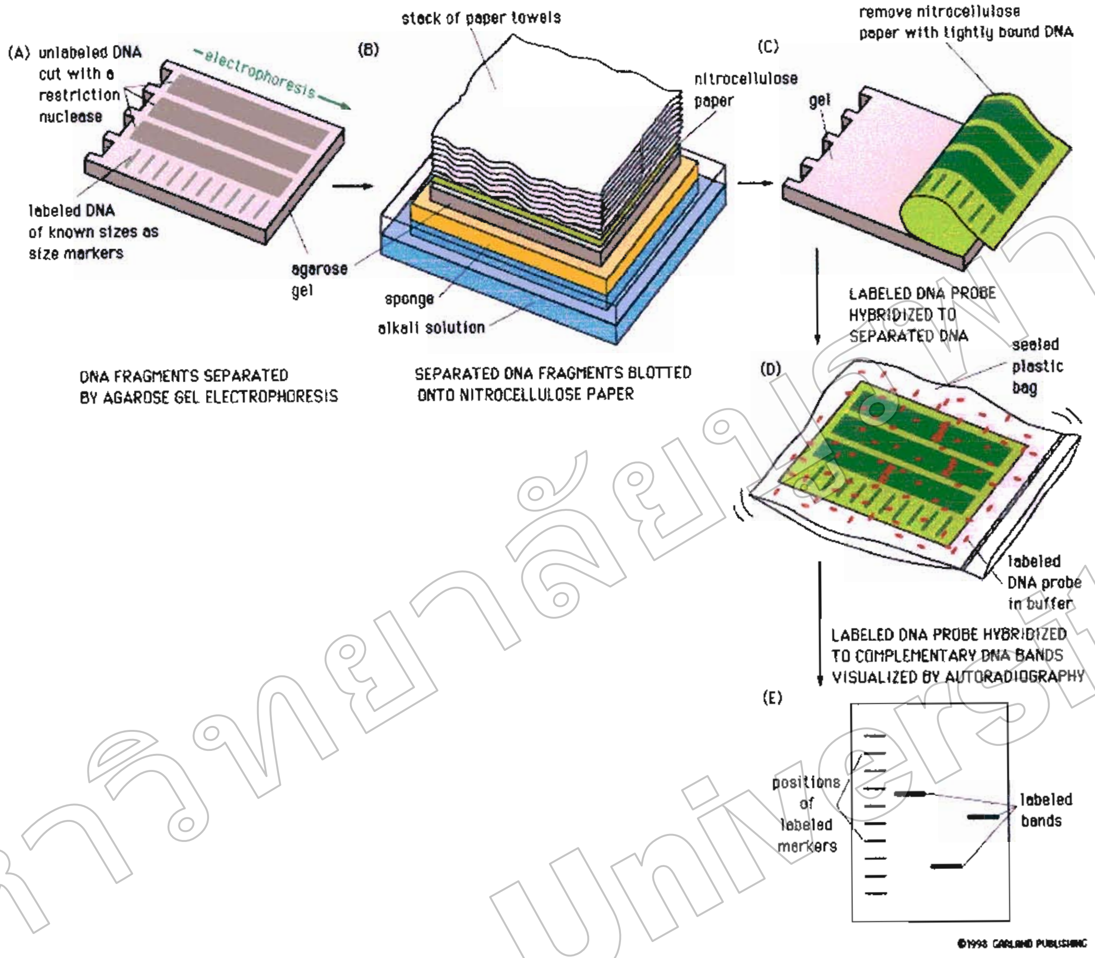
Southern blot hybridization เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ผู้พัฒนาเทคนิคนี้คือ เอ็ดเวิร์ด เอ็ม เซาเทิร์น (Edward M. Southern) จากมหาวิทยาลัยเอดินเบอร์ก สหราชอาณาจักร โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อใช้วิเคราะห์ดีเอ็นเอในตัวกลางวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยกชิ้น DNAที่มีขนาดต่างกันออกจากกันด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส (agarose gel electrophoresis) แล้วทำ southern blot เพื่อวิเคราะห์ DNA ที่ตรวจหาว่าชิ้น DNA ที่มียีนที่ต้องการศึกษาอยู่ในตำแหน่งใด โดยย้ายดีเอ็นเอที่แยกแล้วนั้นออกจากอะกาโรสเจลไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือแผ่นเยื่อไนลอน แล้วนำไปทำไฮบริไดเซชั่น (hybridization) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของ ดี เอ็น เอ (G:C, A:T) พันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างคู่เบสถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนหรือการเพิ่ม pH ของสารละลาย เมื่อพันธะไฮโดรเจนถูกทำลายดีเอ็นเอจะคลายเกลียวเปลี่ยนสภาพจากดีเอ็นสายเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เราเรียกว่ากระบวนการนี้ว่า **denaturation** เมื่อลดอุณหภูมิหรือลด pH ของสารละลายลงให้มีสภาพปกติ สายดีเอ็นเอจะกลับสู่

สภาพเดิม โดยกลับมาเข้าคู่กันใหม่และจับคู่เบสอย่างจำเพาะเจาะจง เราเรียกว่ากระบวนการนี้ว่า **renaturation** (รูปที่ 2.9)


high
temp
or
high
pH
slowly
cool
or
lower
pH
DNA double helices
denaturation to single strands (nucleotide pairs broken)
renaturation restores DNA double helices (nucleotide pairs re-formed)
©1998 GARLAND PUBLISHING

รูปที่ 2.9: แสดงกระบวนการ denaturation และ renaturation ของ DNA
(มาลินี อัศวดิษฐเลิศ, 2550)

สำหรับการประยุกต์ใช้วิธี southern blot hybridization หลังจากที่ทำ southern blot แล้ว จะนำ DNA ตรวจติดตาม (DNA probe) ซึ่งเป็น DNA สายสั้น ๆ ซึ่งติดฉลากกัมมันตรังสีไว้มาจับกับชิ้น DNA ที่ถูกย้ายมาอยู่บนไนโตรเซลลูโลสซึ่งจะมีความจำเพาะต่อกัน แถบของ DNA ที่สามารถจับกับ DNA probe อย่างจำเพาะเจาะจงจะมีการปรากฏของแถบ DNA เกิดขึ้นบนแผ่นฟิมพ์ (รูปที่ 2.10)


(A) unlabeled DNA cut with a restriction nuclease
electrophoresis
labeled DNA of known sizes as size markers
agarose gel
DNA FRAGMENTS SEPARATED BY AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS
(B)
stack of paper towels
nitrocellulose paper
sponge
alkali solution
SEPARATED DNA FRAGMENTS BLOTTED ONTO NITROCELLULOSE PAPER
(C)
remove nitrocellulose paper with tightly bound DNA
gel
LABELED DNA PROBE HYBRIDIZED TO SEPARATED DNA
(D)
sealed plastic bag
labeled DNA probe in buffer
LABELED DNA PROBE HYBRIDIZED TO COMPLEMENTARY DNA BANDS VISUALIZED BY AUTORADIOGRAPHY
(E)
positions of labeled markers
labeled bands
©1998 GARLAND PUBLISHING

รูปที่ 2. 10: แสดงกระบวนการ Southern blot hybridization

(Department of biology, Davidson college, 2002)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

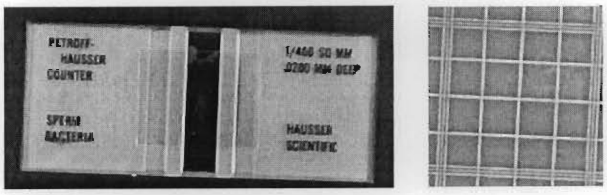
1. การเพาะเลี้ยง Fetal rhesus monkey kidney (Frhk-4) cells

นำ Frhk-4 cell จาก stock ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยงใน flask ที่มี surface area ขนาด 25 cm^2 (T25) ด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complete media ที่ประกอบไปด้วย 10% fetal bovine serum (FBS), 0.0016 mg/ml fungi zone, 500 U/ml penicillin-G และ 0.01 mg/ml gentamycin แล้วบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 10 วัน นำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบเซลล์เกาะพื้น flask มากกกว่าหรือเท่ากับ 70% ขึ้นไปจึงนำมา subculture โดยการดูด media เก่าทิ้งและล้างด้วย 1X PBS ประมาณ 5 ml จากนั้นนำไปใส่เอนไซม์ 0.25% trypsin-versine ประมาณ 0.5 ml เพื่อย่อยเซลล์ใน flask ให้หลุดไปเป็นเซลล์เดี่ยว เมื่อเห็นว่าเซลล์เริ่มหลุดออกแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย DMEM complete media ประมาณ 2 ml จากนั้นดูดเซลล์จาก flask ไปใส่ centrifuges tube ขนาด 15 ml แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1,500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูด media เก่าออกแล้วใส่ DMEM complete media ลงไป 1 ml ทำการ resuspend cell ให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วดูดเซลล์จาก flask เก่าไปใส่ flask ใหม่อย่างละ 0.5 ml จำนวน 2 flask เติม DMEM complete media ลงไป flask หลอดทดลองละประมาณ 5 ml แล้วบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 10 วัน

