สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

โดย

ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส

นายสิทธิศักดิ์ เกตุขุนทด

นางสาวจันทรัตน์ ภูมิพื้นผล

WA165118
-7 W.A. 2557
335595
AQ 0102315
เริ่มบริการ
23 ม.ค. 2557

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ที่เป็นเงินอุดหนุนจากรัฐบาลลักษณะงานวิจัย
และพัฒนาถ่ายทอดเทคโนโลยี
งบประมาณ ปี 2555

อภินันทนาการ

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน อาทิ นาย สิทธิศักดิ์ เกตุขุนทด นิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ทุ่มเทแรงกาย และใจในการทำงานวิจัยซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ senior project ขอขอบคุณ นายวิทยา ภูมิภักดิ์ และนางสาวจันทรัตน์ ภูมิพื้นผล ศิษย์เก่าที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านต่างๆ ขอบคุณ ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต ที่ให้ความอนุเคราะห์หอยนางรมตัวอย่าง ขอบคุณ ผศ.ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร ที่ให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมทำให้งานมีความสมบูรณ์ขึ้น ขอบคุณ ศ.ดร. สมศักดิ์ พันธุวัฒนา ที่ให้กำลังใจให้มีความมานะพยายามเอาชนะอุปสรรคต่างๆ ได้ รวมทั้งปลูกฝังการเป็นนักวิจัยให้ และท้ายสุดขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2555 นี้

อุไรวรรณ อินทมาโส

25 เมษายน 2556

Development of detection of hepatitis A viruses in oysters cultured in the eastern coast of Thailand

Uraiwan Intamaso* ,Sitthisak Ketkhunthod, Jantharat Pumpunphol

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

*Corresponding author: uraiwani@buu.ac.th

Abstract: Hepatitis A virus (HAV) is one of the important viruses that infect people via consuming fresh oysters in the East Coast of Thailand. The detection of fresh oysters prior to selling consumers is considered to provide protection against diseases. In this study, RT-PCR was performed to detect HAV in fresh oysters cultured along the Eastern coast in Chon Buri, Rayong and Chanthaburi provinces of Thailand. Viral nucleic acid was extracted via Glycine-Arginine- PEG method and then amplified with the designed primers by RT-PCR. The result showed that RT-PCR method had the sensitivity in the detection of purified HAV RNA genome as 3.188 ng or artificially contaminated oysters as 2.4×10^2 PFU /1.5 gram oyster or 160 PFU/g while DNA-ELISA can further increase the sensitivity of RT-PCR method about 100 fold and 10 fold, respectively. RT-PCR-DNA-ELISA was also used to detect genetic material of HAV in oysters cultured in nature. The result showed smear band appeared on an agarose gel rather than the expected DNA band. However when confirmed the specificity of RT-PCR products by DNA-ELISA, some of those were positive. These results indicated that DNA-ELISA can enhance both sensitivity and specificity of RT-PCR in the detection of HAV genetic material. Thus, it may be developed as a ready-to-use kit for consumers or entrepreneurs in the detection of HAV in naturally contaminated oysters.

Keywords: HAV, Oysters, RT-PCR, DNA-ELISA, Food contamination, Food safety

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

อุไรวรรณ อินทมาโส[1*], สิทธิศักดิ์ เกตุขุนทด[1], จันทรัตน์ ภูมิพื้นผล[1]

[1] คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก : uraiwani@buu.ac.th

บทคัดย่อ: ไวรัสตับอักเสบชนิดเอเป็นไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งที่มักติดต่อสู่คนผ่านการบริโภคหอยนางรมสดในเขตชายฝั่งทะเลตะวันออก การตรวจหาไวรัสในหอยนางสดก่อนที่จะไปถึงมือผู้บริโภคสามารถมีประโยชน์ในเชิงป้องกันโรคได้ จากงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค RT-PCR-DNA-ELISA มาใช้ตรวจหาไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสด ที่เพาะเลี้ยงตามชายฝั่งทะเลในเขตจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรี โดยสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี Glycine-Arginine-PEG ก่อนนำมาขยายเพิ่มจำนวนด้วย primers ที่ออกแบบ ผลการทดลองพบว่า RT-PCR มีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์ที่ 3.188 ng และเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดที่ 2.4×10^2 PFU ต่อหอยนางรมสด 1.5 กรัม หรือเท่ากับ 160 PFU/g ขณะที่เทคนิค DNA ELISA สามารถเพิ่มความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสได้ประมาณ 100 เท่า และ 10 เท่าตามลำดับ เมื่อนำวิธี RT-PCR-DNA-ELISA มาใช้ทดสอบตัวอย่างหอยนางรมธรรมชาติพบว่ามีการปรากฏเพียงแถบ smear บน agarose gel แทนการปรากฏของ DNA band ที่มีขนาดตามที่คาดหวังไว้ แต่เมื่อยืนยันความจำเพาะด้วยเทคนิค DNA-ELISA พบว่าผลผลิตของ RT-PCR บางตัวอย่างให้ผลเป็นบวก จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ว่าวิธี DNA- ELISA สามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะของเทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้ ดังนั้นวิธีนี้น่าจะสามารถนำมาพัฒนาเป็นชุดทดสอบพร้อมใช้สำหรับผู้บริโภคและผู้ประกอบการเพื่อใช้ในการตรวจหาไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดในธรรมชาติได้

คำสำคัญ: ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ, หอยนางรม, อาร์ทีพีซีอาร์, การปนเปื้อนในอาหาร, อาหารปลอดภัย

สารบัญ

	หน้า
ประกาศคุณูปการ	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
สารบัญ	iv
สารบัญรูปภาพ	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	8
ทำ HAV stock	8
Plaque assay	8
การเก็บตัวอย่างหอยนางรม	9
การปนเปื้อนจำลองด้วย HAV viron ในเนื้อหอยนางรมสด	9
การสกัดไวรัสตับอักเสบเอจากหอยนางรมสด	9
การสกัด RNA ออกจาก virion	10
ปฏิกิริยา RT-PCR	11
Digoxigenin (DIG)-labeling PCR	11
การทดสอบผลิตผลจาก RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
การทดสอบความไวของปฏิกิริยาRT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอ	13
การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอเป็นแม่แบบ	13
ความไวและความจำเพาะของวิธี RT-PCR-DNA ELISA ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด	14
การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดในธรรมชาติด้วยวิธี RT-PCR	15
การทดสอบความจำเพาะของ primer ต่อสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอ	15
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	24
อภิปรายผลการทดลอง	24
สรุปผลการทดลอง	26
ปัญหา และอุปสรรค	26
บรรณานุกรม	27

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	ความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์	17
2	การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์	18
3	ความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด	19
4	การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด	20
5	การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ ด้วยวิธี RT-PCR	21
6	การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้หอยนางรมตัวอย่างในธรรมชาติ	22
7	การทดสอบความจำเพาะของ primer ต่อสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอ	23

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ (hepatitis A หรือ HAV) จัดว่าเป็นหนึ่งในกลุ่ม enteric virus หรือไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาหารประเภทหอยสองฝา (bivalve molluscs) เช่น หอยลาย (clam) หอยแมลงภู่ (mussels) และหอยนางรม (oysters) เป็นต้น สาเหตุหนึ่งเป็นเพราะหอยเป็นแหล่งสะสมสิ่งที่ปะปนมากับน้ำ โดยหอยที่เลี้ยงไว้บริเวณชายฝั่งทะเลน้ำตื้นจะคอยดักจับอาหารและเก็บสะสมไว้ในระบบย่อยอาหาร ถ้าแหล่งน้ำนั้นปนเปื้อนด้วยเชื้อไวรัส เช่น จากการขับถ่ายอุจจาระอย่างผิดสุขลักษณะลงไปในน้ำหรือการที่ฝนตกชะสิ่งปฏิกูลที่ไม่ได้ถูกกำจัดอย่างถูกวิธีจากบริเวณใกล้เคียงไหลมาทับถมบริเวณที่เลี้ยงหอย (Jaykas et al, 1994; Shieh et al, 2000) หอยก็จะกรองดักไวรัสในน้ำนั้นไปด้วยและสะสมไวรัสไว้ในระบบย่อยอาหารซึ่งอาจสะสมได้สูงถึง 100 เท่า (Enriquez et al, 1992) และอีกสาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากพฤติกรรมของผู้บริโภคเองที่นิยมบริโภคหอยดิบหรือที่ปรุงแบบสุกๆ ดิบๆ ความร้อนที่ใช้และเวลาที่ไม่มากพอในการปรุงอาหารนั้นจึงไม่อาจผ่านเปลือกแข็งของหอยเข้าไปทำลายไวรัสซึ่งอยู่ในเนื้อหอยได้

การระบาดของไวรัส hepatitis A ที่รุนแรงมากที่สุดในประวัติศาสตร์เกิดขึ้นที่เมือง Shanghai ประเทศจีนในปี ค.ศ.1988 จากการกินหอยลายที่เลี้ยงไว้บริเวณที่มีสิ่งปฏิกูลปนเปื้อน (Halliday et al, 1991) ซึ่งในครั้งนั้นมีผู้ติดเชื้อถึง 300,000 ราย สำหรับประเทศไทย จากข้อมูลของกองควบคุมโรคในปี 2547 พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อ HAV ประมาณ 4.54% ซึ่งตัวเลขดังกล่าวอาจมีค่าน้อยกว่าที่เกิดขึ้นจริง สาเหตุหนึ่งเป็นเพราะเป็นตัวเลขที่บันทึกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเท่านั้นและผู้ป่วยส่วนใหญ่มักซื้อยามารับประทานเองหรือพักรักษาตัวที่บ้านจึงไม่ได้บันทึกข้อมูลในส่วนนี้ สำหรับการติดต่อด้วย HAV นั้นเกิดขึ้นได้ง่ายเพราะไวรัสชนิดนี้สามารถทนต่อความร้อน และความแห้งในอาหารได้ดีกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ และสามารถอยู่รอดในน้ำทะเลได้นานหลายๆ สัปดาห์ (Cliver, 1997; Croci et al, 1999; Bosch & Shields, 1987) นอกจากนี้แล้ว เมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้วมีระยะฟักตัวเฉลี่ยนานถึง 4 สัปดาห์ (ระหว่าง 2-6 สัปดาห์) ก่อนที่จะแสดงอาการของโรคออกมา (Cromeans et al, 1994) ผู้ป่วยจึงไม่ได้ระวังการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส และถ้าผู้ติดเชื้อนั้นมีการขับถ่ายอุจจาระลงไปในแหล่งน้ำเชื้อไวรัสจะออกมาพร้อมกับอุจจาระได้ยาวนานถึง 10-14 วัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ

แต่ละคนมีการปล่อยไวรัสออกมาทางอุจจาระจำนวนมากระหว่าง 10^6 ถึง 10^{11} อนุภาค ต่ออุจจาระหนึ่งกรัม และในน้ำทิ้งอาจพบไวรัสปนเปื้อนจาก 10^3 ถึง10^5 อนุภาคต่อลิตร (Rodgers, 1981; Jaykas et al, 1994) ถ้าบังเอิญผู้ติดเชื้อนั้นทำงานเกี่ยวข้องกับอาหารโอกาสการถ่ายทอดเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอาหารเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมากหากมีสุขอนามัยที่ไม่ดี เช่น ไม่ได้ล้างมือก่อนไปหยิบจับอาหาร เมื่อได้รับเชื้อ HAV แล้วถ้าแสดงอาการออกมาจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง หรือดีซ่าน และถ้ามีอาการรุนแรง อาจมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งตับได้ (Ciocca, 2000)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าระยะฟักตัวของ HAV มีระยะยาวนาน โดยมากผู้ป่วยจึงไม่ได้เก็บอาหารต้องสงสัยไว้ตรวจสอบ หรือในกรณีที่เก็บอาหารไว้ตรวจสอบแต่การปนเปื้อนของ HAV อาจมีจำนวนน้อยมากจึงไม่สามารถตรวจพบ HAV ได้เนื่องจากวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมยังไม่มีความไวพอ ดังนั้นการตรวจหา HAV ในอาหารก่อนจำหน่าย และบริโภคเพื่อป้องกันการติดเชื้อจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะใช้วิธีทางอณูชีววิทยาซึ่งมีความไว และรวดเร็วมาใช้ในการตรวจหา HAV ในหอยนางรมสด ซึ่งทำให้ทราบถึงข้อมูลถึงการระบาดของ HAVในหอยนางรมสดที่มีการเลี้ยง และรับประทานมากในภาคตะวันออก ความรู้ที่ได้อาจนำไปใช้พัฒนาเป็น kit สำหรับผู้บริโภค และผู้ประกอบการเพื่อใช้ในการตรวจหา HAV ในหอยนางรมสดที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบความไวของวิธี RT-PCR ELISA ในการตรวจหาการปนเปื้อนสารพันธุกรรมบริสุทธิ์หรือที่ปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสด

2. เพื่อทดสอบความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย DNA-ELISA

3. เพื่อทดสอบหาการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติ

สมมติฐานการวิจัย

จากการทดสอบ น่าจะทราบ ความไวและความจำเพาะของวิธี RT-PCR และ DNA-ELISA ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอบริสุทธิ์หรือที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดได้ และสามารถนำมาใช้ตรวจหาการปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้เริ่มจากการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์ที่น้อยที่สุด (Detection limit) ที่สกัดได้จากอนุภาคของเชื้อไวรัสโดยตรง และที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสด ด้วยการใส่เชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีความเข้มข้นต่างๆ จาก undiluted (2.4×10^{6} PFU/ml), 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ปริมาตร 10 µl ลงในเนื้อหอย 1.5 กรัม และทำการสกัดเชื้อไวรัสด้วยวิธีตกตะกอนด้วย Glycine-Arginine-Polyethylene glycol 8000 ก่อน จากนั้นหา ใช้วิธี RT-PCR ในการขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอ และทดสอบความจำเพาะด้วยการใช้เทคนิค DNA-ELISA จากนั้นใช้วิธีดังกล่าวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอจากหอยนางรมสดตัวอย่างที่ได้จากแหล่งต่างๆ ทั้งในจังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบค่าความไวของวิธี RT-PCR-DNA-ELISA ที่ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอบริสุทธิ์ หรือที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสดได้ และวิธีนี้ยังสามารถนำมาใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ปนเปื้อนในธรรมชาติได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนจำลองของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดได้โดยอาศัยหลักการ RT-PCR และ ELISA ได้ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะ สามารถตรวจสอบสารสกัดอาหารได้พร้อมกัน 96 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่องพื้นฐาน อาทิ PCR และ เครื่อง ELISA plate reader ได้ ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร และงานประชุมระดับชาติและนานาชาติได้ และเมื่อมีการพัฒนาต่อยอดต่อไปสามารถนำไปใช้จดสิทธิบัตร และอาจนำไปใช้ผลิตเป็นชุดตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารที่ใช้ในธรรมชาติเพื่อเพิ่มมูลค่าอาหารทะเลได้

บทที่ 2
เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แต่เดิมนั้นการตรวจหาความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ของ gastroenteritis virus ในที่ปนเปื้อนอาหารในห้องปฏิบัติการนิยมใช้ cell culture โดยเพาะเลี้ยงไวรัสจากของเหลวที่สกัดมาจากอาหาร (food extract) ที่ต้องสงสัยว่าอาจปนเปื้อนด้วยไวรัสมาเจริญในเซลล์ที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดนั้น และตรวจหาร่องรอยการติดเชื้อของเซลล์โดยดูจาก cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้น (Jaykas et al, 1994) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้กับ wild type HAV เนื่องจาก HAV ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายใน cell line และต้องอาศัยระยะเวลาการปรับตัวที่ยาวนานก่อนที่จะสามารถเจริญได้ และไม่ทำให้เกิด CPE ด้วย (De Chastonay & Siegel, 1987; Lemon & Robertson, 1993) ดังนั้นในการทดลองส่วนใหญ่ที่จำเป็นต้องเลี้ยง HAV ใน cell line จึงได้นำ HAV ชนิดที่ปรับตัวแล้วที่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (lab-adapted strain) คือ สายพันธุ์ HM-175 ที่เจริญใน BSC-1 (fetal rhesus monkey kidney-derived) cell line (Cromeans et al, 1987) สำหรับทางเลือกอื่นในการตรวจหาไวรัส HAV นั้นใช้วิธีดูจากขนาด รูปร่าง ลักษณะของ particle ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (EM) ซึ่งวิธีนี้มีความไวต่ำต้องมี HAV ปริมาณมากถึง 10^9-10^{11} ต่อมวลสารหนึ่งกรัมจึงจะสามารถตรวจพบได้ และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการใช้ EM ที่สามารถจำแนกลักษณะของไวรัสได้ วิธีนี้อาจใช้ได้ดีกับสิ่งส่งตรวจพวกอุจจาระของผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ไม่มีความไวพอกับสิ่งส่งตรวจพวก food extract ซึ่งมีไวรัสอยู่ในปริมาณน้อยมาก

ได้มีการนำวิธี immunological method มาใช้ตรวจหาไวรัสที่ไม่สามารถเลี้ยงได้ใน cell culture โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างของ antibody ที่ยึด (immobilized) กับ column กับ coat protein ของไวรัส ใน food extract วิธีนี้จึงมีข้อดีคือสามารถตรวจหาจำนวนที่แท้จริงของ infectious viral particles ใน food extract ได้เพราะ antibody จะสามารถจับได้กับไวรัสที่มีอนุภาคสมบูรณ์เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยเช่นกัน เพราะตามการยึด antibody ไว้กับ column ทำให้ antibody ไม่อยู่ในสภาพเป็นอิสระทำให้จับกับ antigen ได้ไม่ดี และวิธีนี้อาจจะต้องใช้เวลานานถึง 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้เกิด ปฏิกิริยาจับกันแน่นระหว่าง immobilized antibody และ antigen ดังนั้นได้มีการพัฒนาให้ antibody จับกับ antigen ได้ดีขึ้นโดย immobilize antibody ไว้กับ bead (Monceyron & Grinde, 1994) หรือบน magnetic particle โดยตรง (Safarik et al., 1995) หรือใช้ปฏิกิริยาระหว่าง

streptavidin และ biotin มาช่วยในการ immobilize antibody บน magnetic particle อีกขั้นหนึ่ง (Lopez et al., 1997) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากมีความไวต่ำ และต้องการปริมาณของไวรัสมากพอจึงจะสามารถตรวจพบไวรัสได้ ดังนั้นจึงมักใช้เป็นวิธีในการ concentrate ไวรัสใน food extract ก่อนนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่น

