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

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรวจสอบการปนเปื้อนไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

โดย

ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ที่เป็นเงินอุดหนุนจากรัฐบาล
ลักษณะงานวิจัยและพัฒนาถ่ายทอดเทคโนโลยี

งบประมาณ ปี 2550-51

16 มี.ค. 2554
284374
QL444.168

เริ่มปรีดาร
21 เม.ย. 2554

ประกาศคุณูปการ

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่าน อาทิ ศ. ดร. สมศักดิ์ พันธุวัฒนาที่ให้คำปรึกษาด้านปฏิบัติการและให้กำลังใจให้มีความมานะพยายามเอาชนะอุปสรรคต่าง ๆ ได้ขอบคุณนายวิทยา ภูมิภักดิ์ นิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ทุ่มเทแรงกายและใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งใน senior project ขอขอบคุณ ดร. วิฑูร ขาวสุข ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ดร. ชลธิชา คลังทอง จากหน่วยไวรัสวิทยากรมการแพทย์ทหารอเมริกา ที่ประสานงานในการขอ cell line และสารเคมีจากหน่วยงานให้ ขอบคุณ ดร. สุพรรณี ลีโทชวลิต ที่ให้ความอนุเคราะห์หอยนางรมตัวอย่าง ศ. ดร. วิฑูรย์ ไวยนันท์ที่ให้ความอนุเคราะห์ไปใช้เครื่อง speed vac centrifuge ที่คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์และท้ายสุดขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

อุไรวรรณ อินทมาโส

Detection of Hepatitis A Viruses in Oysters Cultured in the East Coast of Thailand

Uraiwan Intamaso[1*]
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 coast in Jantaburi Province of Thailand. Nucleic acid of the virus was extracted with acid-adsorption alkaline elution method and then amplified with the designed primers. The result showed only 1 cDNA band at 242 bp nucleotide length as expected but not in the other enteric viruses. Detection of HAV in oyster meat or gut harvested for 6 months displayed cDNA bands but no hybridization signal. These results indicate that RT-PCR is a very sensitive method that may cause false positive results. Thus, RT-PCR protocol requires hybridization step for the detection of viral contamination of oysters.

Keywords: HAV, oysters, RT-PCR, hybridization, food contamination

การตรวจสอบการปนเปื้อนไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

อุไรวรรณ อินทมาโส[1*]

[1] คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก : uraiwani@buu.ac.th

บทคัดย่อ: ไวรัสตับอักเสบชนิดเอเป็นไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งที่มักติดต่อสู่คนผ่านการบริโภคหอยนางรมสดในเขตชายฝั่งทะเลตะวันออก การตรวจหาไวรัสในหอยนางสดก่อนที่จะไปถึงมือผู้บริโภค อาจมีประโยชน์ในเชิงป้องกันโรคได้ จากงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค RT-PCR มาใช้ตรวจหาไวรัสตับอักเสบเอในหอยนางรมสายพันธุ์ *Saccostrea commercialis* ที่เพาะเลี้ยงตามชายฝั่งทะเลในเขตจังหวัดจันทบุรี โดยสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี Acid-adsorption alkaline elution และ นำสารพันธุกรรมของไวรัสมาขยายเพิ่มจำนวนด้วย primer ที่ออกแบบไว้ จากการทดลองพบว่า มีการปรากฏแถบ cDNA เพียง 1 แถบที่มีความยาว นิวคลีโอไทด์ ประมาณ 242 bp ตามที่คาดไว้ และไม่ปรากฏแถบของ cDNA เมื่อใช้สารพันธุกรรมของไวรัสชนิดอื่นที่ติดต่อผ่านทางอาหาร เมื่อตรวจสอบหอยนางรมที่เก็บมาเป็นเวลา 6 เดือนในเนื้อหรือกระเพาะอาหาร พบแถบ cDNA แต่เมื่อนำไปพิสูจน์ความจำเพาะของแถบ cDNA ที่เกิดขึ้นด้วย วิธี Southern blot hybridization ไม่มีการปรากฏของสัญญาณ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าวิธี RT-PCR นั้นแม้มีความไวสูงแต่ อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการยืนยันผลด้วยวิธี Southern blot hybridization ก่อนถึงจะสามารถใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพันธุกรรมของไวรัสหอยนางรมได้

คำสำคัญ: ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ หอยนางรม อาร์ทีพีซีอาร์ ไฮบริไดเซชั่น การปนเปื้อนในอาหาร

สารบัญ

หน้า

ประกาศคุณูปการ i

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ii

บทคัดย่อภาษาไทย iii

สารบัญ iv

สารบัญรูปภาพ vi

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2

สมมติฐานการวิจัย 2

ขอบเขตของโครงการวิจัย 2

ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 7

ทำ HAV stock 7

Plaque assay 7

การเก็บตัวอย่างหอยนางรม 8

การปนเปื้อนจำลองด้วย HAV viron ในเนื้อหอยนางรมสด และconcentrate virion ออกมาจากเนื้อหอยนางรมสด 8

การสกัด RNA ออกจาก virion 9

ปฏิกิริยา RT-PCR 9

การทดสอบความจำเพาะของ cDNA band ด้วยวิธี hybridization 10

บทที่ 4 ผลการวิจัย 11

Plaque assay เพื่อหาความเข้มข้นของ HAV ใน stock 11

การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของปฏิกิริยาRT-PCR 11

การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNA genome ที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง 11

การสุ่มตรวจการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในเขตชายฝั่งทะเลตะวันออก 12
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง 22
อภิปรายผลการทดลอง 22
สรุปผลการทดลอง 22
ปัญหาและอุปสรรค 22
บรรณานุกรม

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 1 การทดสอบหาความเข้มข้นของ HAV ด้วยวิธี plaque assay	13
รูปที่ 2 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากอนุภาคของไวรัส	14
รูปที่ 3 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากอนุภาคของไวรัส	15
รูปที่ 4 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNA ที่สกัดจากหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง	16
รูปที่ 5 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNA ที่สกัดจากหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง	17
รูปที่ 6 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนเนื้อหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยง ใน จ. จันทบุรี	18
รูปที่ 7 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนเนื้อหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยง ใน จ. จันทบุรี	19
รูปที่ 8 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรมสด ที่เพาะเลี้ยงใน จ. จันทบุรี	20
รูปที่ 9 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนกระเพาะอาหารของ หอยนางรมสดที่ เพาะเลี้ยงใน จ. จันทบุรี	21

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

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) และอีกสาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากพฤติกรรมของผู้บริโภคเองที่นิยมบริโภคหอยดิบหรือที่ปรุงแบบสุก ๆ ดิบ ๆ ความร้อนที่ใช้และเวลาที่ไม่มากพอในการปรุงอาหารนั้นจึงไม่อาจผ่านเปลือกแข็งของหอยเข้าไปทำลายไวรัสซึ่งอยู่ในเนื้อหอยได้

