การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ในเขตพื้นที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Detection of viral genome of Hepatitis A virus from Oysters (*Saccostrea commercialis*) in Chanthaburi province by Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

วิทยา ภูมิภักดิ์

โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา
ปีการศึกษา 2551

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และคณะกรรมการสอบปากเปล่า ได้พิจารณาแล้ว มีความเห็นสมควรรับโครงงานวิจัยดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานวิจัย

.... ประธาน

(ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.... ประธาน

(ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส)

.... กรรมการ

(ผศ. ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร)

.... กรรมการ

(ดร.วิทูร ขาวสุข)

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้พิจารณาโครงงานวิจัยดังกล่าวแล้ว เห็นสมควรอนุมัติให้โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

.... หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

(ดร.วิโรจน์ อรุณนพรัตน์)

วันที่......7......เดือน.....พฤษภาคม.....พ.ศ.2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประกาศคุณูปการ

โครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส ซึ่งเป็นที่ปรึกษาโครงงานวิจัยฉบับนี้ โดยท่านได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการแก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างทำการวิจัยรวมทั้งแนะนำเทคนิคในการใช้เครื่องมือ อุปกรณ์ และการทำวิจัยทุกขั้นตอนอย่างละเอียด อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือทุก ๆ ด้าน ทั้งทักษะที่ถูกต้องในการทำงานวิจัย การวางแผนงานการวิจัย ความซื่อสัตย์ต่อการเป็นนักวิจัย แนะนำและแก้ไขแนวการเขียนโครงงานวิจัยให้ถูกต้องสมบูรณ์ ซึ่งทำให้ผู้วิจัยได้รับแนวทางและประสบการณ์อย่างกว้างขวางในการทำโครงงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้ ทำให้สามารถตัดสินใจแก้ปัญหาเฉพาะหน้าได้เป็นอย่างดี จึงกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ ผศ.ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร อาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา และ ดร. วิทูร ขาวสุข ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา แนะนำแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดจนเป็นคณะกรรมการสอบปากเปล่าโครงงานวิทยาศาสตร์การแพทย์นี้ให้ประสบความสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ศ.ดร. วิฑูรย์ ไวยนันท์ คณบดีคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตลอดจนภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์การทดลอง และขอขอบคุณ ดร.สุพรรณี ลีโทชวลิต จากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่อนุเคราะห์เรื่องหอยนางรม และขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร (Afrims) ด้วย ที่อนุเคราะห์เซลล์และสารเคมี

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ นิสิตชั้นปีที่ 4 รุ่นพี่และรุ่นน้อง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และเพื่อน ๆ โรงเรียนเบญจมราชูทิศ หลักสูตรวิทยาศาสตร์-สาธารณสุข รุ่นที่ 45 ทุกคน ที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือรวมทั้งเป็นกำลังใจให้สามารถผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ ญาติพี่น้อง และท่านผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในทุก ๆ เรื่องและเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา

วิทยา ภูมิภักดิ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

48033208 : สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์การแพทย์; วท.บ. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)

คำสำคัญ : Hepatitis A virus/Reverse transcription- polymerase chain reaction

วิทยา ภูมิภักดิ์: การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ในเขตพื้นที่จังหวัดจันทบุรี โดยใช้เทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) (Detection of viral genome of Hepatitis A virus from Oysters (*Saccostrea commercialis*) in Chanthaburi province by Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)). อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานวิจัย: อุไรวรรณ อินทมาโส, Ph.D. 56 หน้า. ปี พ.ศ. 2551

บทคัดย่อ

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีการปนเปื้อนตามธรรมชาติในหอยนางรมสดโดยเทคนิค Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) นั้นสามารถตรวจสอบได้รวดเร็วและมีความไวสูงมากแต่ต้องมีการเพิ่มขั้นตอนโดยการสกัดสารที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อหอยที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR ออกและลดปริมาตรของของเหลวที่ได้ก่อนนำมาใช้เพื่อทำให้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้ง่ายขึ้น ในโครงงานวิจัยนี้เป็นการสกัดของเหลวจากหอยนางรมสด ด้วยวิธี Acid adsorption alkaline elution ตามด้วยวิธี RT-PCR การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุด (Detection limit) ที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสด ด้วยวิธี RT-PCR และใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ที่มีการปนเปื้อนในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่เพาะเลี้ยง ในตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี และพิสูจน์ความจำเพาะของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization จากผลการทดลองพบว่า เทคนิค RT-PCR สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่น้อยที่สุดที่ความเข้มข้นปริมาตร 1μl ซึ่งมีความยาวนิวคลีโอไทด์ ประมาณ 242 bp และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในหอยนางรมสด ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม โดยแยกเก็บเป็นส่วนของเนื้อและทางเดินอาหาร (digestive track) มาตรวจสอบ พบว่าในบางเดือนมีการปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ ประมาณ 242 bp แต่เมื่อพิสูจน์ความจำเพาะเจาะจงดีเอ็นเอด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่า ไม่มีการปรากฏของ hybridization signal แสดงให้เห็นว่าวิธี RT-PCR นั้นมีความไวสูงในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแต่ขาดความจำเพาะ ดังนั้นในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ทั้ง RT-PCR ร่วมกับ hybridization จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าหอยที่เพาะเลี้ยงในช่วงระยะเวลาที่ทำการวิจัยนี้มีความปลอดภัยสามารถนำมาบริโภคได้ และข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้อาจจะนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของหอยนางรมก่อนนำมาบริโภคหรือใช้ในการศึกษาการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 กลุ่มของไวรัสตับอักเสบ.. 7
3-1 ส่วนประกอบต่าง ๆ ต่อ 1 Reaction สำหรับการทำ RT-PCR.. 30
3-2 รายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม RT-PCR 31

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	อนุภาคเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เมื่อดูด้วย Electron microscope	8
2-2	ยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ	10
2-3	โครงสร้างของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ	11
2-4	การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอโดย RC หมายถึง non-structural protein และ C หมายถึง structural protein	12
2-5	อาการตาเหลือง ตัวเหลือง ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ	14
2-6	ช่วงระยะเวลาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอและการปรากฏของ Immunoglobulin ต่าง ๆ	15
2-7	เส้นทางการเข้าออกของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ	16
2-8	อัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอทั่วโลก	17
2-9	ภาพของ Fetal rhesus monkey kidney (FrhK-4) เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสตับอักเสบเอ	18
2-10	ภาพของ Continuous AGMK cells (BSC-1) เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสตับอักเสบเอ	19
2-11	plaque assay ที่เกิดจากการ infection ด้วย HAV	20
2-12	ขั้นตอนของกระบวนการ RT-PCR	22
2-13	Denaturation และ Renaturation ของ DNA	23
2-14	กระบวนการ Southern blot hybridization	24
3-1	วิธีการทำ Southern blot	32
4-1	ผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ pure HAV genome ซึ่งมีความยาวนิวคลีโอไทด์ที่ 242 bp	34
4-2	ความจำเพาะของ cDNA band จากการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด โดยใส่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ จาก 1:1000, 1:100, 1:10 ปริมาตร 100 µl และ 1, 2.5, 5, 10 µl ตามลำดับที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค hybridization	35
4-3	ความจำเพาะของ cDNA band จากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรมสด ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค hybridization	38

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-4 ความจำเพาะของ cDNA band จากส่วนเนื้อของหอยนางรมสดที่ได้
จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค hybridization.. 39

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคตับอักเสบเฉียบพลัน ส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ หรือ Hepatitis A virus (HAV) จากการบริโภคอาหารหรือน้ำดื่มที่มีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสอยู่ มีรายงานว่าไวรัสตับอักเสบเอสามารถพบได้ในหอยนางรม เพราะหอยนางรมจะมีการกินอาหารโดยการกรองและรวบรวมไวรัสต่าง ๆ ที่ปะปนอยู่ในน้ำสกปรก สะสมไว้ในเนื้อหอย หรือในส่วนของทางเดินอาหาร (digestive track) (Coelho et al., 2003) ดังนั้นผู้ที่มีพฤติกรรมการบริโภคหอยนางรมดิบหรือมีการปรุงให้สุกไม่เพียงพอ จึงมีโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้ โดยในแต่ละขั้นตอนก่อนการนำหอยนางรมมาบริโภค เริ่มตั้งแต่ขั้นตอนในการเพาะเลี้ยง หรือสถานที่เพาะเลี้ยงนั้นมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ แหล่งน้ำที่ใช้เพาะเลี้ยงหอยนางรมมีความสกปรก การเก็บเกี่ยวที่ไม่ได้มาตรฐาน ไม่สะอาด รวมไปถึงการนำหอยนางรมมาปรุงอาหารอย่างไม่ถูกสุขลักษณะแล้วนำไปบริโภค โดยไวรัสตับอักเสบแม้เพียงไม่กี่อนุภาคก็สามารถที่จะก่อให้เกิดโรคได้และผู้ที่ติดเชื้อไวรัสก็สามารถแพร่กระจายเชื้อไวรัสไปสู่สิ่งแวดล้อมได้ง่ายโดยผ่านทางอุจจาระ ซึ่งการแพร่กระจายเชื้อไวรัสนี้เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วถ้าขาดระบบสุขาภิบาลดี นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังมีความทนทานในสภาพแวดล้อมและทนต่อความชื้น และอุณหภูมิ เคยมีรายงานว่าพบไวรัสตับอักเสบเอภายในหอพักผู้ป่วยของโรงพยาบาล เช่น ที่แก้วน้ำ ลิ้นชัก อ่างน้ำ โถส้วม พรมเช็ดเท้า เป็นต้น (ลีรา กิตติกูล, 2547)

การที่จะทำลายไวรัสตับอักเสบเอในหอยได้อย่างสมบูรณ์นั้น ต้องใช้อุณหภูมิ 100 ° C นาน 2 นาที นอกจากนี้การล้างมือที่ถูกต้องและการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อที่เหมาะสมก็จะเป็นการช่วยลดปัจจัยเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสที่มีการปนเปื้อนในอาหาร สำหรับการใช้วัคซีนกับผู้ประกอบอาหารนั้น จะต้องมีการศึกษาในเรื่องของความคุ้มทุน (cost effectiveness) เนื่องจากวัคซีนที่ผลิตขึ้นนั้นมีราคาแพง จึงทำให้ไม่เป็นที่นิยม ปัจจุบันการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในอาหารนั้นยังมีน้อย เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อย และในอาหารเองอาจจะมีสารเคมีที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของวิธีการตรวจ จึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการสกัดเชื้อไวรัสและการทำให้เชื้อไวรัสนั้นมีความเข้มข้นมากขึ้น และต้องใช้วิธีตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีความไวและรวดเร็วสูงซึ่งเดิมใช้การตรวจหาอนุภาคของไวรัสทางตรงโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบ แต่วิธีนี้ทำได้ยากในเซลล์เพาะเลี้ยง(cell line) และไวรัสชนิดนี้ไม่ก่อให้เกิด cytopathic effect (CPE) (Coelho et al., 2003) นอกจากนี้อาจใช้การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมีความไวค่อนข้างต่ำและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจ สำหรับวิธี Enzyme

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

immunoassay (EIA) ได้มีผู้นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส ซึ่งวิธีนี้ทำได้ง่ายแต่ก็ยังพบปัญหาคือ ไม่สามารถตรวจหาไวรัสในปริมาณน้อย ๆ ได้ ปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้กันอย่างมากเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาคือ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสทางอ้อมโดยอาศัยเอ็นไซม์ Reverse transcriptase ซึ่งจะทำหน้าที่เปลี่ยนอาร์เอ็นเอ (RNA) ให้กลายเป็นดีเอ็นเอ (DNA) จากนั้นจะเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอนั้นและพิสูจน์ความจำเพาะของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำ Southern blot hybridization วิธี RT-PCR นี้มีความไวสูง สามารถที่จะตรวจหาเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อยได้ (1-10 infectious unit) (ลีรา กิตติกูล, 2547) และยังสามารถทราบผลได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งง่ายกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในเซลล์ นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้นั้นสามารถนำไปศึกษาลำดับของยีน (DNA sequence) ซึ่งทำให้ทราบถึงสายพันธุ์ หรือ genotype ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาการระบาดและเพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหาร ปัจจุบันการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมนั้นยังมีข้อจำกัดซึ่งอยู่ในขั้นตอนของการสกัดและการทำให้ไวรัสนั้นมีความเข้มข้น ขั้นตอนการสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบจากหอยนางรมได้มีการพัฒนามาโดยตลอด ตั้งแต่วิธี direct alkaline elution ซึ่งยังมีประสิทธิภาพที่ไม่ค่อยดี จนมีการพัฒนาจนเป็นวิธี Acid adsorption-alkaline elution (ลีรา กิตติกูล, 2007) ซึ่งเป็นการสกัดเชื้อไวรัสในสภาวะความเป็นกรด จะทำให้ได้เชื้อไวรัสในปริมาณที่มากขึ้น ดังนั้นในการทดลองในครั้งนี้ใช้ วิธี Acid adsorption-alkaline elution ในการสกัดเชื้อไวรัสให้มีความเข้มข้นมากขึ้นก่อนนำไปตรวจด้วยวิธี RT-PCR เพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่เพาะเลี้ยงที่ตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี และได้มีการศึกษาถึงความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่น้อยที่สุด (detection limit)ในหอยนางรมสด ซึ่งความรู้ที่ได้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในแหล่งที่มีการเพาะเลี้ยงหอยนางรม หรือวางจำหน่าย ก่อนที่จะนำหอยนางรมมาบริโภค เพื่อเป็นการควบคุมการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีการปนเปื้อนในหอยนางรม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทราบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุด (Detection limit) ที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ด้วยวิธี Reverse transeription-polymerase ehain reaetion (RT-PCR)

2. ใช้วิธี Acid adsorption alkaline elution และ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่มีการปนเปื้อนในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่เพาะเลี้ยง ในตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

3. เพื่อพิสูจน์ความจำเพาะของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วยวิธี Southern blot hybridization

สมมติฐานการวิจัย

เมื่อสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสดด้วยวิธี Acid adsorption alkaline elution ตามด้วยการทำ RT-PCR น่าจะทราบความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุด (Detection limit) ที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสดได้ และวิธีดังกล่าวน่าจะมีความไวพอที่นำมาใช้ตรวจไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนในธรรมชาติได้

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้จะเริ่มจากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุด (Detection limit) ที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสด โดยเริ่มจากทำการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด โดยจะใส่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีความเข้มข้นต่างๆ จาก 1:1,000, 1:100, 1:10 ในปริมาตร 100 μl และความเข้มข้นปริมาตร 1, 2.5, 5, 10 μl และหา detection limit โดยทำ RT-PCR และ agarose gel electrophoresis จากนั้นจะเริ่มตรวจหาเชื้อไวรัสจากหอยนางรมสดตัวอย่างตั้งแต่เดือนพฤษภาคม จนถึงเดือนตุลาคม ปีพ.ศ. 2551 เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือนจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี มาทำการสกัดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Acid adsorption alkaline elution ก่อนนำมาทำ RT-PCR และพิสูจน์ความจำเพาะเจาะจงโดยการทำ Southern blot hybridization

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบค่าความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่น้อยที่สุด (Detection limit) ที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสดได้ เมื่อนำมาทำการสกัดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Acid adsorption alkaline elution ตามด้วยการทำ RT-PCR และสามารถนำวิธีการนี้มาใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนในธรรมชาติได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