วิธี Nucleic acid tests หรือเทคนิค hybridization method ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหา HAV ในอาหารและสิ่งส่งตรวจจากสิ่งแวดล้อมซึ่งอาศัยปฏิกิริยาการจับจำเพาะระหว่าง single strand plus sense RNA ของ HAV genome กับ single stranded DNA ที่ทำหน้าที่เป็น probe (cDNA probe) ซึ่งประกอบไปด้วยเบสคู่สมกับ viral RNA genome วิธีนี้มีค่า detection limit ในการตรวจหา genomic viral RNA ของ HAV อยู่ที่ 500-1000 infectious units (Shieh et al, 1991) ต่อมามีการพัฒนาเพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหา viral genome โดยเปลี่ยนแปลง probe เป็นชนิด single-strand RNA probe พบว่าสามารถเพิ่มความไวได้ถึง 5-8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ cDNA probe (Jiang et al, 1987; Shiel et al, 1991) แต่วิธีนี้แม้มีความจำเพาะสูงแต่ยังคงมีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR ดังนั้น PCR จึงเป็นวิธีที่นิยมมากในการตรวจหาไวรัสที่มีจำนวนน้อยในอาหาร โดยเฉพาะในอาหารประเภทหอย เพราะมีความไวสูง ในทางทฤษฎีสามารถเพิ่มจำนวนจาก 1 nucleic sequence ตั้งต้นได้ผลผลิต เป็นล้านเท่าโดยอาศัยปฏิกิริยาการจับอย่างจำเพาะระหว่าง viral genome กับ PCR primer การที่ foodborne virus เกือบทั้งหมดนั้นมี genome เป็น RNA ดังนั้น viral RNA genome จะเป็นแม่แบบในการสร้างเส้น complementary DNA เส้นเดียวขึ้นมาโดยใช้ enzyme reverse transcriptase หลังจากนั้นเข้าสู่ขบวนการ PCR ตามปกติได้ผลผลิตเป็น cDNA ที่เป็นเส้นคู่เรียกวิธีนี้ว่า RT-PCR แม้วิธีนี้มีความไวสูงเพราะสามารถเพิ่มจำนวนของ cDNA มากในเวลาสั้นๆ แต่วิธีนี้อย่างเดียวอาจไม่สามารถใช้การตรวจหาไวรัสโดยตรงใน food extract ได้เพราะในอาหารมักมีส่วนประกอบต่างๆ ที่ยับยั้งการทำงานของ enzyme ใน RT-PCR ทำให้อาจเกิดผลเป็น false negative ได้ (Rossen et al, 1992; Dix & Jaykus, 1998; Green et al, 1998; Shiel et al, 1999) เพื่อกำจัด RT-PCR inhibitor ต่างๆ จึงมัก concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract และ purify ไวรัสออกมาก่อนนำไปทำ RT-PCR

โดยทั่วๆ ไปสามารถแบ่ง concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract ออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ 1) extraction-concentration 2) adsorption-elution-concentration โดยทั้งสองวิธีมีจุดมุ่งหมายใน การแยกไวรัสออกมาจากอาหารประเภทหอยก่อนโดยพยายามให้ไวรัสยังคงอยู่ในรูป infectious form เช่น ผ่านการกรอง การตกตะกอน polyelectrolyte flocculation และ solvent extract หรือใช้

Sephadex (De Leon et al, 1992) cellulose, Chelex (Straub et al, 1994) เป็นต้น เพื่อกำจัดเกลือหรือโปรตีนขนาดเล็ก หรือใช้ CTAB (Jiang et al, 1992) เพื่อกำจัด polysaccharide หรืออาจนำ magnetic poly (dT) bead (Kingsley et al, 2001) หรือ silica gel membrane (Shiel et al, 1999) มาใช้ร่วมในการ purify RNA ด้วย สำหรับวิธีการ concentrate viral particle อีกวิธีที่นำมาใช้คือ immunocaptureโดยใช้ antibody แยกอนุภาคไวรัสออกมาจากอาหารตามด้วยความร้อนเพื่อให้ viral RNA หลุดออกมาจาก capsid protein ก่อนเข้าสู่กระบวนการ PCR ต่อไปซึ่งวิธี magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) ที่อาศัยหลักการดังกล่าว (Lopez et al, 1997) สามารถลดปริมาตรของ food extract ได้ 10-100 เท่า และมี yield ที่ได้ 10-90% เมื่อใช้ตรวจหา HAV ในเนื้อหอยนางรม 20 g สามารถตรวจพบอนุภาคของไวรัสได้ต่ำสุด (detection limit) 10 PFU แต่วิธีการสกัดไวรัสเหล่านี้อาจมีความไวไม่พอในการตรวจหาไวรัสที่มีน้อยมากๆ ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ และอาจยังคงมี RT-PCR inhibitor ปะปนอยู่ (Drebot & Lee, 1997) นักวิจัยหลายท่านจึงได้พยายามเพิ่มความไวในการตรวจหาไวรัสด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ internal primers จับกับ cDNA ที่ได้จาก RT-PCR แต่วิธีนี้อาจเพิ่มความเสี่ยงจากการปนเปื้อนในปฏิกิริยาได้ง่าย และอาจได้ผลเป็น false positive ด้วย (Lees et al, 1995; Le guyader et al, 1996; Haflinger et al, 1997; Green et al, 1998)

RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูงจึงอาจเพิ่มโอกาสในการขยายเพิ่มจำนวน nucleic acid อื่นที่อาจปนเปื้อนในปฏิกิริยาได้ ดังนั้นจึงต้องมีวิธียืนยันผลที่ได้ว่าผลผลิตมาจาก viral genome ที่ต้องการหาจริงๆ วิธีที่เชื่อถือได้มากที่สุดคือนำ PCR amplicon ไป sequence วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในงาน routine screening ได้ ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาสูง คอมพิวเตอร์ และ software ในการวิเคราะห์ผล อีกวิธีที่ใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการคือ นำ PCR amplicons ที่ได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุล และตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย Southern blot hybridization โดยใช้ internal oligonucleotide ที่มีการติดฉลาก (Hardy et al, 1997; Honma et al, 2000) แต่วิธีนี้ใช้เวลานานและยุ่งยาก และต้องใช้เวลาประมาณ 2 วัน จึงมีผู้คิดค้นวิธีการตรวจสอบความจำเพาะของ RT-PCR amplicon เมื่อไม่นานนี้คือ DNA enzyme immunoassay (DEIA) อาศัยหลักการ hybridization assay ผสมกับ immunoassay ชนิด ELISA ที่สามารถทำได้ใน microtiter plate โดยการใช้ biotin-labeled probe ที่มีความจำเพาะคอยดักจับ digoxiginin-labeled PCR products ที่ผ่านการ denature เป็น DNA สายเดี่ยวที่ก้นหลุมที่มี streptavidin เคลือบไว้ ได้เป็น DNA hybrid ที่ถูกตรึงไว้เพราะมีการยึดจับกันระหว่าง streptavidin และ biotin ที่ก้นหลุมนั้น หลังจากเติม anti-digoxiginin

enzyme conjugate และ substrate ตามลำดับ ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้น และเปลี่ยน substrate เป็น product ที่มีสี วิธีนี้มีความไวพอๆ กับวิธี hybridization แบบดั้งเดิมแต่ทำได้ในง่ายกว่าใน microtiter plate และใช้เวลาสั้นกว่าแค่ประมาณ 4 ชั่วโมง เท่านั้น และสามารถใช้ตรวจสอบหาการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของไวรัสในอาหารได้มากถึง 96 สารสกัดตัวอย่างใน microtiter plate และเครื่องมือที่ใช้ก็เป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการโดยเฉพาะห้องปฏิบัติการที่ไม่มี qRT-PCR วิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบได้ทั้งไวรัส (Metzger-Boddien and Kehle, 2005; Musiani et al, 2007), แบคทีเรีย (Hong et al, 2003; Fach et, 2002), โปรโตซัว (Sow et al, 2006) และเชื้อรา (Scotter and Chambers 2005) เมื่อทดสอบหาการปนเปื้อนของ adenovirus ใน shellfish พบว่ามีความไวสูง โดยมีค่า detection limit 10-100 50% tissue culture infective dose (TCID50) ต่อ shellfish 1 กรัม (Milne et al, 2007) และสามารถตรวจพบ pancreatic necrosis virus (IPNV) ที่ปนเปื้อนจำลองในไตของปลา trout ได้ต่ำสุดเพียงแค่ $1.5x10^4$ pfu IPNV เท่านั้น (Milne et al, 2006)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การทำ HAV stock

Subculture BSC-1cell line อัตราส่วน 1:2 ($5x10^5$) ใน flask ที่มี surface area 25 cm^2 (T25) ที่มี Modified Eagle Medium (MEM) complete media (Gibco, USA) ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum (FBS), 0.01 µg/ml gentamycin, 100 µg/ml pencilin และ 1 µg/ml fungizone เป็นเวลาประมาณ 10 วันหรือจนเต็มพื้นเป็น monolayer และมีสุขภาพดี แล้วเติม 0.5 ml stock HAV (ATCC, USA) ที่ผ่านการเจือจางด้วย 1X PBS buffer ในอัตราส่วน 1:100 เพื่อให้จำนวน virion ประมาณ 100-1000 PFU แล้วนำ flask ไปวางบน rocking platform เคลื่อนที่เบาๆ เพื่อให้ของเหลวไหลทั่วบริเวณ cell monolayer ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม 5 ml maintenance media ที่มีส่วนประกอบเหมือนกับ complete media ยกเว้น 2% FBS และปล่อยให้ไวรัสมีการเจริญเติบโตภายในเซลล์โดยสังเกตการเกิด CPE ทุกวันจนเกิด CPE มากกว่า 70% หรือเวลาประมาณ 10 วัน แล้วสกัด virion ออกมาโดยการ freeze-thaw โดย freeze ที่ -80°C จนเกิดเป็นเกล็ดน้ำแข็ง และเขย่าเกล็ดน้ำแข็งจนเกล็ดน้ำแข็งละลายหมดเพื่อให้ไวรัสหลุดออกมาจากเซลล์ ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้งนำไปปั่นเพื่อเก็บ supernatant แล้ว aliquot ไว้ใน microcentrifuge tube หลอดละ 0.5 ml เก็บไว้ที่ -80°C เพื่อการทดลองในขั้นต่อไป