การระบาดของไวรัส hepatitis A ที่รุนแรงมากที่สุดในประวัติศาสตร์เกิดขึ้นที่เมือง Shanghai ประเทศจีนในปี ค.ศ. 1988 จากการกินหอยลายที่เลี้ยงไว้บริเวณที่มีสิ่งปฏิกูลปนเปื้อน (Halliday et al, 1991) ซึ่งในครั้งนั้นมีผู้ติดเชื้อถึง 300,000 ราย สำหรับประเทศไทยจาก ข้อมูลของกองควบคุมโรค ในปี 2547 พบว่ามีผู้ป่วยติดเชื้อ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ประมาณ 4.54 % ซึ่งตัวเลข ดังกล่าวอาจมีค่าน้อยกว่าที่ เกิดขึ้นจริงสาเหตุหนึ่งเป็นเพราะเป็นตัวเลขที่บันทึกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลเท่านั้นและผู้ป่วยส่วนใหญ่มักซื้อยามารับประทานเองหรือพักรักษาตัวที่บ้านจึงไม่ได้บันทึกข้อมูลในส่วนนี้ สำหรับการติดต่อด้วย ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ นั้นเกิดขึ้นได้ง่ายเพราะไวรัสชนิดนี้สามารถทนต่อความร้อนและความแห้งในอาหารได้ดีกว่าไวรัสชนิดอื่น ๆ และสามารถอยู่รอดในน้ำทะเล ได้นานหลาย ๆ สัปดาห์ (Cliver, 1997; Croci et al, 1999; Bosch & Shields, 1987) นอกจากนี้แล้วเมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายแล้วมีระยะฟักตัวเฉลี่ยนานถึง 4 สัปดาห์ (ระหว่าง 2-6 สัปดาห์) ก่อนที่จะแสดงอาการของโรคออกมา (Cromeans et al, 1994) ผู้ป่วยจึงไม่ได้ระวังการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและ ถ้าผู้ติดเชื้อนั้นมีการขับถ่ายอุจจาระลงไปในแหล่งน้ำเชื้อไวรัสจะออกมาพร้อมกับอุจจาระได้ยาวนานถึง 10-14 วัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ละคนมีการปล่อยไวรัสออกมาทางอุจจาระจำนวนมากระหว่าง 10^6 ถึง 10^{11} อนุภาค ต่ออุจจาระหนึ่งกรัม และในน้ำทิ้งอาจพบไวรัสปนเปื้อนจาก 10^3 ถึง10^5 อนุภาคต่อลิตร (Rodgers, 1981; Jaykas et al, 1994) ถ้าบังเอิญผู้ติดเชื้อนั้นทำงานเกี่ยวข้องกับอาหาร โอกาสการ

ถ่ายทอดเชื้อออกสู่สิ่งแวดล้อมผ่านทางอาหารเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมากหากมีสุขอนามัยที่ไม่ดี เช่น ไม่ได้ล้างมือก่อนไปหยิบจับอาหาร เมื่อได้รับเชื้อ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ แล้วถ้าแสดงอาการออกมาจะมีอาการตัวเหลือง ตาเหลืองหรือดีซ่านและถ้ามีอาการรุนแรงอาจมีโอกาสเกิดโรคมะเร็งตับได้ (Ciocca, 2000)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าระยะฟักตัวของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ มีระยะยาวนาน โดยมากผู้ป่วยจึงไม่ได้เก็บอาหารต้องสงสัยไว้ตรวจสอบ หรือในกรณีที่เก็บอาหารไว้ตรวจสอบแต่การปนเปื้อนของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ อาจมีจำนวนน้อยมากจึงไม่สามารถตรวจพบ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ได้เนื่องจากวิธีการตรวจแบบดั้งเดิมยังไม่มีความไวพอ ดังนั้นการตรวจหา ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในอาหารก่อนจำหน่ายและบริโภคเพื่อป้องกันการติดเชื้อจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นมาก โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะใช้วิธีทางอณูชีววิทยาซึ่งมีความไวและรวดเร็วมาใช้ในการตรวจหา ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในหอยนางรมสดซึ่งทำให้ทราบถึงข้อมูลถึงการระบาดของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดที่มีการเลี้ยงและรับประทานมากในภาคตะวันออก ความรู้ที่ได้อาจนำไปใช้พัฒนา เป็น kit สำหรับผู้บริโภคและผู้ประกอบการเพื่อใช้ในการตรวจหา ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในหอยนางรมสดที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็วมีความไวและความจำเพาะต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบความไวและความจำเพาะของวิธีทางอณูชีววิทยาที่ใช้ตรวจหาการปนเปื้อนจำลองของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสด

2. เพื่อนำวิธีทางอณูชีววิทยามาใช้สุ่มตรวจการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในเขตภาคตะวันออก

สมมติฐานการวิจัย

วิธีทางอณูชีววิทยา อาทิ วิธี RT-PCR และ hybridization น่าจะสามารถนำมาใช้ในการทดสอบหาความไวและความจำเพาะในการทดสอบหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองและที่ปนเปื้อนในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในธรรมชาติได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการทดสอบความไวของวิธี RT-PCR ทำได้โดยทำการปนเปื้อนจำลองในหอยนางรมสดด้วย virion ของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ปริมาณต่าง ๆ แล้ว concentrate virion ในสารสกัดจากส่วนเนื้อและกระเพาะของหอยนางรมสด สกัด RNA ออกจาก virion ก่อนนำมาทำปฏิกิริยา RT-PCR และตรวจสอบความยาว nucleotide

ของ cDNA band ที่ได้ และทดสอบความจำเพาะของ cDNA band ด้วยวิธี hybridization จากนั้นนำวิธีเหล่านี้มาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในเขต ต. ท่าแฉลบ อ. เมือง จ. จันทบุรี

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบค่าความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่น้อยที่สุดที่ปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสดได้ และวิธีนี้ยังสามารถนำมาใช้ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอที่ปนเปื้อนในธรรมชาติได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ความรู้ที่ได้จากการวิจัยสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็น kit ที่ใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดรวมทั้งอาหารชนิดอื่นให้สะดวด รวดเร็วขึ้นซึ่งผู้ขายสามารถนำไปใช้เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพของหอยนางรมก่อนนำไปวางขาย และเพื่อเป็นการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อด้วย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แต่เดิมนั้นการตรวจหาความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ของ gastroenteritis virus ในที่ปนเปื้อนอาหารในห้องปฏิบัติการนิยมใช้ cell culture โดยเพาะเลี้ยงไวรัสจากของเหลว ที่สกัดมาจากอาหาร (food extract) ที่ต้องสงสัยว่าอาจปนเปื้อนด้วยไวรัสมาเจริญในเซลล์ที่จำเพาะ ต่อไวรัสชนิดนั้นและตรวจหาร่องรอยการติดเชื้อของเซลล์โดยดูจาก cytopathic effect (CPE) ที่เกิดขึ้น (Jaykas et al, 1994) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่สามารถใช้ได้กับ wild type HAV เนื่องจาก ไวรัสตับอักเสบชนิดเอไม่สามารถเจริญเติบโตได้ง่ายใน cell line และต้องอาศัยระยะเวลาการปรับตัว ที่ยาวนานก่อนที่จะสามารถเจริญได้และไม่ทำให้เกิด CPE ด้วย (De Chastonay &Siegel, 1987; Lemon&Robertson, 1993) ดังนั้นในการทดลองส่วนใหญ่ที่จำเป็นต้องเลี้ยง ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ใน cell line จึงได้นำ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ชนิดที่ปรับตัวแล้วที่สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ (lab-adapted strain) คือ สายพันธุ์ HM-175 ที่เจริญใน BSC-1(fetal rhesus monkey kidney-derived) cell line (Cromeans et al, 1987) สำหรับทางเลือกอื่นในการตรวจหาไวรัส ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ นั้นใช้ วิธีดูจากขนาด รูปร่าง ลักษณะ ของ particle ผ่านทางกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (EM) ซึ่งวิธีนี้มีความไวต่ำต้องมี ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ปริมาณมากถึง 10^{9}-10^{11} ต่อมวลสารหนึ่งกรัมจึงจะสามารถตรวจพบได้และต้องอาศัย ผู้เชี่ยวชาญในการใช้ EM ที่สามารถจำแนกลักษณะของไวรัสได้ วิธีนี้อาจใช้ได้ดีกับสิ่งส่งตรวจพวกอุจจาระของผู้ป่วย ที่ติดเชื้อแต่ไม่มีความไวพอกับสิ่งส่งตรวจพวก food extract ซึ่ง มีไวรัสอยู่ในปริมาณน้อยมาก