นำความรู้ที่ได้จากการทำวิจัยไปใช้ในการพัฒนาวิธีการสกัดและตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสดให้รวดเร็วและสะดวกโดยให้ผู้ค้าขายหอยนางรมสามารถนำไปใช้ได้ เพื่อเป็นควบคุมคุณภาพของหอยนางรม (*Saccostrea commercialis*) ก่อนนำมาบริโภคและควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอสามารถปนเปื้อนในอาหาร ได้ เนื่องมาจากการขาดการดูแลสาธารณสุขที่ดี การปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้น สามารถพบได้ในแหล่งน้ำ สิ่งของเครื่องใช้ของผู้ป่วยโรคตับอักเสบเอ และยังมีรายงานว่าสามารถพบเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้ในสตอเบอร์รี่สด (Kittigul, 2001) หอยนางรมพบว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถรวบรวมเชื้อไวรัสได้ในแหล่งน้ำที่สกปรก และพบว่าเชื้อไวรัสนั้นจะเข้าไปสะสมตามส่วนของเนื้อหอยและในส่วนของทางเดินอาหาร (digestive track) (Robert, 1995; Coelho et al., 2003) การที่เชื้อไวรัสสามารถสะสมในหอยนางรมได้นั้น เนื่องมาจากการดำรงชีวิตของหอยนางรมจะมีการกินอาหารผ่านทางการกรอง ซึ่งถ้าแหล่งน้ำมีความสกปรกหรือมีการระบาดของเชื้อไวรัส โอกาสเสี่ยงที่หอยจะได้รับเชื้อไวรัสผ่านทางการกินอาหารก็เป็นไปได้สูง และผู้ที่มีพฤติกรรมการบริโภคหอยนางรมดิบหรือปรุงไม่สุกก็มีโอกาสในการได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรม (oysters) เป็นสัตว์ใน Phylum Mollusca ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงนั้น มีอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) นิยมเลี้ยงมากทางภาคตะวันออก ส่วนหอยรมอีกสองพันธุ์ เป็นหอยนางรมที่ค่อนข้างมีขนาดใหญ่เรียกว่า หอยตะโกรม (*Crassostrea belcheiri)* และหอยตระโกรมกรามดำ (*C .lugubris*) ส่วนใหญ่มีการเลี้ยงอยู่ในเขตจังหวัดทางภาคใต้ หอยนางรมเป็นหอยทะเล 2 ฝา มีกาบหนาแข็ง ซึ่งฝาทั้งสองมีขนาดไม่เท่ากัน บางชนิดมีสีน้ำตาล หรือสีเทา กาบบนจะใหญ่และแบนกว่ากาบล่าง กาบล่างเป็นส่วนที่มีตัวหอยติดอยู่และยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้สลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล กาบบนจะลักษณะแบนบางขนาดความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร เปลือกของหอยนางรม ประกอบด้วยหินปูนร้อยละ 95 หอยนางรมดำรงชีวิต อยู่ได้โดยการดูดน้ำรอบ ๆ ตัวเข้าไปทางด้านหนึ่งและ ปล่อยทิ้งออกอีกด้านหนึ่ง อาหารและก๊าซออกซิเจนจะเข้าไปพร้อมกับน้ำ อาหารของหอยนางรมได้แก่ แพลงค์ตอน พืชและแพลงค์ตอนสัตว์ที่ล่องลอยอยู่ในน้ำ หอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้ และเพศเมียแยกกัน ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยตัวเมียจะปล่อยไข่ และหอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาผสมกันในน้ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติการค้นพบเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (Hepatitis A virus หรือ HAV)

ไวรัสตับอักเสบเอซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของอาการตัวเหลือง ตาเหลือง มีการระบาดมากในกลุ่มทหารและประชาชนในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ผ่านทางการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัส ในปี ค.ศ. 1967 Deinhardt และคณะ (Deinhardt et al., 1967) ได้เริ่มศึกษาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ โดยใช้ลิงซึ่งติดเชื้อด้วยไวรัสชนิดหนึ่งชื่อว่า MS-1 ผ่านทางการกิน (fecal-oral) พบว่าลิงมีอาการของโรคที่คล้ายกับโรคตับอักเสบเอในคนมาก มีอัตราการติดต่อสูง และมีระยะฟักตัวนาน ประมาณ 4 สัปดาห์ นอกจากนี้พบว่าเชื้อสายพันธุ์ MS-1 นี้ยังก่อให้เกิดการติดเชื้อในคนที่เป็นอาสาสมัครด้วย จากการศึกษาถึงโครงสร้างของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดย Stephen M. Feinstone และคณะ (Feinstone et al., 1973) พบว่าอนุภาคของเชื้อไวรัสมีขนาดประมาณ 27 นาโนเมตร และในปี ค.ศ. 1979 Provost และ Hilleman (Provost and Hilleman, 1979) สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงจึงทำให้ทราบข้อมูลถึงยีโนมและ รหัสพันธุกรรมของไวรัส

การจำแนกเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

เชื้อไวรัสตับอักเสบมีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่มดังแสดงไว้ในตารางที่ 2-1 แต่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอจัดอยู่ในกลุ่มของ picornaviridae (Picornaviruses) ในอดีตเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้เคยถูกจัดอยู่ใน genus enterovirus type 72 แต่ในปัจจุบันได้จัดเชื้อไวรัสตับอักเสบเออยู่ใน genus ใหม่ คือ genus Hepatovirus ซึ่งมี HAV เป็นสมาชิกอยู่เพียงชนิดเดียว เนื่องจากมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากเชื้อในกลุ่ม enterovirus มาก เช่น มีเสถียรภาพ (stability) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และที่ pH 1 ไม่ทำปฏิกิริยากับ enterovirus group-specific monoclonal antibody มีความแตกต่างของรหัสพันธุกรรมในสายยีโนมเมื่อเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมของเชื้อในกลุ่ม enterovirus และมี replication cycle ที่แตกต่างกัน (Hollinger et al., 1990) นอกจากนี้ยังเพาะเลี้ยงยากและเพิ่มจำนวนช้ามาก รวมทั้งไม่ก่อให้เกิด cytophatic effect (CPE) ในเซลล์เพาะเลี้ยง เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

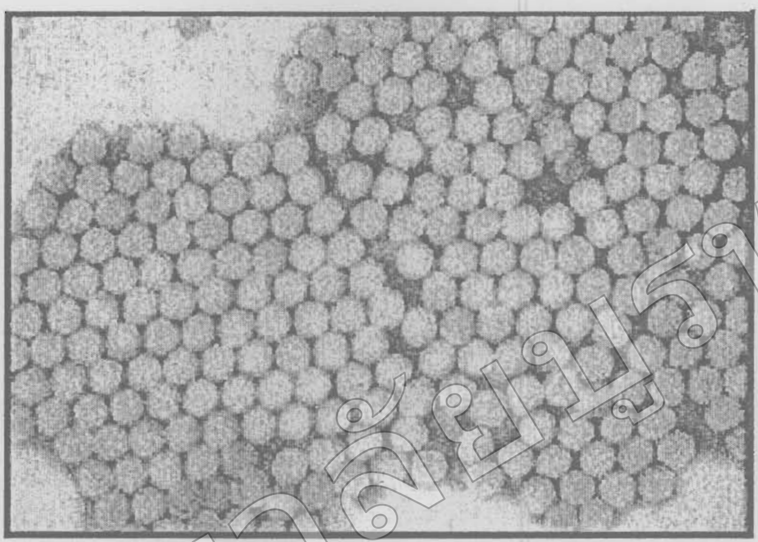
ตาราง 2-1 กลุ่มของไวรัสตับอักเสบ

The major hepatitis viruses				
Virus	Classification	Genome	Envelope	Spread
HAV	Picornaviridae, genus Hepatovirus	RNA	Nonenveloped	Fecal-oral
HBV	Hepadnaviridae	DNA	Lipid enveloped	Parenteral
HCV	Flaviviridae, genus Hepacivirus	RNA	Lipid enveloped	Parenteral
HDV	Unclassified	RNA	Lipid enveloped (from HBV)	Parenteral
HEV	Caliciviridae, genus proposed	RNA	Nonenveloped	Fecal-oral

(Cuthbert(2001), http://cmr.asm.org/cgi/content-nw/full/14/1/38/T1)

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ติดเชื้อในคนมีเพียง serotype เดียว โดยอาศัยคุณสมบัติในการจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส ปัจจุบันได้มีการแบ่งเชื้อไวรัสตับอักเสบเอออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยการแบ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ทางด้านการเจริญเติบโต รหัสพันธุกรรมในสายยีโนม และสถานที่ที่แยกเชื้อได้ที่อาจบ่งถึงระบาดวิทยาของเชื้อ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ มีความแตกต่างค่อนข้างน้อยและรหัสพันธุกรรมเกือบจะไม่ต่างกันเลย ยกเว้นบริเวณส่วนต่อของยีน VP1 และ VP2A ซึ่งมีขนาด 168 นิวคลีโอไทด์ เป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนของรหัสพันธุกรรมสูง (sequence variability) ซึ่งได้นำบริเวณนี้มาใช้ในการเปรียบเทียบกับยีโนมของเชื้อกลุ่ม poliovirus ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอทั้งหมด 152 สายพันธุ์ ออกเป็น genotype ต่าง ๆ ได้เป็น 7 genotype เรียก genotype I-VII โดยแต่ละ genotype มีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 85 โดย genotype I และ III ออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้อีกเป็น subgenotype A และ B สำหรับสายพันธุ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ คือ เชื้อไวรัสตับอักเสบเอ สายพันธุ์ HM 175 ที่มีการดัดแปลงสายพันธุ์ให้สามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์หลายชนิด รวมทั้งยังทำให้มีการกลายพันธุ์น้อยลงเมื่อเพาะเลี้ยงหลาย ๆ passage นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์อื่นที่ได้นำมาศึกษา เช่น สายพันธุ์ CR326, MS-1, SD11, LA, HAS15, MBB, GMB และ PA21 เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 2-1 อนุภาคเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เมื่อดูด้วย Electron microscope
(Cuthbert(2001), http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/HAV.html)

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่พบในคนส่วนใหญ่อยู่ใน Genotype I และสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย คือ สายพันธุ์ SR102 จัดอยู่ใน subgenotype IA สำหรับ genotype II และ VII พบติดเชื้อเฉพาะในคนเท่านั้น คือสายพันธุ์ CF53 และ SLF88 ตามลำดับ ส่วน genotype IV, V, VI, พบติดเชื้อเฉพาะในสัตว์กลุ่มไพรเมทเท่านั้น

คุณสมบัติของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

ในปีพ.ศ. 2516 ได้มีการศึกษาลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งลักษณะของเชื้อเหมือนกับในกลุ่ม picornavirus อื่น ๆ คือมีขนาด 27-32 นาโนเมตร รูปร่างกลม ไม่มี enveloped และมีลักษณะ icosahedral symmetry (รูปที่ 2-1) ที่ประกอบด้วย capsomers ขนาด 8 – 12 นาโนเมตร มีค่า primary buoyant density ของ mature HAV particle ใน CsCl เท่ากับ 1.32 – 1.34 g/ml และค่า sedimentation coefficient ใน neutral sucrose solution เท่ากับ 156 – 160S ไวรัสตับอักเสบเอสามารถทนทานต่อความร้อนได้มากกว่าเชื้อ picornavirus อื่น ๆ โดยทนต่อความร้อน 56 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที สามารถอยู่ในที่แห้งได้นานหลายสัปดาห์และยังเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้หลายปี นอกจากนี้ยังอาจพบเชื้อได้ในน้ำ ดิน หรือหอยในบริเวณที่มีการระบาด เชื้อไวรัสตับอักเสบเอสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรด (pH 3) ได้นาน 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และยังสามารถทน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

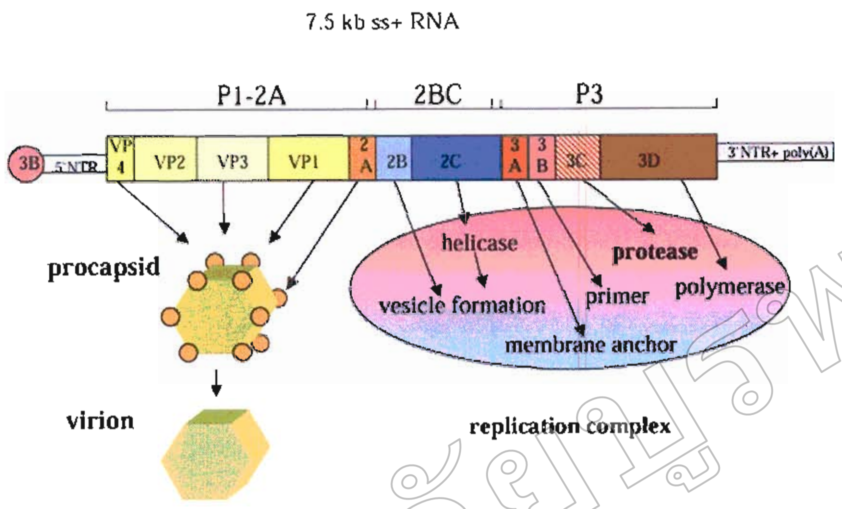
ต่อสาร detergent หลายชนิด สำหรับการทำลายเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้น สามารถทำได้โดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือเมื่ออยู่ในสารละลาย hypochlorite ในความเข้มข้น 1.5 – 2.5 mg/L 15 นาที, 3% formalin ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และถูกทำลายได้โดยรังสีอัลตราไวโอเลต (ลีรา กิตติกูล, 2547)

ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมจีโนมและโปรตีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวก (single stranded RNA) มีขนาดประมาณ 7.5 kb (7,487 นิวคลีโอไทด์) และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.25×10^{6} ดัลตัน ลักษณะการเรียงตัวของจีโนมของเชื้อ ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ต่อไปนี้ดังแสดงไว้ในรูป 2-2

1. 5′-untranslated region (5′-UTR) เป็นส่วนของรหัสที่ไม่ได้นำไปสร้างโปรตีน ประกอบด้วย 735 นิวคลีโอไทด์
2. ส่วนของรหัสที่ใช้ในการสร้างโปรตีน (coding region) มีความยาว 6,681 นิวคลีโอไทด์ โดยจะสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 2,227 ตัว โปรตีนที่ได้จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนหลัก คือ P1, P2, P3 ซึ่งจะถูกตัดออกเป็นหลายๆโปรตีน ที่เรียกชื่อเป็น 1A, 1B…, 2A, 2B…, และ 3A, 3B… ตามลำดับ โปรตีนส่วนโครงสร้าง (structural protein) สร้างจากบริเวณ P1 (2,373 นิวคลีโอไทด์) และโปรตีนไม่ใช่ส่วนโครงสร้าง (non-structural protein)จะถูกสร้างจากบริเวณ P2 และ P3
3. บริเวณ 3′-untanslated region ขนาดสั้นประมาณ 63 นิวคลีโอไทด์
4. บริเวณ poly (A) tail

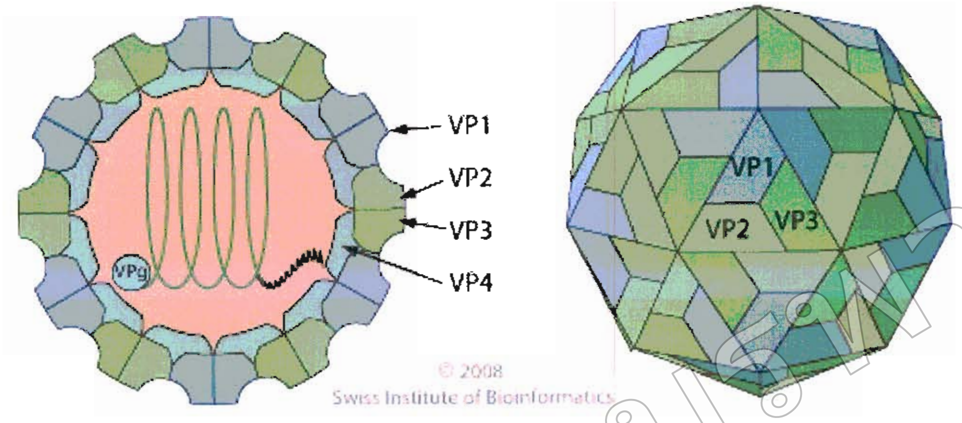
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูป 2-2 ยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

