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

รหัสโครงการ

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสหลายชนิดพร้อมกันในหอยนางรมด้วย วิธี RT-PCR และ Nested-PCR

ผศ.ดร. อุไรวรณ อินทมาโส

มหาวิทยาลัยบูรพา

สนับสนุนโดย สำนักบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษา

และพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน อาทิ ขอบคุณ นายนิรันดร์ องค์อินทร์ และนางสาวบุญรัตน์ เขียวโพธิ์นิสิตสาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์นายปรมินทร์ บุญบรรจง และนางสาวสายธาร วิสุนธร นิสิตสาขาชีวเวชศาสตร์ ที่ทุ่มเทแรงกายและใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ senior project และขอขอบคุณ นายวิทยา ภูมิภักดิ์ ศิษย์เก่าที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านต่างๆ ขอบคุณ ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต ที่ให้ความอนุเคราะห์หอยนางรมตัวอย่าง ขอบคุณ ผศ. ดร. สุดารัตน์ สวนจิตร ที่ให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมทำให้งานมีความสมบูรณ์ขึ้นและท้ายสุดขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2556จาก สำนักงานบริหารโครงการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

อุไรวรรณ อินทมาโส
25 พฤษภาคม2557

The simultaneous detection of viruses in oysters by multiplex RT-PCR and nested PCR

Uraiwan Intamaso

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

*Corresponding author: uraiwani@buu.ac.th

Abstract: Hepatitis A virus (HAV) and rotavirus are one of the most important viruses that infect people via consuming fresh oysters. The detection of fresh oysters prior to selling consumers is considered to provide protection against diseases. Multiplex RT-PCR was utilized to detect HAV and rotaviruses simultaneously in fresh oysters, *Saccostrea commercialis*, cultured along the Eastern coast in Chon Buri, Rayong and Jantabri provinces of Thailand. Nucleic acid of the virus was extracted with Glycine-Arginine PEG method and then amplified with the designed primers. Multiplex RT-PCR had higher sensitivity than monoplex PCR in the detection of purified RNA genome of rotavirus. Nested PCR in combination of RT-PCR technique not only increases the sensitivity of RT-PCR in the detection of viral genomic RNA and artificially contaminated oysters but also confirm the specificity of RT-PCR products. Harvested oysters were found single contamination with rotavirus and HAV as 21.95% and 34.15%, respectively and co-contamination as 7.32% when detected by Multiplex RT-PCR and nested PCR. Genotype G1[8] was reported for all rotavirus contamination in oysters. This combined multiplex RT –nested PCR is sensitive and rapid method for simultaneous detection of HAV and rotavirus and can be utilized in routine screening for the target viruses in oysters.

Keywords: virus, multiplex-RT-PCR, nested PCR, food contamination, food safety

การตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสหลายชนิดพร้อมกันในหอยนางรมด้วยวิธี RT-PCR และ Nested PCR

อุไรวรรณอินทมาโส

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก: uraiwani@buu.ac.th

บทคัดย่อ:ไวรัสตับอักเสบชนิดเอและไวรัสโรต้าเป็นไวรัสสำคัญที่ติดต่อสู่คนผ่านการบริโภคหอยนางรมสดการตรวจหาไวรัสในหอยนางรมสดก่อนที่จะไปถึงมือผู้บริโภคจึงมีประโยชน์ในเชิงป้องกันโรคได้เทคนิค Multiplex RT-PCR ได้ถูกนำมาใช้ตรวจหาไวรัสตับอักเสบเอและไวรัสโรต้าพร้อมกันในหอยนางรมสายพันธุ์ *Saccostrea commercialis* ที่เพาะเลี้ยงตามชายฝั่งทะเลในเขตจังหวัดชลบุรี ระยองและจันทบุรีโดยการสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี Glycine-Arginine PEGและขยายเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วย primer ที่ออกแบบจากผลการทดลองพบว่าเทคนิค multiplex RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรต้าสูงกว่า monoplex PCR เมื่อใช้เทคนิค nested PCR ร่วมกับ multiplex RT-PCR นอกจากจะเพิ่มความไวของเทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบสารพันธุกรรมบริสุทธิ์ของไวรัสเป้าหมายและไวรัสที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมแล้วยังสามารถยืนยันความจำเพาะของผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR และ nested PCR สามารถตรวจพบการปนเปื้อนในหอยนางรมด้วยไวรัสโรต้าและไวรัสตับอักเสบเอ เพียงชนิดเดียวเท่ากับ 21.95%และ 34.15% ตามลำดับ และมีการปนเปื้อนของไวรัสทั้งสองชนิดเท่ากับ 7.32% โดยสายพันธุ์ของไวรัสโรต้าที่พบทั้งหมดเป็น Genotype G1[8] ดังนั้น เทคนิค multiplex RT-PCR-nested PCR จึงเป็นเทคนิคที่มีความไวและรวดเร็วในการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบเอและไวรัสโรต้าพร้อมกันและสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองหอยนางรมที่ปนเปื้อนไวรัสเป้าหมายได้

คำสำคัญ: ไวรัส, มัลติเพลกอาร์ทีพีซีอาร์, เนสเตทพีซีอาร์, การปนเปื้อนในอาหาร, อาหารปลอดภัย

สารบัญ หน้า

ประกาศคุณูปการ i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ii
บทคัดย่อภาษาไทย iii
สารบัญ iv
สารบัญตาราง vi
สารบัญรูปภาพ vii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย v
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 3
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 5
ขอบเขตของโครงการวิจัย 5
ทฤษฎี สมมติฐาน 5
กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง 7
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย 7
วิธีดำเนินการวิจัย 7
วิธี Plaque assay 7
การออกแบบ Primers 8
การสกัด RNA ออกจาก virion 8
การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี monoplex PCR และ multiplex RT-PCR 9
การทดสอบความจำเพาะของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี nested PCR 10
ความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ บริสุทธิ์ ด้วยปฏิกิริยาmonoplex RT-PCRและ Nested-PCR 11
ความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอบริสุทธิ์ ด้วยปฏิกิริยา multiplex RT-PCR และ Nested-PCR 12
การเก็บตัวอย่างหอยนางรม 12
การปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสด 14
การสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมสด 14
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตจากปฏิกริยาnested PCR และวิเคราะห์หา genotype ของไวรัสที่พบในหอยนางรม 15
ผลการวิจัย 15

การทดสอบ Primer ที่ออกแบบเพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR 15
การทดสอบความความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตา หรือไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี monoplex RT-PCR 15
การทดสอบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอด้วยปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR 16
การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอจากตัวอย่างหอยนางรมจากแหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกโดยวิธี Multiplex RT-PCR และ Nested-PCR 16
การหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของผลผลิตจากปฏิกริยาNested PCR และวิเคราะห์หา Genotype ของไวรัสที่พบในหอยนางรม 17
บทที่ 3 อภิปรายผลการทดลอง 28
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 31
บทที่ 5 ผลผลิต 32
บรรณานุกรม

สารบัญตาราง (Table of Contents)

หน้า

ตารางที่

ตารางที่3.1: ลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ของ primers สำหรับปฏิกิริยา RT-PCR และ Nested-PCR 9
ตารางที่ 3.2: การทำปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR 10
ตารางที่ 3.3: การทำปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR 11
ตารางที่ 3.4: สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR 12
ตารางที่ 3.5: การทำปฏิกิริยา Nested PCR 13
ตารางที่ 3.6: สภาวะในการทำปฏิกิริยา Nested PCR 14

สารบัญรูปภาพ (List of Illustrations)

รูปที่	หน้า
รูปที่ 4.1: ขนาดของ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา monoplex RT-PCR	18
รูปที่ 4.2: ความไวของปฏิกิริยา monoplex RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่า	19
รูปที่ 4.3: ความไวของปฏิกิริยา Multiplex RT-PCRในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่า	20
รูปที่ 4.4: การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรม	21
รูปที่ 4.5: การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรตาที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรม	22
รูปที่ 4.6: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอ ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR จากตัวอย่างชุดที่1	23
รูปที่ 4.7: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี Nested-PCR จากตัวอย่างชุดที่1	24
รูปที่ 4.8: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี Multiplex RT-PCR จากตัวอย่างชุดที่ 2	25
รูปที่ 4.9: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี Nested-PCR จากตัวอย่างชุดที่2	26
รูปที่ 4.10 ผลการ Alignment เทียบกับ Reference sequence	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

คำย่อ	ความหมาย
bp	base pair
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CPE	cytopathic effect
DEPC	diethylpyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
EM	electron microscope
FBS	fetal bovine serum
G	gram
ng	nanogram
MEM	minimum essential media
$MgSO_4$	magnesium sulfate
PEG	polyethylene glycol
pfu	plaque forming unit
pg	picogram
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
µl	microlitter
µM	micromolar

บทที่ 1
บทนำ

แต่เดิมนั้นการตรวจหาความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ของ gastroenteritis virus ที่ปนเปื้อนอาหารในห้องปฏิบัติการนิยมใช้วิธี cell culture โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสจากของเหลว ที่สกัดมาจากอาหาร (food extract) ที่ต้องสงสัยว่าอาจปนเปื้อนด้วยไวรัสและตรวจหาร่องรอยการติดเชื้อของเซลล์โดยดูจาก cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้น (Jaykas et al, 1994) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้กับ wild type ไวรัสได้โดยเฉพาะไวรัสตับอักเสบชนิดเอ เนื่องจาก ไวรัสตับอักเสบชนิดเอไม่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายใน cell line และต้องอาศัยระยะเวลาการปรับตัว ที่ยาวนานก่อนที่จะสามารถเจริญได้และไม่ทำให้เกิด CPE ด้วย (De Chastonay &Siegel, 1987; Lemon&Robertson, 1993) สำหรับทางเลือกอื่นในการตรวจหาไวรัสนั้นใช้วิธีดูจากขนาด รูปร่าง ลักษณะ ของอนุภาคผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (EM) ซึ่งวิธีนี้มีความไวต่ำ ต้องมีอนุภาคปริมาณมากถึง 10^{9}-10^{11} ต่อมวลสารหนึ่งกรัมจึงจะสามารถตรวจพบอนุภาคของไวรัสได้และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการใช้ EM ที่สามารถจำแนกลักษณะของไวรัสได้ วิธีนี้อาจใช้ได้ดีกับสิ่งส่งตรวจพวกอุจจาระของผู้ป่วย ที่ติดเชื้อแต่ไม่มีความไวพอกับสิ่งส่งตรวจพวก food extract ซึ่ง มีไวรัสอยู่ในปริมาณน้อยมาก

วิธี immunological method ได้ถูกนำมาใช้ตรวจหาไวรัสที่ไม่สามารถเลี้ยงได้ใน cell culture โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างของ antibody ที่ยึดติด (immobilized) กับ column กับ coat protein ของไวรัส ใน food extract วิธีนี้ จึงมีข้อดีคือสามารถตรวจหาจำนวนที่แท้จริงของ infectious viral particles ใน food extract ได้เพราะ antibody จะสามารถจับได้กับไวรัสที่มีอนุภาคสมบูรณ์เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อด้อยเช่นกันเพราะการยึด antibody ไว้กับ column ทำให้ antibody ไม่อยู่ในสภาพเป็นอิสระทำให้จับกับ antigen ได้ไม่ดี และวิธีนี้อาจจะต้องใช้เวลานานถึง 12-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อให้เกิด ปฏิกิริยาจับกันแน่นระหว่าง immobilized antibody และ antigen ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาให้ antibody จับกับ antigen ได้ดีขึ้นโดย immobilize antibody ไว้กับเม็ด 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) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็ยังคงมี ข้อจำกัดเนื่องจาก มีความไวต่ำและต้องการปริมาณของไวรัสมากพอจึงจะสามารถตรวจพบไวรัสได้ ดังนั้นจึงมักใช้ เป็นวิธีในการ concentrate ไวรัสใน food extract ก่อนนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่น

วิธี PCR จึงเป็นวิธีที่นิยมมากในการตรวจหาไวรัสที่มีจำนวนน้อยในอาหารเพราะมีความไวสูง ในทางทฤษฎีสามารถเพิ่มจำนวนจาก 1 nucleic sequence ตั้งต้นได้ผลผลิต เป็นจำนวนล้านเท่าโดยอาศัยปฏิกิริยาการจับอย่างจำเพาะระหว่าง viral genome กับ PCR primers การที่ foodborne virus เกือบทั้งหมดนั้นมี genome เป็น RNA ดังนั้น viral RNA genome จะเป็นแม่แบบ ในการสร้างเส้น complementary DNA เส้นเดียวขึ้นมาโดยใช้ enzyme reverse transcriptase หลังจาก นั้นเข้าสู่ขบวนการ PCR ตามปกติได้ผลผลิตเป็น cDNA ที่เป็นเส้นคู่เรียกวิธีนี้ว่า RT-PCR แม้วิธีนี้มี ความไวสูงเพราะสามารถเพิ่มจำนวนของ cDNA มากในเวลาสั้น ๆแต่วิธีนี้อย่างเดียวอาจไม่สามารถ ใช้การตรวจหาไวรัสโดยตรงใน food extract ได้เพราะในอาหารมักมีส่วนประกอบต่าง ๆที่ยับยั้ง การทำงานของ enzyme ใน RT-PCR ทำให้อาจเกิดผลเป็น false negative

ได้ (Rossen et al, 1992; Dix&Jaykus, 1998; Green et al, 1998; Shiel et al, 1999) จึงมัก concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract และ purify ไวรัสออกมาก่อนเพื่อกำจัด RT-PCR inhibitor ต่าง ๆ ก่อนนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