Plaque assay

Plate BSC-1cell line $6.5x10^5$ ใน 6-well plate ในปริมาตร 2 ml MEM complete medium incubate ใน 37°C, 5% CO_2 incubator และปล่อยให้เจริญเต็มพื้นผิวเป็น monolayer ล้างเซลล์ 2-3 ครั้งๆ ละ 2 ml ด้วย 1X MEM complete medium ที่ไม่มี FBS และพักไว้ จากนั้นทำการเจือจางไวรัสตับอักเสบชนิดเอใน 1X MEM อัตราส่วน 1:10 โดยเริ่มจาก 10^{-1}, 10^{-2} ไปจนถึง 10^{-5} ส่วน well ที่เติม medium ลงไปแทน virus mixture ใช้เป็น negative control (uninfected cells หรือ mock) แล้วนำ plate ไว้บน rocking platform ให้ของเหลวมีการเคลื่อนที่เบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ไวรัสมีการ adsorption และ infection เข้าไปภายในเซลล์ จากนั้นดูดของเหลวภายใน well ทิ้งทั้งหมด และเติม 2 ml overlayer MEM medium ที่ประกอบด้วย 10% FBS, 1% gum tragacanth และ antibiotic

นำ plate ไป incubate ใน 37°C, 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 13-14 วัน หลังจากนั้นย้อม plaque ที่เกิดขึ้นโดยการใส่สีผสมที่ประกอบด้วย 1% crystal violet ใน 10% formaldehyde solution ลงไปในหลุมๆ ละ 2 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างน้ำหลายๆ ครั้ง ปล่อยให้แห้ง และนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นโดยค่าที่ได้เป็นจำนวนอนุภาคของไวรัสที่มีในของเหลวต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรซึ่งมีหน่วยเป็น PFU/ml

การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

หอยนางรมปากจีบ *(Saccostrea commercialis)* ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงในชายฝั่งภาคตะวันออกทั้งหมด 3 แหล่ง คือ จังหวัดชลบุรีจำนวน 8 ตัวอย่าง จังหวัดจันทบุรีจำนวน 5 ตัวอย่าง และจังหวัดระยองจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยเก็บเป็นเวลาทั้งหมด 4 เดือน ตั้งแต่ช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ.2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ.2556 โดยหอยนางรมที่เก็บมาจะถูกแยกเอาส่วนทางเดินอาหารของหอยนางรม (gastrointestinal tract) แยกเก็บไว้เป็นหลอดทดลอง น้ำหนักหลอดละ 1.5 กรัม เก็บไว้ที่ –80°C จนกว่าจะนำมาทำการสกัดของเหลวเพื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

การปนเปื้อนจำลองด้วย HAV virion ในเนื้อหอยนางรมสด

นำเฉพาะส่วนทางเดินอาหารของหอยนางรมตัวอย่างน้ำหนัก 1.5 กรัม (ใช้หอยนางรมประมาณ 3-4 ตัว) มาบ่มด้วยเชื้อไวรัส HAV stock strain HM-175/187 (ATCC VR-1402 USA lot. 4766814) ที่มีความเข้มข้น 2.4×10^{6} PFU/ml (undiluted) หรือที่นำมาเจือจางในอัตราส่วน 1:10 จาก 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} ปริมาตร 10 µl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาสกัดไวรัสออกจากหอยนางรมในขั้นตอนต่อไป

การสกัดไวรัสตับอักเสบเอจากหอยนางรมสด

การสกัดไวรัสตับอักเสบเอจากหอยนางรมสดนั้นใช้วิธีตกตะกอนด้วย Glycine-Arginine-PEG 8000 ที่ดัดแปลงมาจากวิธีเดิมบ้างเล็กน้อย (Beuret et al, 2003) เริ่มจากนำตัวอย่างหอยนางรมสดที่ได้ทำการปนเปื้อนจำลองหรือจากธรรมชาติมาราดด้วยไนโตรเจนเหลวจนกลายเป็นของแข็ง ทำการบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว และทำ homogenize ต่อด้วยเครื่อง homogenizer เป็นเวลา 1 นาที โดยเติม 0.05 M glycine-0.14 M NaCl buffer (pH 7.5) ปริมาตร 15 ml ในภาชนะที่วางอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา

จากนั้นนำสารผสมที่ได้ไป centrifuged ที่ 5000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C เก็บ supernatant (S1) ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C และนำ pellet มาละลายใน 0.5 M arginine-0.15 M NaCl buffer (pH 7.5) ปริมาตร 15 ml เขย่าส่วนผสมทั้งหมดด้วย vortex mixer เป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไป centrifuged ที่ 5000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C เก็บ supernatant (S2) มารวมกันกับ supernatant (S1) ที่เก็บไว้ จากนั้นเติม 12% PEG 8000-0.3 M NaCl ปริมาตร 15 ml โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ตลอดทั้งคืน จากนั้นนำไป centrifuged ที่ 6,700xg เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C ทิ้ง supernatant และเก็บส่วน pellet ที่เหลือมาละลายใน PBS (pH 7.5) ปริมาตร 15 ml จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 15 ml เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย vortex mixer และนำไป centrifuged ที่ 1,900xg เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4°C ทิ้ง supernatant และนำ pellet ที่ได้มาเติม 6 M guanidine thiocyanate solution ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำส่วนผสมไป centrifuged ที่ 12,000xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำ supernatant ที่ได้เก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะนำไปสกัด RNA ต่อไป

การสกัด RNA ออกจาก virion

นำไวรัสตับอักเสบชนิดเอจาก stock หรือของเหลวที่สกัดมาจากหอยนางรมสดข้างต้นมาสกัด RNA ออกจาก HAV virion ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, Germany) โดยนำ ปริมาตร 200 µl รวมกับ 200 µl Binding buffer ที่ประกอบด้วย Poly A และ Carrier RNA จากนั้นเติม 50 µl Proteinase K ผสมให้เข้ากันและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม 100 µl Binding buffer ลงใน reaction ผสมให้เข้ากันแล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน column ที่ประกอบอยู่กับ collection tube นำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นเติม 500 µl Inhibitor removal buffer แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate และทำการล้างด้วย 450 µl Wash buffer ทั้งหมด 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาที เมื่อเสร็จจากการล้างครั้งที่ 2 แล้ว centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 13,000xg นาน 20 วินาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นเปลี่ยน collection tube ใหม่แล้วเปิดฝา column ทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อให้ wash buffer ระเหยออกไป ตามคำแนะนำที่มากับชุดน้ำยาสำเร็จรูป จากนั้น elute ด้วย 40 µl Elution buffer แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาที เก็บส่วนของ filtrate ซึ่งเป็นส่วนที่มี viral RNA อยู่ นำมาแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 5 µl เก็บไว้ที่ -80°C เพื่อไว้ทำปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

ปฏิกิริยา RT-PCR

ในการสร้าง cDNA product จากปฏิกิริยา RT-PCR ใช้ Superscript™ III One-step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) พร้อมกับ HAV Forward Primer (5′-TTGCTGTTCAAGGG-3′) และ HAV Reverse Primer (5′AAAGTGGTAAGCAC-3′) ที่ออกแบบด้วย program 3 ซึ่งจับจำเพาะบนยีนเป้าหมาย VP2 ที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนโครงสร้างของ capsid (Genbank, accession number M14707.1) โดยใช้วิธีการ และ condition ที่แนะนำมากับชุด kit สำหรับผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาคาดว่ามีความยาวของ nucleotide ประมาณ 242 bp จากการทดสอบด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis โดยย้อมสี DNA ด้วย SYBR gold DNA stain และส่องดูแถบ DNA ภายใต้แสง UV เมื่อเปรียบเทียบกับ Gene Ruler™100 bp Plus DNA ladder marker (Fermentas, USA)

Digoxigenin (DIG)-labeling PCR

ทำการติดฉลาก cDNA ของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย digoxigenin-dUTP เข้าไปภายในสาย DNA (internal labeling dUTP) โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ตาม condition ที่แนะนำมากับชุดน้ำยา PCR DIG labeling kit (Roche, Germany) หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป mini Quick Spin DNA Columns (Roche, Germany)

การทดสอบผลิตผลจาก RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA

นำ cDNA มาทำการยืนยันผลด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป PCR-ELISA (DIG detection) (Roche, Germany) ด้วยการนำPCR sample ที่ได้มา ปริมาตร 5 µl ผสมกับ denature solution ปริมาตร 20 µl แล้วบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นเติม B-HAV probe (5′-GATTGATCTGTGCTATGGTTCCTGGTG-3′) (Jansen et al., 1990) ที่ละลายใน hybridization buffer ปริมาตร 225 µl ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปเติมลงใน 96 well plate ปริมาตรหลุมละ 200 µl ปิดด้วย parafilm เพื่อป้องกันการระเหยของของเหลวในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่อง shaker incubator นานประมาณ 3 ชั่วโมง ในขั้นตอนนี้ DNA จะอยู่ในสภาพที่เป็นเส้นเดี่ยว ทำให้ probe ที่ conjugate ด้วย biotin เข้ามาจับด้วยพันธะ hydrogen bond ระหว่าง complementary bases กลายเป็น DNA เส้นคู่ ที่จะถูกตรึงไว้ที่ก้นหลุมของ microtiter plate ที่เคลือบด้วย streptavidin

จากนั้นล้างด้วย washing solution ปริมาตรหลุมละ 250 µl จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติม anti-DIG-POD antibody (ความเข้มข้น1:100) ปริมาตรหลุมละ 200 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืด เขย่าเบาๆ ด้วยเครื่อง shaker incubator เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม ABTS solution ปริมาตรหลุมละ 200 µl แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ในที่มืดด้วยเครื่อง shaker incubator เป็นเวลา 30 นาที สุดท้ายนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้คลื่นความยาวอ้างอิง 492 nm ด้วยเครื่อง microplate reader

การวิเคราะห์ผลของเทคนิค DNA-ELISA นั้นให้เปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{405/492}$ ของ negative control (dH_2O) จากการทำซ้ำ 4 ครั้ง และบวก 0.2 (mean negative+0.2) หากค่าใดมีค่าที่สูงกว่าค่า cut-off value จัดว่าเป็นค่าที่มีผลบวก