(Swiss institute of Bioinformatic, http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/94.html)

สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ทำหน้าที่เป็น mRNA และ template ในการ replication สารพันธุกรรมมีจำนวน G+C ค่อนข้างต่ำ ประมาณร้อยละ 38 จากการศึกษาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอทั้ง 7 genotypes ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่พบในคนและลิง พบว่าการสร้าง polypeptide ของ HAV จะใช้ส่วนปลายของ 5′ของจีโนม ซึ่งมี internal ribosome entry site (IRES) ซึ่งเป็นบริเวณที่ไรโบโซมรวมทั้ง trans-activating cellular factor ต่างๆ เข้ามาจับเพื่อเริ่มการแปลรหัส (translation) และส่วนของจีโนมที่ถัดมาเป็น open reading frame ที่มี 2 AUG codon ซึ่ง codon ตำแหน่งที่ 2 มักนำมาใช้สร้างโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ โดยโปรตีนที่ถูกสร้างออกมาจากขบวนการ translation จะอยู่ในรูปของ polypeptide P1 ที่เมื่อสร้างใกล้จะเสร็จ เอนไซม์protease ที่ถอดรหัสจากยีน 3C ของไวรัสจะถูกตัดออกเป็น mature viral protein สายสั้นๆ ได้แก่ VP 1, VP 2, VP3 และ VP4 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 33, 27, 29, 6.7-8 kDal ตามลำดับเพื่อประกอบเป็นอนุภาคของ virion ดังแสดงไว้ในรูป 2-3 ส่วน P2 region เป็นส่วนของ non-structural protein เป็นส่วนที่สร้างโปรตีน 2A ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 ตัว ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น protease, 2B ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 107 ตัวทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้าง vesicles และโปรตีน 2C ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 335 ตัว ทำหน้าที่เกี่ยวกับ RNA replication



รูป 2-3 โครงสร้างของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

(Swiss institute of Bioinformatic, http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/94.html)

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอ 1 อนุภาค (รูป 2-3) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้างทั้งหมด 60 ชิ้น (T=1) แม้ว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบเอจะมีหลาย genotype แต่มีโครงสร้างคล้ายกันมากและมี immunodominant epitope ตำแหน่งหลักตำแหน่งเดียว คือ VP1 ซึ่งมีความแปรปรวนของสารพันธุกรรมน้อยมาก และ epitope นี้ สามารถกระตุ้นให้เกิด neutralizing antibody ได้ต่อเชื้อทุก genotype ที่จำเพาะต่อ conformational epitope นี้ ดังนั้นโปรตีนในส่วนของ VP1 ได้ถูกนำมาใช้เป็นแอนติเจนเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีนประเภท recombinant vaccine หรือ synthetic peptide vaccine เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายมีการสร้างภูมิคุ้มกันป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ส่วน 2P หรือ 3P มีบทบาทสำคัญก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค ถ้าทำให้เกิด mutation ในส่วน 2P หรือ 3P นี้จะทำให้มีไวรัสตับอักเสบเอมีฤทธิ์อ่อนลง แต่ยีนส่วนนี้มีการ mutation มาก ดังนั้นในการผลิตวัคซีนชนิด Live attenuated vaccine จึงมีความจำเป็นมากที่ต้องให้ความสำคัญกับจีโนมในส่วน P2 นี้ด้วย

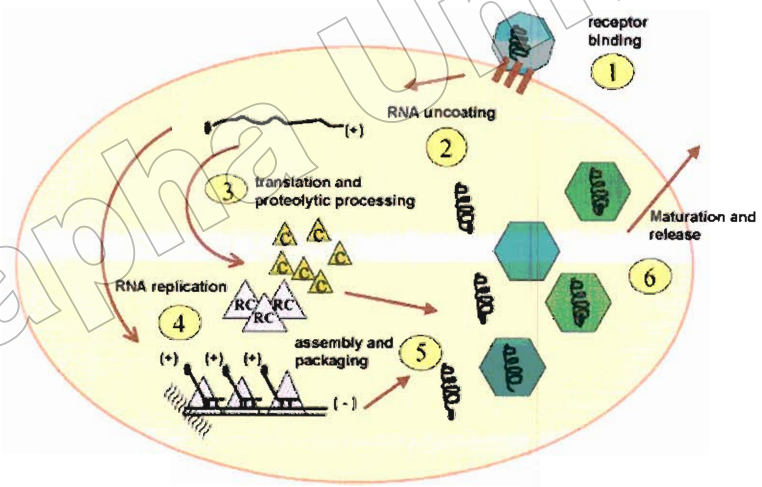
วิธีการแบ่งตัว (Mode of replication)

ถึงแม้เชื้อไวรัสตับอักเสบนั้นจะมีการเรียงต่อของสารพันธุกรรมและมีการเพิ่มจำนวนเหมือนกับไวรัสในกลุ่ม Picornavirus ทั่วไป (รูป 2-4) แต่การศึกษาในรายละเอียดของการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบเอนั้นทำได้ยาก เนื่องมาจากเป็นเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงในเซลล์ได้ยาก ต่างกับเชื้อไวรัสในกลุ่ม picornavirus ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย ความพยายามที่จะศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในเซลล์เพาะเลี้ยง ได้ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1979 โดย Provost และ Hilleman

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(Provost and Hilleman, 1979) ที่สามารถเพิ่มจำนวนของ Marmoset-adapted HAV ใน primary culture ของตับลิงมาร์โมเสท (marmoset) และในเซลล์ไตลิงชนิด FRhK6 หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลาหลายสัปดาห์ โดยสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของ viral antigen แต่ไม่พบลักษณะ cytopathic effect (CPE) เกิดขึ้น ดังนั้นการติดเชื้อในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงจึงเป็นแบบ persistent infection ต่อมาได้มีการศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในเซลล์เพาะเลี้ยง BSC-1 หรือ BGMK (เป็น cell line ที่พัฒนามาจาก African green monkey kidney cell) โดยดูระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนของไวรัส (Cromeans et al., 1989) สามารถแบ่งการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้เป็น 3 ระยะ หลังการ inoculation ดังนี้

1. ช่วงวันที่ 2 – 8 พบ viral RNA ทั้งสายบวกและสายลบ และมีอัตราการสร้าง infectious HAV สูงสุด
2. ช่วงวันที่ 9 – 14 พบการสร้างแอนติเจนของไวรัสในปริมาณสูงสุดและ RNA สายบวก และ infectious HAV ยังคงมีระดับสูง แต่เริ่มไม่พบ viral RNA สายลบ
3. หลังวันที่ 14 ระดับเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเชื้อไวรัสลดลงต่ำสุดและ อนุภาคของไวรัสตับอักเสบเอเกือบทั้งหมดยังคงอยู่ภายในเซลล์ แต่มีอนุภาคเพียงส่วนน้อยที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ในรูป Vesicle



รูป 2-4 การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

โดย RC หมายถึง non-structural protein

C หมายถึง structural protein

(University of Lübeck , http://www.vuz.uni-luebeck.de/gaussmueller.htm)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ส่วนเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ได้รับการปรับสายพันธุ์ (adapted strain) แล้วส่วนใหญ่ยังคงต้องใช้เวลานานหลายวันในการเพิ่มจำนวน การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อจึงต้องอาศัยการศึกษาทางอ้อม โดยใช้วิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจหาเชื้อหรือแอนติเจนของเชื้อ หรือวิธี hybridization assay เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรม HAV เป็นต้น แต่ปัจจุบันมีเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่กลายพันธุ์ไปบางชนิดที่สามารถทำให้เกิด CPE ได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง และบางชนิดแบ่งตัวได้เร็วในเซลล์เพาะเลี้ยง การที่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอมีการปรับตัว อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับกลไกอย่างน้อย 2 อย่างคือ อาจเกิดการกลายพันธุ์บริเวณ 5'-UTR และบริเวณยีน 2B กับ 2C หรือเกี่ยวข้องกับกระบวนการ viral translation โดยเซลล์ที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงไวรัส อาจจะมีโปรตีนที่ช่วยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ เนื่องจากในส่วนของบริเวณ 5′-UTR มี enhancing cap-independent translation (Schultz et al., 1995) โดยไวรัสสายพันธุ์ต่างๆ ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้เหล่านี้ มักเป็น attenuated strain ซึ่งจะไม่ก่อโรคในคนและในสัตว์ ซึ่งการเข้าใจกลไกการปรับตัวของไวรัสกลุ่มนี้จึงมีประโยชน์ในการผลิตวัคซีนชนิด live attenuated vaccine ซึ่งมีราคาถูกกว่าแต่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ inactivated whole virus ที่มีอยู่ในปัจจุบัน

ลักษณะอาการและการดำเนินของโรค

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปในเด็ก เชื้อจะมีระยะฟักตัวประมาณ 15-45 วัน การติดเชื้อนั้นมีทั้งแบบที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ แบบที่มีอาการจะพบสูงขึ้นตามอายุ คือ ในเด็กที่มีอายุน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 ปี ส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการ (ร้อยละ 84) ในเด็กที่มีอายุ 3-5 ปี พบว่ามีการแสดงอาการเกิดขึ้นครึ่งหนึ่ง ส่วนในเด็กที่มีอายุมากกว่า 5 ปี จะมีการแสดงอาการ ร้อยละ 80 และในผู้ใหญ่จะมีอาการที่รุนแรง การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ นั้นพบว่าเป็นแบบไม่เรื้อรัง เริ่มแรกจะมีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้อาเจียน หรืออาจจะมีไข้ต่ำในวันแรก หลังจากนั้นจะตามด้วยอาการปัสสาวะมีสีเข้ม ปวดท้องบริเวณชายโครงขวา ตัวเหลือง ตาเหลือง (รูป 2-5) อุจจาระมีสีซีด เมื่อทำการตรวจร่างกายอาจพบว่ามีอาการของดีซ่านและตับโตร่วมด้วย การตรวจทางห้องปฏิบัติการพบว่า Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) มีระดับที่เพิ่มสูงขึ้น และ bilirubin เพิ่มสูงขึ้นและมี relative lymphocytosis (ภาวะที่ปริมาณ lymphocyte เพิ่มขึ้นเนื่องจากถูกกระตุ้นจากสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ เช่น virus, bacteria, parasite หรือยาบางชนิด) ซึ่งการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบเอนั้น ส่วนใหญ่จะหายได้เอง มีเพียงส่วนน้อยที่อาจเกิดอาการแทรกซ้อนขึ้นได้ เช่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. ภาวะท่อน้ำดีอุดตัน (cholestasis) ซึ่งผู้ป่วยจะมีภาวะนี้เป็นเวลานาน โดยที่มีระดับของ bilirubin รวมมากกว่า 12 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ (mg %)
2. ตับอักเสบชนิดเป็นซ้ำ (relapsing hepatitis) การกลับมาเป็นซ้ำของโรคจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง และพบว่าระดับ SGPT เพิ่มขึ้น
3. ตับวาย (fulminant hepatitis) ภาวะนี้เกิดได้น้อยกว่าตับอักเสบชนิด บีและซี โอกาสที่จะเกิดตับวายจะสูงขึ้นตามอายุ

รูป 2-5 อาการตาเหลือง ตัวเหลือง ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ
(คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrb/CMBwebsite/CMB508301 /Virushtml/16hepatitis.htm)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ หลังจากที่ได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้ว ประมาณ 2 สัปดาห์ หรือในช่วงสุดท้ายของระยะฟักตัวจะปรากฏเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ในอุจจาระและมีแอนติบอดีต่อไวรัส(Anti-HAV) เกิดขึ้น ขณะที่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอกำลังลดจำนวนลง เมื่อตรวจซีรั่มของผู้ป่วยถ้าพบ IgM anti-HAV แสดงว่าผู้ป่วยกำลังเป็นโรคตับอักเสบเอ เพราะแอนติบอดีตัวนี้จะปรากฏในระยะผู้ป่วยเป็นโรคแบบเฉียบพลันและระดับของแอนติบอดีชนิดนี้จะคงอยู่เป็นเวลา 2-6 เดือน ส่วน IgG anti-HAV จะปรากฏในเวลาต่อมา แต่จะคงอยู่ตลอดชีวิต ถ้าตรวจพบ IgG anti-HAV แสดงว่าผู้ป่วยเคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอมาก่อน กำลังที่จะหายจากโรคและมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสนั้น (รูป 2-6)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

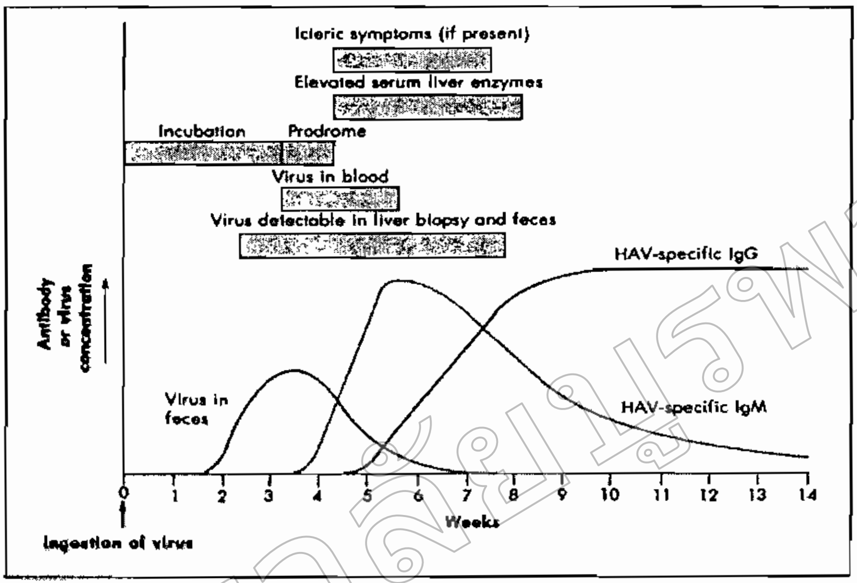


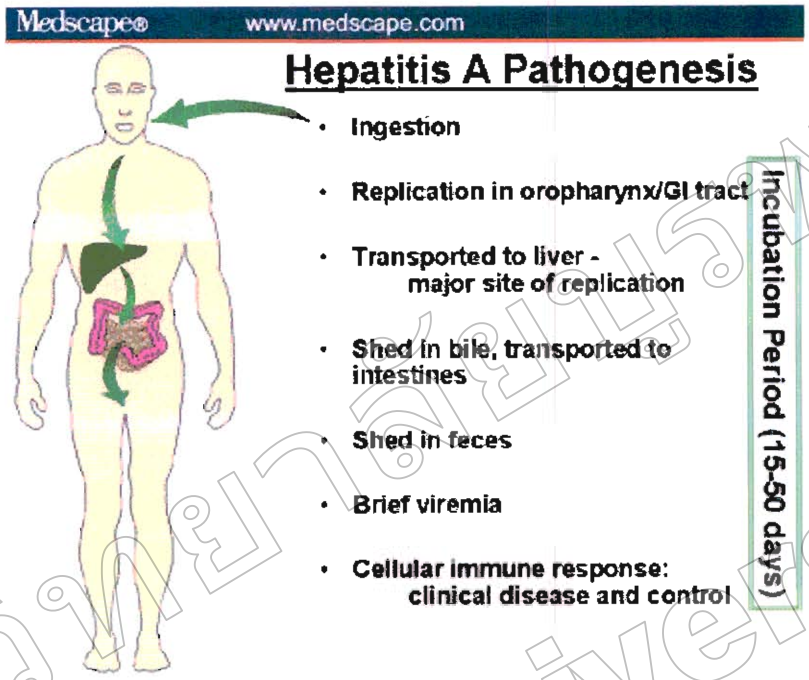
FIGURE 68-3 Time course of HAV infection.