โดยทั่ว ๆ ไปสามารถแบ่งวิธี concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract ออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ 1) extraction-concentration 2) adsorption-elution-concentration โดยทั้งสองวิธีมีจุดมุ่งหมายในการแยกไวรัสออกมาจากอาหารก่อนโดยพยายามให้ไวรัสยังคงอยู่ในรูป infectious form เช่น ผ่านการกรอง, การตกตะกอน, polyelectrolyte flocculation และ solvent extract หรือใช้ Sephadex (De Leon et al, 1992), cellulose (Wilde et al, 1990), Chelex (Straub et al, 1994) เป็นต้นเพื่อกำจัด เกลือหรือโปรตีนขนาดเล็ก หรือใช้ CTAB (Jiang et al, 1992) เพื่อกำจัด polysaccharide หรืออาจนำ magnetic poly (dT) bead (Kingsley et al, 2001) หรือ silica gel membrane (Shiel et al, 1999) มาใช้ร่วมในการ purify RNA ด้วย สำหรับวิธีการ concentrate viral particle อีกวิธีที่นำมาใช้คือ immunocapture โดยใช้ antibody แยกอนุภาคไวรัสออกมาจากอาหารตามด้วยความร้อนเพื่อให้ viral RNA หลุดออกมาจาก capsid protein ก่อนเข้าสู่กระบวนการ PCR ต่อไป วิธี magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) ที่อาศัยหลักการดังกล่าว (Lopez et al, 1997) สามารถ ลดปริมาตรของ food extract ได้ 10-100 เท่าและมี yield ที่ได้ 10-90% เมื่อใช้ตรวจหา ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในเนื้อหอยนางรม 20 g สามารถตรวจพบอนุภาคของไวรัสได้ต่ำสุด (detection limit) 10 PFU แต่วิธีการสกัดไวรัสเหล่านี้อาจมีความไวไม่พอในการตรวจหาไวรัสที่มีปริมาณน้อยมาก ๆ ที่ปนเปื้อนใน อาหารได้และอาจยังคง มี RT-PCR inhibitor เหลือปะปนอยู่ (Drebot&Lee, 1997)

แม้ RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ในทางกลับกันความไวที่สูงมากๆนี้อาจเพิ่มโอกาสในการขยายเพิ่มจำนวน nucleic acid อื่นที่อาจปนเปื้อนในปฏิกิริยาได้ วิธีที่ใช้ยืนยันผลที่ได้ซึ่งกระทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ คือนำ ผลผลิต cDNA ที่ได้ไปแยก ด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย Southern blot hybridization โดยใช้ internal oligonucleotide ที่มีการติดฉลาก (Hardy et al, 1997; Honma et al, 2000) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ใช้เวลานานและยุ่งยากและต้องใช้เวลาประมาณ 2 วัน ดังนั้นจึงผู้ได้นำวิธี nested-PCR โดยใช้ internal primers จับกับ cDNA ที่ได้จาก RT-PCR ทั้งนี้นอกจากเป็นการยืนยันถึงความจำเพาะของ cDNA ที่ได้จากปฏิกริยาแล้วยังเป็นการเพิ่มความไวอีกด้วย อย่างไรก็ตามวิธีที่เชื่อถือได้มากที่สุดคือนำ ผลผลิต cDNA ที่ได้ไป sequence หาตำแหน่งเบส ซึ่งนอกจากใช้เป็นวิธียืนยันผลที่ได้ว่าเป็นผลผลิตที่ขยายเพิ่มจำนวนมาจาก viral genome ที่ต้องการหาจริง ๆ แล้วยังสามารถติดตามการระบาดของเชื้อไวรัสก่อโรคได้ถึงระดับ genotype ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการติดต่อในมนุษย์หรือมาจากมูลของสัตว์ที่ปนเปื้อนในอาหารรวมทั้งยังสามารถเฝ้าติดตามโอกาสในการเกิดการผสมกันของไวรัสสองสายพันธุ์แบบ genetic reassortment ที่มักเกิดกับไวรัสโรตาได้อีกด้วย

อย่างไรก็ตาม RT-PCR ตามปกติใช้ primer เพียง 1 คู่ ในการตรวจหา template เป้าหมายเพียง 1 ชนิดต่อหนึ่งปฏิกริยาเท่านั้น ในทางตรงกันข้าม วิธี multiplex RT- PCR มีการใช้ primer สองคู่หรือหลายคู่ โดยที่แต่ละคู่จำเพาะต่อ template เป้าหมายต่างชนิดกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถใช้ตรวจหา template เป้าหมายสองหรือมากกว่าสองชนิดได้พร้อมกันในหนึ่งปฏิกริยา ดังนั้นจึงมีการนำ multiplex RT- PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสก่อโรคมากมายทางคลินิกเนื่องจากการตรวจสอบมีความสะดวก รวดเร็ว ลด

ค่าใช้จ่าย ลดการสูญเสียทั้งเวลาและแรงงาน (Poddar et al., 2002; Zoll at al, 1992; Yan, et al., 2003) และได้มีการนำมาใช้ตรวจหาไวรัสก่อโรคในน้ำหรืออาหารบ้าง (Coelho, at al, 2003; Tsai et al., 1994; Kou, et al., 2008; Rayas et al, 2010)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

อาหารทะเลประเภทหอยสองฝา (bivalve molluscs) ที่คนนิยมบริโภคเป็นอาหารได้แก่ หอยลาย (clam) หอยแมลงภู่ (mussels) และหอยนางรม (oysters) เป็นต้น มักมีคนนำมาเพาะเลี้ยง ในฟาร์ม บริเวณชายฝั่งทะเลน้ำตื้น ที่มีสารอาหารอยู่ในระดับสูง โดยหอยทำหน้าที่คอยดักจับอาหาร เช่น พวกสาหร่าย ด้วยการกรองจากน้ำที่รายล้อมรอบตัวหอย และนำมาย่อยเป็นอาหาร อย่างไรก็ตามบริเวณชายฝั่งทะเลน้ำตื้น ที่เพาะเลี้ยงหอย มักปะปนด้วยสิ่งปฏิกูลจากมนุษย์ ที่ไม่ได้ถูกกำจัดอย่างถูกวิธีจากบริเวณใกล้เคียงที่น้ำฝนชะไหลมาทับถม รวมทั้งน้ำทิ้ง จากแหล่งอุตสาหกรรม ที่ถูก ชะล้างปนลงมากับน้ำในแม่น้ำ ลำธาร ลงสู่น้ำทะเลตามชายฝั่งทะเล ตลอดจนบริเวณที่เลี้ยงหอย (Jaykas et al, 1994; Shieh et al, 2000) เมื่อหอยกรองดักจับอาหาร เชื้อก่อโรคต่างๆ ที่ปะปน อยู่ ใน น้ำนั้น ก็จะถูกดักจับไปด้วย และสะสมไว้ในระบบย่อยอาหาร ของหอย ซึ่งอาจสะสมได้สูง ถึง 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบ กับที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ (Enriquez et al, 1992) และประกอบกับ พฤติกรรม ของ ผู้บริโภคเอง ที่นิยมบริโภคหอยดิบ หรือที่ปรุงแบบสุก ๆ ดิบ ๆ หรือ ที่ใช้ความร้อน และเวลา ในการ ปรุงอาหาร ไม่มากพอ ความร้อนจึงไม่อาจผ่านเปลือกแข็ง ของหอย เข้าไปทำลายเชื้อโรคเหล่านั้น ซึ่งอยู่ในเนื้อหอยได้ ดังนั้น หอยดังกล่าวเหล่านี้ จึงสามารถกลายเป็นแหล่งระบาด ของเชื้อก่อโรค หลายชนิด โดยเฉพาะไวรัสชนิดที่ติดต่อผ่าน ทางการกินอาหารที่ปนเปื้อน ด้วยสิ่งปฏิกูล จากมนุษย์ (fecal-oral route) โดยทั่วไปแล้ว จุลินทรีย์ที่ ถูกมนุษย์ขับถ่ายออกมา จะมีจำนวนมาก มีหลายชนิด เมื่อออกมา อยู่ ในแหล่งน้ำ จะสามารถ คงทนอยู่ได้ ในแหล่งน้ำเป็นเวลานาน และไม่สามารถ ถูกกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากกระบวนการบำบัดน้ำเสีย ที่มีอยู่ในปัจจุบัน (Sorber, 1983) นอกจากนี้กระบวนการ depurination ที่ทำกันในหลาย ๆ ประเทศ ด้วยการนำหอย ที่มีชีวิต มาใส่ ลงไปในภาชนะขนาดใหญ่ ที่มีน้ำทะเลสะอาดอยู่ ในช่วงเวลาหนึ่ง เพื่อให้หอยคายของเสียออกมา ก่อนนำหอยไปขาย พบว่า ไม่สามารถกำจัดไวรัส ที่สะสมอยู่ในหอย ได้หมด เหมือนกับ แบคทีเรีย (Lees, 2000)

ไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่จัดอยู่ genus Hepatovirus (Nainan et al., 2006) เป็นหนึ่งในไวรัส ที่พบสะสมได้มาก ในหอย ไวรัสชนิดนี้ มีอนุภาคทรงกลม ขนาดประมาณ 27-28 นาโนเมตร ไม่มีชั้นไขมัน (non-envelope) ห่อหุ้มที่ชั้นนอกสุด มีจีโนมเป็นอาร์เอนเอ สายเดี่ยว เส้นบวกมีการติดต่อจากคนสู่คนได้ โดย ผ่านทางอาหาร การระบาดของไวรัส hepatitis A ที่รุนแรงมากที่สุด ในประวัติศาสตร์ เกิดขึ้นที่ เมือง เซียงไฮ้ ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1988 จากการกินหอยลาย ที่เลี้ยงไว้ บริเวณ ที่มีสิ่งปฏิกูล ปนเปื้อน (Halliday et al, 1991) ซึ่งในครั้งนั้น มีผู้ติดเชื้อ ถึง 300,000 ราย สำหรับประเทศไทย จาก ข้อมูล ของ กองควบคุมโรค ในปี 2547 พบว่า มีผู้ป่วยติดเชื้อ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ประมาณ 4.54 % ซึ่งตัวเลข ดังกล่าว อาจ มีค่าน้อยกว่าที่เกิดขึ้นจริง สาเหตุหนึ่ง เป็นเพราะ เป็นตัวเลขที่บันทึกจากผู้ป่วย ที่เข้ารับ การรักษา ที่โรงพยาบาลเท่านั้น และผู้ป่วยส่วนใหญ่ มักซื้อยามารับประทานเอง หรือ พักรักษาตัว ที่บ้าน จึงไม่ได้บันทึกข้อมูล ในส่วนนี้ สำหรับการติดต่อด้วย ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ นั้น เกิดขึ้นได้ง่าย เพราะไวรัสชนิดนี้ สามารถทนต่อความร้อน และ ความ

แห้ง ในอาหาร ได้ดี กว่า ไวรัสชนิดอื่น ๆ และ สามารถอยู่รอด ในน้ำทะเลเป็นระยะเวลาได้นานหลาย ๆ สัปดาห์ (Croci et al, 1999; Bosch & Shields, 1987) นอกจากนี้แล้ว เมื่อเชื้อไวรัส เข้าสู่ร่างกายแล้ว มีระยะฟักตัว เฉลี่ย นานถึง 4 สัปดาห์ (ระหว่าง 2-6 สัปดาห์) ก่อนที่จะ แสดงอาการของโรค ออกมา (Cromeans et al, 1994) ผู้ป่วย จึงไม่ได้ระวัง การแพร่ระบาด ของเชื้อไวรัส และ ถ้าผู้ติดเชื้อนั้น มีการขับถ่ายอุจจาระ ลงไปในแหล่งน้ำ เชื้อไวรัส จะออกมาพร้อมกับอุจจาระ ได้ยาวนาน ถึง 10-14 วัน จากการศึกษา พบว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ละคน มีการปล่อยไวรัส ออกมาทางอุจจาระ จำนวนมากระหว่าง 10^6 ถึง 10^{11} อนุภาค ต่ออุจจาระ หนึ่ง กรัม และในน้ำทิ้ง อาจพบไวรัส ปนเปื้อน จาก 10^3 ถึง10^5 อนุภาค ต่อ ลิตร (Rodgers, 1981; Jaykas et al, 1994) ถ้าหาก บังเอิญผู้ติดเชื้อนั้น ทำงานเกี่ยวข้องกับ อาหาร โอกาส การถ่ายทอดเชื้อ ออกสู่สิ่งแวดล้อม ผ่านทางอาหาร สามารถเกิดขึ้นได้ อย่างรวดเร็วมาก หากมีสุขอนามัยที่ไม่ดี เช่นไม่ได้ล้างมือ ก่อนไปหยิบ จับอาหาร เมื่อได้รับเชื้อ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ แล้ว ถ้าอาการรุนแรงจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง หรือ ดีซ่าน และถ้ามีอาการ รุนแรงมากและยาวนาน อาจมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งตับได้ (Ciocca, 2000)

