การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไวรัสโนโรและไวรัสตับอักเสบ เอในอาหาร โดยวิธี real-time RT-PCR

Method validation for determination of norovirus and hepatitis A virus in food using real-time RT-PCR

ณัฐกานต์ ติยศิวาพร*, จำเรียง ปุญญะประสิทธิ์ และปวีณา พานิชกุล

Nutthakan Tiyasiwaporn*, Chamrieng Poonyaprasit and Paveena Panichakul

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences

บทคัดย่อ

ไวรัสที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคระบาดผ่านทางอาหารและน้ำดื่ม คือ ไวรัสโนโรและไวรัสตับอักเสบ เอ เพื่อเตรียมความพร้อมในการเปิดให้บริการตรวจวิเคราะห์ สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหารจึงทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ไวรัสทั้งสองชนิดในอาหาร 4 กลุ่ม ได้แก่ ผักสลัด (ผักกาดหอม, ผักกาดแก้ว, กรีนโอ๊ค และเรดโอ๊ค) สตรอเบอร์รี่ เนื้อหอยนางรมดิบ และน้ำดื่ม ด้วยเทคนิค real-time RT-PCR ตามวิธี ISO/TS 15216-2:2013 แต่ได้ดัดแปลงการใช้สารควบคุม 2 ชนิด เพื่อทดแทนการใช้เชื้อไวรัสจริง คือใช้ virus-like particle (RNA process control kit; Roche) เป็นตัวควบคุมบวกในขั้นตอนการสกัด และใช้พลาสมิดดีเอ็นเอของไวรัสทั้งสองชนิดในรูปอาร์เอ็นเอทรานสคริป (RNA transcripts) เป็นตัวควบคุมบวกในขั้นตอน PCR ผลการทดสอบมีความไว (sensitivity) ของวิธีเป็นร้อยละ 100 สำหรับการตรวจผักกาดหอม ผักกาดแก้ว สตรอเบอร์รี่ เนื้อหอยนางรมดิบ ในขณะที่น้ำดื่ม ผักสลัดเรดโอ๊คและกรีนโอ๊ค มีความไวร้อยละ 90, 70 และ 60 ตามลำดับ ความจำเพาะ (specificity) ของวิธีเป็นร้อยละ 100 ขีดจำกัดการตรวจพบ (limit of detection) เมื่อใช้อาร์เอ็นเอทรานสคริปของไวรัสโนโร (GI และ GII) และไวรัสตับอักเสบ เอ มีค่า 5 ng/Rxn และ 500 ng/Rxn ตามลำดับ สรุปได้ว่าวิธีที่ทดสอบความใช้ได้นี้ สามารถใช้วิเคราะห์ไวรัส โนโรและไวรัสตับอักเสบ เอ ในผักกาดหอม ผักกาดแก้ว สตรอเบอร์รี่ เนื้อหอยนางรมดิบและน้ำดื่มได้อย่างถูกต้อง ส่วนผักสลัดเรดโอ๊คและกรีนโอ๊ค ยังต้องพัฒนาวิธีเพื่อเพิ่มความไวต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสโนโร, ไวรัสตับอักเสบ เอ, อาหาร, วิธีเรียลไทม์อาร์ที พีซีอาร์

Abstract

Norovirus (NoV) and hepatitis A virus (HAV) are the main cause of foodborne and waterborne outbreak. In order to prepare for analytical services, Bureau of Quality and Safety of Food validated methods for determination of NoV and HAV in 4 groups of foodstuffs: salad vegetables (lettuce, iceberg lettuce, green oak and red oak lettuce), strawberry, raw oyster meat and drinking water by using real-time RT-PCR technique. This study validated analytical methods according to ISO/TS 15216-2:2013 but applied to use two control materials instead of living virus including virus-like particle (RNA process control kit; Roche) for positive control in the extraction process and use plasmid DNA of NoV and HAV inform RNA transcripts for positive control in PCR process. The results showed that sensitivity of methods were 100% for detecting lettuce, iceberg lettuce, strawberry and raw oyster meat while drinking water, red oak and green oak lettuce were 90, 70 and 60% respectively. Specificity of methods were 100% and limit of detection (LOD) of RNA transcripts of NoV (GI and GII) and HAV were 5 ng/Rxn and 500 ng/Rxn respectively. It can be concluded that the validated methods were shown to have good sensitivity for determination of NoV and HAV in lettuce, iceberg lettuce, strawberry, raw oyster meat and drinking water but red oak and green oak lettuce still need to develop method to increase sensitivity.

Keywords: norovirus, hepatitis A virus, food, real-time RT-PCR

*Corresponding author

E-mail: nutthakan.t@dmsc.mail.go.th