รูป 2-6 ช่วงระยะเวลาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอและการปรากฏของ Immunoglobulin ต่าง ๆ (Kent County Health Department, Grand Rapids, Michigan USA, http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrb/CMBwebsite/CMB508301 /Virushtml/16hepatitis.htm)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นิเวศวิทยาและการระบาดของเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสตับอักเสบเอสามารถติดต่อผ่านทางการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่มีเชื้อไวรัสปะปนอยู่ เมื่อได้รับเชื้อแล้วเป้าหมายที่สำคัญของเชื้อไวรัส คือ เซลล์ตับ ระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัสสามารถพบเชื้อได้ในน้ำดี (Bile) และเชื้อไวรัสจำนวนมากจะถูกปล่อยออกมาปะปนกับอุจจาระของผู้ที่ได้รับเชื้อ (รูป 2-7) ซึ่งเชื้อไวรัสที่ออกมาส่วนใหญ่นั้นเป็นเชื้อที่ได้มาจากการเพิ่มจำนวนในเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบไวรัสตับอักเสบเอได้ในกระแสเลือด (viremia) ได้ตั้งแต่ระยะแรกที่เริ่มมีการติดเชื้อจนกระทั่งเริ่มเกิดอาการตับอักเสบถ้ามีเชื้ออยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานาน อาจจะทำให้เชื้อไวรัสสามารถติดต่อผ่านทางกระแสเลือดได้



รูป 2-7 เส้นทางการเข้าออกของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

(Dean A Blumberg, http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/HAV.html)

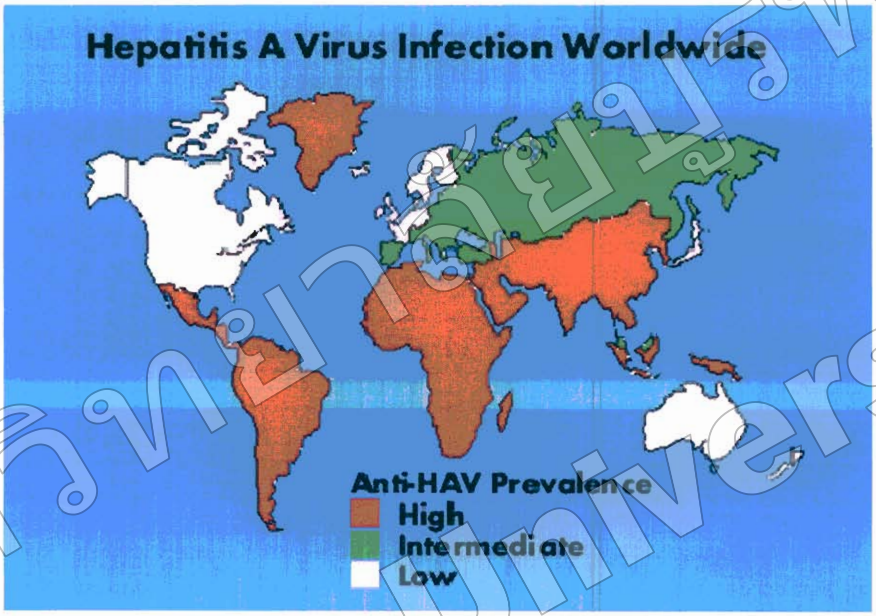
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอมีการระบาดใน 3 กลุ่มใหญ่ ๆ (รูป 2-8) คือ

1. ในประเทศที่มีการพัฒนาแล้ว พบว่ามีการระบาดของเชื้อไวรัสในระดับที่ต่ำ การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดมาจากนักท่องเที่ยวที่เดินทางไปยังประเทศที่มีการระบาดของเชื้อแล้วแพร่มาสู่ประชาชนในประเทศ ด้วยเหตุนี้เชื้อไวรัสจึงไม่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขในประเทศเหล่านี้

2. ประเทศที่กำลังพัฒนา ที่มีความเจริญทางด้านเศรษฐกิจต่ำ การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดในเด็กและมีการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว การติดเชื้อในเด็กส่วนมากจะไม่แสดงอาการ และในคนที่มีอายุมากกว่า 5 ปี จะมีภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัส ประชากรส่วนใหญ่จึงมีภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นเอง จึงทำให้เชื้อไวรัสนั้นมีการระบาดน้อย จึงไม่เป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุข ประเทศไทยจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 อย่างไรก็ตามการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้นเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องมาจากสภาพเศรษฐกิจและสังคมที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา

3. ประเทศที่กำลังพัฒนา ที่มีความเจริญทางด้านเศรษฐกิจสูง เนื่องจากสภาพเศรษฐกิจที่ดี ทำให้ชีวิตความเป็นอยู่ของประชากรดี โอกาสที่จะมีการติดเชื้อไวรัสในวัยเด็ก จึงลดน้อยลง ทำให้ผู้ใหญ่และวัยรุ่นไม่มีภูมิต้านทานต่อเชื้อไวรัส จึงมีโอกาสที่จะติดเชื้อไวรัสสูง ระบาดของเชื้อไวรัสอาจเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขได้



รูป2-8 อัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอทั่วโลก

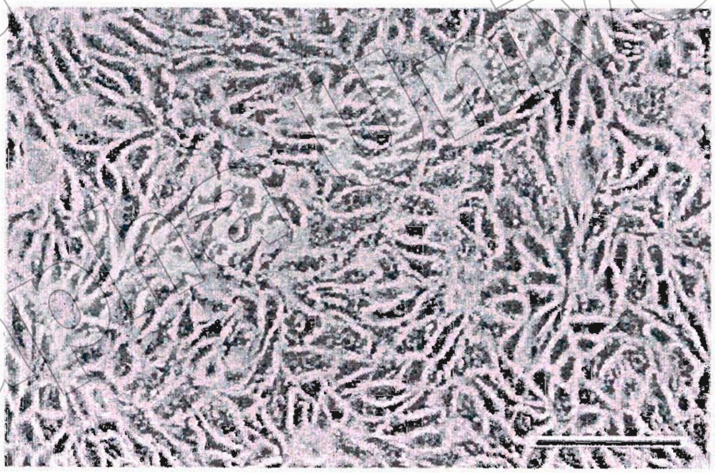
(Centre for Disease Control (USA), http://pathport.vbi.vt.edu/pathinfo/pathogens/HAV.html)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

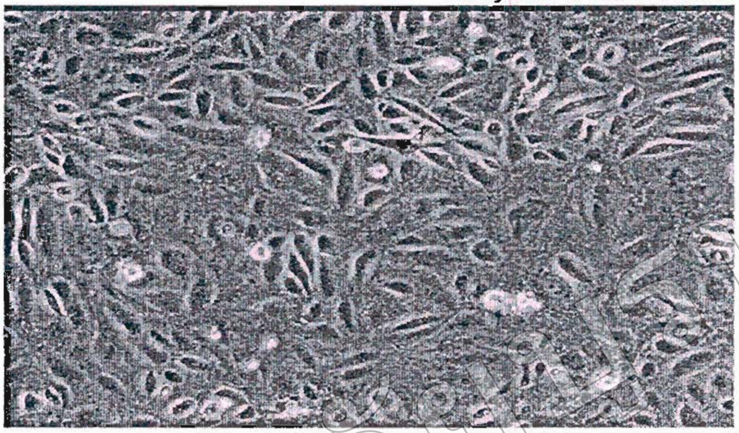
การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงไวรัส ในเซลล์และดู CPE ที่เกิดขึ้น การตรวจหาจำนวนของอนุภาคโดยตรงหรือทางอ้อมด้วยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยาและวิธีทางอณูพันธุศาสตร์

1. การเพาะเลี้ยงไวรัสตับอักเสบเอเพื่อหาปริมาณของเชื้อ เริ่มมีการศึกษาในปีค.ศ. 1979 โดย Provost และ Hilleman (Provost and Hilleman, 1979) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน primary cell culture และ continuous cell line ได้แก่ african green monkey kidney (AGMK) culture, fetal rhesus monkey kidney (FrhK-4) cells (รูป 2-9), non-continuous AGMK cells (BSC-1) (รูป 2-10), human embryonic fibroblast และ hepatoma cell line



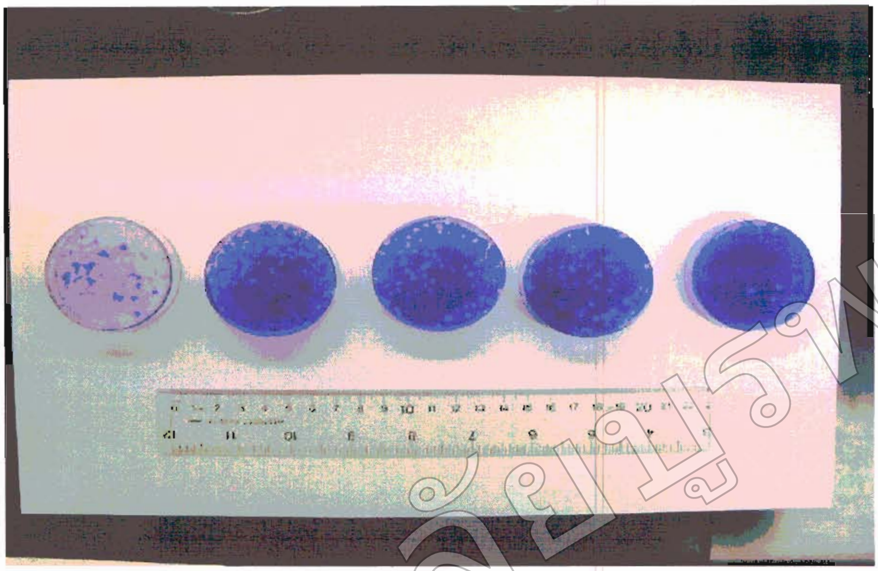
รูป 2-9 ภาพของ Fetal rhesus monkey kidney (FrhK-4) เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสตับอักเสบเอ (Cellroot.dbf , http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb9126.htm)



รูป 2-10 ภาพของ Continuous AGMK cells (BSC-1) เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัสตับอักเสบเอ (Cellroot.dbf, http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb9126.htm)

2. Plaque assay เป็นวิธีการหาปริมาณของเชื้อไวรัส โดยอาศัยหลักการที่ว่า เมื่อเชื้อไวรัสเข้าไปในเซลล์ (monolayer) แล้ว จะก่อให้เกิด CPE และทำให้เซลล์ตาย ดังนั้นเมื่อเราทำการเจือจางเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (dilution) แล้วใส่ในเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง (monolayer) เพื่อให้ไวรัสได้เข้าไปในเซลล์ หลังจากนั้นใส่ semi-solid media ซึ่งเป็น media ที่มีส่วนประกอบของ agarose หรือ carboxymethylcellulose หรือ gamtragacanth แล้วบ่มที่ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 8 วัน หลังจากนั้นนำเซลล์ไปย้อมสี phenol red หรือ crystal violet ซึ่งสีย้อมเหล่านี้จะติดเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ตายจะเห็นว่าเป็นจุดสีขาวเรียก plaque (รูป 2-11) (การย้อมอาจย้อมด้วย สีที่ติดเฉพาะ cell ที่ตายก็ได้) เมื่อนับจำนวน plaque แล้วก็จะมาคำนวนหาค่าจำนวนอนุภาคของไวรัสในหนึ่งหน่วยปริมาตรมีหน่วยเป็น PFU/ml (plaque-forming units)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูป 2-11 Plaque assay ที่เกิดจากการ infect ด้วย HAV

(Public health microbiology, http://public-health-microbiology.net /images /600_HAV_ plaque _assay .jpg)

3. การตรวจหาจำนวนอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เริ่มในปีค.ศ.1973 โดย Stephen M. Feinstone และคณะ (Feinstone et al.,1973)ได้ตรวจพบอนุภาคของไวรัสที่มีขนาด 27 นาโนเมตรและมีรูปร่างกลมในอุจจาระของผู้ป่วย ต่อมาในปี ค.ศ.1983 Andzhaparidze และคณะ (Andzhaparidze et al., 1983) ได้มีการนำความรู้ทางภูมิคุ้มกันวิทยามาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสแล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Immune electron microscopy หรือ IEM) โดยใช้ antibody ที่จำเพาะมาใช้จับกับอนุภาคของ HAV เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาไวรัสได้ดีขึ้น โดยได้ทำการศึกษาในทหารเรือที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนในอาหารจากตัวอย่างอุจจาระของผู้ที่ป่วยในระยะเฉียบพลันที่มีอาการตับอักเสบร่วมกับอาการดีซ่านเท่านั้น โดยอุจจาระถูกเก็บมานับตั้งแต่เริ่มติดเชื้อจนถึง 10 วันก่อนที่จะมีการเพิ่มของระดับ aminotransferase activity ใน serum และก่อนจะมีการเพิ่มของระดับ enzyme activity (Dienstag et al.,1975) พบอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ที่มีขนาด 27 นาโนเมตร จากนี้ radioimmunoassay (RIA) ยังเป็นอีกวิธีที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบโดยใช้ ไอโซโทปของรังสีบางชนิด มาจับกับ HAV ซึ่ง RIA และ IEM มี sensitivity ใกล้เคียงกัน (Andzhaparidze et al.,1983)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

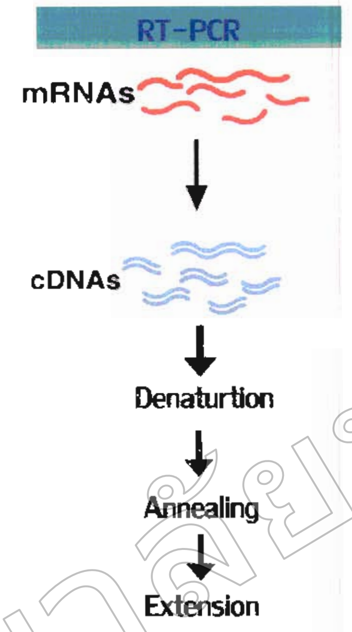
การใช้ปฏิกิริยาระหว่าง Antigen และ Antibody

ได้มีการพัฒนาวิธีที่ทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีจับกันได้ดีขึ้นโดยการนำเอา magnetic beads มาเคลือบด้วย antibodies ที่จำเพาะต่อ surface epitopes ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจับกับอนุภาคของเชื้อไวรัส (Monceyron, 1994) ต่อมาได้มีการใช้อนุภาคของแม่เหล็กมาจับกับอนุภาคของเชื้อไวรัส (Safari , 1995) หรือนำปฏิกิริยาระหว่าง Streptavidin และ biotin มาใช้ยึดแอนติบอดี โดยเคลือบ streptavidin magnetic beads ด้วย biotinylated human anti-HAV IgG เพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการจับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอและเพื่อขจัด RT-PCR inhibitory compounds ที่เป็นส่วนประกอบในอาหารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ RT-PCR (RT-PCR inhibitor) (Lo´pez and Sabater, 1997) อย่างไรก็ตามวิธีที่ได้กล่าวมาข้างต้นนั้น ก็ยังมีความไวในการตรวจที่ต่ำ และต้องมีปริมาณของเชื้อไวรัสในปริมาณสูง จึงจะสามารถตรวจพบได้ แต่วิธีเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการทำให้ไวรัสมีความเข้มข้น (concentrate) ก่อนที่จะนำไปตรวจด้วยวิธีอื่นๆ ต่อไป

การใช้วิธีทางอณูชีววิทยา

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส ในปีค.ศ. 1990 Jansen และคณะ (Jansen et al., 1990) ได้ใช้วิธี Antigen Capture PCR โดยนำ antibody มาจับกับ antigen ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ก่อนทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยวิธี polymerase chain reaction ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Chaves และคณะ (Chaves et al., 1994) ได้นำหลักการของ Reverse transcriptase-Polymcrase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณของยีนที่สนใจจากการใช้อาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นแม่แบบ มีหลักสำคัญ คือ การสังเคราะห์ย้อนกลับจาก mRNA ที่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยให้เป็นดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) ด้วยเอ็นไซม์ reverse transcriptase จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่ปริมาณเล็กน้อยนั้นให้มีจำนวนมากมายโดยปฏิกิริยา PCR ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 2-12