นอกจากไวรัสตับอักเสบชนิดเอแล้ว ยังมี ไวรัส โรตา (Rotaviruses) อีกชนิดหนึ่ง ที่สามารถ ก่อให้เกิดอาการอักเสบ ที่ระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) มีการติดต่อ ผ่านทาง fecal-oral route เนื่องมาจากการกินหอยทะเลสด ที่มีไวรัส สะสมในเนื้อหอย โดยไวรัสโรตาจัดอยู่ใน ตระกูล Reoviridae เป็นไวรัสทรงกลม ที่มีขนาด ประมาณ 72 นาโนเมตร ประกอบด้วย โปรตีน (capsid) 2 ชั้น ที่ล้อมรอบ อาร์เอนเอ เส้นคู่ (double stranded RNA) จำนวน 11 ชิ้น ไว้ภายในอนุภาคไวรัสโรตาที่พบ แบ่งเป็น หลาย ๆ serotype จากกลุ่ม A ถึง G แต่ มีเพียง serotype A, B และ C เท่านั้น ที่เกี่ยว ข้อง กับ การระบาด ในคน (Lees, 2000) โดย serotype A ส่วนใหญ่ ก่อให้เกิด การระบาด ใน เด็กทารก และ เด็กเล็ก และ เป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้เด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ในประเทศ ที่กำลังพัฒนา ป่วย จากอาการท้องเสียอย่างรุนแรง จนต้อง ได้รับการรักษา ในโรงพยาบาล และเป็นสาเหตุ ของ การตาย ได้ถึง 20% ส่วน non-serotype A Rotaviruses ที่พบ มีการระบาด เป็นระยะ ๆ ในครอบครัว หรือ ชุมชน ผ่านทางการกิน อาหารทะเล โดยเฉพาะ หอยทะเล ที่แม้ไม่ค่อยได้พบบ่อยนัก แต่การระบาดบางครั้ง ทำให้เกิดอาการ gastroenteritis ที่รุนแรง จนถึงเสียชีวิตได้ (Bridger, 1994)

อย่างไรก็ตาม แม้การระบาดด้วย โรตาไวรัส serotype A ที่พบได้บ่อย และ จัดว่า เป็นสาเหตุหลัก ในการ ก่อให้เกิดโรค ในเด็ก และ ไม่ก่อโรครุนแรง ในผู้ใหญ่ แต่ผู้ที่ติดเชื้อ สามารถขับถ่ายไวรัส ออกมา จำนวนมาก กว่า 10^{12} อนุภาค ต่อ อุจจาระ 1 กรัม ลงไป ในแหล่งน้ำ (Gajardo et al., 1995; Dubois et al., 1997) เมื่อคนนำ น้ำที่ปนเปื้อนเหล่านั้น กลับนำไปใช้ ในการปรุงอาหาร หรือ ใช้มือ ที่ไม่ สะอาด หยิบจับอาหาร ป้อนใส่ปากเด็ก ก็สามารถทำให้ เกิดโรคติดต่อ ในเด็กเล็กได้ นอกจากนี้ ไวรัสที่เข้าไปสะสม ในหอยทะเล ที่เพาะเลี้ยง ในบริเวณใกล้เคียง สามารถเข้าไปติดเชื้อ ในผู้ใหญ่ ได้โดยตรง ผ่านทางการกินหอยที่ปนเปื้อนด้วยไวรัสเหล่านั้นได้ เกิดการติดเชื้อ และ กลาย เป็น แหล่งแพร่กระจายโรค ได้ต่อไปอีกด้วย ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนที่สามารถป้องกัน ไวรัสโรตาที่มีประสิทธิภาพร้อยละร้อยได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ธรรมชาติของ ไวรัสโรตาที่มีจีโนมเป็นอาร์เอนเอ เส้นคู่ ชิ้น สั้น ๆ ถึง 11 ชิ้น ภายในอนุภาค ทำให้สามารถ เกิดการกลายพันธุ์แบบ genetic reassortment ได้ง่าย หากไวรัสโรตาสองสายพันธุ์ติดเชื้อ พร้อมกัน ภายในเซลล์เดียวกัน เหมือนกับที่เกิดกับ influenza virus ดังนั้นการตรวจหาไวรัส ในหอยทะเล ที่นิยมรับประทานสด หรือ รับประทานสุก ๆ ดิบ ๆ ให้ได้ถูกต้องอย่างรวดเร็ว จึงเป็นสิ่งจำเป็นมาก เพราะ เป็นการป้องกันการแพร่ระบาด ของเชื้อไวรัส ด้วยการตัดวงจร การแพร่ระบาด อย่างไร ก็ตาม วิธีการตรวจ แบบดั้งเดิม ที่ใช้ตรวจหา เชื้อไวรัส ในอาหาร โดยเฉพาะ ใน

หอยทะเลสด ยังมีความไวไม่เพียงพอ ใช้เวลานานในการตรวจ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้ มุ่งที่จะ ใช้วิธี ทางอณูชีววิทยา ซึ่ง มีความไว และ รวดเร็ว มาใช้ ในการ ตรวจหา ไวรัส ตับอักเสบ ชนิดเอ และ ไวรัสโรตาพร้อมกัน ในหอยทะเลสด ที่มีการเลี้ยง และ รับประทาน กันมาก ในภาคตะวันออก ข้อมูลที่ได้ นอกจากจะทำให้ทราบถึงการระบาดของไวรัส เหล่านี้ ใน หอยทะเล สด เพื่อนำไปใช้พัฒนา เป็นวัคซีน ป้องกันติดเชื้อไวรัส ได้แล้ว ยังอาจนำไปใช้ พัฒนาต่อยอด ผลิตเป็นชุดตรวจสอบไวรัส เชิงพาณิชย์ สำหรับผู้บริโภคและผู้ประกอบการ เพื่อใช้ในการตรวจหา ไวรัสในหอยทะเลสด ที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความไว และ ความจำเพาะ ในโอกาส ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อประเมินความไวและความจำเพาะของการตรวจสอบหาไวรัสตับอักเสบชนิดเอและไวรัสโรตาที่ในหอยทะเลสดพร้อมกันด้วยวิธี multiplex RT-PCR และ nested PCR

2. ตรวจสอบการระบาดของไวรัสตับอักเสบชนิดเอและโรตาไวรัสในหอยหอยทะเลสดที่เพาะเลี้ยงและจำหน่ายในภาคตะวันออก

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้เริ่มจากการทดสอบหาความไวของวิธี monoplex และ Multiplex RT-PCR ในการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตา หรือ ไวรัสตับอักเสบ เอ ที่สกัดจากอนุภาคของไวรัสโดยตรงหรือจากอนุภาคไวรัสที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอย ที่ถูกสกัดด้วย Glycine-Arginine-Polyethylene glycol 8000 และยืนยันความจำเพาะของผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) ผลผลิตจากปฏิกิริยาทั้งหมดจะถูกนำมาตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นใช้วิธีการดังกล่าวในการตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตา และไวรัสตับอักเสบ เอ จากตัวอย่างหอยที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออก คือ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจันทบุรี

ทฤษฎี สมมุติฐาน

วิธี multiplex RT-PCR ตามด้วย nested PCR น่าจะ เป็นวิธี ที่มี ความไว และ มีความจำเพาะ ในการตรวจสอบหา การปนเปื้อน ของไวรัส ได้พร้อมกัน และ ข้อมูล ที่ได้ยังทำให้ทราบถึงการระบาดของไวรัสเหล่านี้ ใน หอยทะเลสด ที่เพาะเลี้ยง และ จำหน่าย ใน ภาคตะวันออก ด้วย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

วิธีที่ใช้ อาจนำไป พัฒนาต่อยอด สู่การผลิต ชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ ในการตรวจสอบหาการปนเปื้อนของไวรัส ได้พร้อมกัน และ อาจนำ ไปใช้ ในการพัฒนาวัคซีน ป้องกัน การติดเชื้อไวรัส ตับอักเสบ ชนิด เอ และไวรัส โรตาได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนา วิธีการทดสอบ เพื่อตรวจหา การปนเปื้อน จำลอง ของไวรัส ตับอักเสบ ชนิด เอ และโรตาไวรัส ในหอยทะเลสด ได้ พร้อมกัน ด้วย วิธี multiplex PCR และ nested PCR ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ มีความสะดวก รวดเร็ว มีความไว และความจำเพาะ ที่ อาจนำไปพัฒนาต่อยอด สู่การผลิตชุดทดสอบเชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้ ข้อมูล จาก การระบาด อาจนำไปใช้ ในการพัฒนาวัคซีน ป้องกันการติดเชื้อไวรัส ตับอักเสบ ชนิด เอ และ ไวรัสโรตาได้

บทที่ 2
เนื้อเรื่อง

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย (Materials)

Rotavirus external primers (VP7-F1, VP7-R952)

Rotavirus internal primers (VP7-F1, VP7-F397)

Hepatitis A virus external primers (HAV-F230, HAV-R991)

Hepatitis A virus internal primers (HAV-F354, HAV-R674)

GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder marker (Thermo Scientific, USA)

6x DNA loading dye (Thermo Scientific, USA)

UltraPower DNA SafeDye 10000U (Gellex, Maestrogen, Taiwan)

Agarose Gel (GenePure LE)

SuperScript® III one-step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA)

Taq DNA polymerase (Thermo scientific, USA)

PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, USA)

GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies, Malaysia)

Qubit® RNA HS assay kit (Molecular Probes, Inc., USA)

QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)

Liquid nitrogen

วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

1. วิธี plaque assay

ไวรัสตับอักเสบชนิดเอนำมาเพาะเลี้ยงใน BSC-1 (An african green monkey kidney-derived cell line) ส่วน โรตาไวรัสนำมาเพาะเลี้ยงใน MA-104 (green monkey fetal kidney) cell lines ที่เพาะเลี้ยงก่อนล่วงหน้า 1 วันใน 6 well plate ด้วย MEM complete medium ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) ปริมาตร 2 ml ต่อหลุมบ่มไว้ใน 37°C, 5% CO_2 incubator จนเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวภาชนะเป็น monolayer ทำการล้างเซลล์ 2-3 ครั้ง ๆ ละ 2 ml ด้วย 1XMEM complete medium ที่ไม่มี FBS และพักไว้ จากนั้นทำการเจือจาง ไวรัสใน 1XMEM อัตราส่วน 1:10 โดยเริ่มจาก 10^{-1},10^{-2}, 10^{-3} ไปจนถึง 10^{-5} ส่วนwell ที่เติม medium ลงไปแทน การใส่ไวรัสลงไปใช้เป็น negative control (uninfected cells หรือ mock) แล้วนำ plate ไว้บน rocking platform ให้ของเหลวเคลื่อนที่เบา ๆ เป็นเวลา 1ชั่วโมง 30 นาที เพื่อให้ไวรัสมีการ adsorption และ infection เข้าไปภายในเซลล์ จากนั้นดูดของเหลวภายใน well ทิ้งทั้งหมดและเติม 2 ml overlayer MEM medium ที่ประกอบด้วย 10% FBS และ 1% gum tragacanth และ antibiotic นำ plate ไป incubate ใน 37°C , 5% CO_2 incubator จนมี plaque เกิดขึ้นหลังจากนั้นย้อม plaque ที่เกิดขึ้นโดย

การใส่สีผสมที่ประกอบด้วย 1% crystal violet ใน 10% formaldehyde solution ลงไปใน หลุม ๆ ละ 2 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงแล้วนำมาล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้แห้งและนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นโดยค่าที่ได้เป็นจำนวนอนุภาคของไวรัสที่มีในของเหลวต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรซึ่งมีหน่วยเป็น plaque forming unit(pfu)/มิลลิลิตร (ml)

2. การออกแบบ primers

Primer ทั้งหมดผ่านการออกแบบด้วยโปรแกรม package Bioedit โดยนำลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนต่างๆ ภายในจีโนมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอหรือไวรัสโรตาของ genotype ต่างๆ ที่มีอยู่ใน GenBank database มา alignment เพื่อหาบริเวณภายในยีนของไวรัสที่มีการอนุลักษณ์สูงมาก (highly conserved region) โดยใช้หลักเกณฑ์ของ GC content, melting temperature ที่ใกล้เคียงกัน และข้อควรคำนึงถึงคือ primer คู่ที่ใช้ขยายเพิ่มจำนวนจีโนมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอควรให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวของนิวคลิโอไทด์แตกต่างจากผลผลิตจากการขยายเพิ่มจำนวนจีโนมของไวรัสโรตาทั้งนี้เพื่อให้สามารถตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ได้

สำหรับ primer ที่ใช้ขยายสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาได้ออกแบบให้สามารถจับจำเพาะต่อยีน VP7 ที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนโครงสร้างของ capsid และให้ ampliconประมาณ 952 bp ส่วนไพรเมอร์สำหรับสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ มีความจำเพาะต่อยีน VP4 ซึ่งเป็น capsid ของเชื้อไวรัส โดยมีขนาดของ amplicon ประมาณ 762 bp

นอกจากนี้ยังออกแบบ internal primer เพื่อใช้ในปฏิกิริยา nested PCR โดยสามารถจับภายใน cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR สำหรับ Primer ที่ออกแบบมาทั้งหมดต้องผ่านการตรวจสอบการทำปฏิกิริยาระหว่างคู่ของ primer ด้วยกันเองและการทำปฏิกิริยาระหว่าง primer ต่างคู่กันเพื่อป้องกันการเกิด primer dimer โดย primer สำหรับเชื้อไวรัสโรตาจะให้ amplicon ขนาด ประมาณ 397 bp และสำหรับเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ จะมีขนาดของ amplicon ประมาณ 321 bp ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ของ primers แสดงดังตารางที่ 3.1

3. การสกัด RNA ออกจาก virion

นำไวรัสตับอักเสบชนิดเอจาก stock หรือของเหลวที่สกัดมาจากหอยนางรมสดมาสกัด RNA ออกจาก HAV virion ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, Germany)โดยนำปริมาตร200 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 ที่อยู่ใน collection tube แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นเติม 500 µl Inhibitor removal buffer แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาทีทิ้งส่วนของ filtrate และทำการล้างด้วย 450 µl Wash buffer ทั้งหมด 2 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งจะนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาที เมื่อเสร็จจากการล้างครั้งที่ 2 แล้วจะ centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 13,000xg นาน 20 วินาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นเปลี่ยน collection tube ใหม่แล้วเปิดฝา column ทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อให้ wash buffer ระเหยออกไป ตามคำแนะนำ