2. การนับเซลล์

ใช้ micropipette ดูด cell suspension จาก centrifuge tube แล้วนำไปใส่ในหลุมบน 96 well plate จากนั้นใส่ trypan blue stain ลงไปในอัตราส่วน 1:2 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหยดลงบน hemocytometer (รูปที่ 3.1) ที่ปิดด้วย cover slide นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งจะมีลักษณะเป็นเซลล์ใส ๆ ขณะที่เซลล์ที่ตายแล้วติดสีน้ำเงินเนื่องจากผนังเซลล์ถูกทำลายสีจึงสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ที่ตายแล้วได้นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้ง 5 ช่องบน hemocytometer (รูปที่ 3.1) นำมาคำนวณ เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดโดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (cell/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{Dilution factor (2)} \times 10^4$$



รูปที่ 3.1; Petroff – Hausser counting chamber

(Microbiology microbes everywhere, 2008)

3. การเตรียมเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (Stock HAV)

เลี้ยง Frhk-4 cell ลงใน flask ที่มี surface area ขนาด 75 cm^2 (T75) ด้วย DMEM complete media จนเซลล์กระจายเป็น cell monolayer นำ HAV virus (ATCC, USA) มา dilute ในอัตราส่วน 1:100 ใน PBS มาเติมให้พอท่วมเซลล์ แล้วนำ flask ไปวางบน rocking platform ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ไวรัสค่อย ๆ เข้าไปในเซลล์ได้ (viral infection) จากนั้นเติม maintenance media ที่ประกอบด้วย 2% FBS ลงไป 5 ml แล้วเอาไปบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO$_2$ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สังเกต CPE ทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบ CPE มากกว่า 75% ขึ้นไปจะทำการ freeze-thaw cell 3 ครั้ง แล้วนำไป centrifuge ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บ supernatant ของ HAV virus แล้วทำการแบ่งใส่ลงใน eppendrof หลอดละ 0.5 ml แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำไปใช้

4. การสกัดไวรัสที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ด้วยวิธี acid-adsorption alkaline elution

ตรวจสอบขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลอง

เก็บหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายทั่วไปจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี มาแกะเปลือกออกตัดแบ่งแยกส่วนเนื้อออกจากกระเพาะอาหาร นำเนื้อหอยนางรมสดมา 25 กรัม นำไปบ่มกับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปริมาตร 1, 10, 100 μl และในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการสกัด virion ของไวรัสออกมาจากเนื้อหอยนางรมสดด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method (Kittigul et al, 2008) หลังจากนั้นนำไปเติม 7 volume ของน้ำกลั่นหรือประมาณ 175 ml ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนผสมทั้งหมดไปทำ homogenized ด้วย blender ที่ high speed เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำ homogenate ที่ได้ไปปรับ pH เป็น

4.8 ด้วย 1 M HCl (ประมาณ 1ml) แล้วนำไปเขย่าบน plateform เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส (supernatant) เก็บส่วนตะกอน (pellet) นำไปละลายใน 25 ml ของ 2.9% TPB-6 % glycine, pH 9.0 เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บ supernatant label เป็น S1 พักไว้ส่วน pellet ที่เหลือนำมาแยกไวรัสอีกครั้ง (re-eluted) ด้วย 25 ml ของ 0.5M arginine-0.15M NaCl, pH 7.5 เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 4 °C ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาทีแล้วเก็บ supernatant ไว้ label เป็น S2 จากนั้นนำ S2 ที่ได้ไปรวมกับ S1 แล้วปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย 1M HCl (ประมาณ 2 ml) จากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดไปตกตะกอนไวรัสด้วย 0.5 volume 12.5% PEG 8000–0.3M NaCl ประมาณ 30 ml แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปไว้ที่ 4°C นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมา centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ทิ้ง supernatant ส่วน pellet ที่เหลือนำมาละลายใน 15 ml ของ 0.05M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.5 และตกตะกอนอีกครั้งด้วย 0.5 volume 12.5% PEG 8000–0.3M NaCl ประมาณ 30 ml คนส่วนผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuged ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant นำ pellet ที่ได้มาละลายใน 5 ml ของ PBS, pH7.5 จากนั้นแยกไวรัสออกด้วย 30% chloroform โดยใช้ chloroform ประมาณ 3-4 ml แล้วนำไป centrifuged ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ส่วนบนสุดไว้ label เป็น S3 พักไว้ ส่วน pellet ที่อยู่ระหว่างของเหลวและ chloroform ถูกนำมาแยกไวรัสออกอีกครั้ง (re-extracted) ด้วย 0.5 volume ของ 0.5M arginine-0.15M NaCl, pH 7.5 หรือประมาณ 12.5 ml แล้วนำไป centrifuged ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บ supernatant ส่วนบนสุดไว้ label เป็น S4 จากนั้นนำ supernatant ทั้งสอง (S3, S4) มารวมกันแล้วนำตัวอย่างทั้งหมดไปทำให้เข้มข้นอีกครั้ง (reconcentrated) โดยใช้ SpeedVac centrifugation เพื่อลดปริมาตรจากประมาณ 10 ml ให้เหลือประมาณ 1 ml และเก็บที่ 4°C จนกว่าจะนำมาสกัด nucleic acid ต่อไป

5. การสกัด RNA

นำของเหลวที่สกัดได้จากหอยนางรมสด (*S. commercialis*) มาทำการสกัด RNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอโดยใช้ QIamp Viral RNA miniki (Roche, Germany) เริ่มจากนำของเหลวที่สกัดได้จากหอยนางรมสดมา 140 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วเติม 560 µl buffer AVL ที่ประกอบด้วย carrier RNA ลงไป จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม 560 µl absolute ethanol ลงไปแล้วนำไป vortex อีกครั้งเพื่อให้ส่วนผสม

ทั้งหมดเข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นดูดส่วนผสมที่ได้มา 630 µl ใส่ลงใน column ที่วางอยู่ใน collection tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นทำซ้ำอีกครั้ง โดยดูดส่วนผสมที่เหลืออีก 630 µl มาใส่ใน colum แล้ว centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate หลังจากนั้นล้างเศษขยะครั้งแรกโดยเติม 500 µl buffer AW1 ลงใน column แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate ล้างเศษขยะอีกครั้งด้วย 500 µl buffer AW2 แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate นำ column ไปปั่นเปล่าอีกครั้งที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ column แห้งแล้วเปลี่ยน collection tube ใหม่จากนั้นเติม 60 µl AVE buffer แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนของ filtrate นำมาแบ่งใส่ microcentrifuge tube ละ 6 µl เพื่อใช้ทำ RT-PCR

6. Reverse Transcription-Polymerase Chain

RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน nucleic acid ที่สนใจ โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ (template) ซึ่งการทดลองนี้จะใช้ SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq, USA ซึ่งประกอบไปด้วย Fidelity Taq™ RT-PCR Master Mix (Amersham Biosciences, UK) โดยจะใช้ 20 µM HAV forward primer (5’-TTGCTGTTCAAGGG-3’), 20 µM HAV reverse primer (5 ’AAAGTGGTAAGCAC-3’) ที่จำเพาะต่อบริเวณ VP2 ของ HAV gene ซึ่งขั้นตอนการทำ RT-PCR จะประกอบไปด้วย 2 ขั้นตอน โดยเริ่มจากขั้นดอนการเตรียมสารที่ใช้ในแต่ละ reaction ดังแสดงในตารางที่ 3-1 และขั้นตอนการทำปฏิกริยา RT-PCR ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-1 แสดงส่วนประกอบในแต่ละ reaction เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR

ส่วนประกอบในแต่ละ reaction	**ปริมาตรที่ใช้** (μl)
1. Fideli Taq™ RT-PCR Master mix	12.50
2. 10 μM HAV Forward Primer	2
3. 10 μM HAV Reverse Primer	2
4. 25 mM $MgCl_2$	1
5. Template HAV RNA	5
6. dH_2O water	2.50
Total	**25**

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดลงใน eppendorf จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermal cycle แล้วเลือกโปรแกรม RT-PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม RT-PCR

Step	**Temperature (^{0}C)**	**Time**
1. Prewarmed	42-50	30 min
Add Reaction		
2. Initial denature	94-95	3 min
3. Denature	94-95	30 sec
4. Annealing	55	30 sec
5. Extending	68	1 min
Repeat step 3-5 for 44 cycles		
6. Final	68	5 min
7. Cool	4	Pause

จากนั้นนำไปแช่เย็นที่ อุณหภูมิ -20^{0}C จนกว่าจะนำไปใช้

7. การวิเคราะห์ Nucleotide ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR

7.1 เตรียม 1.2% agarose gel

เตรียมอุปกรณ์โดยนำซี่หวี (comb) มาประกอบกับถาดเจล (gel chamber) พักไว้แล้วเตรียม 1.2% agarose gel โดยละลายผง agarose 1.2 g ลงใน electrophoresis buffer (TBE buffer) 100 ml แล้วนำไปหลอมในไมโครเวฟเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศา จึงค่อยๆเทลงบนถาดเจลที่ประกอบไว้แล้วขณะเทพยายามไม่ให้มีฟองอากาศรอให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เท 1XTBE buffer ลงไปในถาดเจลแล้วค่อยๆดึงซี่หวีออก จากนั้นวางถาดเจลลงในถาด run gel ในเครื่อง electrophoresis ที่บรรจุด้วย TBE buffer (รูปที่ 3.2)