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

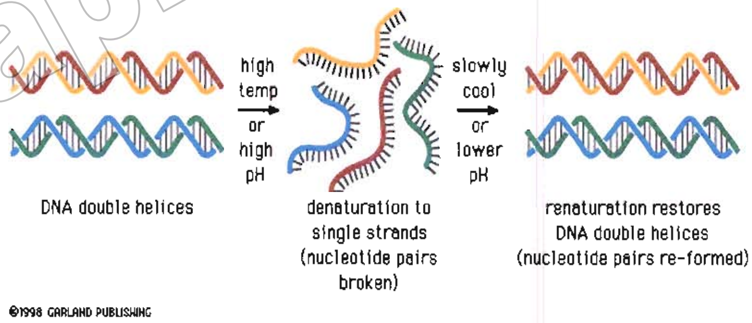


รูป 2-12 ขั้นตอนของกระบวนการ RT-PCR

ในการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยอาศัยการสร้าง cDNA จาก viral RNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซึ่งใช้เป็นแม่แบบ แล้วตามด้วยกระบวนการ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของ cDNA วิธีดังกล่าวนี้มีความไวสูงเพราะสามารถเพิ่มจำนวนของ cDNA ได้ในปริมาณที่สูงและใช้ระยะเวลาสั้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวเพียงอย่างเดียวไม่สามารถใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในอาหารได้โดยตรง ซึ่งอาจจะทำให้ไม่เกิดสัญญาณหรืออาจจะทำให้เกิดผลปลอม (false negative) ได้ ต่อมาได้มีผู้นำวิธี Nested RT-PCR เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยการใช้ primer เพิ่มอีก 1 คู่ เพื่อที่จะจับกับ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR แต่วิธีดังกล่าวมีข้อเสียคือ อาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ (Lees et al., 1995) และหลังจากนั้นได้มีผู้ประยุกต์ใช้วิธี immuno-magnetic capture reverse transcription-PCR assay เพื่อที่จะใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบโดยตรงได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Jothikumar et al., 1998; Casas & Sunen, 2002) นอกจากนี้วิธี Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) ก็ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรม เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่อง thermocycler ที่มีราคาแพง (Chan and Fox, 1999) ในปีค.ศ. 2005 Phan และคณะ (Phan et al., 2005) ได้ใช้วิธี RT-multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยที่จะใส่ primers ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิด วิธีนี้มีความไวสูง มีความจำเพาะและยังคุ้มค่าต่อการลงทุนด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แม้ว่าวิธี RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูงแต่วิธีนี้ก็มีโอกาสเสี่ยงต่อการเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมที่ไม่ใช่ของเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่จะยืนยันผลที่ได้จาก RT-PCR (PCR product) ว่าเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอจริง วิธีที่น่าเชื่อถือมากที่สุดคือ การนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่วิธีดังกล่าวต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงในการวิเคราะห์ข้อมูล จึงไม่สามารถที่จะทำในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ได้ ด้วยเหตุนี้จึงใช้วิธี gel electrophoresis เพื่อใช้ตรวจสอบความยาวของ nucleotide และยืนยันผลด้วยการทำ Southern blot hybridization ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการต่างๆ ทั่วโลก ผู้พัฒนาเทคนิคนี้คือ เอ็ดเวิร์ด เอ็ม เซาเทิร์น (Edward M. Southern) จากมหาวิทยาลัยเอดินเบอร์ก สหราชอาณาจักร ซึ่งใช้เทคนิคนี้วิเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาว่า ดีเอ็นเอชิ้นที่มียีนที่ต้องการศึกษาอยู่ในตำแหน่งใด โดยใช้กระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) แยก DNA ออกตามน้ำหนักโมเลกุลในตัวกลางวุ้นอะกาโรสแล้วย้ายดีเอ็นเอที่แยกแล้วนั้นออกจากอะกาโรสเจลไปสู่แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) หรือแผ่นเยื่อไนลอน (derivatized nylon) วิธีการนี้เรียกว่า Southen blot และวิธี hybridization เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติเรื่องการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของดีเอ็นเอด้วยพันธะไฮโดรเจนที่เชื่อมระหว่างคู่เบสซึ่งถูกทำลายได้ง่าย ๆ ด้วยความร้อน หรือการเพิ่ม pH ของสารละลาย เมื่อพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย ดีเอ็นเอจะคลายเกลียว เปลี่ยนสภาพจากดีเอ็นสายเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว เรียกกระบวนการนี้ว่า Denaturation เมื่อลดอุณหภูมิ หรือลด pH ของสารละลายลงให้มีสภาพปกติ สายดีเอ็นเอจะกลับสู่สภาพเดิม โดยกลับมาเข้าคู่กันใหม่ และจับคู่เบสอย่างจำเพาะเจาะจง เราเรียกว่ากระบวนการนี้ว่า Renaturation การคลายสายดีเอ็นเอที่เป็นเส้นเดี่ยว แล้วทำให้สายดีเอ็นเอเข้าคู่กันใหม่ เรียกว่า กระบวนการทำดีเอ็นเอคู่สมหรือไฮบริไดเซชั่นนั่นเอง (รูป 2-13)



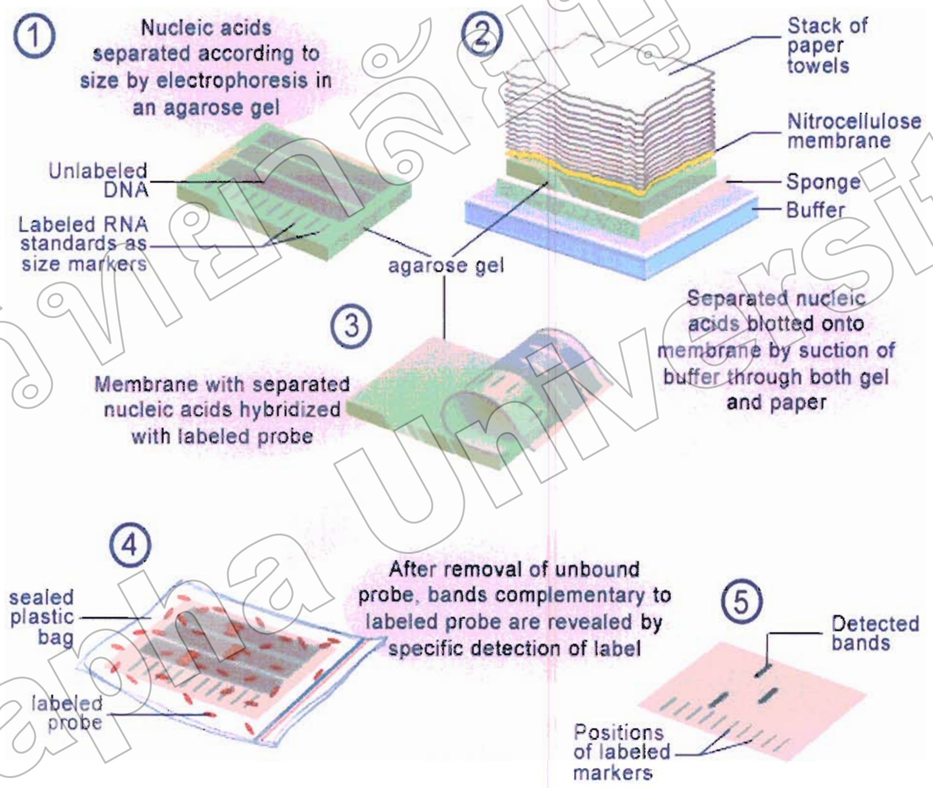
รูป 2-13 Denaturation และ Renaturation ของ DNA

(ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ,

http://www.biotec.or.th/biotechnology-th/newsdetail.asp?id=3265)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการประยุกต์ใช้วิธี Southern blot hybridization หลังจากที่ทำ Southern blot แล้ว จะนำดีเอ็นเอตรวจติดตาม (DNA probe) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ซึ่งติดฉลากกัมมันตรังสี เอนไซม์หรือสารเรืองแสง มาจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกย้ายมาอยู่บนไนโตรเซลลูโลสซึ่งจะมีความจำเพาะต่อกัน แถบของดีเอ็นเอที่สามารถจับกับ DNA probe ได้อย่างจำเพาะเจาะจงจะปรากฏขึ้นเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธีต่าง ๆ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของฉลากที่ติดอยู่กับ DNA probe (รูปที่ 2-14)



รูป 2-14 กระบวนการ Southern blot hybridization

(Molson Medical Informatics Sampler, http://www.mmi.mcgill.ca /mmimediasampler2002 /images /5no15/5no15overview.gif)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอโดยตรงในอาหารอาจมี RT-PCR inhibitors ที่คอยยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งจะทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative) หรือ ไม่มีการแสดงของผลที่ได้ ถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อย ด้วยเหตุนี้จึงมีผู้ที่พยายามหาวิธีที่จะทำการสกัดเชื้อไวรัสจากอาหาร (viral extraction) เพื่อกำจัด RT-PCR inhibitors ต่างๆ และทำให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นมากขึ้น (viral concentration) ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการสกัด RNA ออกจาก virion ของ HAV และทำ RT-PCR ต่อไป มีวิธีหลายวิธีที่นำมาใช้เพื่อรวบรวมเชื้อไวรัสให้มีปริมาณมาก ตั้งแต่การกรองเชื้อไวรัสหรือมีการตกตะกอนด้วยสารละลายต่างๆ ในปีค.ศ. 1990 Jansen และคณะ (Jansen et al.,1990) ได้นำวิธี Antigen-Capture Polymerase Chain Reaction (AC-PCR) มาใช้โดยจะเคลือบ anti-HAV monoclonal ascitic fluid (K32F2) ไว้ใน 1.5-ml polypropylene micro-centrifuge tubes ที่ปราศจากเชื้อ เพื่อใช้จับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอไว้ ก่อนที่จะนำไวรัสไปทำ RT-PCR ซึ่งวิธีนี้มีความง่ายและมีความจำเพาะสูงกว่าวิธี PCR ดั้งเดิม ต่อมาได้มีการนำอนุภาคของแม่เหล็กมาใช้ในการสกัดเชื้อไวรัสให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้อนุภาคของแม่เหล็กเข้าไปแยกโปรตีนขนาดเล็กออกจากอนุภาคของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธี immunomagnetic capture (IMC) มาใช้แยกเชื้อไวรัสโดยอาศัยหลักการจับกันระหว่าง antigen และ antibody เมื่อได้เชื้อไวรัสแล้วจึงใช้ความร้อน ทำให้ RNA ของเชื้อไวรัสหลุดออกมาจากอนุภาคไวรัส แล้วนำ RNA ไปทำ RT-PCR ต่อไป วิธี Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ ซึ่งจะใช้วิธี immunomagnetic separation คู่กับวิธี PCR โดยจะใช้ biotinylated human anti-HAV IgG เคลือบลงบน streptavidin magnetic beads เพื่อจับ อนุภาคของเชื้อไวรัสและแยก RT-PCR inhibitors ออกไป วิธีดังกล่าวสามารถที่จะลดปริมาณสารสกัดที่ได้จากอาหารและสามารถรวบรวมเชื้อไวรัสตับอักเสบเอไว้ได้ในปริมาณที่สูง และ สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบได้ต่ำที่สุดคือ 10 PFU/ml ในหอยนางรม 20 กรัม (Lopez-Sabater et al., 1997)

ในปี ค.ศ. 1978 Sobsey และคณะ (Sobsey et al., 1978) ได้ใช้สารเคมีต่างๆ ทำการสกัด HAV และไวรัสกลุ่ม Enteric virus จากหอยนางรมใช้วิธี Adsorption-elution-ultrafiltration method โดยอาศัยหลักการ absorption ที่ pH 5.0 แล้ว elute ด้วย glycine-saline pH 7.5 ต่อด้วยการนำไปตกตะกอน (reconcentrate) ด้วย polyethylene glycol (PEG) ซึ่งมีรายงานว่า PEG สามารถที่จะ reconcentrate ไวรัสได้ดี (Lewis and Metcalf, 1988) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธี acid adsorption- neutral elution ซึ่งพัฒนามาจากวิธีของ Sobsey และคณะ (Sobsey et al., 1978) โดยได้พัฒนาขั้นตอนการ adsorption เป็นที่ pH 4.8-5.0 และยังเพิ่มขั้นตอนของการ re-elute ด้วย 0.5 M threonine-0.14 M NaCl, pH 7.5 เพิ่มการ extract ด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

chloroform หรือ freon และ re-extract ด้วย Threonine-chloroform และวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการ elute แบบเดิม เพราะสามารถขจัด RT-PCR inhibitors ได้ ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ คือ วิธี acid adsorption- alkaline elution (Kittigul et al. 2005; Mullendore et al., 2001) ซึ่งจะมีการ elute ด้วยสารที่เป็น alkalinc และ cxtract หลายครั้ง ซึ่งจะทำให้สามารถรวบรวมเชื้อไวรัสได้ในปริมาณสูง และสามารถขจัด RT-PCR inhibitors ได้ดีกว่าวิธีอื่น โดยวิธีทุกวิธีที่กล่าวมาข้างต้นเป็นวิธีที่ใช้ในการสกัดเชื้อไวรัสตับอักเสบเอออกจากอาหาร และเมื่อได้เชื้อไวรัสแล้วก็จะทำการสกัดสารพันธุกรรม (viral RNA) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ออกมาเพื่อทำ RT-PCR

การสกัดสารพันธุกรรม (RNA) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอนั้น ในปี ค.ศ. 1987 Chomczynski และคณะ (Chomczynski et al., 1987) ได้ใช้ acid guanidinium thiocyanatc-phenol-chloroform mixture มาใช้ในการสกัด RNA ซึ่งสารดังกล่าวไม่ทำให้ RNA เสียสภาพ แต่ขั้นตอนดังกล่าวใช้เวลานาน ประมาณ 4 ชั่วโมง และในปีค.ศ. 2002 Arnie I. Sair และคณะ (Sair et al., 2002) ได้ใช้ guanidinium isothiocyanatc ในการสกัด RNA โดยใช้หลักของ Chomczynski และคณะ (Chomczynski et al., 1987) นอกจากนี้ยังมีสารอื่นที่นำมาใช้ในการสกัดเชื้อไวรัส เช่น polyethylene glycol, TRIzol, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), phenol-chloroform, scphadcx, pro-cipitate และ viraffinity เป็นต้น ต่อมาภายหลังได้มีการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปในการสกัด RNA เพื่อประหยัดเวลาในการสกัด อาทิเช่น The TRLzol® Reagent (Gibco BRL®, Rockville, MD), QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN®, Valencia,CA) เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์ Fetal rhesus monkey kidney (FrhK-4)

นำเซลล์ FrhK-4 จาก stock ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวมาเพาะเลี้ยงใน flask ที่มี surface area 25 cm^2 ด้วย Dulbecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) complete media ที่มี 10% Fetal Bovine Serum (FBS) และAntibiotic (500 U/ml Pen.G., 0.01 mg/ml Gentamycin, 0.0016 mg/ml Fungizone) บ่มในตู้ incubator ที่มีอุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลาประมาณ 7-8 วัน เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเซลล์จะเกาะพื้น flask มากกว่าหรือเท่ากับ 75-80 % ขึ้นไปจึงนำมาทำการ subculture โดยดูด media เก่าทิ้งแล้วล้างด้วย 1X PBS ประมาณ 5 ml จากนั้นใส่ 0.25% Trypsin ประมาณ 1.5 ml เพื่อย่อยเซลล์ให้หลุดเป็นเซลล์เดี่ยว เมื่อเห็นว่าเซลล์เริ่มหลุดแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย DMEM complete media ประมาณ 2 ml จากนั้นดูดเซลล์จาก flask เก่าใส่ flask ใหม่ ประมาณ 1.5 ml เติม DMEM complete media ลงไปประมาณ 3.5 ml แล้วบ่มในตู้ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO_2 เป็นเวลา 7-8 วัน