ที่มากับชุดน้ำยาสำเร็จรูป จากนั้น elute ด้วย 40 µl Elution buffer แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000xg นาน 1 นาทีเก็บส่วนของ filtrate ซึ่งเป็นส่วนที่มี viral RNA อยู่นำมาแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 5 µl เก็บไว้ที่ -80°C เพื่อไว้ทำปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

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

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

4. การตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี monoplex PCR และ multiplex RT-PCR

นำคู่ต่างๆ ของ primer ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบชนิดเอหรือไวรัสโรตามาประเมินประสิทธิภาพทางด้านความไวเมื่อใช้ในปฏิกิริยา monoplex- และ multiplex RT-PCR โดยใช้ template เป้าหมายเพียงหนึ่งชนิดในปฏิกิริยาที่มี primer คู่ที่จำเพาะ 1 คู่ และ ใช้ template ที่เป็นสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิด

พร้อมกันในปฏิกิริยาที่มี primer คู่ที่จำเพาะ 2 คู่ ตามลำดับและผันแปรความเข้มข้นของอาร์เอนเอจีโนมของไวรัสแต่ละชนิดที่บริสุทธิ์ ด้วยการเจือจาง 10 เท่าจากความเข้มข้นของสารพันธุกรรมเริ่มต้น และนำมาทดสอบในปฏิกิริยา monoplex RT-PCR (ตารางที่ 3.2) หรือ multiplex RT-PCR (ตารางที่ 3.3) ด้วยสภาวะที่แนะนำมาพร้อมกับชุดทดสอบ(SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq, Invitrogen, USA) (ตารางที่ 3.4) โดยการทดลองทั้งหมดใช้ dH_2O เป็น negative control สำหรับผลที่ได้จากปฏิกิริยาถูกวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบ ความยาวของนิวคลิโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA)

ตารางที่ 3.2: การทำปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR

Components	1 reaction (25 µl)	Final conc.
DEPC (RNase-Free water)	5.5	-
2X reaction mix	12.5	1X
5 mM $MgSO_4$	2.0	2 mM
10 µM External forward primer ของเชื้อไวรัส Rotavirus (VP7-F1)หรือ Hepatitis A virus (HAV-F230)	1.0	0.4 µM
10 µM External reverse primer ของเชื้อไวรัส Rotavirus (VP7-R952) หรือ Hepatitis A virus (HAV-R674)	1.0	0.4 µM
SuperScript® III RT-PCR/ with Platinum® *Taq* mix	2.0	-
RNA template ของเชื้อไวรัส Rotavirus หรือ Hepatitis A virus	1.0	-

5. การทดสอบความจำเพาะของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี nested PCR

นำ 1 µl ของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา multiplex PCR หรือ monoplex PCR มาทำ ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 25 µl (ตารางที่ 3.5) ด้วยสภาวะที่เหมาะสม (ตารางที่ 3.6) โดยใช้ internal primer ที่ออกแบบไว้ (ตารางที่ 3.1) ในการทดสอบใช้ dH_2O เป็น negative control ผลที่ได้จากปฏิกิริยาทั้ง multiplex และ monoplex RT-PCR จะถูกวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบความยาวของนิวคลิโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA)

ตารางที่ 3.3: การทำปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR

Components	1 reaction (25 µl)	Final conc.
DEPC (RNase-Free water)	3.5	-
2X reaction mix	12.5	1X
5 mM $MgSO_4$	2.0	2 mM
10 µM Rotavirus external forward primer (VP7-F)	2.0	0.4 µM
10 µM Rotavirus external reverse primer (VP7-R952)	1.0	0.4 µM
10 µM Hepatitis A virus external forward primer (HAV-F230)	0.5	0.2 µM
10 µM Hepatitis A virus external reverse primer (HAV-R991)	0.5	0.2 µM
SuperScript® III RT-PCR/ with Platinum® *Taq* mix	1.0	-
Rotavirus RNA template	2.0	-
Hepatitis A virus RNA template	1.0	-

6. ความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ บริสุทธิ์ด้วยปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR และ Nested-PCR

การหาความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรม บริสุทธิ์ด้วยปฏิกิริยา monoplex RT-PCR และปฏิกิริยา Nested-PCR สามารถทดสอบด้วยการนำ โดย genomic RNA ของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอที่มีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 33.0 และ 6.21 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับโดย genomic RNA แต่ละชนิดนำมาเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่า จาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} และนำ genomic RNA แต่ละความเข้มข้นมาทดสอบหาความไวของปฏิกิริยา monoplex RT-PCR ซึ่งหมายถึงปริมาณ genomic RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบแถบ cDNA ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปผ่านการ

สกัดให้บริสุทธิ์ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ก่อนนำไปทดสอบต่อด้วยวิธี nested PCR ต่อไปเพื่อตรวจสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้

ตารางที่ 3.4: สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

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

* Annealing temperature = Tm primers-5 °C

** Extension time 1min/kb

7. ความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ บริสุทธิ์ด้วยปฏิกิริยา multiplex RT-PCR และ Nested-PCR

การหาความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ บริสุทธิ์ด้วยปฏิกิริยา multiplex RT-PCR นั้นเริ่มจากการนำ genomic RNA ของไวรัสแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 33.0 และ 6.21 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับมาปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากันคือ 6.21 ng/µl ก่อนแล้วนำ genomic RNA แต่ละชนิดมาเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่าจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} ก่อนนำมาใช้ในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR โดยใช้อัตราส่วนระหว่างไวรัสโรตาต่อไวรัสตับอักเสบเอ ตามลำดับ ดังนี้ 10^{2}: 10^{2}, 10^{2}: 10^{-5}, 10^{-1}: 10^{-4}, 10^{-2}: 10^{-3} และ 10^{-3}: 10^{-2}และตรวจหาปริมาณ RNA ที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบแถบ cDNA ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นนำ cDNA ที่ได้ไปผ่านการสกัดให้บริสุทธิ์ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ก่อนนำไปทดสอบต่อด้วยวิธี nested PCR ต่อไปเพื่อตรวจสอบความไวและความจำเพาะของผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้

8. การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea commercialis*) ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บมาจากแหล่งเพาะเลี้ยงในชายฝั่งภาคตะวันออกทั้งหมด 3 แหล่ง จำนวนทั้งหมด 41 ตัวอย่าง คือ จังหวัดชลบุรี จำนวน 32 ตัวอย่าง,

จังหวัดจันทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง และจังหวัดระยอง จำนวน 4 ตัวอย่างเป็นเวลาทั้งหมด 4 เดือนตั้งแต่ช่วงเดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2556 โดยหอยนางรมที่เก็บมาจะถูกแยกเอาส่วนทางเดินอาหารของหอยนางรม (gastrointestinal tract) แยกเก็บไว้เป็นหลอดทดลอง น้ำหนักหลอดละ 1.5 กรัมจากหอยจำนวน 3-5 ตัวที่คิดเป็น 1 ตัวอย่าง ทั้งนี้เพิ่มโอกาสในการหาการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส โดยเก็บตัวอย่างหอยไว้ที่ -80 °C จนกว่าจะนำมาทำการสกัดของเหลวเพื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

ตารางที่ 3.5: การทำปฏิกิริยา Nested PCR

Components	1 reaction (25 µl)	Final conc.
Nuclease-Free water	6.5	-
10X *Taq* buffer	2.5	1X
2 mM dNTPs mix	2.5	0.2 mM
25 mM $MgCl_2$	2.0	2.0 mM
10 µM Rotavirus interternal forward primer (VP7-F)	2.5	1.0 µM
10 µM Rotavirus internal reverse primer (VP7-R397)	2.5	1.0 µM
10 µM Hepatitis A virus internal forward primer (HAV-F354)	2.5	1.0 µM
10 µM Hepatitis A virus internal reverse primer (HAV-R674)	2.5	1.0 µM
Taq DNA polymerase (500 U) 5U/µl	0.5	2.5
DNA template (Purified RT-PCR product)	1.0	-

9. การปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสในเนื้อหอยนางรมสด

นำเอาเฉพาะส่วนทางเดินอาหารของหอยนางรมตัวอย่างปริมาณ 1.5 กรัม (ใช้หอยนางรมประมาณ 3-4 ตัว) มาบ่มกับเชื้อไวรัส HAV stock strain HM-175/187 หรือไวรัสโรตาที่มีความเข้มข้น 2.4×10^{6} PFU/ml (undiluted) และ 3×10^{6} PFU/ml ตามลำดับ หรือนำมาเจือจางในอัตราส่วนสิบเท่าจาก 10^{-1} ถึง 10^{-5} ปริมาตร 10 µl ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนดำเนินการสกัดของเหลวจากหอยนางรมในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.6: สภาวะในการทำปฏิกิริยา Nested PCR

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

* Extension time 1min/kb

10. การสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมสด

การสกัดไวรัสจากหอยนางรมสดจากที่มีการจำลองการปนเปื้อนหรือหอยตามธรรมชาตินั้นใช้วิธีตกตะกอนด้วย Glycine-Arginine-PEG ที่ดัดแปลงมาจากวิธีเดิมบ้างเล็กน้อย (Beuret et al, 2003) โดยนำตัวอย่างหอยนางรมสดที่ได้ทำการปนเปื้อนจำลองหรือจากธรรมชาตินำมาราดด้วยไนโตรเจนเหลวจนกลายเป็นของแข็ง ทำการบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้ว และทำ homogenize ต่อ ด้วยเครื่อง 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 เพื่อทดสอบความไวของปฏิกิริยา RT-PCR ต่อไป

11. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตจากปฏิกริยา nested PCR และวิเคราะห์หา genotypeของไวรัสที่พบในหอยนางรม

ผลผลิตจากปฏิกิริยา nested PCR จะถูกนำสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNAs equencing ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดใน GenBank และ EMBL โดยใช้ PubmedNCBI BLAST program

ผลการวิจัย

1. การทดสอบ primer ที่ออกแบบเพื่อใช้ในปฏิกิริยาRT-PCR

External Primer ที่ได้รับการออกแบบเพื่อใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR จะถูกนำมาทดสอบถึงความสามารถในการจับจำเพาะกับ genomic RNA เป้าหมาย ผลจากการวิเคราะห์ขนาดของ cDNA ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยาพบว่า คู่ของ primer VP7-F1และ VP7-R952 ที่ใช้จับกับ genomic RNA ของโรตาไวรัสให้ขนาดแถบของ DNA ประมาณ 952 bp (รูปที่ 4-1A, lane 2) และ คู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 ใช้จับกับ genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอให้ขนาดแถบของ DNA ประมาณ 762 bp (รูปที่ 4-1B, lane 2) ซึ่งมีขนาดตามที่คาดไว้ จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า external primer ทั้งสองคู่สามารถนำมาใช้ปฏิกิริยา RT-PCR ได้

2. การทดสอบความความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาหรือไวรัสตับอักเสบเอด้วยวิธี monoplex RT-PCR

Primer ที่ผ่านการทดสอบว่าสามารถจับจำเพาะกับ genomic RNA เป้าหมาย ได้ถูกนำมาใช้ในปฏิกิริยา monoplex RT-PCR เพื่อทดสอบหาความไวในการเพิ่มขยายปริมาณ RNA เป้าหมายทีละชนิด จากผลการทดลองพบว่า คู่ของ primer VP7-F1และ VP7-R952 มีความสามารถในการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมของโรต้าไวรัสที่ถูกเจือจางสูงสุดที่ 10^{-2}หรือมีปริมาณ RNA ประมาณ 0.66 ng (รูปที่ 4-2A, lane 4) และ คู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 มีความสามารถในการเพิ่มขยายปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ถูกเจือจางสูงสุดที่ 10^{-3} หรือมีปริมาณ RNA ประมาณ 12.42 pg (รูปที่ 4-2B, lane 5) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า คู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991มีความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอได้ดีกว่าคู่ของ primer VP7-F1และ VP7-R952 ที่ใช้จับกับสารพันธุกรรมของโรตาไวรัส

3. การทดสอบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอด้วยปฏิกิริยา Multiplex RT-PCR

การทดสอบความไวในปฏิกิริยา multiplex RT-PCR ด้วยการใช้ primer ของโรต้าไวรัสมากกว่าไวรัสตับอักเสบชนิดเอ 2 เท่าและปรับความเข้มข้นของสารพันธุกรรมของไวรัสโรต้าให้เท่ากัน จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยา multiplex RT-PCR สามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิดได้ความเข้มของแถบ cDNAใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4-3, lane 2) แต่เมื่อเจือจางสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งสองจนถึงที่สุดพบว่าปฏิกิริยาสามารถเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของโรต้าไวรัสและไวรัสตับอักเสบชนิดเอปริมาณน้อยที่สุดที่ 0.1224 ng และ 12.24 pg ตามลำดับ (รูปที่ 4-3, lane 5) อย่างไรก็ตามหากสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดใดมีน้อยกว่าค่าความไวจะไม่สามารถขยายเพิ่มจำนวนได้ดังจะสังเกตได้จากการใช้สารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอที่น้อยกว่าค่าความไวจะพบเพียงแถบ cDNA ของไวรัสโรต้าเท่านั้น (รูปที่ 4-3, lane 3 และ 4) ซึ่งเกิดขึ้นในทำนองเดียวกับใช้สารพันธุกรรมของไวรัสโรต้า(รูปที่ 4-3, lane 6)

4. การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรตาหรือไวรัสตับอักเสบ เอ ที่ปนเปื้อนจำลองในตัวอย่างหอยนางรมสดด้วยวิธี Monoplex RT-PCR และวิธี Nested-PCR