ได้มีการนำวิธี immunological method มาใช้ตรวจหาไวรัสที่ไม่สามารถเลี้ยงได้ใน cell culture โดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างของ antibody ที่ยึด (immobilized) กับ column กับ coat protein ของไวรัส ใน food extract ซึ่งวิธีนี้มีข้อดี คือสามารถตรวจหาไวรัสที่มีอนุภาคสมบูรณ์ที่สามารถจับกับ antibody ได้เท่านั้น ข้อมูลที่ได้สามารถบอกถึงจำนวนที่แท้จริงของ infectious viral particles ใน food extract ได้แต่การยึด antibody ไว้กับ column ทำให้ antibody ไม่อยู่ในสภาพเป็นอิสระทำให้จับกับ antigen ได้ไม่ดี วิธีนี้อาจจะต้องใช้เวลานานถึง 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) อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ก็ยังคงมี ข้อจำกัดเนื่องจาก มีความไวต่ำและต้องการปริมาณของไวรัสมาก พอจึง

จะสามารถตรวจพบไวรัสได้ ดังนั้นจึงใช้ เป็นวิธีในการ concentrate ไวรัสใน food extract ก่อนนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่น

วิธี Nucleic acid tests หรือเทคนิค hybridization method ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหา ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในอาหารและสิ่งส่งตรวจจากสิ่งแวดล้อมซึ่งอาศัยปฏิกิริยาการจับจำเพาะระหว่าง single strand plus sense RNA ของ HAV genome กับ single stranded DNAที่ทำหน้าที่เป็น probe (cDNA probe) ซึ่งประกอบไปด้วยเบสคู่สมกับ viral RNA genome วิธีนี้มีค่า detection limit ในการตรวจหา genomic viral RNA ของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ อยู่ที่ 500-1000 infectious units (Shieh et al, 1991) ต่อมามีการพัฒนา เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจหา viral genome โดยเปลี่ยนแปลง probe เป็นชนิด single-strand RNA probe พบว่าสามารถเพิ่ม ความไวได้ถึง 5-8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ cDNA probe (Jiang et al, 1987; Shiel et al, 1991) แต่วิธีนี้แม้มีความจำเพาะสูง แต่มีความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR ดังนั้น PCR จึงเป็นวิธีที่นิยมมากในการตรวจหาไวรัสที่จำนวนน้อยในอาหาร โดยเฉพาะ ในอาหารประเภทหอย เพราะมีความไวสูง ทางทฤษฎีสามารถเพิ่มจำนวนจาก 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 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) เพื่อกำจัด RT-PCR inhibitor ต่าง ๆ จึงมัก concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract และ purify ไวรัสออกมาก่อนนำไปทำ RT-PCRโดยทั่ว ๆ ไป

สามารถแบ่ง concentrate ไวรัสจากของเหลวใน food extract ออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ 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 (Wilde et al, 1990) Chelex (Straub et al, 1994) เป็นต้นเพื่อกำจัดเกลือหรือโปรตีนขนาดเล็ก 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 ต่อไปซึ่งวิธี 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 แต่วิธีการสกัดไวรัสเหล่านี้อาจมีความไวไม่พอในการตรวจหาไวรัสที่มีน้อยมาก ๆ ที่ปนเปื้อนใน อาหารได้และอาจยังคง มี RT-PCR inhibitor ปะปนอยู่ (Drebot&Lee, 1997) นักวิจัยหลายท่านจึงได้พยายามเพิ่มความไวในการตรวจหาไวรัสด้วยวิธี nested-PCR โดยใช้ internal primers จับกับ cDNA ที่ได้จาก RT-PCR แต่วิธีนี้อาจเพิ่มความเสี่ยงจากการปนเปื้อนในปฏิกิริยา ได้ง่ายและอาจได้ผลเป็น false positive ด้วย (Lees et al, 1995; Le guyader et al, 1996; Haflinger et al, 1997; Green et al, 1998) RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง จึงอาจเพิ่มโอกาสในการขยายเพิ่มจำนวน nucleic acid อื่นที่อาจปนเปื้อนในปฏิกิริยาได้ ดังนั้นจึงต้องมีวิธียืนยันผลที่ได้ว่าผลผลิตมาจาก viral genome ที่ต้องการหาจริง ๆ วิธีที่เชื่อถือได้มากที่สุดคือนำ PCR amplicon ไป sequence หาตำแหน่งเบส แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้ในงาน routine screening ได้ต้องอาศัยเครื่องมือ ราคาแพง คอมพิวเตอร์และ software ในการวิเคราะห์ผล อีกวิธีที่ใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการ คือนำ PCR amplicons ที่ได้ไปแยก ด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลและตรวจสอบเพิ่มเติมด้วย Southern blot hybridization โดยใช้ internal oligonucleotide ที่มีการติดฉลาก (Hardy et al, 1997; Honma et al, 2000) แต่วิธีนี้ใช้เวลานานและยุ่งยากและต้องใช้เวลาประมาณ 2 วัน จึงมีผู้คิดค้นวิธีการตรวจสอบความจำเพาะของ RT-PCRamplicon เมื่อไม่นานนี้คือ DNA enzyme immunoassay (DEIA) อาศัยหลักการ hybridization assay ผสมกับ immunoassay ชนิด ELISA ที่สามารถทำได้ใน microtiter plate โดยการใช้ streptavidin เคลือบไว้ที่ก้นหลุมแล้วเติม oligo probe ที่ติดฉลากด้วย biotin โดยที่ probe นั้นมีความจำเพาะกับ amplicon ที่เกิดขึ้น เมื่อเกิดปฏิกิริยาระหว่าง streptavidin และ biotin จะทำให้ oligo probe ถูกยึดอยู่ได้และพร้อมที่จะจับกับ RT-PCR product ซึ่งได้ผ่านการ denature เป็น single-stranded DNA แล้วเกิดการจับกับ oligo probe เป็น duplex DNA แล้วเติม anti-DNA antibody ซึ่งจะจับกับ duplex DNA ที่เกิดขึ้นตามด้วย enzyme tracer ที่ถูกเติมเข้าไปใน ขั้นสุดท้าย เมื่อมีการเติม substrate จะเปลี่ยนเป็น product ที่มีสี วิธีนี้มีความไวพอ ๆ กับวิธี hybridization แบบดั้งเดิมแต่ทำได้ในง่ายกว่าใน microtiter plate และใช้เวลาสั้นกว่าแค่ประมาณ 4 ชั่วโมง (Schwab et al, 2000)