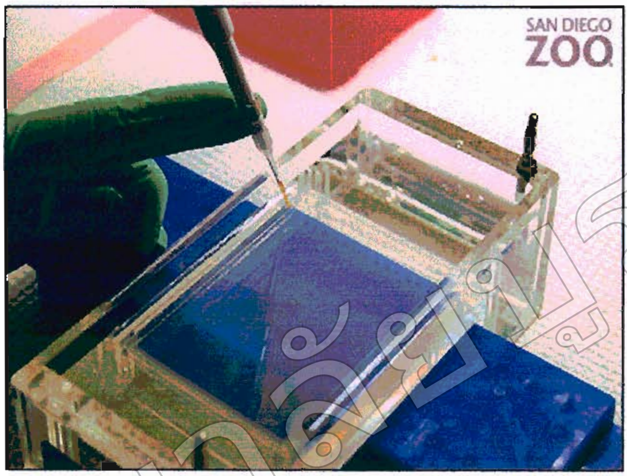
รูปที่ 3. 2: แสดงวิธีการเตรียม agarose gel

(Coffey et al., 2002)

7.2 ตรวจสอบ ความยาวของ nucleotide ของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR

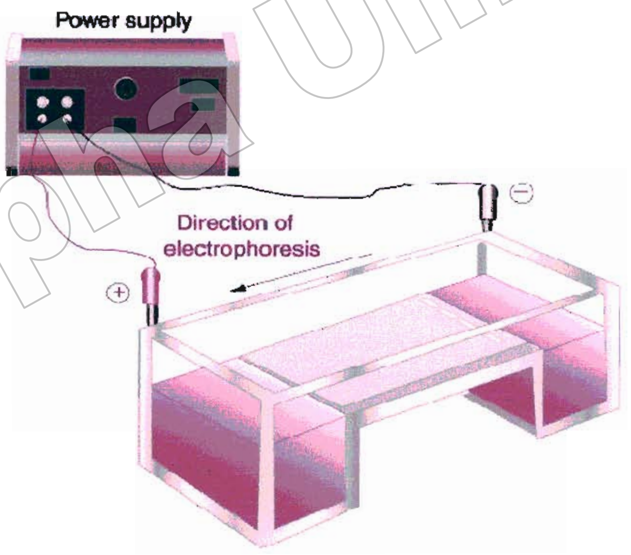
หลังจากเตรียม 1.2% agarose gel นำ 1 µl ของ 100 bp DNA ladder marker (TrackIt, Invitrogen) มา load ลงในหลุมแรกเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน (รูปที่ 3.3) แล้วนำ 1 µl PCR product ที่ได้มาผสมกับ DNA loading dye 1 หยด ที่มี syber gold ผสมอยู่ในอัตราส่วน 1:10,000 ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์ม แล้วดูดสารทั้งหมดไป load ลงในหลุมถัดไป จากนั้นปิดฝาแท็งค์แล้วต่อสายไฟให้กระแสไฟฟ้าจากขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ไปยังขั้วแอโนด (ขั้วบวก) ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 125V, 250 mA เป็นเวลาประมาณ 30 นาที (รูปที่ 3.4) เสร็จแล้วนำแผ่นเจลไปวางบนเครื่องที่มีแสงอุลตราไวโอเลตจะเห็นการเรืองแสงของ cDNA band ที่ขยายเพิ่มจำนวนมาจาก

HAV RNA แม่แบบโดย ความยาวของ nucleotide ของ HAV ที่ได้ควรจะประมาณ 242 bp แล้ว ถ่ายรูปเก็บไว้ศึกษา


SAN DIEGO
ZOO

รูปที่ 3.3 แสดงวิธี load DNA ลงใน agarose gel

(Storlie, 2007)

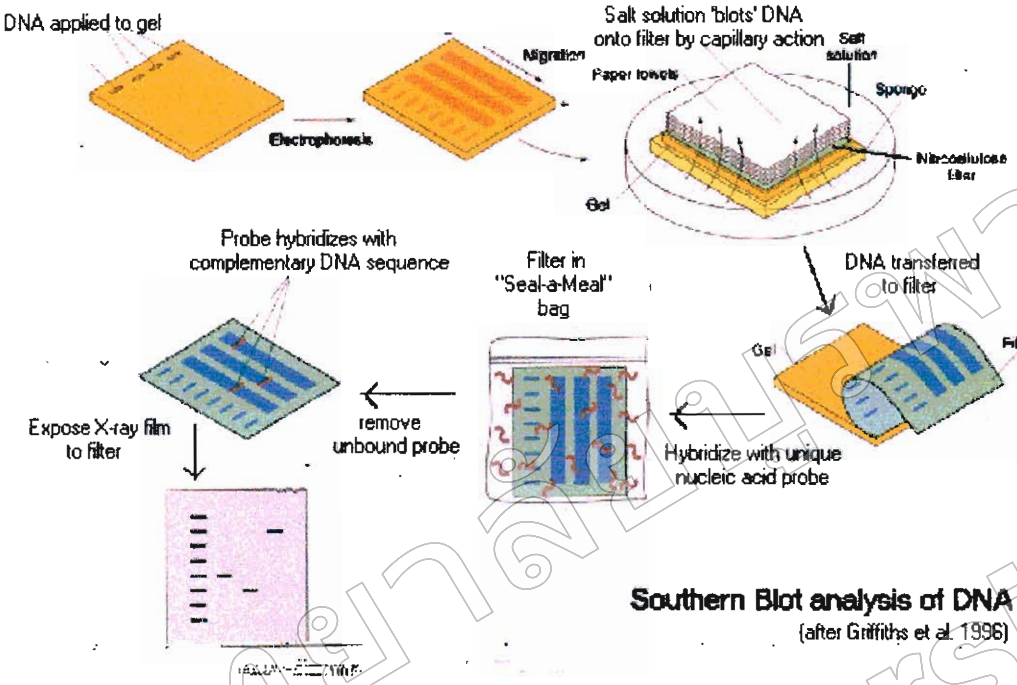

Power supply
⊖
Direction of electrophoresis
⊕

รูปที่ 3.4 แสดงการแยก DNA โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis

(Department of biochemistry & Molecular biophysics, 2001)

7.3 วิธี Southern blot hybridization

เริ่มจากเตรียมกระดาษกรอง 3 แผ่นขนาดเท่าแผ่น agarose gel พักไว้แล้วเตรียม nitrocellulose membrane 1 แผ่น ล้างน้ำกลั่นพอเปียกแล้วนำไปแช่ทิ้งไว้ใน transfer buffer และเตรียมตัดกระดาษทิชชู่ขนาดเท่าแผ่น agarose gel หนาอย่างน้อย 2 นิ้ว ทำการ blot โดยการนำ 1.2% agarose gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis มาแช่ใน 7 ml denature DNA solution เขย่าเบาๆบน shaker เป็นเวลา 30 นาที เทสารเดิมทิ้งแล้วเติม 7 ml neutralize solution ลงไป เขย่าเบาๆ บน shaker เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำอีกครั้งโดยแช่เจลใน 7 ml neutralize solution เป็นเวลา 20 นาที เทสารเดิมทิ้งแล้วเติม transfer buffer ลงไปเขย่าเบาๆบน shaker เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ agarose gel ไปวางไว้ใน glass plate แล้ววางแผ่น nitrocellulose membrane ไว้บน agarose gel โดยพยายามไม่ให้มีฟองอากาศ แล้ววางกระดาษกรองขนาดเท่ากับเจลไว้บนแผ่น nitrocellulose membrane โดยวางกระดาษกรองซ้อนกัน 3 แผ่นจากนั้นใช้กระดาษทิชชู่วางทับบนกระดาษกรอง แล้วนำของหนัก ๆ มาวางทับด้านบนเพื่อให้เจลแนบชิดกับแผ่น membrane มากที่สุดทิ้งไว้เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แผ่นกระดาษซับที่แห้งจะค่อย ๆ ดูดซับสารละลายบัฟเฟอร์ที่อยู่ข้างล่างให้เคลื่อนที่ขึ้นผ่าน agarose gel ไปยัง nitrocellulose membrane ในขณะที่สารละลายบัฟเฟอร์เคลื่อนที่นั้น ชิ้น DNA จะหลุดออกจาก agarose gel ไปเกาะติดกับแผ่น nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำแผ่น membrane ที่ได้ไปเข้าเครื่อง UV เป็นเวลา 5 นาที แล้วเข้าตู้ incubator ที่ 80°C เป็นเวลา 20 นาทีเพื่อให้ DNA ติด membrane แน่นขึ้นแล้วนำไปแช่ใน 5 ml hybridization buffer ที่ 55° C บนเครื่อง shaker เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ 10 µM BB probe (5'DIG-GATTGATCTGTGCTATGGTTCCTGGTG 3') ที่ผ่านความร้อน ที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมา 25 µl ละลายใน hybridization buffer 5 ml จากนั้นทิ้งไว้นาน 16 ชั่วโมง นำมาล้างด้วย wash I (2X SSC, 0.1% SDS) 2 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วล้างด้วย wash II (0.1X SSC, 0.1% SDS) 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที นำ membrane ไปแช่ใน 1% blocking solution ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม horseradish peroxidase(HRP)-labeled anti digoxigenin-POD (poly), Fab fragment (Roche, Germany) (1:1,000ใน 1% blocking solution) เขย่าเบา ๆ ด้วยเครื่อง shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย 5 ml PBS-0.05%Tween 20 จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที (รูปที่ 3.5)