จากการปนเปื้อนจำลองด้วยเชื้อไวรัสโรตาไวรัสหรือไวรัสตับอักเสบในหอยนางรมสดและทดสอบความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสแต่ละชนิดพบว่าวิธี monoplex RT-PCR มีความไวของสารพันธุกรรมจากหอยที่ปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสตับอักเสบเอที่ 16 PFU/g ของเนื้อหอย (รูปที่ 4-4A, lane 8)โดยสังเกตจากแถบของ cDNA ผลผลิตของปฏิกิริยาที่ปรากฏเป็นแถบชัดเจน และเมื่อทดสอบต่อด้วยปฏิกิริยา nested PCR พบแถบ DNA ปรากฏที่ 1.6 PFU/gของเนื้อหอย (รูปที่ 4-4B, lane 9) อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบความไวในการปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสโรตากลับไม่ปรากฏแถบ cDNA แต่พบเพียงsmear band ปรากฏ (รูปที่ 4-5A) อย่างไรก็ตามเมื่อนำ cDNA มาทำปฏิกิริยา nested PCR ต่อ กลับพบแถบ DNA อย่างชัดเจนเมื่อมีการเจือจางสารพันธุกรรมสูงสุดที่10^{-4}หรือมีการปนเปื้อนโรตาไวรัสในเนื้อหอยที่ 2 PFU/g (รูปที่ 4-5B, lane 7) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปฏิกิริยา nested PCR สามารถเพิ่มความไวของผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ได้ อย่างน้อย 10 เท่า และยังสามารถยืนยันความจำเพาะของผลผลิตที่ได้ด้วย

5. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ จากตัวอย่างหอยนางรมจากแหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกโดยวิธี Multiplex RT-PCR และ Nested-PCR

จากผลการวิเคราะห์หอยนางรมที่ถูกเก็บมาจากแหล่งต่างๆ ของชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก โดยมีการจัดเก็บเป็น 2 ชุดจำนวนหอยนางรมทั้งสิ้น 41 ตัวอย่างด้วยปฏิกริยา multiplex RT-PCR ทุกๆ ตัวอย่างไม่พบแถบ cDNA เกิดขึ้น แต่พบเพียง smear band ในตัวอย่างที่เก็บชุดที่ 1 (รูปที่ 4-6 A และ B) และชุดที่ 2 (รูปที่ 4-8 A และ B) เมื่อนำผลผลิตที่ได้ไปทำปฏิกิริยา nested PCR ต่อไปเพื่อยืนยันว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส (รูปที่4-7และ 4-9) พบว่าบางตัวอย่างเกิดแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 952 bp จำนวน 1 แบน ในตัวอย่างที่เก็บชุดที่ 1 ได้แก่ จากจังหวัดชลบุรี 1, 2, 3, 4, และ 5 ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตา (รูปที่ 4-7 A, lane 4-8 และแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 762 bp จำนวน 1 แบน ในตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี

7 และจังหวัดระยอง 2 (รูปที่4-7 A, lane 10 และ 13 ตามลำดับ) ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ และไม่พบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายในตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี 6, 8 จังหวัดระยอง 1, 3, 4 (รูปที่4-7 A, lane 9,11,12,14 และ 15) และจากจังหวัดจันทบุรีเลย(รูปที่4-7 B)

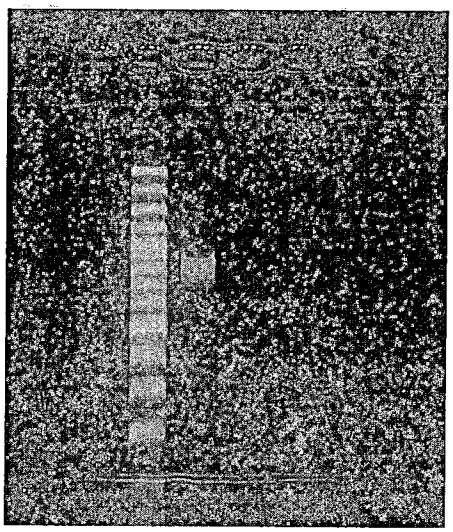
สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพันธุกรรมของไวรัสในหอยที่เก็บจากตัวอย่างหอยนางรมชุดที่ 2 พบก็ให้เป็นไปในทำนองเดียวกัน โดยพบแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 952 bp จำนวน 1 แบนในตัวอย่างจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี 2, 3, 9 (รูปที่4-9 A, lane 5,6 และ12) และจากสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี 2 (รูปที่4-9 B, lane 5) ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตาและแบนของดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 762 bp จำนวน 1 แบนในตัวอย่างจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี 1, 11, 12 (รูปที่4-9 A, lane 4, 14 และ 15) และสะพานปลาอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (รูปที่4-9 B, lane 4, 6, 8,9,10,11, 12, 13และ 14) ที่คาดว่าน่าจะมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ และพบแบนดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 2 แบน ในตัวอย่างจากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี 4, 5, 6 (รูปที่4-9 A, lane 7, 8 และ 9) แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีการปนเปื้อนทั้งเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอ ส่วนตัวอย่างที่เหลือไม่พบแถบของดีเอ็นเอเป้าหมาย จากการตรวจสอบทั้งหมดจากตัวอย่างหอยนางรม 2 ชุด รวมทั้งหมด 41 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสโรตาเท่านั้นคิดเป็น 21.95% (9/41 ตัวอย่าง), ผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอเท่านั้นคิดเป็น 34.15% (14/41 ตัวอย่าง) และผลการทดสอบบวกทั้งเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ 7.32% (3/41 ตัวอย่าง) และผลการทดสอบลบ 36.58% (15/40 ตัวอย่าง)

6.การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตจากปฏิกริยา Nested PCR และวิเคราะห์หา genotype ของไวรัสที่พบในหอยนางรม

เมื่อนำแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดไปสกัดออกจาก agarose gel และนำไปทดสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสทั้งสองชนิดจริงเมื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยโรตาไวรัสเป็น genotype G1[8]ทั้งหมด (รูปที่ 4-10) แต่ไม่สามารถบอก genotype ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอได้เนื่องจากบริเวณที่เพิ่มขยายสารพันธุกรรมไม่ใช่บริเวณที่ใช้แยก genotype ของไวรัสชนิดนี้

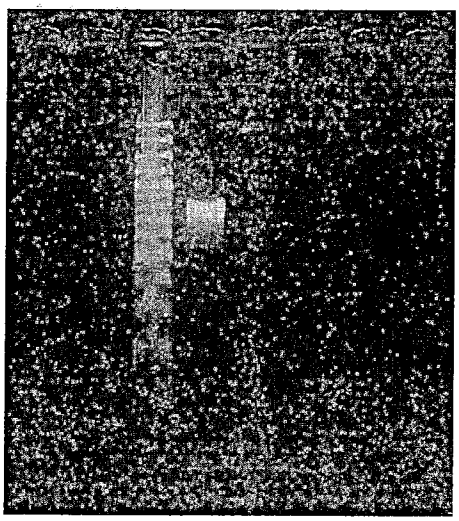
A. ไวรัสโรตา

1 2 3



B. ไวรัสตับอักเสบเอ

1 2 3



รูปที่ 4.1:ขนาดของ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา monoplex RT-PCR

A. ไวรัสโรตา

B. ไวรัสตับอักเสบเอ

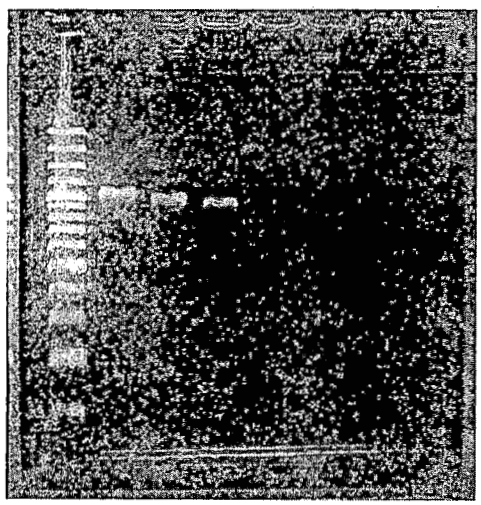
Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : viral genomic RNA

Lane 3 : Negative control (น้ำ)

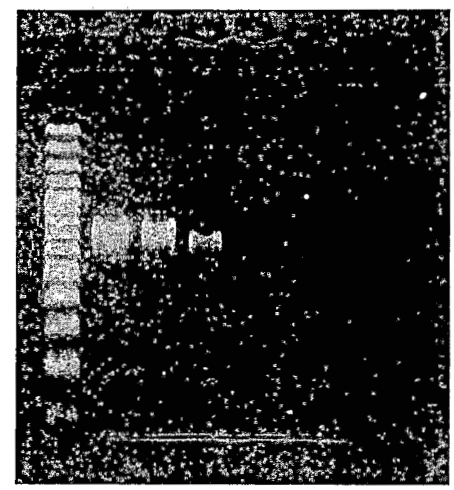
A. ไวรัสโรต้า

1 2 3 4 5 6 7 8



B. ไวรัสตับอักเสบเอ

1 2 3 4 5 6 7 8



รูปที่ 4.2: ความไวของปฏิกิริยา monoplex RT-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่า

A. ไวรัสโรต้า

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Undiluted RNA Rotavirus (66 ng)

Lane 3-Lane 7 : Diluted RNA virus 10^{-1} ถึง 10^{-5}(6.6 ng, 0.66 ng, 66 pg, 6.6 pg, 0.66 pg, ตามลำดับ)

Lane 8 : Negative control (น้ำ)

B. ไวรัสตับอักเสบเอ

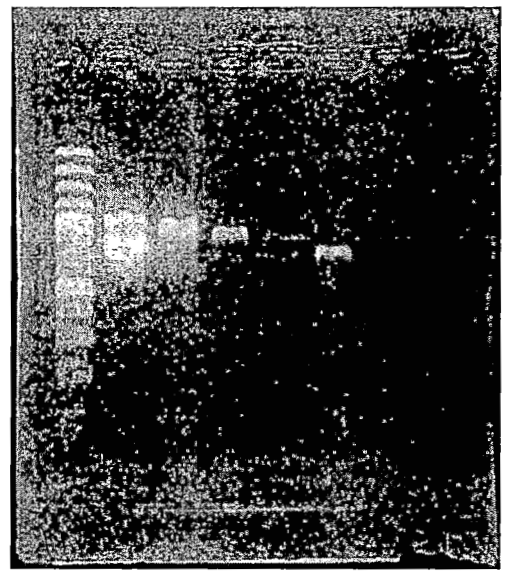
Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Undiluted RNA Hepatitis A virus (12.42ng)

Lane 3-Lane 7 : Diluted RNA virus 10^{-1}ถึง 10^{-5}(1.242ng, 0.1242ng, 12.42 pg, 1.242 pg, 0.1242 pg ตามลำดับ)

Lane 8 : Negative control (น้ำ)

1 2 3 4 5 6 7



รูปที่ 4.3: ความไวของปฏิกิริยา Multiplex RT-PCRในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 10 เท่า

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : 10^{-2} , 10^{-2} (12.42 ng ,12.42ng)

Lane 3 : 10^{-2} ,10^{-5} (12.42ng , 0.1242 pg)

Lane 4 : 10^{-1}, 10^{-4} (1.242ng ,1.242 pg)

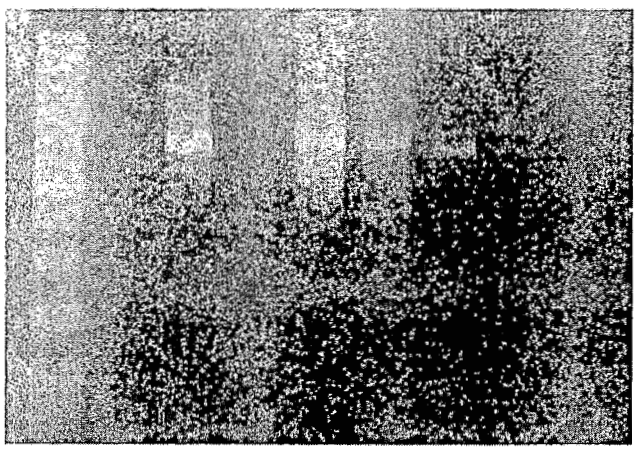
Lane 5 : 10^{-2}, 10^{-3}(0.1242ng ,12.42 pg)

Lane 6 : 10^{-3}, 10^{-2} (12.42 pg ,0.1242ng)

Lane 7 : Negative control (น้ำ)

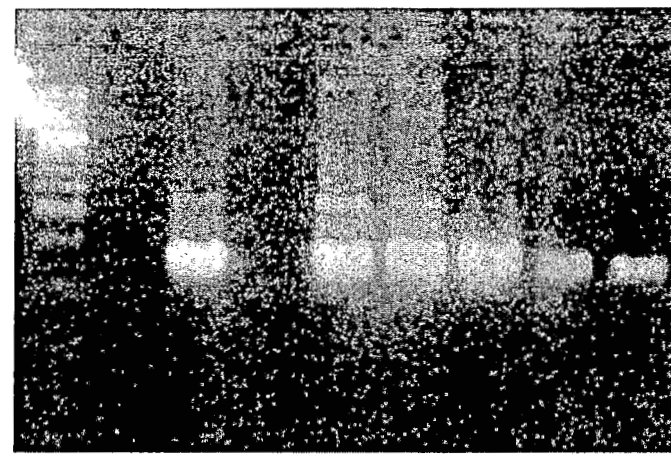
A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



B.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



รูปที่ 4.4: การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรม

A. วิธี Monoplex RT-PCR

Lane 1: 100 bp Marker

Lane 2 : Negative Control (น้ำ)

Lane 3 : Positive Control (purified genomic RNA HAV)

Lane 4 : Uninfected oysters

Lane 5 : Undiluted HAV (16,000 PFU/g)

Lane 6-Lane 9 : HAV ที่ถูกเจือจาง 10 เท่า (1,600, 160, 16, 1.6 PFU/gตามลำดับ)