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์

จากการทดสอบความไวของปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ RNA genome บริสุทธิ์ที่สกัดจาก HAV stock ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) ซึ่งมีความเข้มข้น 318.8 ng หรือที่ได้รับการเจือจางแบบ serial dilution 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-8} ตามลำดับ มาใช้เป็นแม่แบบ จากผลการวิเคราะห์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis พบ cDNA ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาRT-PCR มีเพียง 1 แถบ ซึ่งมีความยาวของ nucleotide ตามที่คาดไว้ประมาณ 242 bp ในปฏิกิริยาที่ใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (รูปที่ 1, lane 1) และที่ได้รับการเจือจางจาก 10^{-1} (รูปที่ 1, lane 2) จนถึงเมื่อได้รับการเจือจางสูงสุดที่ 10^{-2} (รูปที่ 1, lane 3) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าความไวของปฏิกิริยา RT-PCR สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่มีปริมาณน้อยที่สุดที่ 3.188 ng

การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอเป็นแม่แบบ

การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA นั้น กำหนดให้เปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยจากค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{405/492}$ ของ negative control (dH_2O) จากการทำซ้ำ 4 ครั้ง และบวก 0.2 (mean negative+0.2) หากค่าใดมีค่าที่สูงกว่าค่า cut-off value จะแปลผลเป็นบวก จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยา RT-PCR ที่ใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (318.8 ng) และที่ได้รับการเจือจางแบบ serial dilution 10 เท่า จาก 10^{-1} (31.88 ng), 10^{-2} (3.188 ng), 10^{-3} (318.8 pg) และ 10^{-4} (31.88 pg) ทั้งหมดให้ผลเป็นบวก (รูปที่ 2) จากผลการทดลองชี้ว่าวิธี DNA-ELISA นอกจากใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR แล้วยังสามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบได้สูงถึง 100 เท่าด้วย

ความไว และความจำเพาะของวิธี RT-PCR-DNA-ELISA ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด

เมื่อทำการปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสดน้ำหนัก 1.5 กรัม ด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอ stock ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.4×10^{6} PFU/ml ด้วยปริมาณต่างๆ จากที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือเชื้อไวรัสที่ถูกเจือจางแบบ serial dilution 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-4} ปริมาตร 10 µl และสกัด RNA ของไวรัสออกจากเนื้อหอยมาทำปฏิกิริยา RT-PCR จากผลการทดลองพบ cDNA band ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา RT-PCR เพียง 1 band ตามที่คาดไว้ประมาณ 242 bp เมื่อใช้ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองด้วย undiluted, 10^{-1}, 10^{-2} (2.4×10^{4}, 2.4×10^{3} และ 2.4×10^{2} PFU ตามลำดับ) (รูปที่ 3, lane 3, 4 และ 5 ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับ positive control ที่ใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของไวรัสตับอักเสบเอเป็นแม่แบบ (รูปที่ 3 , lane 2) แต่ไม่พบ cDNA band เมื่อใช้ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยที่ปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ได้รับการเจือจางที่ 10^{-3} และ 10^{-4} (รูปที่ 3 , lane 6 และ 7 ตามลำดับ) รวมทั้งเมื่อใช้น้ำแทน ซึ่งใช้เป็น negative control (รูปที่ 3 , lane 8) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอเมื่อใช้การสกัดไวรัสออกจากหอยนางรมด้วยวิธีตกตะกอนด้วย Glycine-Arginine-PEG 8000 โดย RT-PCR มีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดอยู่ที่ความเข้มข้น 2.4×10^{2} PFU ต่อหอยนางรมสด 1.5 กรัมหรือเท่ากับ 160 PFU/g (รูปที่ 3, lane 5)

จากการพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด โดยเปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.2685 พบว่าปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวกนั้นคือปฏิกิริยาที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อไวรัสความเข้มข้นตั้งแต่ undiluted, 10^{-1}, 10^{-2} จนถึง 10^{-3} (รูปที่ 4) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าวิธี DNA-ELISA นอกจากจะใช้พิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตจาก RT-PCR แล้วยังสามารถเพิ่มความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสได้ด้วย โดยสามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ปนเปื้อนจำลองได้ประมาณ 10 เท่า

การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดธรรมชาติด้วยวิธี RT-PCR

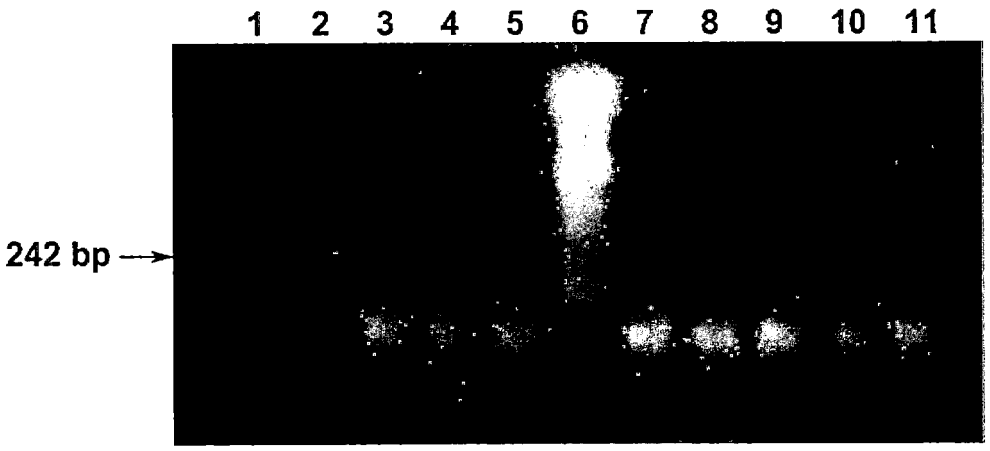
จากการตรวจหาการปนเปื้อนของหอยนางรมสดธรรมชาติที่เพาะเลี้ยงหรือวางขายในภาคตะวันออก ในเขต จ. ชลบุรี ระยองและจันทบุรี เป็นเวลาทั้งหมด 4 เดือนตั้งแต่ช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2556 เมื่อแยกส่วนกระเพาะอาหารนำมาสกัดของเหลวเพื่อทดสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR จากผลการทดลองพบว่าไม่มีการปรากฏของแถบ cDNA เป้าหมายจากการทดสอบตัวอย่างหอยนางรมสดที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ ทั้งจังหวัดระยอง จันทบุรี และชลบุรี โดยมีการปรากฏแต่เพียงแถบ smear เท่านั้น (รูปที่ 5, lane 3-21) เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของ positive control ที่ใช้ของเหลวที่สกัดจากหอยที่มีการปนเปื้อนจำลองด้วย 16,000 PFU/g พบว่ามีการปรากฏของแถบ cDNA เป้าหมายที่ขนาดประมาณ 242 bp (รูปที่ 5, lane 2)

อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้เทคนิค DNA-ELISA โดยเปรียบเทียบกับค่า cut-off value ของค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{405/492}$ เท่ากับ 0.2685 จากผลการทดลองพบว่า จังหวัดระยองจำนวน 2 ตัวอย่าง (คิดเป็น 50%) จังหวัดจันทบุรีจำนวน 1 ตัวอย่าง (คิดเป็น 20%) และจังหวัดชลบุรีจำนวน 5 ตัวอย่าง (คิดเป็น 62.5%) มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอ (รูปที่ 6)

การทดสอบความจำเพาะของคู่ primer ต่อสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอ

วิธี RT-PCR เป็นวิธีที่มีข้อดีคือ มีความไวสูงแต่อาจมีข้อด้อยเรื่องความจำเพาะ ดังนั้นการออกแบบ primer เพื่อใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมด้วยวิธี RT-PCR นั้นจึงมีความสำคัญมาก โดยคู่ primer ต้องมีการออกแบบมาจากยีนบริเวณที่มีการอนุรักษ์ของไวรัสเป้าหมายเพื่อทำให้ primer สามารถจับได้บนยีนของเชื้อไวรัสเป้าหมายเท่านั้น และไม่จับกับยีนของไวรัสชนิดอื่น จากการทดสอบความจำเพาะของ คู่ primer ที่ใช้โดยเปรียบเทียบการจับของ primer กับสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอกับของ RNA virus ชนิดอื่นที่มักมีการปนเปื้อนในอาหาร ได้แก่ Polio virus ใน family *Picornaviridae* ตระกูลที่ใกล้เคียงกันและ Rota virus ใน family *Reoviridae* จากผลการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามี cDNA ซึ่งเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาเกิดขึ้นเมื่อใช้สารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอเป็นแม่แบบเท่านั้น (รูปที่ 7, lane 2) แต่ไม่พบแถบ cDNA เมื่อใช้สารพันธุกรรมของ Polio virus

และ Rota virus (รูปที่ 7, lane 3 และ 4, ตามลำดับ) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า primer คู่ที่ใช้ทดสอบมีความจำเพาะในการขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอเท่านั้น



รูปที่ 1 ความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์ที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือ ที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่า เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยลูกศรที่ชี้แสดงถึงความยาวของ cDNA ตามที่คาดที่ 242 bp

Lane 1: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่ไม่ได้ถูกเจือจางที่มีความ เข้มข้น 318.8 ng (undiluted)

Lane 2: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 31.88 ng (10^{-1})

Lane 3: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 3.188 ng (10^{-2})

Lane 4: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 318.8 pg (10^{-3})

Lane 5: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 31.88 pg (10^{-4})