DNA applied to gel
Electrophoresis
Migration
Salt solution 'blots' DNA onto filter by capillary action
Salt solution
Paper towels
Sponge
Nitrocellulose filter
Gel
DNA transferred to filter
Gel
Filter
Hybridize with unique nucleic acid probe
Filter in "Seal-a-Meal" bag
remove unbound probe
Probe hybridizes with complementary DNA sequence
Expose X-ray film to filter
Southern Blot analysis of DNA
(after Griffiths et al. 1996)

รูปที่ 3.5: แสดงวิธีตรวจสอบความจำเพาะของ cDNA band โดยเทคนิควิธี Southern blot hybridization (Griffiths et al., 1996)

จากนั้นนำไปตรวจสอบความจำเพาะของ cDNA band บนแผ่นฟิล์ม โดยเตรียม substrateที่ใช้โดยผสม Southern blotting detection reagent 1 ปริมาตร 1 ml กับ Southern blotting detection reagent 2 (Amersham ECL^{TM}Western Blotting Detection Reagent, UK) ปริมาตร 1 ml ในที่มืด ผสมให้เข้ากัน ประมาณ 1 นาที แล้วเทลงในกล่องที่มี nitrocellulose membrane ที่เท buffer ทิ้งแล้ว เขย่าเบา ๆ ด้วยมือประมาณ 5 นาที แล้วใช้ forcep คีบ membrane ปาดกับขอบกล่องให้แห้งมากที่สุด นำไปวางใน cassette ที่หุ้มด้วย wrab แล้ววาง wrab ทับลงบน membrane อีกชั้นหนึ่ง โดยรีดให้เรียบมากที่สุด แล้ววางแผ่นฟิล์มทับตัดให้มีขนาดเท่ากับ gel ปิดฝาทิ้งไว้ประมาณ 2.5-5 นาที จากนั้นนำฟิล์มจุ่มใน developer ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำแล้วจุ่มลงใน stopped bash ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำแล้วนำไปจุ่มใน super fixer ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำแล้วนำไปส่องดู band ที่เกิดขึ้นในที่มีแสงสว่าง (รูปที่ 3.5)

7.4 การทดสอบประสิทธิภาพการโอนย้าย cDNA โดยการย้อมสี agarose gel ด้วย syber gold

นำเจลที่ผ่านการทำ Southern blot มาย้อมสี syber gold ในอัตราส่วน 1:10,000 แล้วนำไปไปวางบนเครื่องที่มีแสงอุลตราไวโอเลตถ้าไม่มีการเรืองแสงของ band แสดงว่า cDNA ถูกย้ายไปยัง nitrocellulose membrane หมด

8. ตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

8.1 การเตรียมตัวอย่างหอยนางรมสด (*S. commercialis*) จาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

เก็บหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายที่ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรีในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือนตั้งแต่เดือน พฤษภาคม-ตุลาคม 2551 นำมาแกะเปลือกออก ตัดแบ่งแยกส่วนเนื้อ (ประกอบด้วยหอยประมาณ 5-6 ตัว) และ digestive tract (ประกอบด้วยหอยประมาณ 3-4ตัว) ออกจากกัน โดยแต่ละส่วนแยกเก็บไว้ 25 g และเก็บไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะใช้

8.2 ตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) จาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

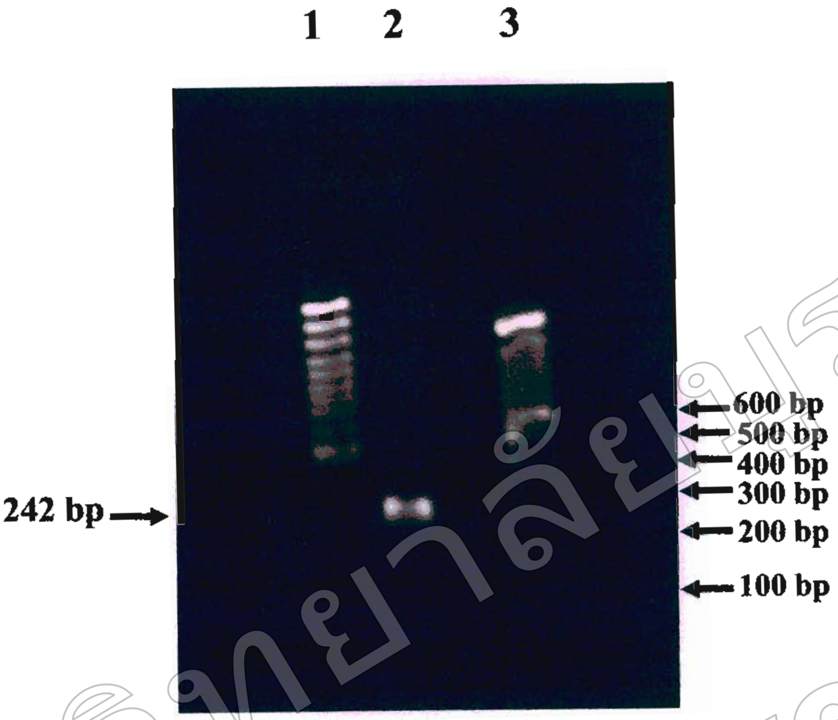
นำหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ทั้งส่วนที่เป็นเนื้อและ digestive tract ที่เก็บไว้ส่วนละ 25 g ในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือน นำมาทำการสกัดด้วยวิธี acid-adsorption alkaline elution (Kittigul et al, 2008) ดังที่กล่าวแล้วในหัวข้อที่ 4 แล้วนำมาสกัด RNA ของไวรัสตับอักเสบเอ โดยใช้ QIamp Viral RNA minikit 50 (Roche, Germany) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR แล้วนำผลที่ได้จากการทำ RT-PCR ไปวิเคราะห์ความยาวของ nucleotide ของ cDNA band โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis แล้วตรวจสอบความจำเพาะของ cDNA band ที่แยกได้ โดยใช้เทคนิค Southern blot hybridization

บทที่4

ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Reverse Transcription-Polymerase Chain (RT-PCR) โดยใช้ pure HAV genome

นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์ (pure HAV genome) เป็นแม่แบบมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA ladder marker (TrackIt, Invitrogen) ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน จากผลการทดลองพบว่า cDNA band ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คาดไว้คือ 242 bp (รูปที่ 4.1) และเมื่อพิสูจน์ความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้ด้วยเทคนิค southern blot hybridization พบว่าเกิดสัญญาณขึ้น ณ ตำแหน่งที่มีการปรากฏของ cDNA band (รูปที่ 4.2) แสดงว่า primer ที่ใช้สามารถเพิ่มขยายจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ และสามารถยืนยันได้ว่า cDNA band ที่ได้นี้เป็น cDNA band ของ pure HAV genome จึงสมควรนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

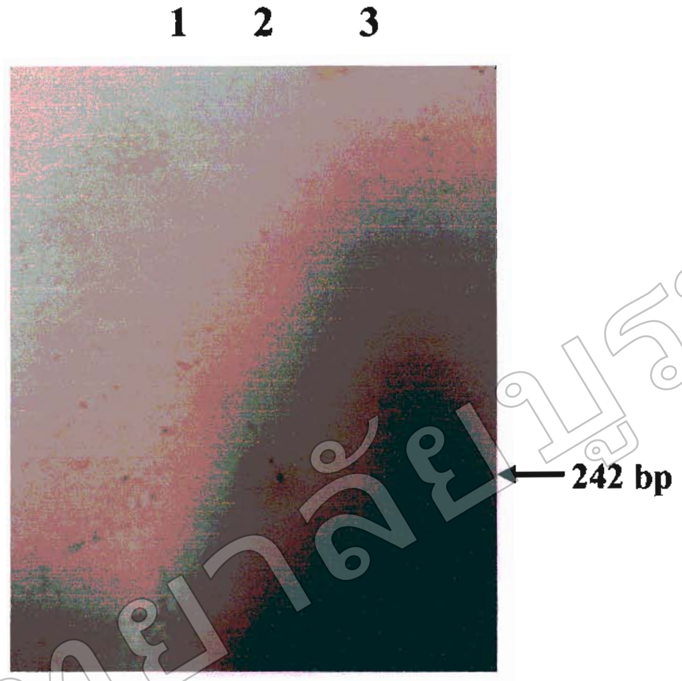

1
2
3
242 bp
600 bp
500 bp
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

รูปที่ 4.1: ผลผลิต cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ pure HAV genome เป็นแม่แบบ (template) ซึ่งได้น้ำหนักโมเลกุลตามที่คาดคือ 242 bp โดยถ่ายจาก 1.2% agarose gel electrophoresis