การนับเซลล์

ใช้ micropipette ดูด cell suspension 10 μl จาก Flask ใส่ลงในหลุมของ 96 well plate แล้วใส่สี Trypan blue 10 μl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette แล้วหยดลงบน hemocytometer ที่ปิดด้วย coverslip นำไปนับเซลล์ที่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะใสขณะเซลล์ที่ตายแล้วสีจะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้จะเห็นเป็นสีน้ำเงิน จำนวนเซลล์ที่นับได้จากทั้ง 5 ช่อง บน hemocytometer นำมาคำนวณเพื่อหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมดโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด(cell/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่นับได้}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

การเตรียมเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (Stock HAV)

ทำการเลี้ยงเซลล์ FrhK-4 ลงใน flask ที่มี surface area 25 cm^2 ด้วย DMEM complete media จนเซลล์เจริญเต็มพื้น flask(monolayer) แล้วทำการเติม HAV virus (100-1,000 PFU) (ATCC, USA) ที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

dilute 1:100 ใน PBS เติมพอท่วมเซลล์ แล้วนำ flask ไปทำการ shake เบาๆ บน rocking platform ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อให้ไวรัสสามารถเข้าเซลล์ได้(Viral Infection) เมื่อครบเวลาแล้ว เติม maintenance media ที่ประกอบด้วย 2% FBS ลงไป 5 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ โดยระหว่างที่ทำการบ่มจะต้องดู CPE ที่เกิดขึ้น ถ้าหากเกิด CPE มากกว่า 75% จะทำการ Freeze-Thaw cell โดยนำ flask ไปใส่ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลาครั้งละ 7-10 นาที เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็งจากนั้นนำ flask ออกมาจากตู้แช่แข็งปล่อยให้ผลึกน้ำแข็ง ค่อย ๆ ละลายพร้อมกับ เขย่า flask แรง ๆ ทำจนครบ 3 ครั้ง นำของเหลวที่ได้ไป centrifuged แล้วเก็บส่วนของ Supernatant ไว้ แล้วแบ่งใส่ลงใน eppendorf หลอดละ 0.5 ml เก็บไว้ที่ -80 จนกว่าจะนำมาใช้

การเตรียมหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) **ที่ใช้ในการทดลอง**

หอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือนตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม ปีพ.ศ. 2551 โดยหอยนางรมที่เก็บมาจะถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเนื้อหอยนางรม (meats) และส่วนที่เป็นทางเดินอาหารของหอยนางรม (GI tract) อย่างละ 25 กรัม หอยนางรมทั้งหมดจะถูกเก็บไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะนำมาทำการสกัดหาเชื้อไวรัส

การสกัดไวรัสตับอักเสบเอ (HAV) จากหอยนางรมด้วยวิธี Acid-adsorption alkaline elution

การหา Detection limit ของ HAV ในหอยนางรมตัวอย่าง

นำส่วนของหอยนางรม 25 กรัม (ถ้าในส่วนที่เป็นเนื้อหอยนางรม จะใช้หอยนางรมสดประมาณ 10-15 ตัว และในส่วนที่เป็นทางเดินอาหารของหอยนางรม จะใช้หอยนางรมสดประมาณ 5-8 ตัว) ที่ซื้อจากตลาดหนองมนหรือห้างโลตัส จ. ชลบุรี มาบ่มกับเชื้อไวรัส HAV stock ด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ จาก 1:1000, 1:100, 1:10 ปริมาตร 100 µl และที่ปนเปื้อนจำลองด้วยปริมาตร 1 µl, 2.5 µl, 5 µl และ 10 µl เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้ว homogenized ด้วย blender เป็นเวลา 3 นาที โดยเติม 7 volume ของน้ำกลั่น (ประมาณ 175 ml) ที่อุณหภูมิ 4 °C หลังจากนั้นนำ homogenate ไปปรับ pH เป็น 4.8 ด้วย 1 N HCl เขย่า 15 นาที แล้วนำไป centrifuged ที่ 2000X g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C ทิ้ง supernatant แล้วนำ pellet ละลายใน 25 ml ของ 2.9% TPB ที่ประกอบด้วย 6 % glycine, pH 9.0 เพื่อจะ elute ไวรัส เขย่าสารทั้งหมดเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป centrifuged ที่ 10,000X g เป็นเวลา 15 นาที ที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4°C เก็บ supernatant ไว้ (S1) ส่วน pellet ที่เหลือนำมา re-eluted ด้วย 25 ml ของ 0.5 M arginine-0.15 M NaCl, pH 7.5 เขย่า 15 นาที แล้วนำไป centrifuged ที่ 10,000X g เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C เก็บ supernatant ไว้ (S2) นำ supernatant ทั้ง 2 ครั้งมารวมกันได้ปริมาตรประมาณ 70 mlแล้วปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย 1 N HCl และตกตะกอนไวรัสใน supernatant ด้วย 12.5% PEG 8000 – 0.3 M NaCl 0.5 volume (ปริมาตรประมาณ 35 ml) บ่มส่วนผสมทั้งหมดไว้ข้ามคืนที่ 4°C หลังจากนั้นนำไป centrifuged ที่ 10,000X g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนของ pellet ที่ได้มาละลายใน 15 mlของ 0.05 M Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.5 และตกตะกอนอีกครั้งด้วย PEG-NaCl 0.5 volume (ปริมาตรประมาณ 7.5 ml) ส่วนผสมถูกเขย่าให้เข้ากันนาน 2 ชั่วโมง ที่ 4°C แล้ว centrifuged ที่ 10,000X g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C ซึ่ง pellet ที่ได้นำมาละลายใน 5 ml ของ PBS และ extract ด้วย 30% chloroform (ปริมาตรประมาณ 3 ml) แล้วนำไป centrifuged ที่ 3,000X g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C โดยเก็บส่วนของเหลวส่วนบนไว้ (S3) pellet ที่อยู่ระหว่างของเหลวและ chloroform ถูกนำมา re-extracted อีกครั้งด้วย 0.5 volume ของ arginine-NaCl, pH 7.5 แล้วนำไป centrifuged ที่ 3,000X g เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C เก็บส่วนส่วนบนไว้ (S4) นำของเหลวที่ได้ทั้ง 2 ครั้งมารวมกันกัน (S3+S4) แล้วทำการ reconcentrated โดยใช้ SpeedVac centrifugation เพื่อลดปริมาตรเป็น 1 ml แล้วเก็บที่ - 80°C จนกว่าจะนำมาสกัด nucleic acid

การสกัด RNA จากเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ (RNA extraction)

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, Germany) โดยนำ 200 µl ของเหลวที่สกัดได้จากหอยนางรม รวมกับ 200 µl Binding buffer ที่ประกอบด้วย Poly A และ Carrier RNA และ 50 µl Proteinase K ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม binding buffer 100 µl ลงใน reaction แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน column ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000Xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate เติม Inhibitor removal buffer 500 µl แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000Xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate ทำการล้างด้วย Wash buffer 2 ครั้ง ครั้งละ 450 µl โดยแต่ละครั้งหลังจากที่ใส่ Wash buffer แล้วจะทำการ centrifuge ที่ 8,000Xg นาน 1 นาที เมื่อเสร็จจากการล้างด้วย Wash buffer ครั้งที่ 2 แล้วจะ centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด (13,000Xg) นาน 10 วินาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นเปลี่ยน collection tube ใหม่แล้วทำการ elute ด้วย elution buffer 50 µl แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000Xg นาน 1 นาที เก็บส่วนของ filtrate ไว้ (viral RNA) นำมาแบ่งใส่ eppendorf หลอดละ 5 µl เพื่อทำ RT-PCR ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

ในการทดลองครั้งนี้ใช้ Superscript™ III One-step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) โดยใช้ HAV Forward primer ได้แก่ 5′ TTGCTGTTCAAGG GTTGTTG′3 และHAV Reverse primer ได้แก่ 5′AAAGTGGTAAGCACCTCTTGTG′3 ซึ่ง primer ที่นำมาใช้ในครั้งนี้ถูกออกแบบด้วยโปรมแกรม 3 โดยมี target gene อยู่ในส่วนของ gene ที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนโครงสร้างส่วน VP 2 (Genbank, accession number 14707) โดยขั้นตอนการทำ RT-PCR เริ่มจากการผสมสารดัง ตารางที่ 3-1 และขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT-PCR ดังตารางที่ 3-2

ตารางที่3-1 แสดงส่วนประกอบต่างๆต่อ 1 Reaction สำหรับการทำ RT-PCR

ส่วนประกอบใน reaction	ปริมาตรต่อ 1 reaction
2X Reaction Mix	25 µl
Template RNA	5 µl
HAV Forward primer (10 µM)	1 µl
HAV Reverse primer (10 µM)	1 µl
Superscript™III RT/Platinum Taq Mix	2 µl
dH_2O	16 µl
Total	50 µl

เมื่อผสมสารทุกอย่างเรียบร้อยแล้ว นำไปใส่เครื่อง RT-PCR โดยตั้งโปรแกรมดังตารางที่ 3-2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3-2 แสดงรายละเอียดแต่ละขั้นตอนของโปรแกรม RT-PCR

step	Temperature (°C)	Time
1. Pre-warmed	50	30 min
	Add Reaction	
2. Initial denature	94	2 min
3. Denature	94	50 sec
4. Annealing	55	30 sec
5. Extending	68	1 min
	Repeat step 3-5 for 39 cycles	
6. Final extending	68	5 min
7.Cool	4	Pause

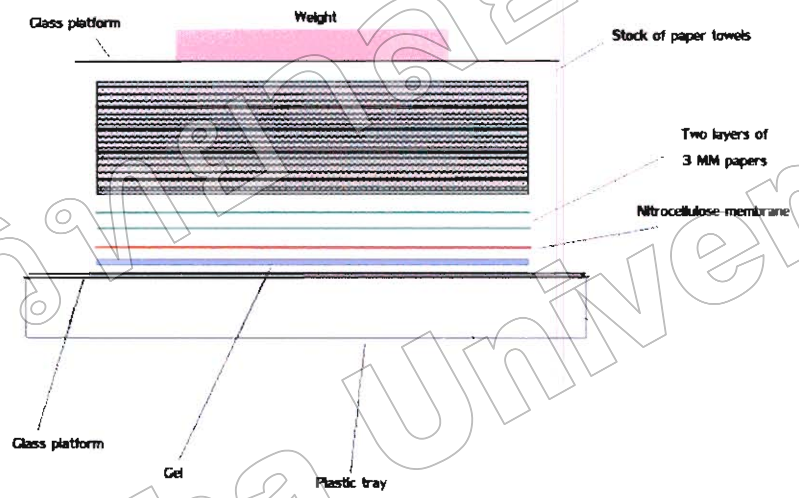
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การตรวจสอบขนาด Nucleotide ของ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR

เตรียม 1.2% Agarose gel จากนั้น load cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ลงไปเพื่อทำ electrophoresis โดย load 100 bp DNA Ladder marker (Track It, invitrogen) 1 μl หรือ cDNA ตัวอย่างละ 2 μl โดยความยาว nucleotide ของ HAV ที่ได้ควรเป็น 242 bp

Southern blot hybridization

นำ Agarose gel ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis มาแช่ในสารละลาย denature เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ใน สารละลาย neutralization 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที แล้วนำไปแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ Agarose gel ไป blot ลงบน nitrocellulose membrane โดยวาง Agarose gel ไว้ล่างสุดต่อจากนั้นวาง nitrocellulose membrane ที่แช่ Transfer buffer แล้ววางกระดาษกรอง 3 แผ่น กระดาษทิชชูที่มีความสูง 2 นิ้ว แล้ววางของแข็งทับไว้ด้านบนซ้อนกันตามลำดับดังรูปที่ 3-2



รูปที่ 3-1 แสดงวิธีการทำ Southern blot

ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมงหรือข้ามคืน หลังจาก 16 ชั่วโมงแล้ว เก็บ membrane เพื่อทำ hybridization โดยนำ membrane ไปแช่ 5X SSC เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปอบด้วย UV นาน 3 นาที และบ่มที่ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำ membrane แช่ลงใน pre-hybridization buffer ที่ถูกอุ่นไว้ที่ 55 °C บ่ม membrane ที่ 55 °C เป็นเวลา 20-30 นาที หลังจากนั้นนำ membrane ไปบ่มใน hybridization buffer 5 ml ที่มี 50 nM BB probe ที่ติดฉลากด้วยDIG ที่ปลาย 5′(DIG-5′GATTGATCTGTGCTATGGTTCCTGGTGACC3′) (Jansen, 1990) ปริมาตร 5 µl โดย BB probe ที่ใช้นี้จะจับกับส่วนของ genome ที่สร้างส่วนของโปรตีน VP2 บริเวณช่วงกลาง ก่อนใส่ BB probe ควรนำไปผ่านการ heat ที่ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที เมื่อบ่ม membrane เป็นเวลา16 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

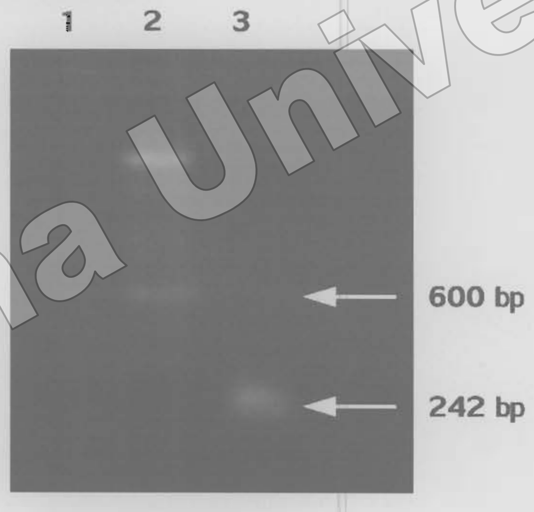
หรือข้ามคืน แล้ว ล้าง membrane ด้วย 2X SSC ที่ประกอบด้วย 0.1% SDS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แล้วล้างด้วย 0.1X SSC ที่ประกอบด้วย 0.1% SDS 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และหลังจากนั้นล้างด้วย Maleic acid buffer แล้วทำการ block membrane ด้วย 1% blocking ที่ละลายใน Maleic acid buffer โดยบ่มเป็นเวลา 30-60 นาที เมื่อเสร็จแล้วนำ membrane ไปบ่มกับ HRP-labeled anti-DIG IgG 5 µl ใน Maleic acid buffer 5 ml (1:1,000 ใน 1% blocking solution) เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้าง membrane ครั้งสุดท้ายด้วย PBS-T (1X PBS ที่ประกอบด้วย 0.05% Tween® 20) ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เมื่อเสร็จแล้วก็นำ membranc ไปทำการปะฟิล์ม X-Ray โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham, UK)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอด้วย Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

เพื่อที่จะตรวจสอบความยาวของ cDNA ที่เพิ่มจำนวนด้วยวิธี RT-PCR ในการทดลองได้ใช้สารพันธุกรรมจากเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ บริสุทธิ์ (pure HAV genome) เป็นแม่แบบและใช้ primer ที่ออกแบบมา ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยานำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder marker (Track It, invitrogen) พบว่า cDNA มีความยาวนิวคลีโอไทด์ประมาณ 242 bp (รูป 4-1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า primer ที่นำมาใช้มีความจำเพาะเจาะจง (specific) กับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่บริสุทธิ์



รูปที่ 4-1 แสดงผลผลิต cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ pure HAV genome ได้ความยาวนิวคลีโอไทด์ที่ 242 bp

Lane 1: Negative control (dH_2O)