B. Nested-PCR

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Negative Control (น้ำ)

Lane 3 : Positive Control (purified cDNA HAV)

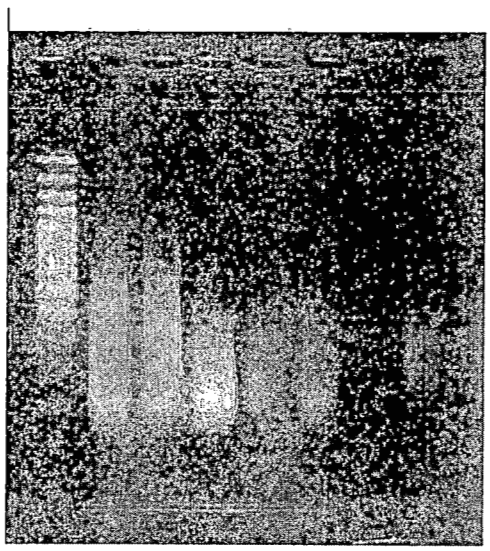
Lane 4 : Uninfected oysters

Lane 5 : cDNA จาก Undiluted HAV

Lane 6-Lane 9 : cDNA HAV ที่ถูกเจือจาง 10 เท่า (1,600, 160, 16, 1.6 PFU/gตามลำดับ)

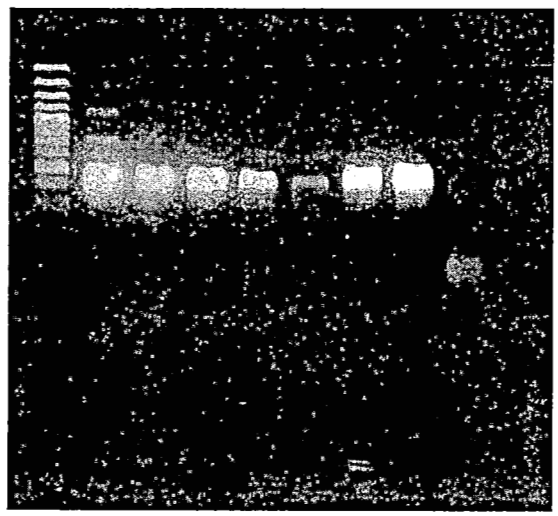
A

1 2 3 4 5 6 7 8



B.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



รูปที่ 4.5:การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรตาที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรม

A. Monoplex RT-PCR

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : undiluted Rotavirus (20,000 PFU/g)

Lane 3- Lane 6 : Rotavirus ที่ถูกเจือจาง 10 เท่า (2000, 200, 20, 2 PFU/g, ตามลำดับ)

Lane 7 : Negative control (น้ำ)

Lane 8 : uninfected oysters

B. Nested PCR

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive Control (purified cDNA Rotavirus)

Lane 3 : cDNA จาก undiluted Rotavirus (20,000 PFU/g)

Lane 4- Lane 7 : cDNA Rotavirus ที่ถูกเจือจาง 10 เท่า (2000, 200, 20, 2 PFU/g, ตามลำดับ)

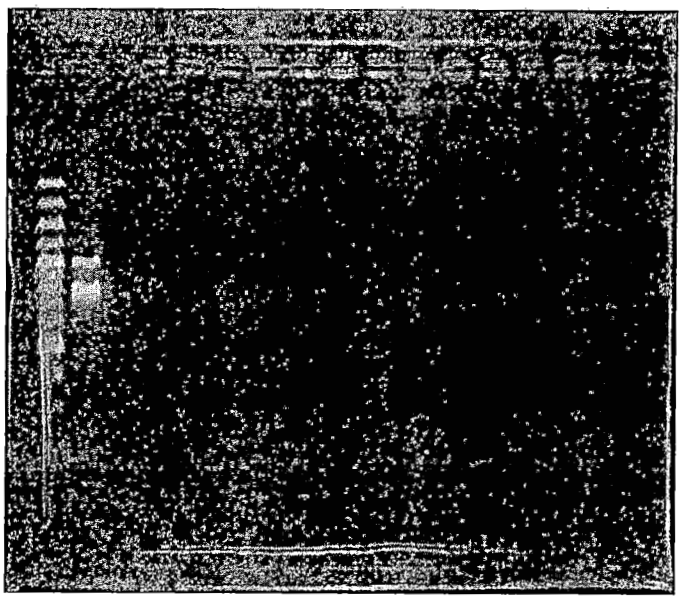
Lane 8- Lane 9 : uninfected oysters

Lane 10: Negative control (น้ำ)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131
615.95293
ค 858ก

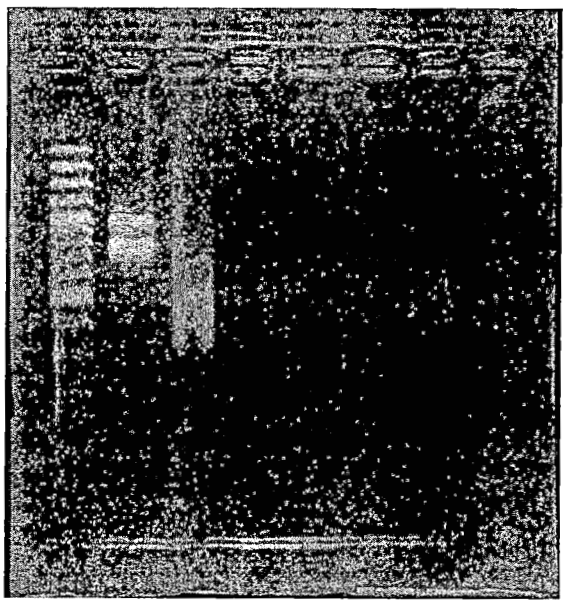
A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



B.

1 2 3 4 5 6 7 8



รูปที่ 4.6: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR จากตัวอย่างชุดที่1

A. **ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง**

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 :Positive controlจาก multiplex RT-PCR

Lane 3- Lane 10: ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี 1-8, ตามลำดับ)

Lane 11- Lane 14: ตัวอย่างจากจังหวัดระยอง 1-4, ตามลำดับ)

Lane 15: Negative control (น้ำ)

B. **ตัวอย่างจากจังหวัดจันทบุรี**

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive control จาก multiplex RT-PCR

Lane 3- Lane 7 : ตัวอย่างที่ 1- 5, ตามลำดับ)

Lane 8 : Negative control (น้ำ)

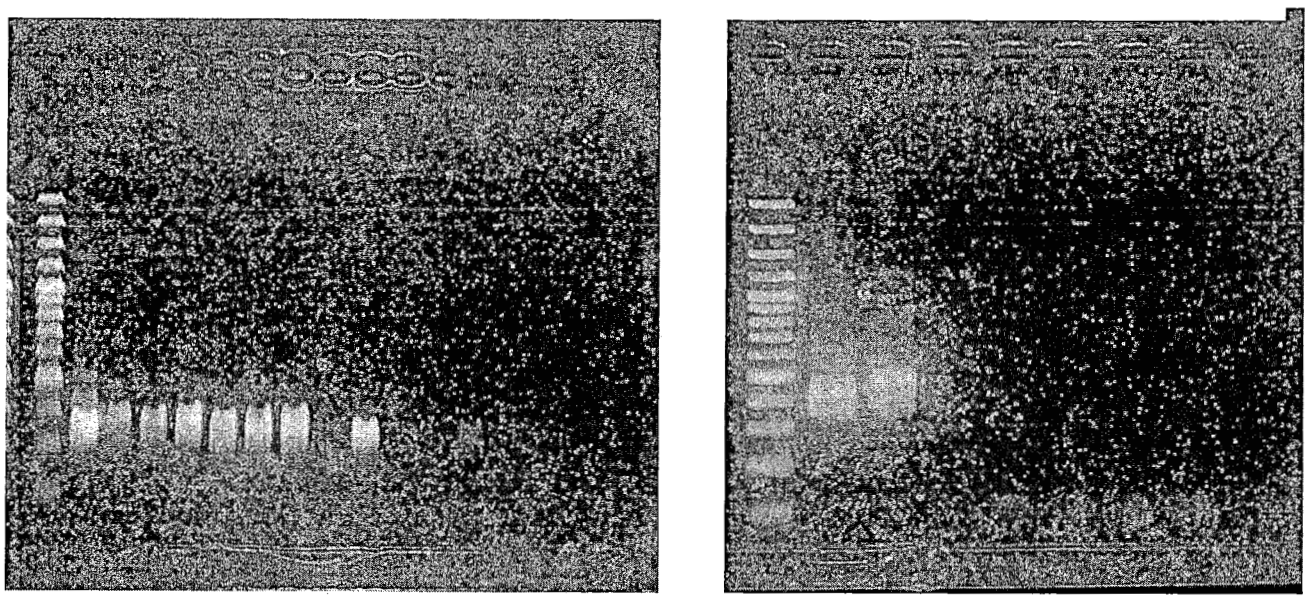
355584

A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

B.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



รูปที่ 4.7: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ ด้วยวิธี Nested-PCR จากตัวอย่างชุดที่1 ของหอยนางรม

A. **ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี และจังหวัดระยอง**

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive control HAV (purified cDNA HAV)

Lane 3 : Positive control Rotavirus (purified cDNA Rotavirus)

Lane 4- Lane 11: ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี1-8, ตามลำดับ)

Lane 12- Lane 15: ตัวอย่างจากจังหวัดระยอง1-4, ตามลำดับ)

Lane 16: Negative control (น้ำ)

B. **ตัวอย่างจากจังหวัดจันทบุรี**

Lane 1 : Marker

Lane 2 : Positive control HAV (purified cDNA HAV)

Lane 3 : Positive control Rotavirus (purified cDNA Rotavirus)

Lane 4- Lane 8: ตัวอย่างที่ 1- 5, ตามลำดับ)

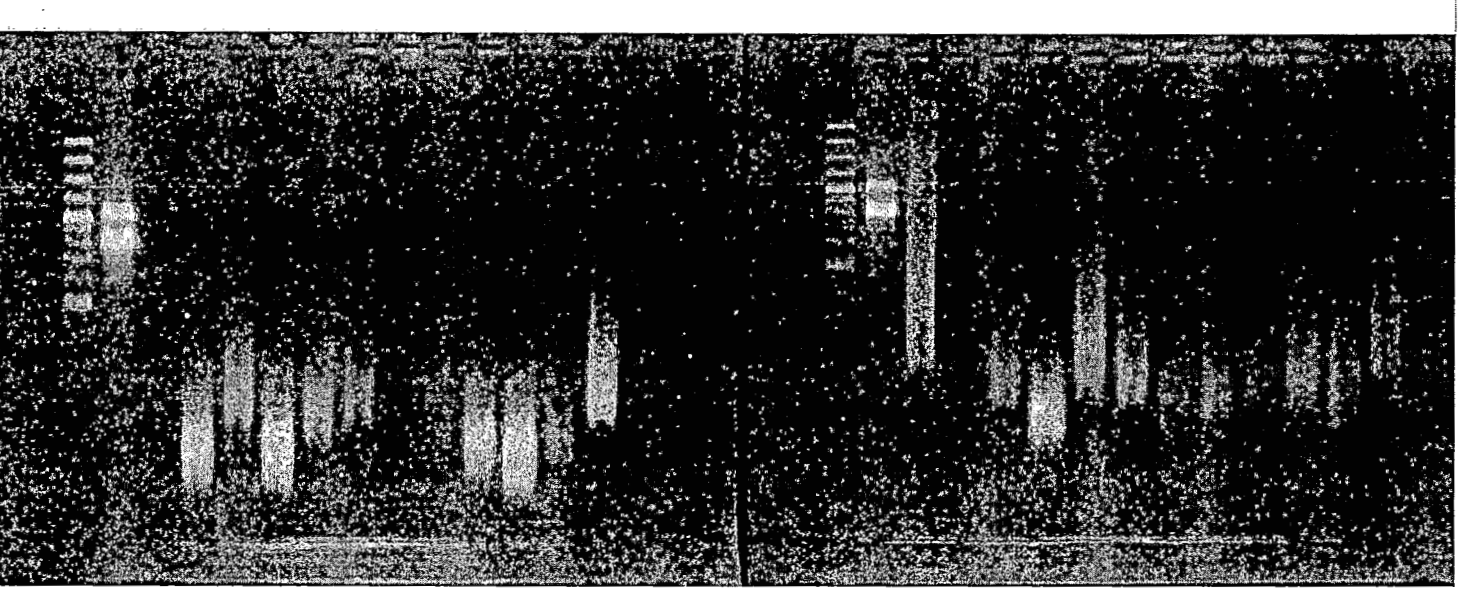
Lane 9 : Negative control (น้ำ)

A

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

B.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



รูปที่ 4.8: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ ด้วยวิธี Multiplex RT-PCR จากตัวอย่างชุดที่ 2 ของหอยนางรมจากจังหวัดชลบุรี

A. **ตัวอย่างจากตลาดหนองมน**

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive multiplex (Genomic RNA Rotavirus and HAV)

Lane 3-Lane 14: ตัวอย่างที่ 1-12, ตามลำดับ

Lane 15: Negative control (น้ำ)

B. **ตัวอย่างจากอ่างศิลา**

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive multiplex (Genomic RNA Rotavirus and HAV)