Lane 1: 100 bp marker (Fermentus)

Lane 2: cDNA ผลผลิตที่ได้จาก RT-PCR

Lane 3: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen)



รูปที่ 4.2: แสดงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค hybridization เมื่อใช้ pure HAV genome เป็นแม่แบบ (template) จากการทดลองใช้ 50 nM DIG-labeled probe และตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti digoxigenin-POD (poly), Fab fragment (Roche, Germany) (1:1,000 ใน 1% blocking solution) ลูกศรที่ชี้แสดงถึง band ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คาดคือ 242 bp

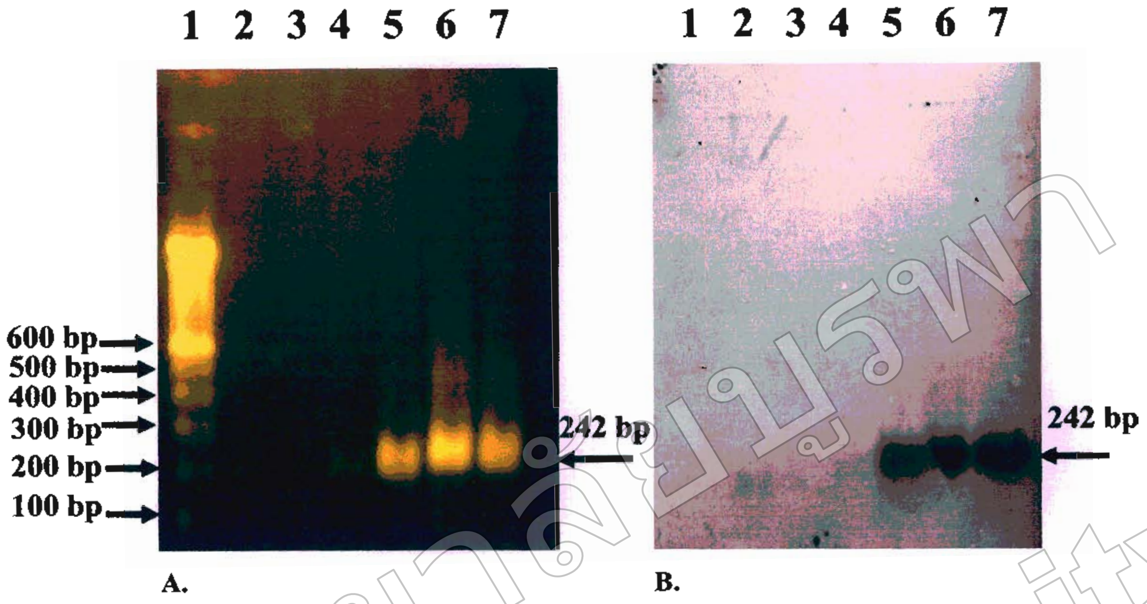
Lane 1: 100 bp marker (Fermentus)

Lane 2: cDNA ผลผลิตจาก RT-PCR

Lane 3: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen)

2. ตรวจสอบขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR ในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV viruses

เพื่อตรวจสอบขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค RT-PCR จากการนำเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ถูกทำให้ปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปริมาณแตกต่างกันคือ 1, 10, 100 µl และเจือจางไวรัสในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 ด้วยปริมาตร 100 µl แล้วสกัด virion ของเชื้อไวรัสออกด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method จากนั้นทำการสกัด nucleic acid ของ HAV viruses และเพิ่มจำนวน nucleic acid ของ HAV viruses ด้วยเทคนิค RT-PCR และตรวจสอบผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR นี้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน 100 bp DNA ladder marker (TrackIt, Invitrogen) จากผลการทดลองพบว่า cDNA band ในหอยนางรมสดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยปริมาตร 1, 10, 100 µl โดยที่ band ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คาดไว้คือ 242 bp (รูปที่ 4.3 A) และเมื่อนำไปพิสูจน์ความจำเพาะของ primer กับ cDNA band ที่ได้ด้วยเทคนิค southern blot hybridization พบว่าเกิดสัญญาณขึ้น ณ ตำแหน่งที่มีการปรากฏของ cDNA band ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้ของหอยนางรมสดที่ทำการปนเปื้อนด้วย HAV ด้วยปริมาตร 1, 10, 100 µl (รูปที่ 4.3 B) อย่างไรก็ตามไม่พบ band ใดเลยในหอยนางรมสด ที่ถูกทำให้ปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4. 3: แสดงผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR และแสดงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค hybridization จากเนื้อหอยนางรมสด (*S.commercialis*) ที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย HAV viruses ที่ปริมาณต่าง ๆ (A.) ผลผลิต cDNA band ที่ได้จากปฏิกริยา RT-PCR ซึ่งได้น้ำหนักโมเลกุลตามที่คาดคือ 242 bp โดยถ่ายจาก 1.2% agarose gel electrophoresis (B.) การทำ hybridization โดยใช้ 50 nM DIG-labeled probe และทำการตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti digoxigenin-POD (poly), Fab fragment (Roche, Germany) (1:1,000ใน 1% blocking solution) ลูกศรที่ชี้แสดงถึง band ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 242 bp

Lane 1: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen)

Lane 2: Negative control (dH_2O)

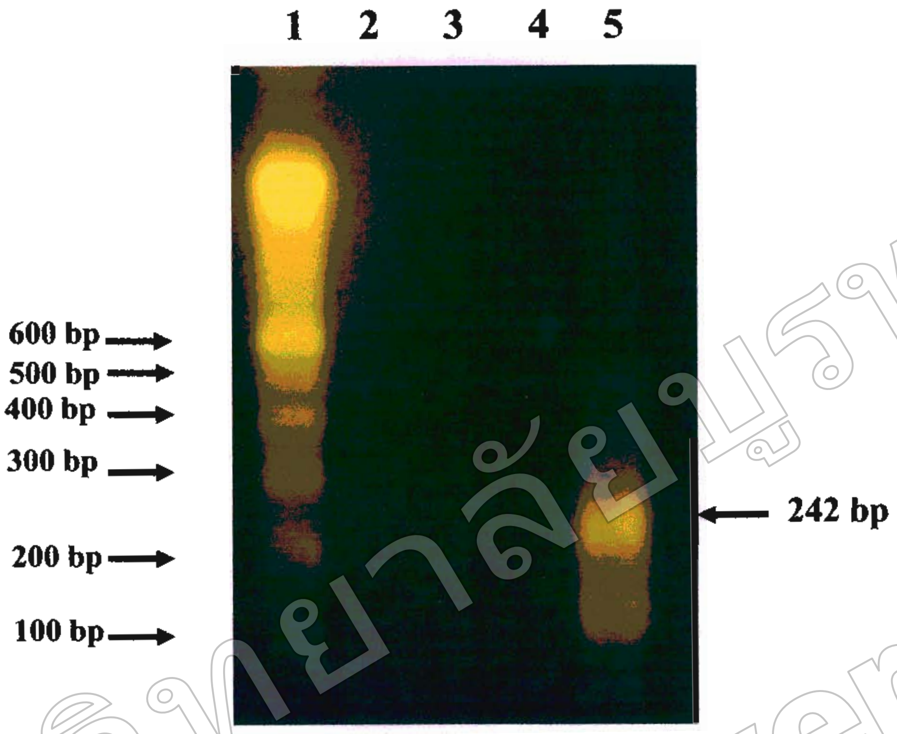
Lane 3: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ไม่มีการปนเปื้อน HAV จากห้างโลตัส

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ไม่มีการปนเปื้อน HAV จากหนองมน

Lane 5: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 1 µl

Lane 6: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 10 µl

Lane 7: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 100 µl



รูปที่ 4.4: ผลผลิต cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ที่สกัดได้จากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย HAV viruses ที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ โดยถ่ายจาก 1.2% agarose gel electrophoresis โดยลูกศรชี้ถึง cDNA band ที่น้ำหนักโมเลกุล 242 *bp*

Lane 1: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen)

Lane 2: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10

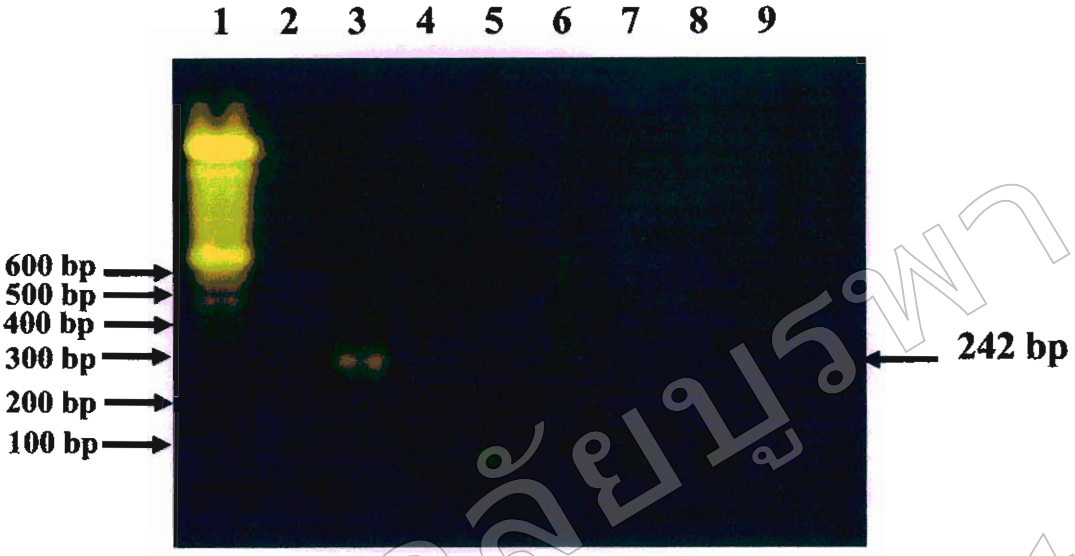
Lane 3: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:100