Lane 2: 1 µl ข อง 100 bp marker (Track-it, Invitrogen) ปริมาตร 1 µl

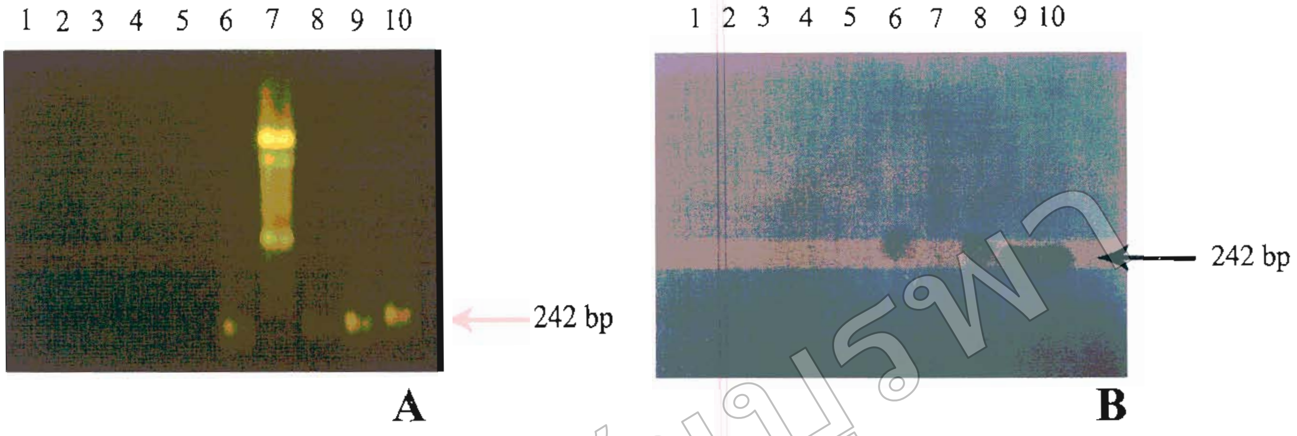
Lane 3: pure HAV genome (10 ng/reaction)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.การทดสอบความไวของวิธี Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เมื่อทำการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด

นำเชื้อไวรัสตับอักเสบเอมาทำการเจือจางในสารละลาย PBS ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำไปทำการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดจาก 1:1000, 1:100, 1:10 ปริมาตร 100 μl และ 1, 2.5, 5, 10 μl ตามลำดับ จากนั้นจะสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมด้วยวิธี Acid-adsorption alkaline elution และสกัด RNA จากเชื้อไวรัสโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, Germany) ซึ่ง RNA ที่ได้จากการสกัดนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อนำผลผลิตจากปฏิกิริยามาวิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis พบว่าเมื่อปนเปื้อนเชื้อไวรัสในหอยนางรมสดที่ความเข้มข้น 1:1000, 1:100, 1:10 ไม่มีการปรากฏของ cDNA band แต่มีการปรากฏของ cDNA band ที่มีความยาวนิวคลีโอไทด์ประมาณ 242 bp ทุกปริมาตรที่ทำการปนเปื้อนจำลองจาก 1 ถึง 10 μl (รูปที่4-2 A) และเมื่อนำไปทำ Southern blot hybridization โดยใช้ DIG-labeled probe และตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase (HRP)-labeled anti DIG IgG (1:1,000) พบสัญญาณเกิดขึ้นที่ band 242 bp จากผลการผลการทดลองเพื่อยืนยันถึงความจำเพาะของcDNA ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ว่าเพิ่มจำนวนมาจากสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอจริง ดังรูปที่ (4-2 B)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-2 แสดงความไวของวิธี RT-PCR และความจำเพาะของ cDNA band ได้จากปฏิกิริยาด้วยเทคนิค hybridization จากการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด โดยใส่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ 1:1000, 1:100, 1:10 ปริมาตร 100 µl และ1, 2.5, 5, 10 µl ตามลำดับที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค hybridization (A) cDNA band ที่สกัดได้จากการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด 1:1000, 1:100, 1:10 ปริมาตร 100 µl และ1, 2.5, 5, 10 µl ตามลำดับ ซึ่งถ่ายจาก 1.2% Agarose gel electrophoresis (B) ผลการทำ hybridization จาก Membrane แผ่นเดียวกันโดยใช้ DIG-labeled probe และตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase (HRP) -labeled anti DIG IgG (1:1,000) ลูกศรที่ชี้แสดงถึงความยาวของ cDNA ตามที่คาดที่ 242 bp

Lane 1: Negative control (dH_2O)

Lane 2: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ไม่มีการเติมเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ

Lane 3: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 1: 1000 ปริมาตร 100 µl

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 1: 100 ปริมาตร 100 µl

Lane 5: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 1: 10 ปริมาตร 100 µl

Lane 6: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 1 µl

Lane 7: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen) ปริมาตร 1 µl

Lane 8: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 2.5 µl

Lane 9: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 5 µl

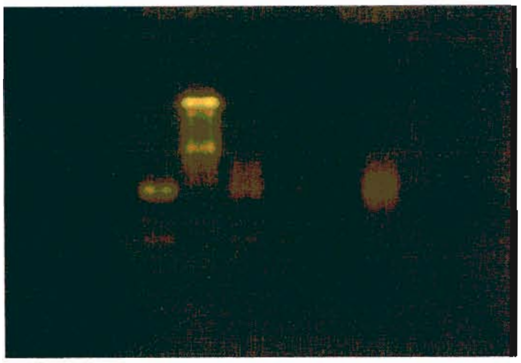
Lane 10: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 10 µl

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอจากหอยนางรมสดกลุ่มตัวอย่างที่ถูกเก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

หอยนางรมตัวอย่าง (*Saccostrea commercialis*) ที่ถูกเก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคมในปีพ.ศ. 2551 เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือน หอยนางรมสดที่ได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรม 25 กรัม และส่วนของเนื้อหอยนางรม 25 กรัม จากนั้นนำไปสกัดเชื้อไวรัสและRNA แล้วนำ RNA ไปทำปฏิกิริยา RT-PCR cDNA ที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarose gel elcctrophoresis และทำการพิสูจน์ความจำเพาะของ cDNA band ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยใช้ DIG-labeled probe และตรวจสอบด้วย horseradish pcroxidasc(HRP)-labeled anti DIG antibodies (1:1,000) ผลจากการทดลองเมื่อวิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarosc gel electrophoresis พบว่า มีการปรากฏของ cDNA band ที่มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 242 bp ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะให้คะแนนความเข้มของ cDNA band ที่เกิดขึ้นจากมากไปหาน้อยตามลำดับ จาก +4 ถึง 0 โดยที่ +4 หมายถึงมีความเข้มของ cDNA band มากที่สุด +3 หมายถึงมีความเข้มของ cDNA band มาก +2 หมายถึงมีความเข้มของ cDNA band ปานกลาง +1 หมายถึงมีความเข้มของ cDNA band น้อย และ 0 หมายถึงไม่มีการปรากฏของ cDNA band เมื่อวิเคราะห์ cDNA band ที่ได้จากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรม พบว่าในเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม cDNA band มีคะแนนความเข้มข้นเป็น +3, +1, +1, +4 ตามลำดับ (รูปที่4-3A lane ที่ 5-8 ตามลำดับ) และในเดือนกันยายนและตุลาคม ไม่พบการปรากฏของ cDNA band (รูปที่4-3A lane 9และ10 ตามลำดับ) หลังจากนั้นนำไปพิสูจน์ความจำเพาะของ cDNA band ด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่า ไม่มีการปรากฏของ signal ในทุกเดือน ดังที่แสดงไว้ในรูปที่4-3B และเมื่อวิเคราะห์ cDNA band ที่ได้จากส่วนเนื้อของหอยนางรม พบว่าในเดือนที่ มิถุนายนจนถึงเดือนกันยายน cDNA band มีคะแนนความเข้มข้นเป็น +1, +1, +2, +1 ตามลำดับ (รูปที่4-4A lane 6-9 ตามลำดับ) และในเดือนพฤษภาคมและตุลาคม พบว่าไม่มีการปรากฏของ cDNA band (รูปที่4-4A lane 5 และ 10) หลังจากนั้นนำไปพิสูจน์ความจำเพาะของ cDNA band ด้วยวิธี Southern blot hybridization พบว่า ไม่มีการปรากฏของ signal ในทุกเดือน ดังที่แสดงไว้ในรูปที่4-4B จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธี RT-PCR นั้นมีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสมาก แต่เมื่อนำไปทำ hybridization ไม่มีการปรากฏของ hybridization signal

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



รูปที่ 4-3 แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยวิธี RT-PCR จากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรมสดที่เก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือนจากเดือน พฤษภาคม ถึงเดือน ตุลาคม 2551 (A) cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา ซึ่งถ่ายจาก 1.2% Agarose gel electrophoresis (B) ผลการทำ hybridization จาก Membrane เดียวกันโดยใช้ DIG-labeled probe และตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase (HRP) -labeled anti DIG antibodies (1:1,000) ลูกศรที่ชี้แสดงถึงความยาวของ cDNA ตามที่คาดที่ 242 bp

Lane 1: Negative control (dH_2O)

Lane 2: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 10 µl

Lane 3: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen) ปริมาตร 1 µl

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะอาหารหอยนางรมสดที่เก็บในเดือนพฤษภาคม

Lane 5: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะอาหารหอยนางรมสดในเดือนมิถุนายน

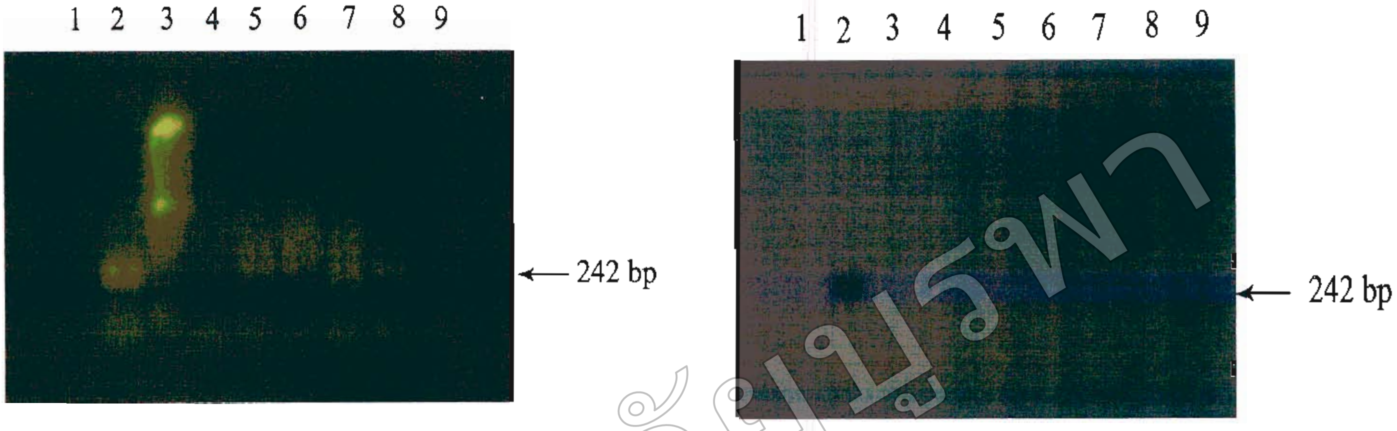
Lane 6: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะอาหารหอยนางรมสดในเดือนกรกฎาคม

Lane 7: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะอาหารหอยนางรมสดในเดือนสิงหาคม

Lane 8: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะอาหารหอยนางรมสดในเดือนกันยายน

Lane 9: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะอาหารหอยนางรมสดในเดือนตุลาคม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



A **B**

รูปที่ 4-4 แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยวิธี RT-PCR จากส่วนเนื้อของหอยนางรมสดที่เก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือน จากเดือน พฤษภาคม ถึงเดือน ตุลาคม 2551 (A) cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา ซึ่งถ่ายจาก 1.2% Agarose gel electrophoresis (B) ผลการทำ hybridization จาก Membrane เดียวกัน โดยใช้ DIG-labeled probe และตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase (HRP) -labeled anti DIG antibodies (1:1,000) ลูกศรที่ชี้แสดงถึงความยาวของ cDNA ตามที่คาดที่ 242 bp

Lane 1: Negative control (dH_2O)

Lane 2: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV 10 μl

Lane 3: 100 bp marker (Track-it, Invitrogen) ปริมาตร 1 μl

Lane 4: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดใน เดือนพฤษภาคม

Lane 5: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดใน เดือนมิถุนายน

Lane 6: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดใน เดือนกรกฎาคม

Lane 7: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดใน เดือนสิงหาคม

Lane 8: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดใน เดือนกันยายน

Lane 9: ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดใน เดือนตุลาคม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในอาหารจำพวกหอยนางรมนั้น พบว่ายังมีปัญหาในการศึกษาคืออาจมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อยมากแต่เชื้อไวรัสยังมีความสามารถในการติดเชื้อได้ จนวิธีที่ใช้ในการตรวจไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการต่างๆเพื่อใช้วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแทนวิธีเดิมที่นิยมใช้กันนั้นแต่เดิมซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงและตรวจหา infectivity เชื้อไวรัส ซึ่งมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานานมาก วิธี RT-PCR จึงเป็นอีกวิธีที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว แต่อาจมีสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อหอยนางรมที่คอยยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาการตรวจหา จึงต้องเพิ่มวิธีการทำให้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส มีความเข้มข้นก่อนนำไปตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR จากผลการทดลองเมื่อใช้ primer คู่ที่จำเพาะต่อ VP2 gene ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนโครงสร้างซึ่งเป็นบริเวณอนุลักษณ์ (highly conserved) บน genome ของไวรัสตับอักเสบเอโดยใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่บริสุทธิ์ (pure HAV genome) เป็นแม่แบบ พบว่ามีการปรากฏแถบ cDNA เพียง 1 แถบที่มีความยาวนิวคลีโอไทด์ประมาณ 242 bp (รูป 4-1) แสดงให้เห็นว่า primer ที่ได้ออกแบบเพื่อนำมาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้น cDNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอเป้าหมายได้ แต่ผลที่ได้นั้นยังไม่เพียงพอในการบ่งบอกถึงความจำเพาะเจาะจงของ primers ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้อาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของ primers เมื่อทำการศึกษาใน pure genome ของเชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารชนิดอื่น

ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเอาวิธี Acid-adsorption alkaline elution ซึ่งได้เคยนำมาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโรต้าไวรัส ในหอยตะโกรม (*Crassostrea belcheri*) โดยวิธีดังกล่าวที่ได้พัฒนามาจากวิธี direct alkaline elution และ acid adsorption-neutral elution (Kittigul et al., 2001) เพื่อทำให้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ปะปนอยู่จำนวนน้อยนั้นมีความเข้มข้นขึ้น นอกจากนี้ยังจำกัดสารเคมีที่สามารถยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย จากการทดลองเพื่อศึกษาความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมด้วยปริมาตรต่างๆ เพื่อให้ทราบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (detection limit) ที่สามารถตรวจพบได้ พบว่าวิธี RT-PCR มีความไวสูงมากเพราะสามารถตรวจพบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปริมาตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1 μl (รูป 4-2(A)) ในlaneที่ 6 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ผ่านมาว่าวิธี RT-PCR สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้ที่ 0.2-1 PFU/ml (Ribao et al., 2004) หรือตรวจหาเชื้อไวรัสโรต้าไวรัสได้ที่ 3.12X 10^2 PFU/ml (Kittigul et al., 2001) และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะของแถบ cDNAที่ปรากฏนั้นด้วย วิธี Southern blot hybridization โดยใช้ BB probe (Jansen, 1990) พบว่าเกิด hybridization signal ที่ความเข้มข้น 1 μl ที่ได้จากการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรม (รูป 4-2(B)) ซึ่ง BB probe ที่ Jansen ได้ทำการศึกษานั้นพบว่าเป็น probe ที่มี targets sequence อยู่ที่ส่วน VP2 gene