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% 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 virionประมาณ 100-1000 PFU แล้วนำ flask ไปวางบน rocking platform เคลื่อนที่เบา ๆ เพื่อให้ของเหลวไหลทั่วบริเวณ cell monolayer ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม 5 ml maintenance media ที่มีส่วนประกอบเหมือนกับ complete media ยกเว้น 2% FBS และปล่อยให้ไวรัสมีการเจริญเติบโตภายในเซลล์ โดยสังเกตการเกิด CPE ทุกวันจนเกิด CPE มากกว่า 70% หรือเวลาประมาณ 10 วัน แล้วสกัด virion ออกมาโดยการ freeze-thaw โดย freeze ที่ -80°C จนเกิดเป็นเกล็ดน้ำแข็งและเขย่าเกล็ดน้ำแข็งจนเกล็ดน้ำแข็งละลายหมด เพื่อให้ไวรัสหลุดออกมาจากเซลล์ ทำซ้ำจนครบ 3 ครั้งนำไปปั่นเพื่อเก็บ supernatant แล้ว aliquot ไว้ใน eppendorf 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% CO2 incubator และปล่อยให้เจริญเต็มพื้นผิวเป็น monolayer ล้างเซลล์ 2-3 ครั้ง ๆ ละ 2 ml ด้วย 1XMEM complete medium ที่ไม่มี FBS และพักไว้ จากนั้นทำการเจือจาง ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ใน 1XMEM อัตราส่วน 1:10 โดยเริ่มจาก 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ไปจนถึง 10^{-5} ส่วนwell ที่เติม medium ลงไปแทน virus mixture ใช้เป็น negative control (uninfected cells หรือ mock) แล้วนำ plate ไว้บน rocking platform ให้ของเหลวมีการเคลื่อนที่เบา 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% CO2 incubator เป็นเวลา 13-14 วันหลังจากนั้นย้อม plaque ที่เกิดขึ้นโดยการใส่สีผสมที่ประกอบด้วย 1% crystal violet ใน 10% formaldehyde solution ลงไปใน หลุม ๆ ละ 2 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมงแล้วนำมาล้างน้ำหลาย ๆ ครั้ง ปล่อยให้

แห้งและนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น โดยค่าที่ได้เป็นจำนวนอนุภาคของไวรัสที่มีในของเหลวต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรซึ่งมีหน่วยเป็น pfu/ml

การเก็บตัวอย่างหอยนางรม

หอยนางรมสด (*Saccostrea commercialis*) ที่ใช้ในการทดลองถูกเก็บมาจากตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือนตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม ปีพ.ศ. 2551 โดยหอยนางรมที่เก็บมาจะถูกแยกออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเนื้อหอยนางรม (meats) และส่วนที่เป็นทางเดินอาหารของหอยนางรม (GI tract) อย่างละ 25 กรัม และเก็บไว้ที่ -80 ºC จนกว่าจะนำมาทำการสกัดสกัดของเหลวเพื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR

การปนเปื้อนจำลองด้วย HAV viron ในเนื้อหอยนางรมสด และconcentrate virion ออกมาจากเนื้อหอยนางรมสด

นำ HAV virion ที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาเติมด้วยปริมาตรต่าง ๆ จาก 1 -100 µl ในเนื้อหอยนางรมสด 25 กรัมและ incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สกัด virion ของไวรัสออกมาจากเนื้อหอยนางรมสดด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method (Kittigul et al. 2008) หลังจากนั้นนำไปเติม 7 volume ของน้ำกลั่นหรือประมาณ 175 ml ที่อุณหภูมิ 4 °C นำส่วนผสมทั้งหมดไปทำ Homogenized ด้วย blender ที่ high speed แล้วนำ Homogenate ที่ได้ไปปรับ pH เป็น 4.8 ด้วย 1 N HCl (ประมาณ 1ml) แล้วนำไปเขย่าบน plateform เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 2000 ×g เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนใส (supernatant) เก็บส่วนตะกอน (pellet) นำไปละลายใน 25 ml ของ 2.9% TPB - 6 % glycine, pH 9.0 เขย่ าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 15 นาที เก็บ supernatant label ว่า เป็น S1 พักไว้ ส่วน pellet ที่เหลือนำมาแยกไวรัสอีกครั้ง(re-eluted) ด้วย 25 ml ของ 0.5 M arginine-0.15 M NaCl, pH 7.5 เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บ supernatant ไว้ label ว่าเป็น S2 จากนั้นนำ S2 ที่ได้ไปรวมกับ S1 แล้วปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย 1 N HCl (ประมาณ 2 ml) จากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดไปตกตะกอนไวรัส ด้วย 12.5% PEG 8000 – 0.3 M NaCl ประมาณ 30 ml แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดไปไว้ที่ 4°C นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมา centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 15 นาที ทิ้ง supernatant ส่วน pellet ที่เหลือนำมาละลายใน 15 ml ของ 0.05 M Phosphate buffer saline (PBS) ,pH 7.5 และตกตะกอนอีกครั้งด้วย 12.5% PEG 8000 – 0.3 M NaCl ประมาณ 30 ml คนส่วนผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไป centrifuged ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 10,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที ทิ้ง supernatant นำ pellet ที่ได้มาละลายใน 5 ml ของ PBS ,pH7.5 จากนั้นแยกไวรัส

ออกด้วย 100% chloroform ให้มี final volume เป็น 30% chloroform (ประมาณ 3-4 ml) แล้วนำไป centrifuged ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 3,000X g เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ด้านบนสุดไว้ label ว่า S3 พักไว้ ส่วนpellet ที่อยู่ระหว่างของเหลวและ chloroform ถูกนำมาแยกไวรัสออกอีกครั้ง (re-extracted) ด้วย 0.5 volume ของ 0.5 M arginine-0.15 M NaCl, pH 7.5 (ประมาณ 12.5 ml) แล้วนำไป centrifuged ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 3,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บ supernatant ด้านบนสุดไว้ label ว่า S4 จากนั้นนำ supernatant ทั้งสอง (S3,S4) มารวมกัน แล้วนำตัวอย่างทั้งหมดไปไปทำให้เข้มข้นอีกครั้ง(reconcentrated) โดยใช้ SpeedVac centrifugation เพื่อลดปริมาตรจากประมาณ 10 ml ให้เหลือประมาณ 1 ml และเก็บที่ 4°C จนกว่าจะนำมาสกัด nucleic acid ต่อไป

การสกัด RNA ออกจาก virion (QIamp Viral RNA minikit, Germany)

นำของเหลวที่สกัดได้จากหอยนางรมสดในข้อ 3 มาปริมาตร 140 µl ใส่ลงใน microcentrifuge tube แล้วเติม 560 µl Buffer AVL contain carrier RNA ลงไป จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติม 560 µl absolute ethanol ลงไปแล้วนำไป vortex อีกครั้งเพื่อให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากัน เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นดูดส่วนผสมที่ได้มา 630 µl ใส่ลงใน column ที่วางอยู่ใน collection tube นำไป centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate จากนั้นทำซ้ำอีกครั้ง โดยดูดส่วนผสมที่เหลืออีก 630 µl มาใส่ใน column แล้ว centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate หลังจากนั้นล้างสิ่งที่เจือปนออกครั้งแรกโดยเติม Buffer AW1 500 µl ลงใน column แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate ล้างอีกครั้งด้วย Buffer AW2 500 µl แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งส่วนของ filtrate นำ column ไปปั่นเปล่าอีกครั้งที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อปั่นของเหลวที่ค้างอยู่ใน column ออกให้หมด เปลี่ยน collection tube ใหม่จากนั้นเติม sterile deionized water ลงไป 40 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไป centrifuge ที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของ filtrate มา aliquot ใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 6 µl และเก็บไว้ที่ -80°C ก่อนนำไปทำ RT-PCR ต่อไป

ปฏิกิริยา RT-PCR (SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq,USA)

ในการสร้าง cDNA จาก HAV RNA template ที่สกัดได้จากข้อ 4 นั้นใช้ primer ที่จำเพาะกับ HAV RNA ดังนี้ HAV Forward Primer (5′-TTGCTGTTCAAGGG-3′) และ HAV Reverse Primer (5′AAAGTGGTAAGCAC-3′) ที่ออกแบบด้วย program 3 โดยขนาดความยาว nucleotide ของ cDNA ที่คาดว่าจะได้ควรประมาณ 242 bp สำหรับ RT-PCR reaction ใช้วิธีการ และ condition ที่แนะให้ใช้กับ kit (SuperScript III one-step RT-PCR with Platinum Taq,USA)

การทดสอบความจำเพาะของ cDNA band ด้วยวิธี hybridization

นำ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกบน 1.2%Agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้าโดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder marker (TrackIt, Invitrogen, USA) เพื่อตรวจสอบความยาวของ cDNA band แล้วนำ gel ไป denature ตามด้วย neutralize ด้วย denature DNA solution และ neutralize solution ตามลำดับ แล้วแช่ใน transfer buffer ก่อนนำ blot ให้ DNA มีการเคลื่อนที่จาก gel สู่ nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำแผ่น gel ไปตรวจหา DNA ที่หลงเหลือบนแผ่น gel ด้วย syber gold (Invitrogen, USA) 1:10,000 ส่วนแผ่น membrane นำไป fix ด้วยแสง UV และ incubate ที่ 80^{o}C เพื่อให้ DNA ยึดติดบนแผ่น membrane ก่อนนำไป incubate กับ 50nM BB probe (5′GATTGATCTGTGCTATGGTTCC TGGTG-DIG 3′) ที่ผ่านความร้อนที่ 95^{o}C มาแล้วเป็นเวลา 5 นาที ใน hybridization buffer ที่มีอุณหภูมิ 55^{o} C หลังจาก incubation เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างด้วย buffer 2 ครั้ง แล้ว block ด้วย blocking solution แล้วเติม horseradish peroxidase (HRP)- labeled Anti DIG antibodies (1:1,000ใน 1% Blocking solution) ล้าง non-specific binding ออกแล้วนำไป ตรวจหาสัญญาณที่เกิดขึ้นด้วย ECL chemiluminescence (Amersham Biosciences, UK)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การทำ Plaque assay เพื่อหาความเข้มข้นของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ใน stock

จากผลการทดลองพบว่าในหลุมที่การเติม ไวรัสที่ dilution 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} พบว่ามีไวรัสปริมาณมากเกินไปจึงย่อยสลายเซลล์จนหมด ส่วนหลุมที่เติมไวรัสที่ dilution 10^{-4} มี plaque อยู่เป็นจำนวนมากจนนับไม่ได้ แต่สามารถนับได้ในหลุมที่มีไวรัสที่ dilution 10^{-5} ที่จำนวน 21 plaques หรือมีจำนวนเท่ากับ $4.2x10^{6}$ pfu/ml หรือ $4.2x10^{3}$pfu/μl (รูปที่ 1) และ control cell ที่ไม่มีไวรัส (uninfected cell หรือ mock) ไม่พบ plaque เกิดขึ้น

การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของปฏิกิริยาRT-PCR

เพื่อเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-PCR และความจำเพาะของ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา ได้นำRNA genome ที่สกัดให้บริสุทธิ์มาจาก HAV stock ใช้เป็น template ผลการทดลองพบ cDNA ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา มีเพียง 1 แถบ ซึ่งมีความยาวของ nucleotide ตามที่คาดไว้ประมาณ 242 bp (รูปที่ 2, lane ที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับแถบ DNA มาตราฐาน (รูปที่ 2, lane ที่ 1) และเพื่อยืนยันถึงความจำเพาะของ cDNA band ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี hybridization พบว่ามีสัญญาณเกิดขึ้นเพียง 1 แถบเท่านั้น (รูปที่ 3, lane ที่ 2) นอกจากนี้ cDNA band ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา RT-PCR ยังจำเพาะต่อ HAV RNA เท่านั้นเพราะไม่ปรากฏแถบ cDNA เมื่อใช้ RNA template ของ polio virus และ rota virus (ไม่ได้แสดงรูป) จากผลทดลองชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-PCRและความจำเพาะ primer ที่ใช้ในการทดสอบ

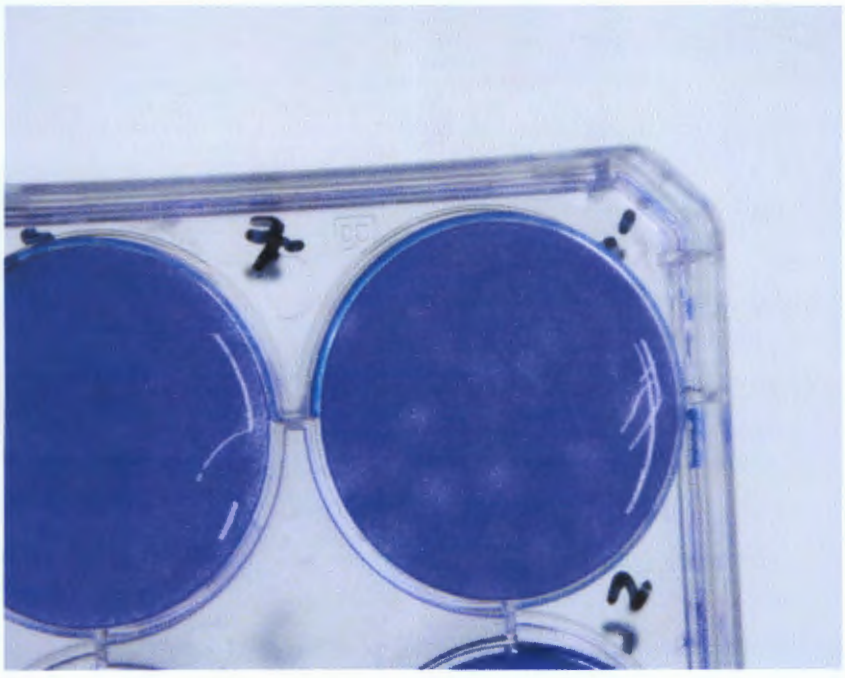
การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNA genome ที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง

เมื่อทำการปนเปื้อนจำลองในเนื้อหอยนางรมสดด้วย ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ด้วยปริมาตรต่าง ๆ จาก 1 μl ($4.2x10^{3}$ pfu), 10 μl ($4.2x10^{4}$pfu) และ 100 μl ($4.2x10^{5}$ pfu) และสกัด RNA ของไวรัสออกจากเนื้อหอยมาทำปฏิกิริยา RT-PCR จากผลการทดลองพบ cDNA band ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา RT-PCR เพียง 1 band เมื่อใช้ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ใส่ HAV virion ในปริมาตรจาก 1 μl ($4.2 x10^{3}$ pfu), 10 μl ($4.2x10^{4}$pfu) และ 100 μl ($4.2x10^{5}$ pfu) (รูปที่ 4 , lane 5, 6 และ 7 ตามลำดับ) และไม่พบ cDNA band เมื่อใช้ของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยที่ใช้เป็นตัวควบคุม (รูปที่ 4, lane 2-4) ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อสกัดด้วยวิธี acid adsorption-alkaline elution method (Kittigul et al.

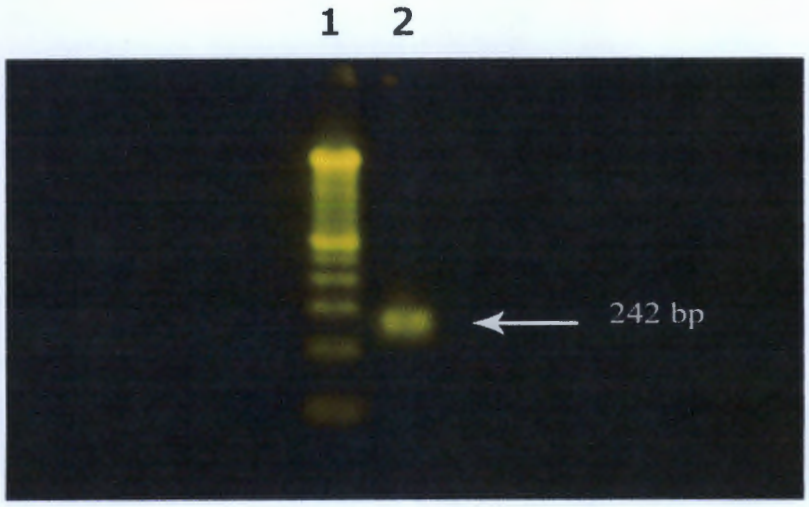
2008) และมีความไวที่จะใช้ตรวจหา HAV genome แม้ทำการปนเปื้อนจำลองด้วย ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ เพียงแค่ 1 μl ($4.2x10^3$ pfu) เท่านั้น และไม่พบ cDNA band เมื่อปนเปื้อนจำลองเมื่อเติม ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ลงไปในเนื้อหอย $4.2x10^2$ pfu (ไม่ได้แสดงรูป) เมื่อยืนยันถึงความจำเพาะของ cDNA band ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี hybridization พบว่ามีสัญญาณเกิดขึ้นเพียง 1 แถบเท่านั้นจากของเหลวที่สกัดจากการปนเปื้อนจำลองด้วย ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ (รูปที่ 5, lane 5-7) โดยไม่พบสัญญาณจากปฏิกิริยาของตัวควบคุมแต่อย่างใด (รูปที่ 5, lane 2-4)

การสุ่มตรวจการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบชนิดเอในหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในเขตชายฝั่งทะเลตะวันออก

จากการสุ่มตรวจการปนเปื้อนของหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในเขต จ. จันทบุรีเป็นเวลา 6 เดือน โดยเริ่มจากเดือน พฤษภาคมไปจนถึงตุลาคม เมื่อแยกส่วนเนื้อออกจากส่วนกระเพาะอาหารแล้วนำแต่ละส่วนมาสกัดของเหลวเพื่อทำปฏิกิริยา RT-PCR จากผลการทดลองที่ใช้ของเหลวที่สกัดจากส่วนเนื้อพบแถบสารพันธุกรรมมีลักษณะเป็นsmear (รูปที่ 6, lane 6-9) เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของแถบที่ปรากฏด้วยวิธี hybridization ไม่พบสัญญาณเกิดขึ้นยกเว้นเนื้อหอยนางรมที่ปนเปื้อนจำลองที่ใช้เป็นตัวควบคุม(รูปที่ 7 lane 3) และผลการทดลองเป็นทำนองเดียวกับทำปฏิกิริยา RT-PCR และปฏิกิริยา hybridization จากของเหลวที่สกัดจากส่วนกระเพาะ (รูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ) จากผลการทดลองแสดงว่าหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในเขต จ. จันทบุรีที่นำมาใช้ทดสอบน่าจะไม่มีการปนเปื้อนด้วย ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ



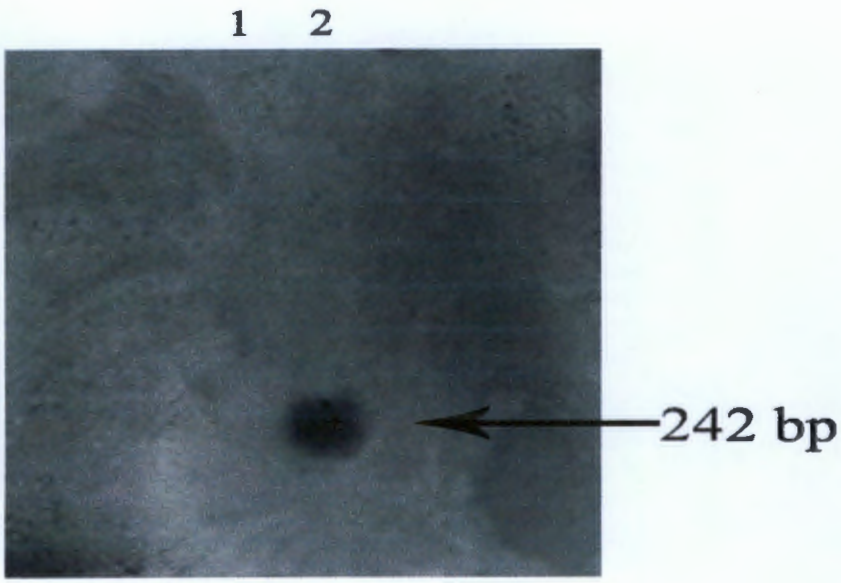
รูปที่ 1 การทดสอบหาความเข้มข้นของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ด้วยวิธี plaque assay



รูปที่ 2 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากอนุภาคของไวรัส

Lane1 : 100 bp marker

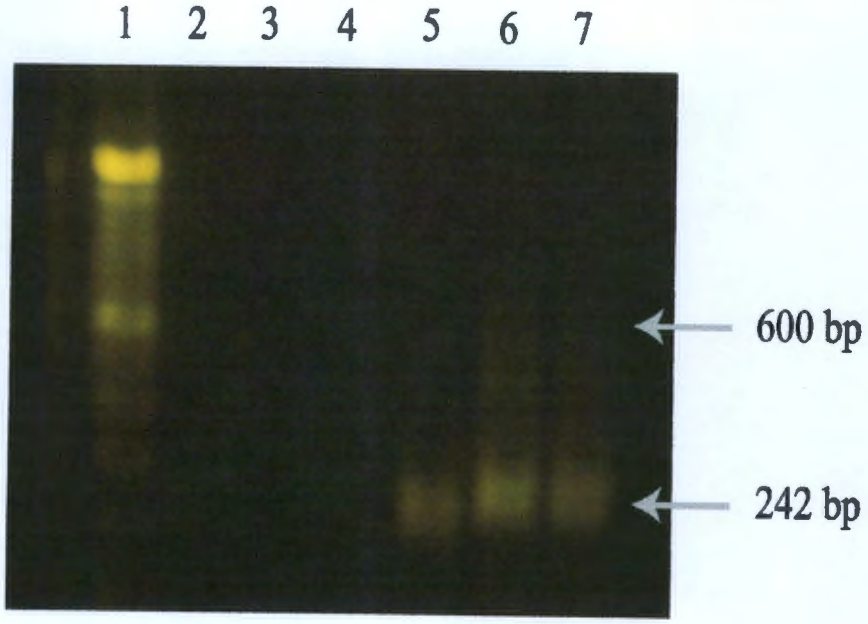
Lane 2: HAV genome 10 ng



รูปที่ 3 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากอนุภาคของไวรัส

Lane1 : 100 bp marker

Lane 2: IIAV genome 10 ng



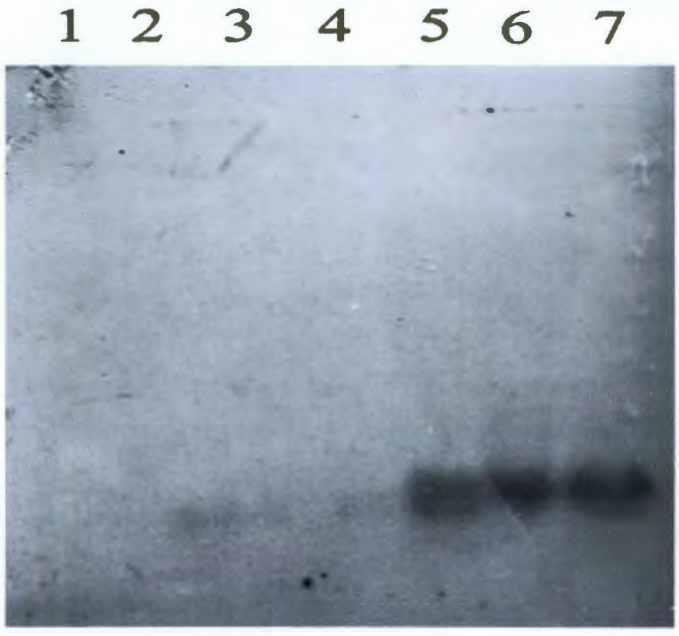
รูปที่ 4 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNA ที่สกัดจากหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง

Lane 1 : 100 bp marker

Lane 2: หอยนางรมสดที่ใส่น้ำลงไป

Lane3-4:หอยนางรมสดจากห้างโลตัสและตลาดหนองมนจ.ชลบุรีตามลำดับ

Lane 5-7 : หอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอ 1µl ($4.2x10^3$ pfu), 10 µl ($4.2x10^4$ pfu),100 µl ($4.2x10^5$ pfu), ตามลำดับ



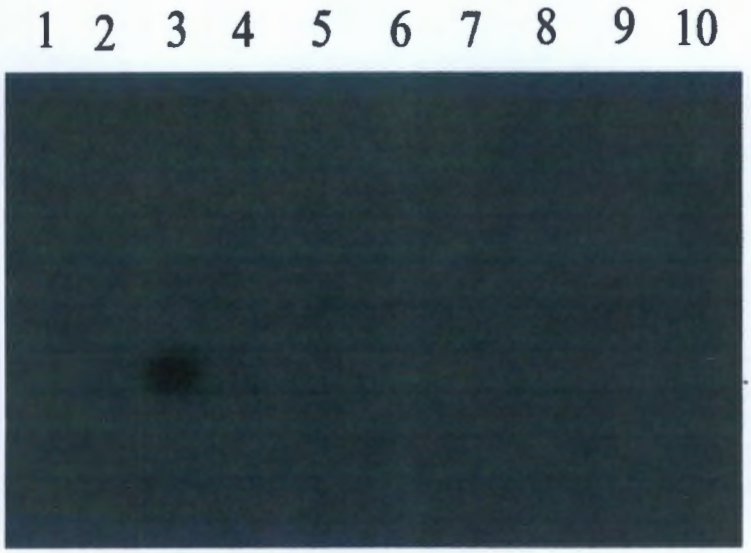
รูปที่ 5 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNA ที่สกัดจากหอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง

Lane 1 : 100 bp marker

Lane 2: หอยนางรมสดที่ใส่น้ำลงไป

Lane3-4:หอยนางรมสดจากห้างโลตัสและตลาดหนองมนจ.ชลบุรีตามลำดับ

Lane 5-7 : หอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอ 1μl ($4.2x10^3$ pfu), 10 μl ($4.2x10^4$ pfu),100 μl ($4.2x10^5$ pfu), ตามลำดับ



รูปที่ 7 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนเนื้อหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงใน จ. จันทบุรี ซึ่งถ่ายจาก 1.2% agarose gel electrophoresis

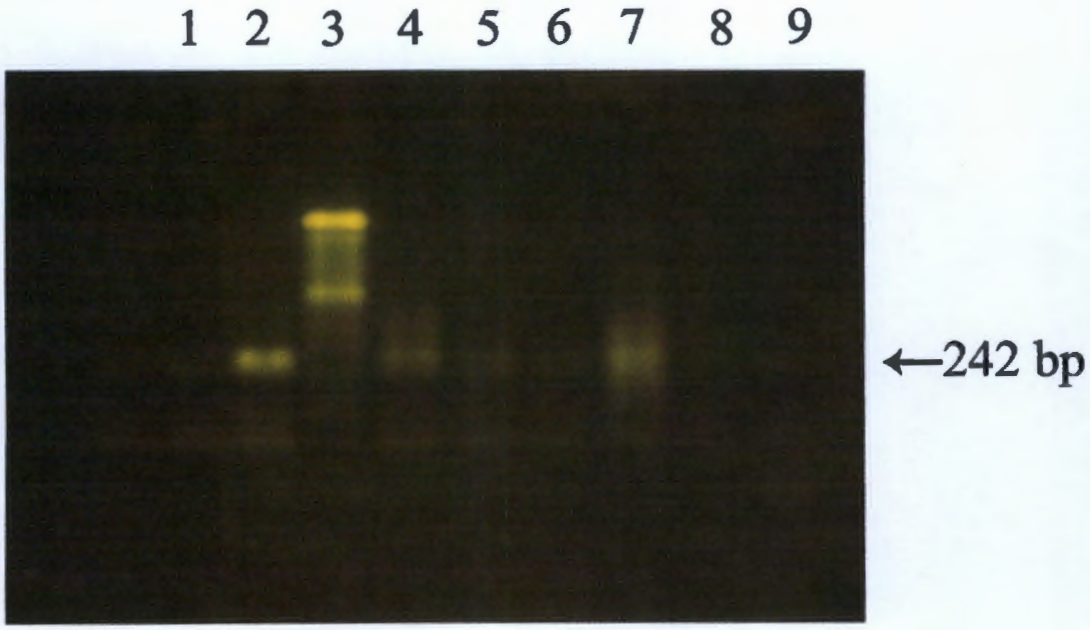
Lane 1: เนื้อหอยนางรมสดที่ใส่น้ำลงไป

Lane 2: เนื้อหอยนางรมสดจากห้างโลตัส จ. ชลบุรี

Lane 3: เนื้อหอยนางรมสดเมื่อปนเปื้อนจำลองด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอ 1µl ($4.2x10^3$ pfu)

Lane 4: 100 bp marker

Lane 5-10 : เนื้อหอยนางรมสดในเดือน พฤษภาคม-ตุลาคม 2551



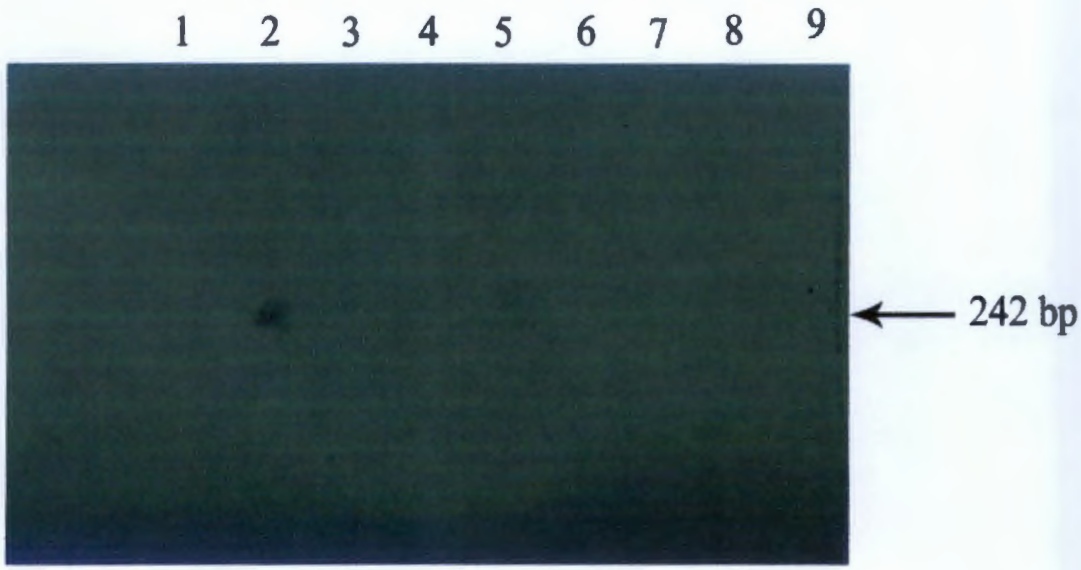
รูปที่ 8 ปฏิกิริยา RT-PCR เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงใน จ. จันทบุรี ซึ่งถ่ายจาก 1.2% agarose gel electrophoresis

Lane 1: หอยนางรมสดที่ใส่น้ำลงไป

Lane 2: หอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง

Lane 3: 100 bp marker

Lane 4-9:หอยนางรมสดที่เก็บในเดือน พ.ค-ต.ค 2551



รูปที่ 9 ปฏิกิริยา hybridization เมื่อใช้ RNAที่สกัดจากสกัดจากส่วนกระเพาะอาหารของหอยนางรมสด ที่เพาะเลี้ยงใน จ. จันทบุรี ซึ่งถ่ายจาก 1.2% agarose gel electrophoresis

Lane 1: หอยนางรมสดที่ใส่น้ำลงไป

Lane 2: หอยนางรมสดที่ปนเปื้อนจำลอง

Lane 3: 100 bp marker

Lane 4-9:หอยนางรมสดที่เก็บในเดือน พ.ค-ต.ค 2551

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ปฏิกิริยา RT-PCR เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความไวสูงมากซึ่งสามารถขยายเพิ่มจำนวน HAV genome เป็น cDNA product จาก pure genome ซึ่งมีปริมาณต่ำเพียง 10 ng และจากของเหลวที่สกัดจากเนื้อหอยนางรมสดที่ทำการปนเปื้อนจำลองจาก stock virus เพียง $4.2x10^3$ pfu ได้ความยาว nucleotide ตามคาดที่ 242 bp โดย Primer ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อสารพันธุกรรมของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ จริง ๆ เพราะเมื่อนำไปทดสอบด้วย RT-PCR กับไวรัสที่ติดต่อผ่านทางเดินอาหารอื่น อาทิ poliovirus และ rotavirus พบว่าไม่เกิดแถบของ cDNA product เมื่อยืนยันถึงความจำเพาะของ cDNA band ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยวิธี hybridization พบว่า มี hybridization signal เกิดขึ้นเพียง 1 signal เท่านั้นจาก cDNA band ที่ขยายเพิ่มจำนวนมาจากสารพันธุกรรมของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ อย่างไรก็ตามแม้วิธี RT-PCR มีความไวสูงแต่อาจมีความเสี่ยงในการเกิดผลบวกปลอมได้เพราะผลการทดลองจากการตรวจสอบสารพันธุกรรมของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในสารสกัดจากหอยนางรมสดที่เพาะเลี้ยงในตำบลท่าแฉลบ อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี เป็นเวลาทั้งหมด 6 เดือนตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม ปีพ.ศ. 2551 ทั้งส่วนเนื้อและส่วนกระเพาะอาหารพบว่ามี cDNA band เกิดขึ้นแต่เมื่อยืนยันความจำเพาะของ cDNA band ด้วยวิธี hybridization กลับไม่พบ hybridization signal

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการนำวิธี RT-PCR มาใช้ในการตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของ ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ในหอยนางรมสดสามารถกระทำได้แต่จำเป็นต้องยืนยันความจำเพาะด้วยวิธี hybridization หรือวิธี DNA sequencing ด้วย ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของนักวิจัยอื่น ๆ (Lees et al. 1995; Le guyader et al 1996; Haflinger et al 1997; Green et al 1998)

ปัญหาและอุปสรรค

มีความไม่พร้อมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ อาทิ speed vac centrifuge ที่ใช้ในการ concentrate สารสกัดจากอาหารซึ่งเสียและยังไม่สามารถซ่อมแซมได้ในเวลานี้จึงต้องไปขอยืมใช้จากคณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัย-ธรรมศาสตร์ซึ่งมีความยากลำบากในการเดินทางพอสมควร, ขาด inverted microscope ที่ใช้ในการสังเกตเซลล์ที่เป็น monolayer ที่ใช้ทำ plaque assay ซึ่งมีความจำเป็นที่ใช้เซลล์ที่ต้องเจริญอย่างหนาแน่นเต็มพื้น plate ที่ใช้เพาะเลี้ยง ปัจจุบันได้ประยุกต์ ใช้ stereo microscope ที่ปรับให้เลนส์มีกำลังขยายมากขึ้นแต่การมองดูเซลล์ยังมี

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

ศักยภาพจำกัด, cell line ที่ใช้คือ FRhk-4 ซึ่งเป็นเซลล์จาก rhesus monkey เป็นเซลล์ต้องห้ามที่ต้องขออนุญาตนำเข้าเป็นพิเศษออกจากประเทศสหรัฐอเมริกาทำให้เกิดความล่าช้าในการทดลองมาก จึงได้เปลี่ยนไปใช้ BSC-1 ที่ขอมาจากหน่วยไวรัสวิทยา สถาบันวิจัยการแพทย์ทหาร (AFRIMS), ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีขั้นตอนยุ่งยากมากและการเพาะเลี้ยงต้องใช้เวลานานมากประมาณ 9-10 วันจึงต้องมีการดูแลเป็นพิเศษ, นอกจากนี้ผู้ที่ทำการทดลองเป็นนิสิตปริญญาตรีที่ขาดทักษะจึงต้องใช้เวลานานในการฝึกฝนทักษะและวิธีทำใช้การทดลองและหัวหน้าโครงการขาดประสบการณ์ในการเพาะเลี้ยง ไวรัสตับอักเสบชนิดเอ อย่างไรก็ตามขณะนี้มีประสบการณ์มากขึ้นจึงสามารถดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นลงได้

W5.95293
ด858ก
ล.2

284374

บรรณานุกรม

Bosch, A., Shields, P.A. 1987. Survival of hepatitis A virus and poliovirus in seawater and marine sediments. *Abstr Ann Mtg Am Soc Microbiol.* p295.

Ciocca, M. 2000. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* 18: SuppI 1: S71-4.

Cliver, D.O. 1997. Foodborne viruses. In " Fundamentals of Food Microbiology." Eds. M.P. Doyle, L.R.Beuchat, and T.J. Montville. American Society for Microbiology, Washington, D.C., in press.

Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A., Toti, L. 1999. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *J. Appl. Microbiol.* 87: 884:888.

Cromeans, T., Sobsey, M.D., Fields, H.A. 1987. Development of a plaque assays for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* 22:45-56.

Cromeans, T., Nainan, O.V., Fields, H.A., Favorov, M.O., Margolis, H.S.. 1994. 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, pp 1-56. Marcel Dekker, New York

De Chastonay, J., and Siegel, G. 1987. Replicative events in hepatitis A virus-infected MRC-5 cells. *Virology* 157: 268-275.

De Leon, R., Matsui, S.M., Baric, R.S., Herrmann, J.E., Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., Sobsey, M.D. 1992. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J. Clin. Microbiol.* 30:3151-3157.

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

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

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

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

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

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

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

Honma, s., Nakata, S., Kinoshita-Numata K., Kogawa, K., Chiba, S. 2000. 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.* 44: 411-419.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Monceyron, C. and Grinde, B. 1994. Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. *Journal of Virological Methods* 46: 157-166.

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

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

Safarik, I., Safarikava, M., and Forsythe, S.J. 1995. The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 575-585.

Schwab, K.J., Neill, F.H., Guyader, F.L., Esters, M.K., and Atmar, R.L. 2001. Development of a reverse transcriptase-PCR-DNA enzyme immunoassay for detection of "Norwalk-like" viruses and hepatitis A virus in stool and shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:742-749

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

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

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

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

Wilde, J., Eiden, J., Yolken, R. 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1300-1307.