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1000

Lane 5: positive control (ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ด้วยปริมาตร 100 µl)

3. ตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี

จากการนำหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ตัดแบ่งแยกส่วนเนื้อออกจาก digestive tract นำส่วนที่เป็นเนื้อและ digestive tract ส่วนละ 25g ในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือน ตั้งแต่พฤษภาคม-ตุลาคม พ.ศ.2551 นำมาทำการสกัดด้วยวิธี acid-adsorption alkaline elution แล้วสกัด RNA ของไวรัสตับอักเสบเอ นำไปเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR นำ cDNA ผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR ไปวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน 100 bp DNA ladder marker (TrackIt, Invitrogen) และนำไปพิสูจน์ความจำเพาะของ primer กับ cDNA band ที่ได้ด้วยเทคนิค southern blot hybridization จากการทดลองพบว่า ไม่พบ cDNA band ใดเลยทั้งส่วนของเนื้อและ digestive tract ของหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่เก็บจากตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี (รูปที่ 4.5 และ 4.6 ตามลำดับ) ทุกเดือนที่ทำการตรวจสอบ ในขณะที่ positive control ที่ใช้พบว่า เกิด cDNA band ขึ้น ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 242 bp



รูปที่ 4.5: ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ที่สกัดจากส่วน digestive tract ของหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือนและตรวจสอบโดยใช้ 1.2% agarose gel electrophoresis

Lane 1: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen)

Lane 2: Negative control (dH_2O)

Lane 3: Positive control ของเหลวที่สกัดได้จากหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 10

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของ digestive tract หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน พฤษภาคม 2551

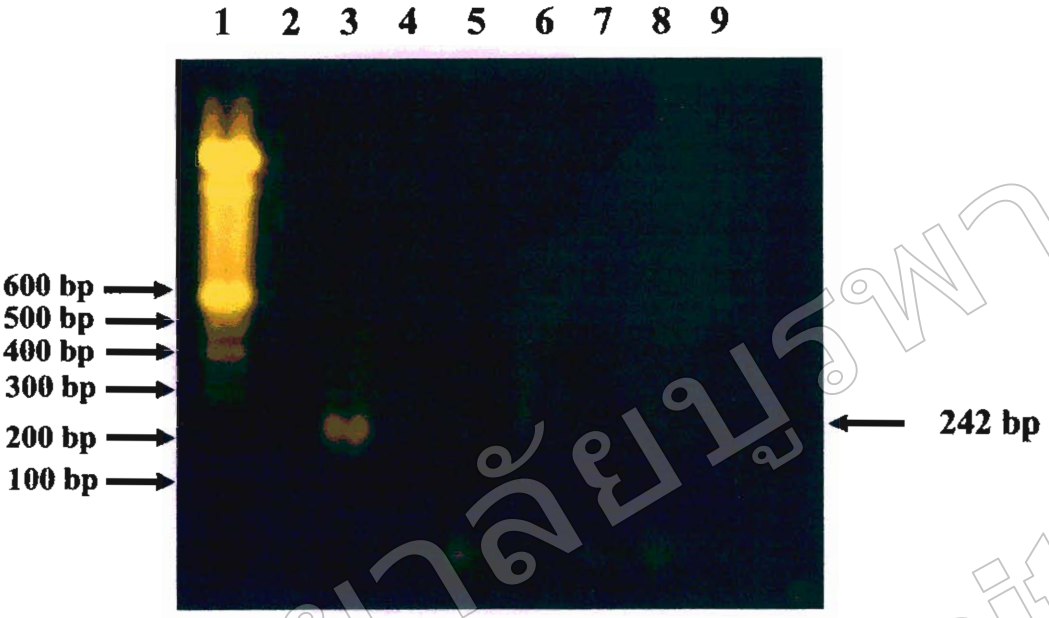
Lane 5: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของ digestive tract หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน มิถุนายน 2551

Lane 6: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของ digestive tract หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน กรกฎาคม 2551

Lane 7: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของ digestive tract หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน สิงหาคม 2551

Lane 8: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของ digestive tract หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน กันยายน 2551

Lane 9: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของ digestive tract หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน ตุลาคม 2551



รูปที่ 4.6: ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ที่สกัดจากส่วนเนื้อของหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในแต่ละเดือนเป็นเวลา 6 เดือน และตรวจสอบโดยใช้ 1.2% agarose gel electrophoresis

Lane 1: 100 bp marker (Track-it,Invitrogen)

Lane 2: Negative control (dH_2O)

Lane 3: Positive control ของเหลวที่สกัดได้จากหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 10 µl

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน พฤษภาคม 2551

Lane 5: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน มิถุนายน 2551

Lane 6: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน กรกฎาคม 2551

Lane 7: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน สิงหาคม 2551

Lane 8: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน กันยายน 2551

Lane 9: ของเหลวที่สกัดจากส่วนของเนื้อหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่วางขายในเดือน ตุลาคม 2551

บทที่5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ในปัจจุบันมีการระบาดของโรคในระบบทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก โดยส่วนมากมักจะเกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยนางรมที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (Less et al., 2000) ซึ่งเทคนิค RT-PCR ที่ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมไม่สามารถใช้ตรวจหาได้โดยตรงเนื่องจากในหอยนางรมมักมีส่วนประกอบอื่นที่มีผลยับยั้งการทำงานของ reverse transcriptase enzyme เช่น คาร์โบไฮเดรต, โปรตีน และไขมันที่เป็นองค์ประกอบของหอยซึ่งอาจทำให้ไม่เกิดสัญญาณหรือเกิดผลลบปลอม (false negative) ได้ (Rossen et al., 1992; Dix & Jaykus, 1998; Green et al., 1998; Shiel et al., 1999) ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาและตรวจหาเชื้อไวรัสในหอยนางรมสดโดยใช้กระบวนการสกัดที่มีประสิทธิภาพและทำให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น จากงานวิจัยนี้ใช้การสกัดเชื้อไวรัสด้วยกระบวนการ acid adsorption-alkaline elution method ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธี direct alkaline elution และ acid adsorption–neutral elution (Kittigul et al., 2008) เป็นการดึงเอาไวรัสออกจากเนื้อหอยนางรมสดที่ภาวะความเป็นกรดตามด้วยการแยกไวรัสออกด้วย 0.5M arginine-0.15M NaCl, pH 7.5 แล้วตกตะกอนไวรัสด้วย 12.5% PEG 8000 – 0.3M NaCl แล้วทำการแยกไวรัสออกอีกครั้งด้วยโดยใช้ chloroform และทำให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นขึ้นโดยใช้ SpeedVac centrifugation แล้วสกัด nucleic acid ของ HAV viruses ก่อนใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัสได้ตั้งแต่ 1.25×10^3 PFU/ml (Kittigul et al., 2008)

สำหรับในงานวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบขีดความสามารถ (detection limit) ของเทคนิค RT PCR ที่ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด โดยการนำผลผลิตที่สกัดได้จากเนื้อหอยนางรมสดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนจำลองที่ปริมาตร 1, 10, 100 µl และในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ1:1000 มาทำปฏิกิริยา RT-PCR แล้วตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis พบว่าเกิด cDNA band ขึ้นในหอยนางรมที่ถูกทำให้ปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปริมาตร 1, 10, 100 µl ซึ่ง cDNA band ที่ตรวจพบมีน้ำหนักโมเลกุลตามที่คาดไว้คือ 242 bp (รูปที่ 4.3 A) เมื่อเทียบกับ 100 bp DNA ladder marker (TrackIt, Invitrogen) ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบมาตรฐาน ซึ่งการพบ band เกิดขึ้นนี้หมายความว่า primer ที่ใช้สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ได้จึงเกิดปฏิกิริยา RT-PCR และเมื่อใช้ร่วมกับเทคนิค Southern blot hybridization จะช่วยพิสูจน์ความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสดได้ จากการทดลองพบว่าเกิด