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี RT-PCR ในหอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่ถูกเก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคม ปี พ.ศ.2551 เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือน โดยหอยนางรมที่เก็บมานั้นจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ เนื้อและทางเดินอาหาร เมื่อวิเคราะห์ด้วย 1.2% Agarose gel electrophoresis พบว่ามีการปรากฏแถบ cDNA ที่มีความยาวนิวคลีโอไทด์ประมาณ 242 bp ซึ่งเท่ากับความยาวของนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR เมื่อใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์เป็นแม่แบบ แต่ความเข้มของแถบ cDNA ในแต่ละเดือนนั้นมีความเข้มไม่เท่ากัน และเมื่อนำไปพิสูจน์ความจำเพาะของแถบ cDNA ที่เกิดขึ้นด้วย วิธี Southern blot hybridization กลับไม่มีการปรากฏ hybridization signal (รูป4-3 และ 4-4 (B)) โดยจากการศึกษาในหอยนางรมทั้ง 2 ส่วนนั้นให้ผลที่คล้ายกัน จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไม่ว่าจะเป็นส่วนของเนื้อหอยนางรมหรือส่วนทางเดินอาหารของหอยนางรมนั้น เชื้อไวรัสตับอักเสบเอสามารถ infection ได้ทั้ง 2 ส่วน และจากผลของการทำ RT-PCR และ hybridization พบว่า RT-PCR ให้ผลบวก (positive) แต่ hybridization ให้ผลลบ (negative) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลที่เกิดขึ้นนั้นอาจมีสาเหตุ ๆ สาเหตุ อาทิเช่น ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในตัวอย่างหอยนางรมนั้นมีน้อย ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์จากการทำ RT-PCR นั้นน้อยกว่า detection limit ของเทคนิค hybridization โดย detection limit ของเทคนิค hybridization นั้นสามารถพิสูจน์ความจำเพาะของ DNA ที่ปริมาณ 0.1 pg ดังนั้นหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงที่ตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรีในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2551 หากนำมาบริโภคก็อาจมีโอกาสเสี่ยงในการได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าวิธี RT-PCR นั้นมีความไวสูงมากและวิธี Southern blot hybridization นี้เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการพิสูจน์ความจำเพาะของแถบ cDNA ที่น่าเชื่อถือที่นักวิจัยนิยมนำมาใช้ (Schiffman et al., 1991, Kellokoski et al., 1992, Wang et al., 2000) นอกเหนือจาก การนำ cDNA ไปหาลำดับเบส (DNA sequencing) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานแต่เป็นวิธีที่ต้องลงทุนสูงจึงไม่สามารถทำได้เองในห้องปฏิบัติการทั่วไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Cellroot.dbf, BSC-1 เข้าถึงได้จาก http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb9126.htm สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม ปี 2552

Chan and Fox (1999). NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Re. Med. Microbiol.*, 10(10), 185-196.

Chaves, Graff, Normann and Flehmig. (1994). Specific detection of minus strand hepatitis A virus RNA by Tail-PCR following reverse transcription. *Nucleic Acids Res.*, 22(10), p. 1919–1920.

Chomczynski, Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, p.156-159.

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

Coelho ,Heinert, Simões and Barardi. (2003). Hepatitis A virus Detection in Oysters (Crassostrea gigas) Santa Catarina State, Brazil, by Reverae Transcription Polymerase Chain Reaction. Brazil: *J. Food Prot.*, Vol.66, No. 3, 2003, Pages 507-511

Cuthbert (2001), Hepatitis A virus เข้าถึงได้จาก http://cmr.asm.org/cgi/content-nw/full/14/1/38/T1 สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม ปี 2552

David, Gloria and Gary (2002). Detection of both Hepatitis A Virus and Norwalk-Like Virus in Imported Clams Associated with Food-Borne Illness. *Appl Environ Microbiol..*, p. 3914–3918.

Dean A Blumberg, Hepatitis A virus เข้าถึงได้จาก http://pathport.vbi.vt.edu /pathinfo/pathogens/ HAV.html สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม ปี 2552

Deinhardt , Holmes, Capps and Popper (1967). Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkey. *J Exp M.*,125(4). P.673-678.

Derk , Masao , Linda , Kevin and Stanley (1995). Mutations within the 59 nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured african green monkey kidney cells. *J. Virol.*, p. 1041–1049.

Dienstag , Routenberg , Purcell , Hooper and Harrison (1975). Foodhandler-associated outbreak of hepatitis type A. An immune electron microscopic study. *Ann Intern Med.* ,85(5), p.647 - 650.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Duwoon Kim, Seok-Ryel Kim, Ki-Sung Kwon, Ji-Won Lee, and Myung-Joo Oh. (2008). Detection of Hepatitis A virus from oyster by nested PCR using efficient Extraction and Concentration method. *J. Microbiol.*, p.436-440.

Ester Sun˜e´n , Mark (1999). Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (Mercenaria mercenaria) by RT-PCR methods. *J. Virol. Meth. 77* ., p.179–187.

Ester Sun˜e´n, Nerea Casas, Bele´n Moreno, Carmen Zigorrag. (2004). Comparison of two methods for the detection of hepatitis Avirus in clam samples (*Tapes* spp.) by reverse transeription-nested PCR. *Inter J. Food Microbiol. 91* ,p.147– 154.

Gillian and Theodore (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. *Appl Environ Microbiol.* ,August, 54(8), p.1983-1988.

Hollinger and Ticehurst (1990) Hepatitis A Virus. In: Fields BN, Knipe DM, eds. Fields virology vol 1. 2 nd. ed. Newyork: Raven Press, 1990: 631-67

Jansen, Siegl, Lemon (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. Proc *Natl Acad Sci.*, U S A. , 87(8),p. 2867 - 2871.

Jiang, Liao , Zhao, Sun, Qian, Bian, Jiang (2004). Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 97(5). p.1105 - 1112.

Jothikumar, Dean and Tadesse (1998). Immunomagnetic Capture PCR for Rapid Concentration and Detection of Hepatitis A Virus from Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol.* , p. 504-508.

Kellokoski , Syrjänen , Chang , Yliskoski and Syrjänen (1992). Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol. & Med.*, p. 459 – 464.

Burapha University

Kent County Health Department, Grand Rapids, Michigan USA, Hepatitis A virus เข้าถึงได้จาก http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrb/CMBwebsite/CMB508301 /Virushtml/16hepatitis.htm สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม ปี 2552

Kittigul , Pombubpa , Rattanatham , Diraphat , Utrarachkij , Pungchitton , Khamrin and Ushijima (2008). Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol.*, 122(1-2), p.204-10.

Kittigul , Khamoun , Sujirarat , Utrarachkij , Chipirom , Chaichantanakit and Vathanophas (2001). An improved method for concentrating rotavirus from water samples. *Memorias do Instituto Oswaldo Crus 96*, 815-821.

Lees , Henshilwood , Green , Gallimore and Brown (1995). Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcriptase-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 61., p. 4418-4424.

Lopez-Sabater and Dengand. (1997). Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA)for detection Of hepatitis A virus (HAV) in American oyster (Crassostrea virginiea). *L. Appl Microbiol.* 24., p.101–104.

Mae Callum FO. (1947). Homologus serum hepatitis.Lancet 2, 691-2.

Molson Medical Informatics Sampler, Southern blot hybridization เข้าถึงได้จาก http://www.mmi.mcgill.ca/mmimediasampler2002 /images /5no15/5no15overview.gif สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม ปี 2552

Monceyrona C. and B. Grindea (1994). Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetie separation and PCR. *J. Virol. Meth.*, p. 157-166.

Mullendore Jennifer, Mark D and Y. S. Carol. (2001). Improved method for the recovery of hepatitis A virus from oysters. *J. Virol. Meth.*, p.25-35.

Nerea Casas and Ester Sunen. (2002). Detection of enteroviruses,hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. *Microbiol. Res.* (2002) 157, p. 169–175.

Phan , Nguyen , Yan , Okitsu and Ushijima . (2005). A novel RT-multiplex PCR for enteroviruses, hepatitis A and E viruses and influenza A virus among infants and children with diarrhea in Vietnam. *Arch Virol.* 150(6), p. 1175 – 1185.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Pina Sonia, Montserrat Puig, Francisco Lucena, Joan Jofre and Rosina Girones. (1998). Viral Pollution in the Environment and in Shellfish: Human Adenovirus Detection by PCR as an Index of Human Viruses. *Appl Environ Microbiol.*, p. 3376–3382.

Provost and Hilleman (1979). Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro.*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160, p.213-221.

Public health microbiology, HAV plaque assay เข้าถึงได้จาก http://public-health-microbiology.net /images /600_HAV_ plaque_assay .jpg สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม ปี 2552

Qiong Wang, Linda and Donald , (2000). Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot Hybridization. *Diseases of aquatic organisms Dis Aquat Org*, vol. 43: 175–181.

Ribao , Torrado , Vilarino and Romalde (2004). Assessment of different commercial RNA-extraetion and RT-PCR kits for detection of hepatitis A virus in mussel tissue. *J. Virol. Meth. 115*, 177-182.

Safari'k, Safarikova and Forsythe.(1995). The applieation of magnetic separations in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 78, p. 575-585.

Schwab, Neill, Fankhauser, Daniels, Monroe, Bcrgmire-sweat, Estes and Atmar. (2000). Development of Methods To Detect "Norwalk-Like Viruses" (NLVs) and Hepatitis A Virus in Delicatessen Foods:Application to a Food-Borne NLV Outbreak. *Appl Environ Microbiol.*, p. 213–218.

Schiffman, Bauer, Lorincz, Manos, Byrne, Glass, Cadell and Howley (1991). Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J. Clinic Microbiol.* 1991; 29(3): 573-577.

Sobsey, Robert and Harold (1978). Improved Methods for Detecting Enteric Viruses in Oysters. *Appl Environ Microbiol.*, p. 121-128.

Stephen, Albert and Robert (1973). Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness: *Science 7 December 1973*: Vol. 182. no. 4116, pp. 1026 – 1028.

Swiss institute of Bioinformatic, Hepatitis A virus เข้าถึงได้จาก http://www.expasy.ch /viralzone/all_ by_speeies/94.html สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม 2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Theresa, Howard and Mark (1989). Replication kinetics and cytopatic effect of hepatitis A virus. *J. gen. Virol. (1989)*, 70, p. 2051-2062.

University of Lübeck , Hepatitis A virus เข้าถึงได้จาก http://www.vuz.uni-luebeck.de /gaussmueller .htm สืบค้นข้อมูลเมื่อ ตุลาคม 2552

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก
วิธีเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิจัย

1.การเพาะเลี้ยง FrhK-4 cell

1X DMEM complete

10X DMEM	10	ml
Fetal bovine serum (FBS)	10	ml
5% $NaHCO_3$	2	ml
100X Pen. G. (10,000 U/ml)	1	ml
Gentamycin (4,000 μg/ml)	0.1	ml
Fungizone (250 μg/ml)	0.4	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

ปรับ pH เป็น 6.8-7.2 ด้วย 1 N HCl

เก็บที่ 4 °C

Maintenance media (2% FBS) 100 ml

10X DMEM	10	ml
Fetal bovine serum (FBS)	2	ml
5% $NaHCO_3$	2	ml
100X Pen. G. (10,000 U/ml)	1	ml
Gentamyein (4,000 μg/ml)	0.1	ml
Fungizone (250 μg/ml)	0.4	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

ปรับ pH เป็น 6.8-7.2 ด้วย 1 N HCl

เก็บที่ 4 °C

0.25% Trypsin-versene mixture (100 ml)

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

เก็บที่ -20 °C

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.การสกัดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Acid-adsorption alkaline elution

Stock

100 % Tryptose phosphate broth (TPB) 100 ml

Tryptose	2	g
Dextose หรือ glucose	0.2	g
NaCl	0.5	g
Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	0.25	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

เก็บที่ 4 °C

25% Poly-ethylene glycol 8000 (ประกอบด้วย 0.3 M NaCl) 100 ml

PEG 8000	25	g
NaCl	1.75	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

Working

1 N HCl 50 ml

Conc. HCl (12 N)	4.17	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	50	ml

2.9% Tryptose phosphate broth (ประกอบด้วย 6% glycine, pH 9.0) 100 ml

100 % TPB	2.9	ml
Glycine	6	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

ปรับ pH เป็น 9.0 ด้วย NaOH

0.5 M Arginine- 0.15 M NaCl (100 ml)

Arginine	8.71	g
NaCl	0.877	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

0.05 M PBS, pH 7.5 (100 ml)

10X PBS, pH7.5	0.5	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.การทำ Gel electrophoresis

Stock

10X TBE buffer 1000 ml

Tris base	108	g
Boric acid	55	g
EDTA	9.3	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

Working

1.2 % Agarose 100 ml

Agarose	1.2	g
ปรับปริมาตร ด้วย 1X TBE buffer จนถึง	100	ml

1X TBE buffer 1000 ml

10X TBE buffer	100	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

4.การทำ Southern blot Hybridization

Stock

5 M NaCl (1000 ml)

NaCl	292.5	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

10 M NaOH (200 ml)

NaOH	80	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	200	ml

20X SSC (1000 ml)

NaCl	175.5	g
Sodium citrate ($Na_3C_3H_5O(COO)_3$)	88.23	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 N HCl

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

20% Sodium dodecyl sulfate (SDS) 200 ml

Sodium dodecyl sulfate (SDS)	40	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	200	ml

1 M Maleic acid (1000 ml)

Maleic aeid	116.07	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

10X PBS, pH7.5 (1000 ml)

Na_2HPO_4	115	g
NaH_2PO_4	29.6	g
NaCl	58.4	g
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย HCl

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

Protein blocking reagent	2	g
ปรับปริมาตร ด้วย Maleic aeid buffer จนถึง	100	ml

Maleic acid buffer ถูกอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C และเก็บที่ 4 °C

Working

Denature DNA (3 M NaCl, 0.5 M NaOH) 1000 ml

5 M NaCl	600	ml
10 M NaOH	50	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

Neutralize DNA (0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH 7.0) 1000 ml

Tris-HCl	60.55	g
5 M NaCl	300	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย HCl

Transfer buffer (10x SSC) 1000 ml

20X SSC	500	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	1000	ml

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Hybridization buffer 250 ml

(5X SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1% Protein blocking, 50% Formamide)

20X SSC	62.5	ml
N-lauroylsarcosine	0.25	g
20% SDS	0.25	ml
10X Blocking Solution	4	ml
100 % Formamide	125	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	250	ml

Wash I: 2X SSC, 0.1% SDS (250 ml)

20X SSC	25	ml
20% SDS	1.25	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	250	ml

Wash II: 0.1X SSC, 0.1% SDS (250 ml)

20X SSC	1.25	ml
20% SDS	1.25	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	250	ml

5X SSC (50 ml)

20X SSC	12.5	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	50	ml

Washing buffer (PBS-T)(1X PBS, 0.05% Tween® 20) 300 ml

10X PBS	30	ml
Tween® 20	0.15	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	300	ml

Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) 100 ml

1 M Maleic acid	10	ml
5 M NaCl	3	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Sterile dH_2O จนถึง	100	ml

ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย NaOH

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Blocking solution (1X conc.) 20 ml

10X Protein blocking stock solution	2	ml
ปรับปริมาตร ด้วย Maleic acid buffer จนถึง	100	ml
เก็บที่ 4 °C		

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นายวิทยา ภูมิภักดิ์
วัน เดือน ปีเกิด	13 กันยายน 2529
สถานที่เกิด	อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	1/45 ต.ท่าช้าง อ.เมือง จ.จันทบุรี 22000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2542	จบการศึกษาระดับประถมศึกษา โรงเรียนสฤษดิเดช จ.จันทบุรี
พ.ศ.2545	จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเบญจมราชูทิศ จ.จันทบุรี
พ.ศ.2548	จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบญจมราชูทิศ จ.จันทบุรี
พ.ศ.2551	จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University