Lane 6: 100 bp DNA Ladder marker เข้มข้น 0.1 µg

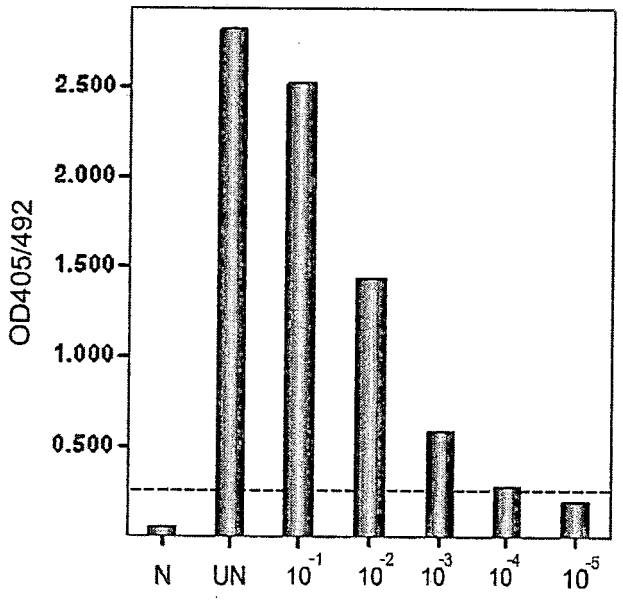
Lane 7: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 3.188 pg (10^{-5})

Lane 8: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 318.8 fg (10^{-6})

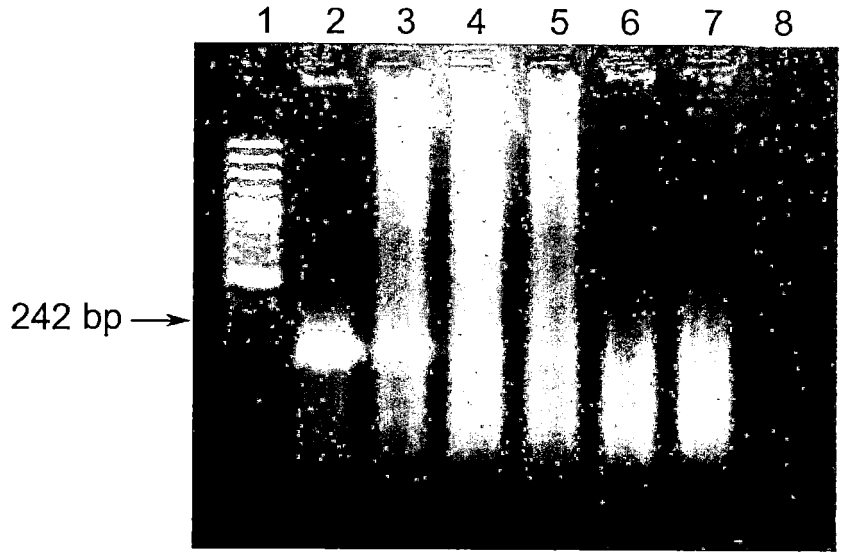
Lane 9: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 31.88 fg (10^{-7})

Lane 10: cDNA จากปฏิกิริยาที่ได้เมื่อใช้ RNA ที่มีความเข้มข้น 3.188 fg (10^{-8})

Lane 11: dH_2O (Negative control)



รูปที่ 2 การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอเป็นแม่แบบจากที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือ ที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่า โดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-off value เท่ากับ 0.254 (N = negative control, UN = undiluted)



รูปที่ 3 ความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสด จากการบ่มด้วยเชื้อไวรัสตับอักเสบเอไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่า เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยลูกศรที่ชี้แสดงถึงความยาวของ cDNA ตามที่คาดที่ 242 bp

Lane 1: 100 bp Plus DNA ladder marker เข้มข้น 0.1 µg

Lane 2: RT-PCR product เมื่อใช้ purified RNA เป็น template (positive control)

Lane 3: RT-PCR product เมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 16,000 PFU/g (undiluted)

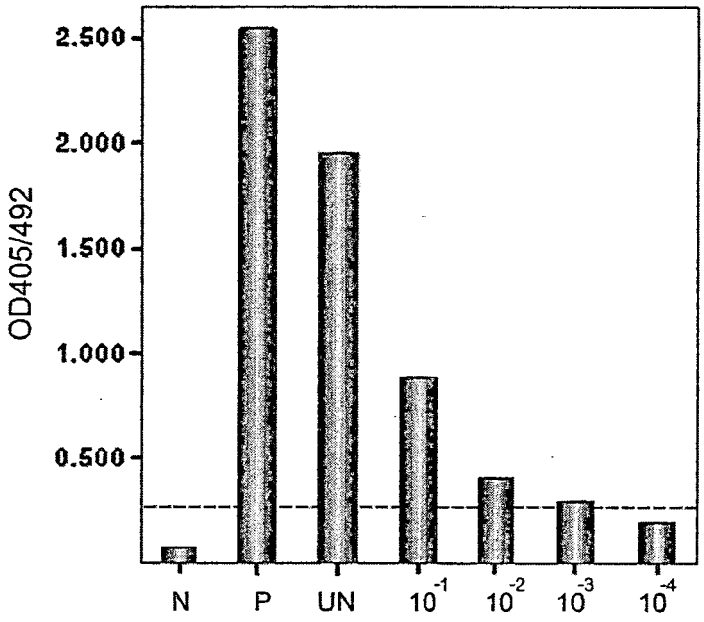
Lane 4: RT-PCR product เมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 1,600 PFU/g

Lane 5: RT-PCR product เมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 160 PFU/g

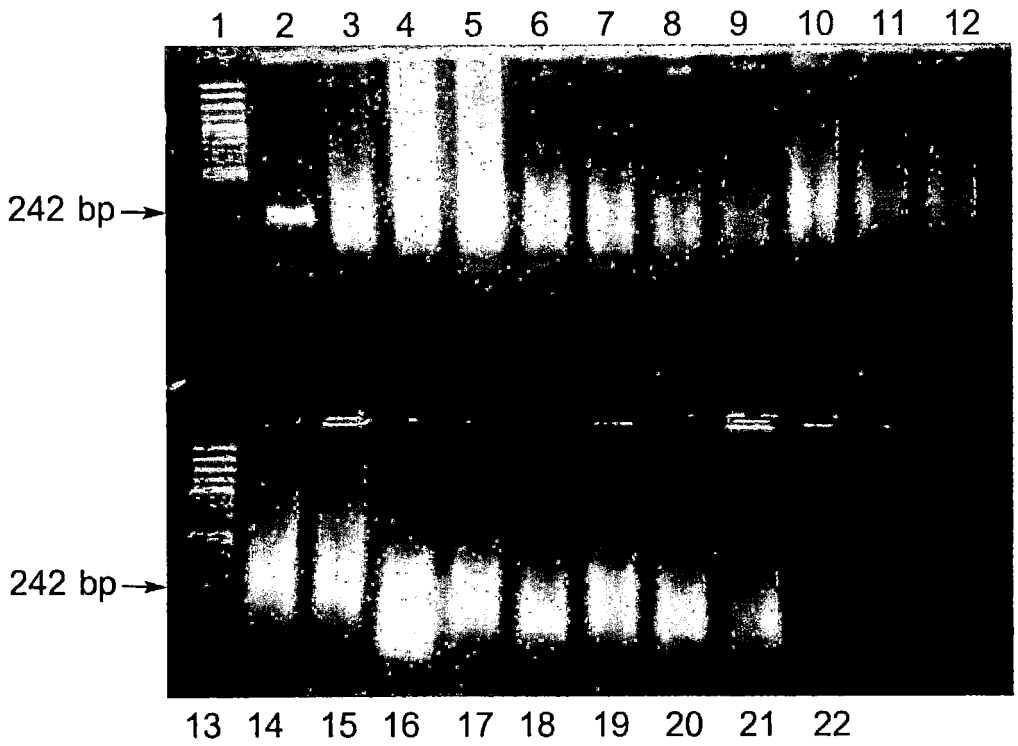
Lane 6: RT-PCR product เมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 16 PFU/g

Lane 7: RT-PCR product เมื่อปนเปื้อนจำลองด้วย HAV ความเข้มข้น 1.6 PFU/g

Lane 8: dH_2O (negative control)



รูปที่ 4 การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดจากที่ไม่ได้รับการเจือจาง (undiluted) หรือ ที่เจือจางความเข้มข้นแบบ serial dilution 10 เท่า โดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-off value เท่ากับ 0.254 (N = negative control, UN = undiluted)



รูปที่ 5 การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนในธรรมชาติ ด้วยวิธี RT-PCR เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยลูกศรที่ชี้แสดงถึงความยาวของ cDNA ตามที่คาดที่ 242 bp

Lane 1 และ 13: 100 bp Plus DNA ladder marker เข้มข้น 0.1 µg

Lane 2: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อ HAV ความเข้มข้น 16,000 PFU/g (positive control)

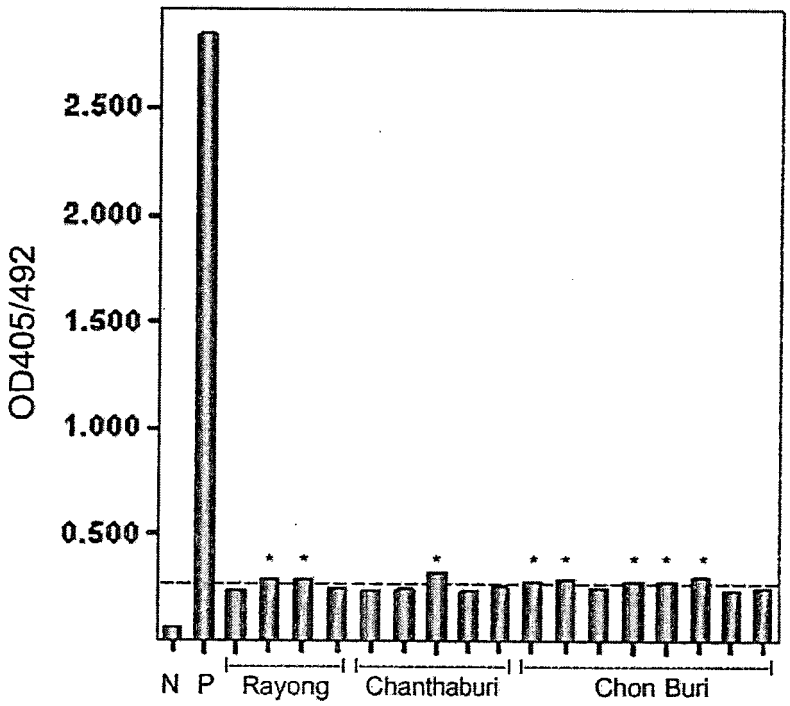
Lane 3: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะหอยนางรมสดที่ไม่ได้ทำการปนเปื้อนจำลอง

Lane 4-7: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะหอยนางรมสดที่เก็บจากจังหวัดระยอง

Lane 8-12: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะหอยนางรมสดที่เก็บจากจังหวัดจันทบุรี

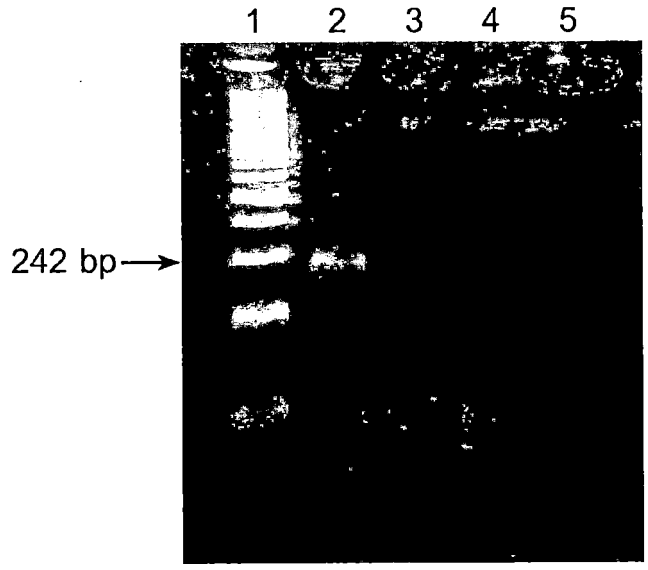
Lane 14-21: ของเหลวที่สกัดจากกระเพาะหอยนางรมสดที่เก็บจากจังหวัดชลบุรี

Lane 22: dH_2O (negative control)



รูปที่ 6 การพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี DNA-ELISA เมื่อใช้หอยนามรมตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดระยอง จันทบุรี และชลบุรี โดยเส้นประแสดงระดับของค่า cut-off value เท่ากับ 0.254 และดอกจันแสดงการแปลผลเป็นบวก (N = negative control, UN = undiluted)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



รูปที่ 7 การทดสอบความจำเพาะของ primer ต่อสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอเมื่อเปรียบเทียบกับสารพันธุกรรมของ RNA virus ชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในอาหาร

Lane 1: 100 bp Plus DNA ladder marker เข้มข้น 0.1 µg

Lane 2: HAV virus

Lane 3: Polio virus

Lane 4: Rota virus

Lane 5: dH_2O (negative control)

615.95293
ด858ก5

335595

บทที่ 5
อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอเป็นเชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารต่างๆ โดยเฉพาะหอยนางรมสดที่มีการเพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสิ่งปฏิกูลจากมนุษย์ ประกอบกับพฤติกรรมการบริโภคหอยนางรมแบบสดๆ หรือแบบดิบๆ สุกๆ ที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ทำให้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสดก่อนถึงผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสก่อโรคนั้นยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากการปนเปื้อนอาจมีปริมาณที่น้อยมาก วิธีที่ใช้ตรวจจึงต้องมีความไวสูงจึงจะสามารถตรวจพบได้ ปัจจุบัน วิธี RT-PCR เป็นวิธีที่นิยมมากเพราะเป็นวิธีที่ง่าย และใช้เวลาเพียง 2-3 ชั่วโมงเท่านั้น แต่มีข้อจำกัดที่ไม่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้โดยตรง จำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมเสียก่อน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุภาคไวรัสที่ปะปนในหอยนางรมสด และเพื่อกำจัดสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของ RT-PCR ออกไป

จากการทดสอบหาความไวของวิธี RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอโดยใช้คู่ primer จับจำเพาะบนยีน VP2 ของไวรัสตับอักเสบเอ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์บน genome พบว่า วิธี RT-PCR มีความไวในการตรวจหาหาสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ผ่านการเจือจางสูงสุดที่ 10^{-2} หรือที่มีปริมาณน้อยที่สุดที่ 3.188 ng (รูปที่ 1, lane 3) โดยมีแถบ cDNA ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่มีความยาวนิวคลีโอไทด์ตามที่คาดไว้ประมาณ 242 bp และเมื่อพิสูจน์ผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค DNA-ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่คำนวณได้จากค่าเฉลี่ยจากค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{405/492}$ ของ negative control (dH_2O) จากการทำซ้ำ 4 ครั้ง และบวก 0.2 (mean negative+0.2) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.254 พบว่า เทคนิค DNA-ELISA มีความไวของการทดสอบเท่ากับ 31.88 pg (รูปที่ 2) โดยเทคนิคนี้สามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ในตรวจสอบสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ได้ประมาณ 100 เท่า อย่างไรก็ตามเมื่อนำเทคนิค RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมด้วยปริมาณต่างๆ พบว่าเทคนิค RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมที่ความเข้มข้น 2.4×10^{2} PFU ต่อหอยนางรมสด 1.5 กรัม หรือเท่ากับ 160 PFU/g (รูปที่ 4) ซึ่งมีความไวน้อยกว่าการทดสอบที่ผ่านมาของคณะผู้วิจัยจากการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR

และพิสูจน์ความจำเพาะของผลผลิตของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค southern blot hybridization (Intamaso and Poomipak, 2011) ที่มีความไวในการตรวจสอบหาการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมที่ความเข้มข้น 125 PFU/g จึงอาจเป็นได้ที่วิธีการสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธีการตกตะกอนด้วย Glycine-Arginine-PEG 8000 ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการตกตะกอนด้วย Glycine-Threonine-PEG 6000 แทนการศึกษาที่ผ่านมาที่สกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมด้วยวิธี Acid adsorption alkaline elution (Kittigul et al.,2008) ที่ให้ผลความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ในการตรวจสอบหาการปนเปื้อนจำลองของ Rotavirus ในหอยนางรมสดได้ที่ความเข้มข้น 125 PFU/g เช่นเดียวกัน ดังนั้นขั้นตอนการสกัดไวรัสก่อนนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR จึงมีความสำคัญมากที่ต้องมีพัฒนาต่อไปเพื่อให้การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสมีความไวเพิ่มขึ้น

เมื่อพิสูจน์ผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยเทคนิค DNA-ELISA ที่ใช้หลักการของ hybridization ในรูปแบบ ELISA format โดยใช้ BB-probe (Jansen et al., 1990) ที่มีลำดับพันธุกรรมเป้าหมายอยู่ที่ส่วน VP2 gene พบว่าเทคนิค DNA-ELISA มีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนอยู่ที่ 16 PFU/g (รูปที่ 4) หรือ สามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมได้ประมาณ 10 เท่า ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเทคนิค DNA-ELISA นอกจากนำมาใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR แล้วยังสามารถใช้ในการเพิ่มความไวในการตรวจสอบได้ประมาณ 10-100 เท่า ด้วยนอกจากนี้วิธี DNA-ELISA ยังมีข้อดีคือใช้ระยะเวลาในการยืนยันผลเพียงแค่ 1 วันเท่านั้น ซึ่งมีความรวดเร็วมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี hybridization ที่มีการตรวจสอบผลบนแผ่นเมมเบรนซึ่งใช้เวลาถึง 2-3 วันจึงจะสามารถทราบผลได้ และยังสามารถทดสอบผลด้วยจำนวนสารตัวอย่างจำนวนมากพร้อมกันในรูปของ ELISA format ได้สูงถึง 96 ตัวอย่าง

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี RT-PCR ในหอยนางรมสด *Saccostrea commercialis* ในธรรมชาติที่ถูกเพาะเลี้ยง และวางขายเก็บมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงจังหวัดชายฝั่งภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดระยอง จันทบุรี และชลบุรี พบว่าไม่มีการปรากฏแถบของ cDNA ที่ขนาด 242 bp แต่พบแถบ smear เกิดขึ้น จากผลการทดลองที่เกิดขึ้นนั้นเป็นไปได้ว่าข้อจำกัดของปฏิกิริยา RT-PCR ที่มีการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วย Agarose gel electrophoresis ภายใต้แสง UV ดังนั้นการใช้สีที่ใช้ย้อมสารพันธุกรรมจึงมีความสำคัญมาก เพราะสีย้อมที่มีความไวจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นได้ดีขึ้น สำหรับการทดสอบหอยนางรมตัวอย่างที่มีการปรากฏของแถบ smear บน agarose gel อาจเป็นไปได้ที่ว่า SYBR gold ไปจับกับสารบางชนิดที่สกัดจากหอยจึงเห็น

เป็นแถบ smear ที่รบกวนการมองเห็นแถบ cDNA เป้าหมายเมื่อส่องดูภายใต้แสง UV หรือมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสมีน้อยกว่าค่า detection limit ของวิธี RT-PCR อย่างไรก็ตามเมื่อนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ไปพิสูจน์ความจำเพาะด้วยเทคนิค DNA-ELISA เมื่อเทียบกับค่า cut-off value พบว่าหอยนางรมบางตัวอย่างให้ผลเป็นบวก (รูปที่ 6) ดังนั้นการกำหนดค่า cut-off value ของแต่ละห้องปฏิบัติการจึงเป็นสิ่งสำคัญมากเพราะถ้ามีการกำหนดต่ำไปจะทำให้สารตัวอย่างที่ทดสอบให้ผลบวกมากเกินจริง หรือในทางตรงกันข้ามการกำหนดให้มีค่าสูงเกินไปจะทำให้สารตัวอย่างให้ผลลบมากเกินจริงได้ จากผลการทดสอบพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า cut-off value ที่กำหนดพบว่าหอยนางรมบางตัวอย่างมีการปนเปื้อนจริง แต่การเกิดโรคได้นั้นจำเป็นต้องได้รับเชื้อไวรัสอย่างน้อย 100 อนุภาค (Greig JD., 2010) และแต่ละคนจะมีโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคไม่เท่ากันทั้งนี้ขึ้นกับภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบเอด้วย

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบหาเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนในอาหารจำเป็นต้องใช้เทคนิคในการตรวจอย่างน้อย 2 เทคนิคเพื่อช่วยในการตรวจสอบและยืนยันผล แม้วิธี RT-PCR นั้นมีความไวสูงมากแต่มักขาดความจำเพาะ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิค DNA-ELISA เพื่อพิสูจน์ผลผลิตของสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอที่เพิ่มได้จากปฏิกิริยา RT-PCR นอกเหนือจากวิเคราะห์ลำดับของสารพันธุกรรม (DNA sequencing) และวิธี hybridization ที่มีการตรวจสอบผลบนแผ่นเมมเบรน ดังนั้นเทคนิค DNA-ELISA จึงเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและยังสามารถเพิ่มความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย

ปัญหา และอุปสรรค

มีความไม่พร้อมเรื่องอุปกรณ์ที่ใช้ อาทิ speed vac centrifuge ที่ใช้ในการ concentrate สารสกัดจากอาหาร ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงต้องเปลี่ยนวิธีในการสกัดหอยนางรมที่ใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่มีใช้อยู่ในคณะสหเวชศาสตร์ นอกจากนี้ผู้ที่ทำการทดลองเป็นนิสิตปริญญาตรีที่ขาดทักษะ จึงต้องใช้เวลาในการฝึกฝนทักษะให้นิสิต

บรรณานุกรม

1. Bosch, A., Shields, P.A. Survival of hepatitis A virus and poliovirus in seawater and marine sediments. *Abstr Ann Mtg Am Soc Microbiol.* 1987; p295.
2. Beuret, C., Baumgartner, A., Schluep, J. Virus-contaminated oysyers: a three-mouth monitering of oysters imported to Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 2292-2297.
3. Ciocca, M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine.* 2000; 18: Suppl 1: S71-4.
4. Cliver, D.O. Foodborne viruses. In "Fundamentals of Food Microbiology" eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. American Society for Microbiology, Washington DC, 1997.
5. Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A., Toti, L. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J Appl Microbiol.* 1999; 87: 884:888
6. Cromeans, T., Sobsey, M.D., Fields, H.A. Development of a plaque assays for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J Med Virol.* 1987; 22: 45-56.
7. Cromeans, T., Nainan, O.V., Fields, H.A., Favorov, M.O., Margolis, H.S. Heaptitis A and E viruses. In "Foodborne Disease handbook: Vol 2. Diseases caused by viruses, parasites, and fungi," eds. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., and Cliver, D.O. pp 1-56. Marcel Dekker, New York. 1994.
8. De Chastonay, J., and Siegel, G. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology.* 1987; 157: 268-275.
9. De Leon, R., Matsui, S.M., Baric, R.S., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., Sobsey, M.D. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 3151-3157.

10. Dix, A.B., and Jaykus, L.A. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. *J Food Prot.* 1998; 61: 458-465.

11. Drebot, M.A., Lee, S.H. RT-PCR detection of RNA viruses in stool specimens. *Biotechniques.* 1997; 23: 616-618.

12. Enriquez, R., Frosner, G.G., Hochstein-Mintzel, V., Riedemann, S., Reinhardt, G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J Med Virol.* 1992; 37: 174-179.

13. Fach Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Dargaignaratz, C., Botella, L., Gourreau, J.M., Carlin, F., Popoff, M.R., and Broussolle, V. Detection by PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of *Clostridium botulinum* in Fish and Environmental Samples from a Coastal Area in Northern France. *Appl Env Microbiol.* 2002; 68: 5870-5876.

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

15. Greig, J.D. Infective dose and pathogen carriage. 2010 food safety education conference, Atlanta, Georgia, USA, 2010.

16. Haflinger, D., Gilgen, M., Luthy, J., Hubner, P. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int J Food Microbiol.* 1997; 37: 27-36.

17. Halliday, M.L., Kang, L.Y., Zhou, T.K., Hu, M.D., Pan, Q.C., Fu, T.Y., Huang, Y.S., and Hu, S.L. An epidermis of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in changhai, China. *J Infect Dis.* 1991; 164; 852-859.

18. Hardy, M.E., Kramer, S.F., Treanor, J.J., Ester, M.K. Human calicivirus genogroup II capsid sequence diversity revealed by analyses of the prototype snow mountain agent. *Ach Virol.* 1997; 142: 197-202.

19. Hong, Y., Berrang, M.E., Liu, T., Hofacre, C.L., Sanchez, S., Wang, L., and Maurer, J.J. Rapid Detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enteric* on Poultry Carcasses by Using PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Appl Env Microbiol.* 2003; 69: 3492-3499

20. Honma, S., Nakata, S., Kinoshita-Numata, K., Kogawa, K., Chiba, S. Evaluation of 9 sets of PCR primers in the RNA dependent RNA polymerase region for detection and differentiation of members of the family *Caliciviridae*, Norwalk virus and Sapporo virus. *Microbiol Immunol.* 2000; 44: 411-419.

21. Intamaso, U., and Poomipak, W. Rapid detection of Hepatitis A virus in oysters in the East coast of Thailand. *J Science, technology and Humanities.* 2011; 9: 9-17.

22. Jansen, R.W., Siegl, G., Lemon, S.M. Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *PNAS.* 1990; 87: 2867-2871.

23. Jaykas, L.A., Hemard, M.T., Sobsey, M.D. Human enteric pathogenic viruses. In: Hackney, C.R., Pierson, M.D., eds. Environmental indicators and shellfish safety. New York: Chapman and Hall. 1994: P92-153.

24. Jiang, X., Ester, M.K., Metcalf, T.G. Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53: 2487-2495.

25. Jiang, X., Wang, M., Graham, D.Y., Esters, M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol.* 1992; 66: 6527-6532.

26. Kingsley, D.H., and Richards, G.P. Rapid and efficient extraction methods for reverse transcription-PCR detection of Hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67: 4152-4157.

27. Kittigul, L., Pombubpa, K., Rattanatham, T., Diraphat, P., Utrarachkij, F., Pungchitton, S., Khamrin, P., and Ushijima, H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Inter J Food Microbiol.* 2008; 204-210.

28. Lees, D.N., Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcriptase-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 1995; 61: 4418-4424.

29. Le guyader, F., Neill, F.H., ester, M.K., Monroe, S.S., Ando, T., Atmar, R.L. Detection and analysis of a small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 4268-4272.

30. Lemon, S.M., and Robertson, B.H. Current perspectives in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Semin Virol.* 1993; 4: 285-295.

31. Lopez-Sabater, E.I., Deng, M.Y., and Cliver, D.O. Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) for detection of hepatitis A virus (HAV) in American oyster (*Crassostrea virginica*). *Letters in Applied microbiology.* 1997; 24: 101-104.

32. Metzger-Boddien, C., and Kehle, J. Development and Evaluation of a Sensitive PCR-ELISA for Detection of Adenoviruses in Feces. *Intervirology.* 2005; 48: 297–300.

33. Milne, S.A., Gallacher, S., Cash, P., Lees, D.N., Henshilwood, K., Porter, A.J. A sensitive and reliable reverse transcriptase PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human pathogenic viruses in bivalve molluscs. *J Food Prot.* 2007; 70: 1475-82.

34. Milne, S.A., Gallacher, S., Cash, P., Porter, A.J. A reliable RT-PCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. *J Virol Methods.* 2006; 132: 92-6.

35. Monceyron, C., and Grinde, B. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *J Virol Methods.* 1994; 6: 157-166.

36. Musiani, M., Venturoli, S., Gallinella, G., Zerbini, M. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. *Nat Protoc.* 2007; 2: 2502-2510.

37. Rodgers, F.G. Concentration of viruses in faecal samples from patients with gastroenteritis. In: Goddard, M., Buttler, M., eds. Viruses and wastewater treatment. New York: Pergamon Press. 1981: P 15-18.

38. Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O.F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol.* 1992; 17: 37-45

39. Safarik, I., Safarikava, M., and Forsythe, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *J Appl Bact.* 1995; 78: 575-585.

40. Scotter, J.M., and Chambers, S.T. Comparison of Galactomannan Detection, PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Real-Time PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis in a Neutropenic Rat Model and Effect of Caspofungin Acetate. *Clin Diag Lab Ilmmunol.* 2005; 12: 1322-1327.

41. Shieh, Y.C., Baric, R.S., Sobsey, M.D., Ticehurst, J., Meile, T.A., De Leon, R., Walter, R. Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in water by sRNA probes. *J Virol Methods.* 1991; 31:119-136.

42. Shieh, Y.C., Calci, K.R., and Baric, R.S. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65: 4709-4714.

43. Shieh, Y.C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, W., Baric, R.S. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J Infect Dis.* 2000; 181(S2): S360-366.

44. Sow, A., Sidibé, I., Desquesnes, M., Bengaly, Z., and Pangui, L.J. The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma congolense* type savannah (*TCS*) in bovine blood samples. *Tropical Biomedicine.* 2006; 23: 123–129.

45. Straub, T.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. *Can J Microbiol.* 1994; 40: 884-888.