สัญญาณขึ้น ณ ตำแหน่งที่มีการปรากฏของ cDNA band (รูปที่ 4.3 B) แสดงว่า probe ที่ใช้มีความจำเพาะกับ cDNA band ที่ได้จึงสามารถยืนยันได้ว่า cDNA band ที่ได้นี้เป็น cDNA band ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ต้องการหาจริง ๆ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบ band ใดเลยในหอยนางรมสดที่ถูกทำให้ปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 จากการทดลองในครั้งนี้ ทำให้ทราบขีดความสามารถของเทคนิค RT-PCR ซึ่งสามารถใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุดได้ที่ปริมาตร 1 µl อย่างไรก็ตามการหา detection limit โดยใช้การวัดปริมาตรนั้นมีข้อด้อยคือ ไม่สามารถตรวจหาจำนวนอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ได้ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงควรทำ plaque assay เพื่อใช้ตรวจหาจำนวนอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหน่วย PFU/ml ด้วย แต่เนื่องจากการทำ cell culture สำหรับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เป็นไปได้ยากและใช้เวลานาน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงยังไม่ได้ทำการทดลองนี้

จากการสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method เมื่อนำไปใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่อาจปนเปื้อนในหอยนางรมสด (*S. commercialis*)ที่ขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในแต่ละเดือนตั้งแต่เดือนพฤษภาคม-ตุลาคม 2551 โดยการทำให้ไวรัสเข้มข้นขึ้นด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method และใช้เทคนิค RT PCR ที่ทราบขีดความสามารถในตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุดได้ที่ปริมาตร 1 µl ร่วมกับเทคนิค Southern blot hybridization เมื่อทำการตรวจหาในหอยนางรม (*S. commercialis*) ที่ขายจาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ทั้งส่วนที่เป็น digestive tract และส่วนของเนื้อหอย พบว่า ไม่พบ band เกิดขึ้นเลย ทั้ง 2 ส่วน แต่อย่างไรก็ตามไม่ได้หมายความว่า ไม่มีเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ตรวจสอบแต่อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ปริมาณต่ำกว่า detection limit ที่หาได้

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่า เทคนิค RT-PCR สามารถใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ถูกทำให้เข้มข้นด้วยวิธี acid-adsorption alkaline elution ได้น้อยที่สุดที่ปริมาตร 1 µl และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสด (*S. comercialis*) จาก ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยใช้การสกัดหอยด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method และใช้เทคนิค RT-PCR พบว่า ไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ทั้งส่วนที่เป็นเนื้อและ digestive tract ของหอยนางรมสด (*S. commercialis*) แต่ไม่ได้หมายความว่าไม่มีเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ปนเปื้อนอยู่ใน

หอยนางรมสด (*S. commercialis*) ที่ตรวจสอบอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ อยู่ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 µl (detection limit) ดังนั้นจึงตรวจไม่พบ

ข้อเสนอแนะ

ควรทำ plaque assay ร่วมด้วยเพื่อตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหน่วย PFU/ml นอกจากนี้ควรพัฒนาการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมากับอาหารให้สะดวก รวดเร็วขึ้นและยังใช้เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร

เอกสารอ้างอิง

ชมรมโรคตับแห่งประเทศไทย. (2544). *ความรู้เรื่องโรคตับสำหรับประชาชน*. กรุงเทพฯ: ชมรมโรคตับสำหรับประชาชน.

นุสนธิ์ กลัดเจริญ. (2532). *โรคตับ เรื่องน่ารู้สำหรับประชาชน*. กรุงเทพฯ: เมดิคัล มีเดีย.

เฟื่องเพชร เกียรติเสวี. (2537). *ตับอักเสบจากไวรัสสมัยนี้*. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: กรุงเทพวารสาร.

มาลินี อัศวดิษฐเลิศ. (2550). *ไฮบริไดเซชั่น*. วันที่ค้นข้อมูล 12 มกราคม 2551, เข้าถึงได้จาก http://www.biotec.or.th /biotechnology-th/newsdetail.asp?id=3265

ยง ภู่วรรณ. (2529). *ไวรัสตับอักเสบและการป้องกัน*. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ.

ยุวดี จอมพิทักษ์, ทรงชัย สิมะโรจน์, พรชัย สิมะโรจน์, ธวัชชัย สิมะโรจน์ และมยุรี ภิรมย์โสภา, (2540). *ตับแข็ง ตับอักเสบ*. กรุงเทพฯ: หอสมุดกลาง.

ภาวพันธ์ ภัทรโกศล. (2550). *หลักไวรัสวิทยาทางการแพทย์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โนว์เลจด์เพรส.

สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. (2543). *ตับอักเสบจากไวรัส*. กรุงเทพฯ: บางกอกบล๊อก.

Bidawid S., Farber J.M. and Sattar S.A. (2000). Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries. *J. Virol.* 88, 175-185.

Bordier B.B., Marion P.L., Ohashi K., Kay M.A., Greenberg H.B. and Casey J.L., et al. (2002). A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* 76, 10465-10472.

Carmen W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M.J. and Makris A., et al. (1989). Mutations preventing formation of antigen in-patients with chronic HBV infection. *Lancet.* 2, 588-591

Chao Y.C., Chang M.F, Gust. I., and Lai M.M. (1990). Sequence conservation and divergence of hepatitis delta virus RNA. *Virology.* 178, 384-392.

Chaves R.L., Graff J., Normann A. and Fleming B. (1994). Specific detection of minus strand hepatitis a virus RNA by tail-PCR following reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* 22(10), 1919-1920

Cliver D.O. and YIideng M. (1995). Persistence of inoculated hepatitis a virus in mixed human and animal wastes. *Appl Environ Microbiol.* 61(1), 87-91.

Cockayne E.A. (1912). Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Q. J. Med.* 6, 1-29.

Coelho C., Heinert A.P., Simoes C.M.O. and Barardi C.R.M. (2003). Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J.Food Prot.* 66(3), 507-511.

Coffey S., Hinden D., Kingston K., Mansfied T. and Nulty B. (2002). *Making an agarose gel.* Retrieved Jan 20 2009, from www.bio.davidson. edu/.../method/ lemethod/le.htm

Cromeans T., Nainan O.V., Fields H.A., Favorov M.O. and Margolis H.S. (1994). Hepatitis A and E viruses. Cited by Hui YH, Gorham J.R., Mucell K.D. and Cliver D.O. *Foodborne diseases handbook.* New York: Marcel Dekker.

Daily A. (2007). *Virus.* Retrieved Jan 20, 2009, from anukp.wordpress.com/2007/01/21/

Deinhardt F., Holmes A. W., Capps R. B., and Popper H. (1967). Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkey. *J. Exp M.* 31, 125(4).

Deinhardt F., Peterson D., Cross G.,Wolfe L. and Holmes A.W. (1975). Hepatitis in marmosets. *American Journal of the Medical Sciences*, 270(1), 73-80.

Department of biochemistry & Molecular biophysics. (2001). *Nucleic acid biochemistry.* Retrieved Jan 20 2008, from www.biochem.arizona.edu/.../Lecture2.html.

Department of biology, Davidson college, Davidson, (2002). *Southern and Northern Blots.* Retrieved Jan 20,2008, from www.bio.davidson.edu/.../method/lemethod/le.htm.

Dix A.B. and Jaykus L.(1998). A virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hardshelled clams. *J. Food Prot.* 61, 458-465.

Feinstone S.M., Kapikian A.Z. and Purceli R.H. (1973). Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science.* 182 (116), 1026–1028.

Griffiths et al., (1996). Hybridization. Retrieved Jan 20 2008, from http://www.koreanbio.org/ Biocourse/index.php/Hybridization.

Green J., Henshilwood K., Gallimore C. I., Brown D.W.G. and Lees D. N. (1998). A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 858-863.

Halliday M.L., Kang L.Y., Zhou T.K., Hu M.D., Pan Q.C. and Fu T.Y. et al. (1991). An epidemic of hepatitis a attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J. Infect. Dis.* 164, 852-859.

Hopps H.E, Bernheim B.C., Nisalak A., Tjio J.H. and Smadel J.H. (1963). Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the African green monkey. *J. Immunol.* 91, 416-424.

Invertebrates zoology for fisheries. (2004). *Phylum mollusca.* Retrieved Jan 22 2009, from http://web.nkc.kku.ac.th/118214 /modules.php?name=Content& pa=showpage&pid=18

Jansen R.W., Siegl G. and Lemon SM. (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc Natl Acad Sci.* 87(8), 2867–2871.

Jones N.L., Day A.S., Jennings H.A. and Sherman P.M. (1999). Helicobacter pylori Induces Gastric Epithelial Cell Apoptosis in Association with Increased Fas Receptor Expression. *Infect. Immun.* 67, 4237-4242.

Kittigul L., Pombubpa K., Rattanatham T., Diraphat P., Utrarachkij F. and Pungchitton S. et al. (2008). Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol.* 122(1-2), 204-210.

Rossen K., Nully P., and Skov B.G. (1992). Heterotopic thyroid tissue localized to the pelvis *Pub.Med.* 154(16), 1114-1115.

Storlie J. (2007). *Gel Electrophoresis Protocol.* Retrieved Jan 12 2009, from https:/.../gel-electrophoresis-protocol.

Le G., Veronica C., Fabienne L., Lynn J., Françoise S. and Linda J.S. (2006). Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. *App. Environ.l Microbiol.* 72(3), 1800-1809.

