DETECTION OF HEPATITIS A VIRUS IN SHELLFISH BY REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

KAEWTA INTALAPAPORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)
MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES AND EPIDEMIOLOGY
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-4298-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจหาไวรัสตับอักเสบ เอ ในตัวอย่างหอยโดยวิธี reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (DETECTION OF HEPATITIS A VIRUS IN SHELLFISH BY REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION)

แก้วตา อินทลาภาพร 4436070 PHPH/M

วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร์) สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อและวิทยาการระบาด

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ลีรา กิตติกูล, Ph.D. (Microbiology), เฟื่องฟ้า อุตรารัชต์กิจ, M.Sc. (Public Health)

บทคัดย่อ

ไวรัสตับอักเสบ เอ เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคตับอักเสบเฉียบพลันในมนุษย์ การระบาดของโรคตับอักเสบ เอ หลายครั้งเกิดจากการรับประทานหอยที่ดิบหรือสุกๆ ดิบๆ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาวิธีการทำให้ไวรัสในตัวอย่างหอยนางรมเข้มข้นขึ้นเพื่อนำไปตรวจหาไวรัสตับอักเสบ เอ ด้วยวิธี reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) วิธี RT-nested PCR มีความไวในการตรวจไวรัสตับอักเสบ เอ 1.29 radioimmunofocus assay (RIFA) units ต่อตัวอย่างหอยนางรมที่ถูกทำให้เข้มข้นแล้ว 1 มล. หรือ 0.18 RIFA units/assay ปรากฏแถบดีเอนเอที่ 183 bp ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกับไวรัสโปลิโอที่ความเข้มข้น $\leq$ 1.43 X 10^5 50% tissue culture infective dose/ml และไวรัสโรตาที่ความเข้มข้น $\leq$ 1.43 X 10^4 infectious forming units/ml ได้นำวิธีการทำให้ไวรัสเข้มข้นที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในการตรวจไวรัสตับอักเสบ เอ ในตัวอย่างหอยนางรมจำนวน 100 ตัวอย่างซึ่งเก็บจากตลาดหลายแห่งในกรุงเทพมหานครและจังหวัดปทุมธานี ทำให้ไวรัสเข้มข้นโดยตกตะกอนไวรัสที่ pH 4.8, ชะไวรัสออกจากเนื้อหอยโดยใช้ 2.9% tryptose phosphate broth-6% glycine, ตกตะกอนไวรัสโดยใช้ polyethylene glycol (PEG) 2 ครั้ง, และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม หลังจากนั้นนำตัวอย่างหอยนางรมที่เข้มข้นรวมกับส่วนที่เหลือในขั้นตอนการชะไวรัสออกจากเนื้อหอย และขั้นตอนการละลายหลังจากตกตะกอนด้วย PEG ครั้งที่ 2 มาตรวจอาร์เอนเอของไวรัสตับอักเสบ เอ โดยใช้วิธี RT-nested PCR ผลการทดลองไม่พบอาร์เอนเอของไวรัสตับอักเสบ เอ ในตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมด ทำการตรวจ fecal coliforms และ *E. coli* ในตัวอย่างหอยนางรมโดยใช้วิธี multiple tube fermentation method เพื่อตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าตัวอย่างหอยนางรม 94 ตัวอย่าง (ร้อยละ 94) ปนเปื้อนด้วย fecal coliforms ในจำนวนนี้มีตัวอย่างหอยนางรมที่ปนเปื้อน fecal coliforms เกินค่ามาตรฐาน (ค่ามาตรฐาน <20 MPN/g) 58 ตัวอย่าง (ร้อยละ 61.7) โดยมีค่าการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 21-540 MPN/g และ ตัวอย่างหอยนางรม 93 ตัวอย่าง (ร้อยละ 93) ปนเปื้อนด้วย *E. coli* มีค่าการปนเปื้อนอยู่ในช่วง 1.8-240 MPN/g และพบว่ามีตัวอย่างหอยนางรมจำนวน 35 ตัวอย่างจากหอยนางรม 42 ตัวอย่าง (ร้อยละ 83.3) ซึ่งมีค่า fecal coliforms อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ปนเปื้อนด้วย *E. coli* 1.8-17 MPN/g

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ตัวอย่างหอยนางรมมีความปลอดภัยจากไวรัสตับอักเสบ เอ อย่างไรก็ตาม การตรวจพบแบคทีเรียตัวชี้วัด (fecal coliforms และ *E. coli*) ในตัวอย่างหอยนางรมมากกว่าครึ่งหนึ่งของตัวอย่างหอยนางรมทั้งหมด อาจมีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคหอยนางรมแบบดิบหรือสุกๆ ดิบๆ และอาจเป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย

103 หน้า. ISBN 974-04-4298-6

DETECTION OF HEPATITIS A VIRUS IN SHELLFISH BY REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

KAEWTA INTALAPAPORN 4436070 PHPH/M

M.Sc. (PUBLIC HEALTH) MAJOR IN INFECTIOUS DISEASES AND EPIDEMIOLOGY

THESIS ADVISORS: LEERA KITTIGUL, Ph.D. (MICROBIOLOGY), FUANGFA UTRARACHKIJ, M.Sc. (PUBLIC HEALTH)

ABSTRACT

Hepatitis A virus (HAV) is a major cause of infectious hepatitis in humans. Outbreaks of hepatitis A have been linked to the consumption of both raw or slightly cooked shellfish. This study described the development of a method to concentrate the virus from oyster samples for detection of HAV by reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR). The sensitivity of RT-nested PCR for HAV was 1.29 radioimmunofocus assay (RIFA) units/ml of concentrated oyster sample or 0.18 RIFA units/assay. The DNA band appeared at 183 bp fragment. No cross-reactivity was found in the presence of poliovirus ($\leq 1.43 \times 10^5$ 50% tissue culture infective dose/ml) and rotavirus ($\leq 1.43 \times 10^4$ infectious forming units/ml). The developed concentration method was applied for the detection of HAV in 100 oyster samples collected from several markets in Bangkok and Pathumthani Province. Virus particles were concentrated by acid adsorption at pH 4.8, elution of the virus from oyster meat with 2.9% tryptose phosphate broth-6% glycine, twice polyethylene glycol (PEG) precipitation, and chloroform extraction. The combination of concentrated oyster samples and the remaining suspension of elution step from oyster solids and dissolving after the second PEG precipitation were determined for HAV RNA using RT-nested PCR. All oyster samples were negative for HAV. Fecal coliforms and *E. coli* in all oyster samples were examined using multiple tube fermentation method for determining the microbiological quality of oysters. Of 100 oyster samples, 94 samples (94%) were contaminated with fecal coliforms. Among these oyster samples, 58 samples (61.7%) had fecal coliforms higher than the standard level of raw shellfish (< 20 MPN/g) and MPN values were in the range of 21-540 MPN/g. Ninety-three oyster samples (93%) were contaminated with *E. coli* and MPN values were in the range of 1.8-240 MPN/g. It was found that of 42 oyster samples with acceptable levels of fecal coliforms, 35 samples (83.3%) were contaminated with *E. coli* in the range of 1.8-17 MPN/g.

The present study indicated that these oyster samples were safe for HAV. However, the presence of bacterial indicators (fecal coliforms and *E. coli*) in the oyster samples (more than half of oyster samples) could be a health risk for consumers who ate raw or only slightly cooked oysters, and it might be a source of gastrointestinal illness.

KEY WORDS: HEPATITIS A VIRUS / OYSTER SAMPLES / REVERSE TRANSCRIPTASE-NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION
103 P. ISBN 974-04-4298-6