Lane 3- Lane 14: ตัวอย่างที่ 1- 12, ตามลำดับ

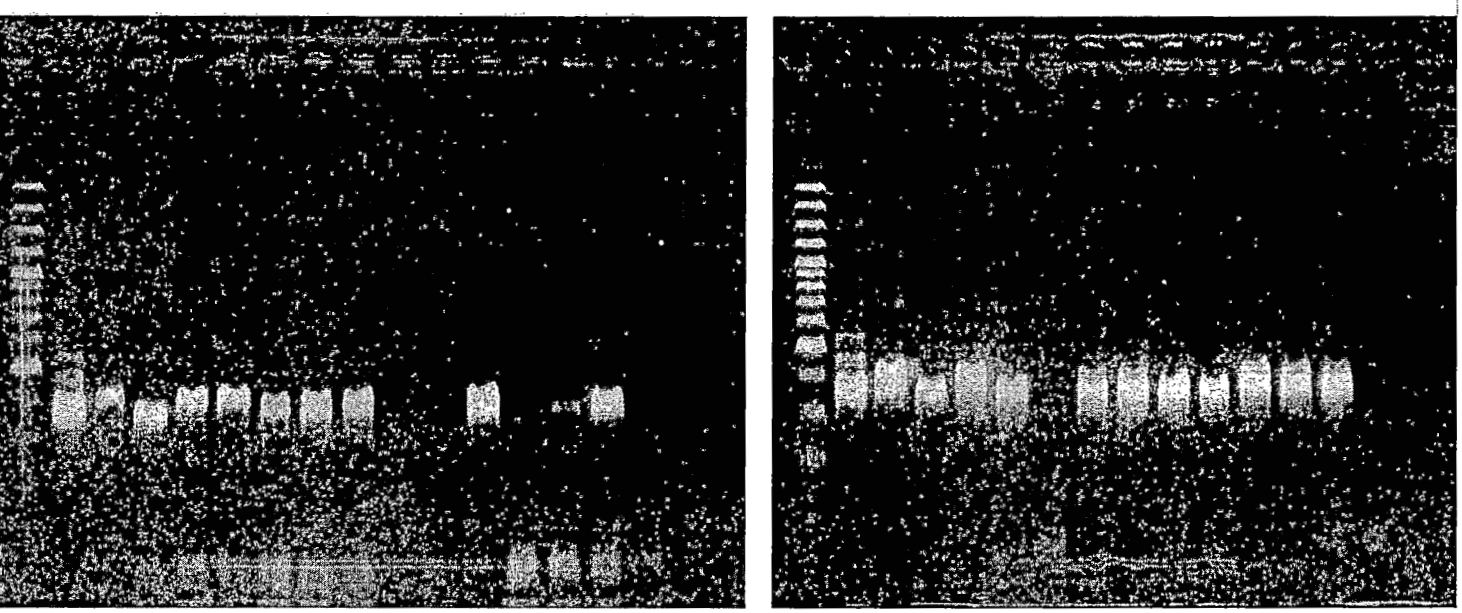
Lane 15: Negative control (น้ำ)

A.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

B.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



รูปที่ 4.9: การตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ ด้วยวิธี Nested-PCR จากตัวอย่างชุดที่2ของหอยนางรมจากจังหวัดชลบุรี

A. **ตัวอย่างจากตลาดหนองมน**

Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive control HAV (purified cDNA HAV)

Lane 3 : Positive control Rotavirus (purified cDNA Rotavirus)

Lane 4-Lane 15 : ตัวอย่างที่ 1-12, ตามลำดับ)

Lane 16: Negative control (น้ำ)

B. **ตัวอย่างจากอ่างศิลา**

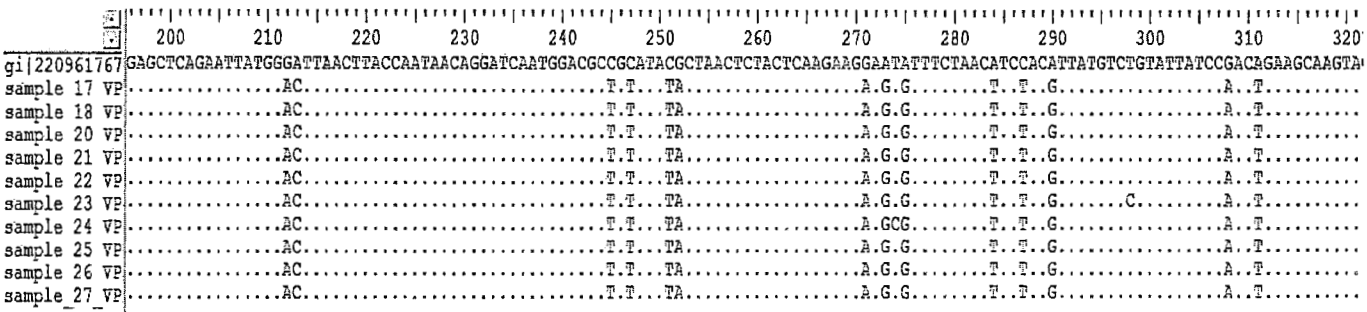
Lane 1 : 100 bp Marker

Lane 2 : Positive control HAV (purified cDNA HAV)

Lane 3 : Positive control Rotavirus (purified cDNA Rotavirus)

Lane 4- Lane 15: ตัวอย่างที่ 1-12, ตามลำดับ)

Lane 16: Negative control (น้ำ)



รูปที่ 4.10ผลการ Alignment เทียบกับ Reference sequence

Human rotavirus A strain 0613158-CA VP7 (VP7) gene, complete cds (GenBank: EU984109.1)

บทที่ 3
อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

เชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอ เป็นเชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารต่างๆ โดยเฉพาะหอยนางรมสดที่มีวิธีการกินอาหารด้วยกรองดักอาหารที่อยู่ในน้ำและสะสมไว้ในกระเพาะอาหาร หอยนางรมจึงอาจเป็นแหล่งสะสมของเชื้อก่อโรคได้หากมีการเพาะเลี้ยงในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนด้วยสิ่งปฏิกูลจากมนุษย์ การที่เชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารมีความคงทนในธรรมชาติเป็นเวลานานประกอบกับพฤติกรรมการบริโภคหอยนางรมแบบสดๆ หรือแบบดิบๆสุกๆ ที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสจากการบริโภคหอยนางรมสดได้

การตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสดก่อนถึงผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามการตรวจหาการปนเปื้อนยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสในหอยนางรมอาจมีปริมาณที่น้อยมาก วิธีที่ใช้ตรวจจึงต้องมีความไวสูงจึงจะสามารถตรวจพบได้ ปัจจุบัน วิธี RT-PCR เป็นวิธีที่นิยมมากเพราะเป็นวิธีที่ง่ายและใช้เวลารวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดที่ ไม่สามารถตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้โดยตรงจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการสกัดเชื้อไวรัสออกจากหอยนางรมก่อนทั้งนี้เพื่อ concentrate อนุภาคของไวรัสที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดและเพื่อกำจัดสารที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของ RT-PCR ที่อาจให้ผลการตรวจเป็นผลลบปลอมได้และในทางตรงข้ามปฏิกิริยาของ RT-PCR อาจให้ผลบวกปลอมได้เช่นกันเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก จึงอาจมีการขยายเพิ่มจำนวนของสารพันธุกรรมอื่นที่ปนเปื้อน ถ้า primer ที่ออกแบบมาไม่มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมเป้าหมาย หรืออาจเกิด cross-contamination สารตัวอย่างด้วยสารพันธุกรรมชนิดเดียวกันได้ ดังนั้นวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR จึงควรยืนยันผลด้วยวิธีอื่นเสมอ

จากการทดสอบ primer ที่ออกแบบมาพบว่า External Primer คู่ของ primer VP7-F1และ VP7-R952 ที่ใช้จับกับ genomic RNA ของไวรัสโรตาและ HAV-F230 และ HAV-R991 ใช้จับกับ genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอให้ขนาดแถบของ DNA เป็นไปตามที่คาดไว้ประมาณ 952 bp และ762 bp ตามลำดับ(รูปที่ 4-1) จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า external primer ทั้งสองคู่มีความจำเพาะกับ genomic RNA เป้าหมายเนื่องจากถูกออกแบบให้จับที่บริเวณอนุลักษณ์ของยีนของไวรัสทั้งสองและได้มีการตรวจสอบผ่านการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI database แล้วว่าไม่จับกับไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารชนิดอื่นและสามารถใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR ได้ อย่างไรก็ตามการที่จะสามารถยืนยันว่า primer ทั้งคู่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสเป้าหมายจริงๆ ควรมีการยืนยันผลด้วยการทดสอบนำ primer ทั้งคู่ไปจับกับ food-borne virus ชนิดอื่นด้วย

จากการทดสอบความไวของ ปฏิกิริยา monoplex RT-PCR ในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมพบว่าคู่ของ primer HAV-F230 และ HAV-R991 ที่ใช้มีความสามารถในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบเอประมาณ 12.42 pg (รูปที่ 4-2B, lane 5) ซึ่งมีความไวมากกว่าคู่ของ primer VP7-F1และ VP7-R952 ที่ใช้กับสารพันธุกรรมของโรตาไวรัสที่ 0.66 ng (รูปที่ 4-2A, lane 4) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบที่พบว่าปฏิกิริยา multiplex RT-PCR มีความไวในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของโรต้าไวรัสและไวรัสตับอักเสบชนิดเอปริมาณน้อยที่สุดที่ 0.1224 ng และ 12.24 pg ตามลำดับ (รูปที่ 4-3, lane 5) โดยอาจกล่าวได้ว่า

ปฏิกิริยา multiplex RT-PCR มีความไวในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอได้ดีกว่าไวรัสโรต้าประมาณ 10 เท่า และถ้าใช้ปริมาณของสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองเท่ากันจะสามารถตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสทั้งสองชนิดได้ดีใกล้เคียงกันเมื่อใช้ primer ของไวรัสโรต้ามากกว่าไวรัสตับอักเสบชนิดเอ 2 เท่าจากผลการทดลองจะชี้ให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดและปริมาณ primerและปริมาณของสารพันธุกรรมเป้าหมาย เป็นต้น

จากผลการเปรียบเทียบความไวระหว่าง monoplex RT-PCR และ multiplex PCR พบว่า วิธี multiplex RT-PCR มีความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาได้ดีกว่าวิธี monoplex RT-PCR ที่ประมาณ 0.1242 ng และ 0.66 ng ตามลำดับ ส่วนของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอมีความไวเท่ากันทั้งสองวิธีที่สารพันธุกรรมประมาณ 12.42 pg ดังนั้นวิธี Multiplex RT-PCR จึงมีข้อดีกว่าวิธี Monoplex PCR ที่นอกจากมีความรวดเร็วในการตรวจและสามารถลดค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการตรวจได้แล้ว ยังมีความไวในการทดสอบดีกว่าวิธี Monoplex PCR ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Coelho et al.,2003 ; Freymuth et al.,2006; Kou et. al.,2008 ;Tsai et.al., 1994) ที่พบว่าวิธี Multiplex PCR ให้ผลในการตรวจการติดเชื้อไวรัสได้ดีกว่าวิธี Monoplex PCR

จากผลการทดสอบความไวในการตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมด้วยวิธี monoplex RT-PCR พบว่าเชื้อไวรัสโรตาที่ปนเปื้อนจำลองให้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่มีลักษณะเป็น smear band (รูปที่ 4-5A) ส่วนการทดสอบเชื้อไวรัสตับอักเสบเอที่ปนเปื้อนจำลองพบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 762 bp และมีความไวในการทดสอบเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้น 10^{-3} หรือคิดเป็นปริมาณไวรัส 16 PFU ต่อเนื้อหอย 1 กรัม (รูปที่ 4-4A) การเกิด smear band ที่เกิดขึ้นกับเชื้อไวรัสโรตานั้น อาจเกิดจากกระบวนการสกัดอนุภาคไวรัสจากเนื้อหอย หากสารเคมีที่ใช้ในการสกัดมีค่า pH ที่ไม่เหมาะสมหรือเทคนิคในการสกัดที่แตกต่างกันของผู้ปฏิบัติอาจทำให้สารพันธุกรรมของหอยปนเปื้อนอยู่มาก เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ที่ต้องมีใช้สีไปจับสารพันธุกรรมเพื่อส่องดูการเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ใช้อาจไปจับสารพันธุกรรมของหอยที่หลงเหลืออยู่ทำให้เกิดลักษณะ smear band ที่รบกวนการมองแถบ cDNA ผลิตผลของปฏิกิริยา RT-PCR ที่อาจมีปริมาณที่น้อยมาก แต่เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา Monoplex RT-PCR มาทำปฏิกิริยาต่อด้วยวิธี Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิดกลับพบว่ามีการปรากฏแถบของ cDNA ของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ โดยมีขนาดของนิวคลีโอไทด์ตามที่คาดไว้ประมาณ 397 bp และ 321 bp ตามลำดับ และมีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาอยู่ที่ความเข้มข้น ประมาณ 2 PFU/g (รูปที่ 4-5B) ส่วนความไวในการตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอได้น้อยที่สุดที่คิดเป็นปริมาณอนุภาคไวรัส 1.6 PFU/g เนื้อหอย (รูปที่ 4-4 B) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kittikul และคณะ (Kittigulet al., 2010) ที่พบว่าวิธี Nested-PCR สามารถเพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสโรตาได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Severini และคณะ (Severiniet al., 1993) ที่พบว่าปฏิกิริยา Nested-PCR เป็นวิธีที่ให้ความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมที่สูง เนื่องจากวิธี Nested-PCR เป็นวิธีการเพิ่มขยายจำนวน DNA 2 รอบ โดยนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาแรกมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อสร้างผลผลิตในปฏิกิริยาที่ 2 และยังสามารถใช้ยืนยันความจำเพาะของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกริยา RT-PCR ได้ด้วย

วิธี multiplex RT-PCR และ nested PCR ได้ถูกนำมาใช้จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบเอจากการตัวอย่างหอยนางรมจากแหล่งเพาะเลี้ยงหอยแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง และจังหวัดจันทบุรี รวมทั้งสิ้น 41 ตัวอย่างจาก 2 ชุดตัวอย่าง พบว่าเกิดแถบของ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ในลักษณะ smear band (รูปที่ 4.6 และ 4.8) แต่เมื่อนำไปทดสอบต่อด้วยวิธี Nested-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของไวรัสแต่ละชนิด พบว่าปรากฏแถบของ DNA ของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 397 bp และ 321 bp ตามลำดับ โดยพบว่าในบางตัวอย่างปรากฏแถบของ DNA เพียง 1 แถบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหอยทะเลตามธรรมชาติอาจมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสโรตาหรือไวรัสตับอักเสบ เอ ชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยมีตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสโรตาคิดเป็น 21.95% (9/41 ตัวอย่าง) และผลการทดสอบบวกต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ 34.15% (14/41 ตัวอย่าง)สำหรับมีบางตัวอย่างที่ปรากฏแถบของ DNA ทั้ง 2 แถบ น่าจะมีการปนเปื้อนของทั้งเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ จากการทดสอบคิดเป็น 7.32% (3/41 ตัวอย่าง) ซึ่งจากการศึกษาของ Kittigul และคณะ (Kittigulet al., 2008; Kittigulet al., 2010) ที่พบว่าในตัวอย่างหอยนางรมที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี พบความชุกของการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ อยู่ที่ 3.3% และ 0.9% ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระบบการเลี้ยงและความสะอาดของน้ำที่แตกต่างกันจึงทำให้หอยนางรมในภาคตะวันออกมีการปนเปื้อนเชื้อไวรัสมากกว่า สำหรับตัวอย่างหอยที่ไม่ปรากฏแถบ DNA ใดๆ เลย มีความเป็นไปได้ว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในหอย หรือมีความเป็นไปได้ว่าการสกัดยังมีการปนเปื้อนของ RT-PCR inhibitor ที่ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา RT-PCR หลงเหลืออยู่ดังนั้นจึงควรยืนยันว่าเป็นผลลบจริงด้วยการใช้ internal control primer ซึ่งเป็น primer ที่จะจับกับ Housekeeping gene ของหอยมาทำปฏิกิริยากับตัวอย่างหอย เพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว

การทำปฏิกิริยา Nested-PCR อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมขึ้นได้ โดยอาจจะเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถพบได้ในช่วงที่มีการเตรียมสารสำหรับทำปฏิกิริยารวมถึงการดูดแบ่งสารสำหรับทำปฏิกิริยา แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบการปนเปื้อนระหว่างการทำปฏิกิริยา โดยพิจารณาจากหลอดควบคุม (Negative control) ซึ่งไม่ปรากฏแถบของ cDNA และการปรากฏ pattern ของ DNA band ที่เป็นผลผลิตของปฏิกิริยามีความแตกต่างกัน การนำผลผลิตจากปฏิกิริยา nested PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing จะเป็นการยืนยันผลการปนเปื้อนได้ จากผลการนำลำดับนิวคลิโอไทด์และนำไปเทียบกับฐานข้อมูล สามารถยืนยันได้ว่าสารพันธุกรรมที่พบในหอยนางรมธรรมชาติเป็นสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ จริงโดยโรตาไวรัสทั้งหมดที่ปนเปื้อนมีgenotype G1[8] (รูปที่ 4-10) แต่ไม่สามารถบอก genotype ของไวรัสตับอักเสบชนิดเอได้เนื่องจากบริเวณที่เพิ่มขยายสารพันธุกรรมไม่ใช่บริเวณที่ใช้แยก genotype ของไวรัสชนิดนี้

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้วิธี Multiplex RT-PCR ร่วมกับวิธี Nested-PCR สามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรตาและไวรัสตับอักเสบ เอ ในหอยทะเลตามธรรมชาติที่จำหน่ายในจังหวัดชายฝั่งภาคตะวันออกได้ วิธี Multiplex RT-PCR สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้หลายชนิดในครั้งเดียว ทำให้ประหยัดเวลาในการตรวจหาเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนและผลผลิตที่ได้สามารถนำไปหา genotype ของไวรัสได้ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาการระบาดของเชื้อด้วย หากในอนาคตมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ปนเปื้อนได้ และพัฒนาให้เป็นวิธีในการตรวจคัดกรองการติดเชื้อไวรัสได้ต่อไป จะสามารถป้องกันการได้รับเชื้อไวรัสที่ปนเปื้อนจากอาหารได้

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

Multiplex Reverse transcription-PCR พบว่ามีความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อโรต้าไวรัสและไวรัสตับอักเสบ เอ น้อยที่สุดที่ 0.1242 ng และ 12.42 pg ตามลำดับ และมีความไวกว่า monoplex RT-PCR เมื่อใช้เทคนิคNested-PCR ร่วมด้วยจะสามารถเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหาเชื้อมากยิ่งขึ้น และสามารถใช้ตรวจหาการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโรต้าและไวรัสตับอักเสบเอได้ในหอยนางรมสดจากธรรมชาติได้ ผลงานวิจัยถ้ามีการพัฒนาต่อไปให้สามารถสกัดไวรัสนางรมได้รวดเร็วขึ้นหรือพัฒนาให้กระทำได้หลายๆตัวอย่างพร้อมๆกันในรูปของ microtiter plate จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนของไวรัสในหอยนามรมก่อนไปถึงมือผู้บริโภคได้

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองกับเชื้อไวรัสที่ติดต่อผ่านทางอาหารชนิดอื่นด้วย สำหรับหอยนางรมสดที่ให้ผลการทดสอบด้วย multiplex RT PCR-nested PCR เป็นลบหรือไม่ปรากฏแถบ DNA ผลผลิตจากปฏิกิริยาควรมีการทดสอบเพิ่มเติมด้วยการใช้ internal control โดยใช้ primer คู่ที่จับจำเพาะกับ house-keeping gene ของหอยนางรม หากมีการขยายเพิ่มจำนวนได้ผลผลิตจะถือได้ว่าหอยนางรมไม่มีการปนเปื้อนจริง

บทที่ 5
ผลผลิต (Output)

5.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

คาดว่าจะได้รับการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Journal of Food Protection และ International Food Research Journalที่มี impact factor สูงมากกว่า 1

5.2 การจดสิทธิบัตร

ไม่มี

5.3 ผลงานเชิงเชิงพาณิชย์

ยังไม่มี

5.4 ผลงานเชิงสาธารณธะ

หากจัดโครงการให้ความรู้แก่ผู้เพาะเลี้ยง จำหน่ายและขายหอยนางรมทราบถึงการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจะทำให้ตระหนักถึงอันตรายจากการปนเปื้อนเชื้อไวรัสและแนวทางป้องกันร่วมกันเพื่อให้หอยนางรมที่บริโภคมีความปลอดภัยมากขึ้น

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการ

โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสหลายชนิดพร้อมกันในหอยนางรมด้วยวิธี RT-PCR **และ** Nested PCR

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ผศ.ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง 31 กันยายน พ.ศ. 2556

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี 7 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2555 ถึง 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2557

<u>รายจ่าย</u>

หมวด	รายจ่ายจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมรายจ่ายสะสมจนถึงงวดปัจจุบัน	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	คงเหลือ
1.ค่าตอบแทน	5,000	10,000	15,000	10,000	0
2. ค่าจ้าง	7,000	32,000	39,000	32,000	14,000
3. ค่าวัสดุ	78,000	112,527	190,527	192,000	1,473
4. ค่าใช้สอย	0	1,900	1900	40,000	38,100
5. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	0	0	0	0	
รวม	90,000	156,427	246,427	300,000	53,573

<u>จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินคงเหลือ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ 270,000

งวดที่ 1 150,000 บาท เมื่อ 12 พฤศจิกายน 2555

งวดที่ 2 120,000 บาท เมื่อ 9 พฤษภาคม 2556

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

บรรณานุกรม

1. Bosch, A., Shields, P.A. Survival of hepatitis A virus and poliovirus in seawater and marine sediments. *Abstr Ann Mtg Am Soc Microbiol.* 1987; p295.
2. Bridger, J.C. Non-group A rotaviruses. In: Kapikian, A.Z. (E.d.) Viral infections of the Gastrointestinal Tract. Marcel Dekker, New York. 1994; p. 369-407.
3. Beuret C, Baumgartner A, Schluep J. Virus-contaminated oysters: a three-month monitoring of oysters imported to Switzerland. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:2292-7.
4. Ciocca, M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* 2000; 18: Suppl 1: S71-4.
5. Coelho, C., Vinatea, CEB, Heinert, A.P., Simoes, CMO and Barardi, CRM. Comparison between specific and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for deteftion of hepatitis avirus, polioviruss and rotavirus in experimentally seeded oysters. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de aneiro*, 2003; 98: 465-468.
6. Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A., Toti, L. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 87: 884:888
7. Cromeans, T., Nainan, O.V., Fields, H.A., Favorov, M.O., Margolis, H.S.. Heaptitis A and E viruses. In "Foodborne Disease handbook: Vol 2. Diseases caused by viruses, parasites, and fungi," eds. Y.H. Hui, J.R. Gorham, K.D. Murrell, and D.O. Cliver, 1994; p 1-56. Marcel Dekker, New York.
8. De Chastonay, J., and Siegel, G. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* 1987; 157: 268-275.
9. De Leon, R., Matsui, S.M., Baric, R.S., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., Sobsey, M.D. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30:3151-3157.
10. Dix, A.B., and Jaykus, L.A. Virion concentration method for the detection of human enteric viruses in extracts of hard-shelled clams. *J. Food. Prot.* 1998; 61:458-465
11. Drebot, M.A., Lee, S.H. RT-PCR detection of RNA viruses in stool specimens. *Biotechniques.*1997; 23: 616-618.
12. Dubois, E., Leguyader, F., Haugarreau, L., Koecka, H., Cormier, M., Pommerpuy, M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 1794-1800.

13. Enriquez, R. Frosner, G.G., Hochstein-Mintzel, V., Riedemann, S., Reinhardt, G. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *J. Med. Virol.* 1992; 37: 174-179.
14. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol.* 2006; 78:1498-504.
15. Gajardo, R., Bouchriti, N., Pinto, R.M., Sato, T., Bosch, A., Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 3460-3462.
16. Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G., Lees, D.N. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ.Microbiol.* 1998; 64: 858-863
17. Halliday, M.L., Kang, L.Y., Zhou, T.K., Hu, M.D., Pan, Q.C., Fu, T.Y., Huang, Y.S., and Hu, S.L.. . 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. 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.
20. Jaykas, L.A., Hemard M.T., Sobsey, M.D. Human enteric pathogenic viruses. In: Hackney C.R., Pierson M.D., editors. Environmental indicators and shellfish safety. New York: Chapman and Hall. 1994. p92-153.
21. 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.
22. 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.
23. Kittigul L, Pombubpa K, Rattanatham T, Diraphat P, Utrarachkij F, Pungchitton S, et al. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. *Int J Food Microbiol.* 2008; 122:204-10.
24. Kittigul L, Pombubpa K, Sukonthalux S, Rattanatham T, Utrarachkij F, Diraphat P. Detection of hepatitis A virus and bacterial contamination in raw oysters in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2010; 41:105-13.

25. Kou, X., Wu, Q., Wang, D., and Zhang, J. Simultaneous detection of norovirus and rotavirus in oysters by multiplex PCR RT-PCR. *Food control* 2008; 19: 722-726.
26. Lees, D. Viruses and bivalve shellfish. *Inter. J. Food Microbiol.* 2000; 59: 81-116.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Nainan, OV., Xia, GL., Vanghan, G., Margolis, HS. Diagnostic of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 63-79.
31. Poddar, S.K., Espina, R., Schnurr, D.P., Evaluation of a single-step multiplex RT-PCR for influenza virus type and subtype detection in respiratory samples. *J. Clin. Lab.Anal.* 2002; 16: 163-166.
32. Rayas, RM., Wolffs, PFG, and Griffiths, MW. Simultaneous separation and detection of hepatitis A virus and norovirus in produce. *Inter. J. Food. Microbiol.* 2010; 139:48-55
33. Rodgers, F.G. Concentration of viruses in faecal samples from patients with gastroenteritis. In: Goddard M, Buttler M, editors. Viruses and wastewater treatment. New York: Pergamon Press. 1981. P 15-18.
34. 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
35. Safarik, I., Safarikava, M., and Forsythe, S.J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology.* 1995; 78: 575-585.
36. Severini GM, Mestroni L, Falaschi A, Camerini F, Giacca M. Nested polymerase chain reaction for high-sensitivity detection of enteroviral RNA in biological samples. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:1345-9.
37. 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.
38. Shieh, Y.C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, III W., Baric, R.S. Detection of Norwalk-like virus in shellfish implicated in illness. *J. Infect. Dis.* 2000; 181(S2): S360-366.
39. Sorber, C.A. Removal of viruses from waste water and effluent by treatment processes. In Berg, G., (Ed.), Viral pollution of the Environment. CRC press, Boca Raton, FL, 1983. p. 39-52.

40. 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.
41. Tsai, Yu-Li, Tran, B., Sangermano, L.R., and Palmer, C. Detection of poliovirus, hepatitis virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Env. Microbiol.* 1994; 60: 2400-2407
42. Wilde, J., Eiden, J., Yolken, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28: 1300-1307.
43. Yan, H., Yagyu, F., Okitsu, S., Nishio, O., Ushijima, H. Detection of norovirus (GI, GII), saprovirus and astrovirus in fecal specimens using reverse transcription single round multiplex PCR. *J. Virol. Methods* 2003; 14: 37-44
44. Zoll, G.J., Melchers, W.., Kopecka, H., ambroesm G., van der Poel, H.., Galama, J.M. General primer-mediated opolymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *Clin. Microbiol.* 1992; 30:160-165.