Lces D. (2000).Viruses and bivavalveshellfish.Internation. *J Food Microbiol.* 59, 81-116.

Marion K.,Erwin D. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International J. Food Microbiology.*

Melnick J.L., Rennick V. (1980). Infectivity titers of enterovirus as found in human stools. *J. Med Virol.* 5, 205-220.

Microbiology microbes everywhere. (2008). *The Petroff-Hauser counting chamber.* Retrieved Jan 20 2009, from http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book...

Miller S.A. and Harley J.P. (2002).*Zoology*. 5th ed. Boston: McGraw-Hill.

Nainan OV., Xia G., Vaughan G. and Margolis HS. (2006). Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol.* (1), 63-79.

Provost P. and Hilleman M. (1979). Propagation of human hepatitis a virus in cell culture in vitro. *J. Med Virol.* 160, 213-221.2.

Roos B. (1956). Hepatitis epidemic conveyed by oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 989-1003.

Richardt H. (2007). *Chapter nineteen-hepatitis part one-disease transmitted enterically hepatitis A and E.* Retrieved Jan 12 2009, from pathmicro.med.sc.edu/virol/hepatitis-disease.htm.

Rossen K., Nully P., Skov B.G. (1992). Heterotrophic thyroid tissue localized to the pelvis *Pub.Med.* 154(16), 1114-1115.

Safer.healthier.people. (1997). *Centers for disease control and prevention.* Retrieved Jan 12 2009, from http://wonder.cdc.gov/.../m0048084/m0048084.asp.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

วิธีการเตรียมสารละลาย ที่ใช้ในงาวิจัยครั้งนี้

1. การเพาะเลี้ยง Frhk-4 cell และ BS-C 1 cell

10% DMEM complete (200 ml)

10X DMEM	20	ml
Fetal bovine serum (FBS)	20	ml
0.0016 mg /ml Fungizone	0.8	ml
500 U/ ml Pen.G.	2	ml
0.01 mg /ml Gentamysin	0.2	ml
5% $NaHCO_3$	4	ml
เติมน้ำกลั่น	153.8	ml

ปรับ pH = 6.8-7.2 ด้วย 1 N HCl และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

Serum for Freeze (DMEM) 100 ml

DMSO	10	ml
Incomplete DMEM	40	ml
Fetal bovine serum (FBS)	50	ml

เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

1X MEM complete for BS-C 1 (100 ml)

10X MEM	10	ml
Fetal bovine serum (FBS)	10	ml
5% $NaHCO_3$	2	ml
100X Pen. G.	1	ml
4,000 µg /ml Gentamysin	0.1	ml
250 µg/ml Fungizone	0.4	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	100	ml

ปรับ pH = 6.8-7.2 ด้วย 1 N HCl และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1X Trypsin-versine mixture (0.25%) 100 ml

2.5 % Trypsin	10	ml
10X Versine	10	ml
PBS	80	ml

เก็บที่อุณหภูมิ -20°C

10X PBS Buffer (1000 ml)

Na_2HPO_4	115	g
NaH_2PO_4	29.6	g
NaCl	58.4	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

ปรับ pH = 7.5 ด้วย 1 N HCl

1X PBS buffer (1L)

10X PBS	100	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สกัดไวรัสจากเนื้อหอยนางรม

Stock: 100% TPB Media (50 ml)

Tryptose	1	g
Dextose	0.1	g
Nacl	0.25	g
Na_2HPO_4	0.125	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	50	ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4°C

Stock: 25%PEG 8000-0.3M Nacl (200 ml)

PEG 8000	50	g
NaCl	3.5	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	200	ml

Working: 1N HCl (50 ml)

Conc. HCl (12 N)	4.17	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	50	ml

Working: 2.9% TPB contained 6% glycine, pH 9.0 (100 ml)

100 % TPB	2.9	ml
Glycine	6	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	100	ml

ปรับ pH = 9 ด้วย 1 M NaOH

Working: 0.5M Arginine-0.15M Nacl (250 ml)

Arginine	21.78	g
Nacl	2.19	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	250	ml

ปรับ pH = 9 ด้วย 1 M NaOH

Working: 0.05M PBS buffer (500 ml)

10X PBS, pH7.5	2.5	ml
Water	497.5	ml

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.เตรียม Stock HAV และ Plaque assay

Maintenance media for FrhK-4 และ BS-C 1 cell (contained 2% FBS) 100 ml

10X DMEM	10	ml
Fetal bovine serum (FBS)	2	ml
5% $NaHCO_3$	2	ml
100X Pen. G.	1	ml
4,000 μg /ml Gentamysin	0.1	ml
250 μg/ml Fungizone	0.4	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	100	ml

ปรับ pH = 6.8-7.2 ด้วย 1 N HCl และ เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

Growth media For FrhK-4 และ BS-C 1 (contained 2% gamtragacanth) 100 ml

Maintenance media For FrhK-4	50	ml
2% gamtragacanth	50	ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

2% Gamtragacanth (100 ml)

Gamtragacanth	2	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	100	ml

Autoclave และเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4.วิเคราะห์ผล RNA โดย Agarose gel electrophoresis

Stock: 10X TBE buffer (1000 ml)

Tris base	108	g
Boric acid	55	g
EDTA	9.3	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Stock: 1.2% Agarose gel (100 ml)

Agarose Powder	1.2	g
เติม1X TBE buffer จนมีปริมาตรรวมเป็น	100	ml

Working: 1X TBE buffer (1000 ml)

10X TBE buffer	100	ml
เติมน้ำกลั่น	900	ml

5. Southern blot hybridization

Denature DNA solution

Stock: 5M NaCl (1000 ml)

NaCl	292.5	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Stock: 10M NaOH (200ml)

NaOH	80	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	200	ml

Working: (3M NaCl+0.5N NaOH; 1000 ml)

5M NaCl	600	ml
10M NaOH	50	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Neutralized Buffer

Stock: 5 M NaCl (1000 ml)

NaCl	292.5	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Stock:10 M NaOH (200 ml)

NaOH	80	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	200	ml

ปรับ pH 7.0 ด้วย 1 N HCl

Working: 20% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 200 ml

Sodium dodecyl sulfate (SDS)	40	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	200	ml

Working: 1M Maleic acid (1000 ml)

Maleic acid	116.07	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Stock: Protein blocking stock solution 10X con. (20 ml)

Protein blocking reagent	2	g
Maleic acid buffer	20	ml

ต้องเตรียมที่อุณหภูมิ 65°C และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

Working: (0.5M Tris-HCl+1.5M NaCl: 1L)

Tris-HCl	60.55	g
5M Nacl	300	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

ปรับ pH =7 โดย 1M HCl

Transfer Buffer (10X SSC: 1L)

Stock: 20X SSC (1000 ml)

NaCl	175.5	g
Sodium citrate	88.23	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

ปรับ pH =7 โดย 1M HCl

Working: (10X SSC: 1L)

20X SSC	500	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

7. Hybridization

Hybridization buffer

Stock: 20% SDS (200ml)

SDS	40	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Stock: 1M Maleic acid (1L)

Maleic acid	116.07	g
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	1000	ml

Stock: 10Xconc Blocking solution (20ml)

Blocking reagent	2	g
Maleic acid buffer	20	ml

ขณะเตรียมต้องเขย่าบน Heating Block (65°C) และเก็บที่ 4 °C

หากต้องการเก็บไว้นานนำไป Incubateที่ 65°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บ Freezed

Stock: 5X SSC (50 ml)

20X SSC	12.5	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	50	ml

Working: 5X SSC+0.1% N-laurylsarcosine+0.02% SDS+2% Blocking solution+50% Dimethyl formamind (250ml)

20X SSC	62.5	ml
N-laurylsarcosine	0.25	g
20% SDS	0.25	ml
10X Blocking solution	4	ml
Dimethyl formamind	125	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	250	ml

Washing hybridization solution

WashI: 2XSSC+0.1%SDS (250ml)

20X SSC	25	ml
20% SDS	1.25	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	250	ml

WashII: 0.1XSSC+0.1%SDS (250ml)

20X SSC	1.25	ml
20% SDS	1.25	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	250	ml

Maleic acid buffer (100ml)

1M Maleic acid	10	ml
5M NaOH	3	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	100	ml

ปรับ pH =7.5 โดย 1M NaOH

Blocking solution (1X conc.) 20 ml

10X Protein blocking stock solution	2	ml
Maleic acid buffer	20	ml

เก็บที่อุณหภูมิ 4°

Washing Buffer or PBS-T

Working: 1X PBS+0.05%Tween ® 20(300ml)

10XPBS	30	ml
0.05%Tween ® 20	0.15	ml
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรรวมเป็น	300	ml

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวมนสิชา บุญศิริ
วัน เดือน ปีเกิด	4 พฤศจิกายน 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานครฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	27/9 ถ.อารักษ์ ต.ศรีภูมิ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2541	จบการศึกษาระดับประถมศึกษา โรงเรียนพระหฤทัย จ.เชียงใหม่
พ.ศ. 2544	จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนพระหฤทัย จ.เชียงใหม่
พ.ศ. 2547	จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพระหฤทัย จ.เชียงใหม่
พ.ศ. 2551	จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา