
การตรวจหาไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมดิบโดยวิธี Real time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (real time RT-PCR)

จำเรียง ปุณฺณะประสิทธิ์ ฌัฐกานต์ ดิยศิริพร และอชฌา สัจจาปะละ

สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ ไวรัสโนโรเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบและโรคอาหารเป็นพิษ ที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยนางรม เนื่องจากหอยนางรมกินอาหารด้วยการกรองอาหารจากน้ำ และสะสมไวรัสโนโรจากแหล่งน้ำที่มีไวรัสปนเปื้อน การบริโภคหอยนางรมดิบหรือหอยนางรมที่ให้ความร้อนไม่เพียงพออาจก่อให้เกิดโรคได้ ปัจจุบันไวรัสโนโรไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์ได้ ต้องใช้วิธีทางอ้อมในการตรวจหา การศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของไวรัสโนโรในตัวอย่างเนื้อหอยนางรมดิบที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และชลบุรี ด้วยวิธี real-time RT-PCR รวมทั้งหมด 219 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 ผลการศึกษาพบไวรัสโนโร 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.76 เป็นชนิด genogroup I (GI) ร้อยละ 0.91 (2/219 ตัวอย่าง) genogroup II (GII) ร้อยละ 6.85 (15/219 ตัวอย่าง) การตรวจพบ GII ที่มากกว่า GI สอดคล้องกับการตรวจพบไวรัสโนโรในอุจจาระของผู้ป่วยในประเทศไทย ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อประเมินความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยให้กับผู้บริโภค

บทนำ

ไวรัสโนโรเป็นสาเหตุของการเกิดโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบที่มีรายงานการระบาดไปทั่วโลก⁽¹⁾ รวมทั้งเป็นสาเหตุสำคัญชนิดหนึ่งของโรคอาหารเป็นพิษซึ่งพบในคนทุกเพศทุกวัย การระบาดมักเกิดขึ้นในกรณีที่มีคนอยู่ร่วมกันจำนวนมาก ๆ เช่น ค่ายลูกเสือ โรงเรียน สถานเลี้ยงเด็ก เรือสำราญ บ้านพักคนชรา โรคนี้สามารถติดต่อถึงกันได้ คือ จากคนสู่คน เป็นการติดต่อกันโดยตรงจากละอองที่ปนเปื้อนเชื้อโรคผ่านเข้ามาทางระบบทางเดินอาหาร หรือโดยการบริโภคอาหารและน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่^(2, 3) ไวรัสโนโรไม่สามารถแบ่งตัวสร้างหน่วยใหม่ด้วยตัวเอง ต้องอาศัยเซลล์ที่มีชีวิตอื่นเพื่อยังชีพและเพิ่มจำนวน จึงไม่เพิ่มจำนวนในอาหาร แต่อาหารอาจเป็นพาหะที่จะนำไวรัสเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ เพิ่มจำนวน และทำลายเซลล์ที่เข้าไปอยู่ ทำให้เกิดอาการของโรคขึ้น เมื่อคนได้รับเชื้อแล้วอาจจะไม่แสดงอาการหรือแสดงอาการโดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและท้องเสียเป็นน้ำแบบไม่มีเลือด และมักหายได้เองภายใน 1-3 วัน ในคนที่มีสุขภาพปกติ แต่จะมีอาการรุนแรงได้ในเด็กทารก ผู้สูงอายุและผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น อาการอุจจาระร่วงอย่างแรงเป็นสาเหตุให้เสียชีวิตได้⁽⁴⁾

ไวรัสโนโรเป็นอาร์ เอ็น เอ สายเดี่ยว ไม่มีเปลือกหุ้ม อยู่ใน family Caliciviridae มี 5 genogroups (G) คือ GI, GII, GIII, GIV และ GV ในแต่ละ genogroup แบ่งย่อยเป็นหลาย genotypes สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์คือ GI, GII และ GIV ส่วน GIII และ GV ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ genogroup II genotype 4 (GII.4) เป็นกลุ่มก่อให้เกิดโรคที่มีรายงานพบการระบาดทั่วโลก⁽⁵⁾

อาหารที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคและการระบาดได้แก่ ผักกาดหอม ผักกะหล่ำ ต้นหอม สลัดผัก แชนดวีซ สตรอเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ และหอยสองฝา เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ หอยแครง⁽⁶⁾ จากการศึกษาการระบาดของไวรัสในอาหารทะเล⁽⁷⁾ พบไวรัสโนโรร้อยละ 83.7 โดยพบในหอยนางรมร้อยละ 58.4 นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบไวรัสโนโรในหอยนางรมในหลายประเทศทั่วโลก^(8, 9, 10) เนื่องจากหอยนางรมเป็นสัตว์น้ำที่กินอาหารโดยการกรอง (filter feeder) จึงทำให้สิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ รวมทั้งแบคทีเรียและไวรัสในตัวหอยมีความเข้มข้นมากกว่าสิ่งปนเปื้อนที่มีอยู่ในน้ำทะเลหลายเท่า สิ่งปนเปื้อนและเชื้อโรคเหล่านี้ อาจมาจากน้ำที่ไหลมาจากการเกษตรและ/หรือการปนเปื้อนของน้ำเสียจากแหล่งชุมชน การนำหอยนางรมมาบริโภคในลักษณะที่มีชีวิตหรือดิบ หรือผ่านความร้อนเพียงเล็กน้อยแบบสุก ๆ ดิบ ๆ ทำให้ได้รับเชื้อเข้าไปในระบบทางเดินอาหารซึ่งอาจก่อให้เกิดโรคได้

ไวรัสโนโรไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์ได้จึงต้องใช้วิธีทางอ้อมในการตรวจหา การตรวจด้วยวิธี electron microscopy (EM) และ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เหมาะสำหรับตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีไวรัสปนเปื้อนเป็นจำนวนมากเท่านั้น ไม่สามารถใช้กับตัวอย่างอาหารและสิ่งแวดล้อมที่มีไวรัสปนเปื้อนจำนวนน้อย ต้องใช้วิธีทำให้ไวรัสเข้มข้นขึ้น และตรวจด้วยวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงโดยใช้เทคนิค PCR⁽¹¹⁾ ซึ่งเป็นวิธีทางอ้อมจึงจะสามารถตรวจหา genome ของไวรัสได้ genome ของไวรัสประกอบด้วย RNA มากกว่า DNA จึงใช้วิธี real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) ในการตรวจหา RNA

การตรวจหาไวรัสโนโรในอาหารนี้เป็นเรื่องสำคัญ โดย Codex alimentarius committee ซึ่งเป็นองค์กรมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศได้กำหนดมาตรฐานเรื่องนี้ไว้ใน Guideline on the application of general principles of food hygiene to the control of virus in food⁽¹²⁾ ห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยา สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีภารกิจในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพ ตระหนักถึงความสำคัญนี้ จึงทำการศึกษาการปนเปื้อนของไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมดิบ ที่จำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร และปริมณฑล จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และชลบุรี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 เพื่อเตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการให้สามารถรองรับการตรวจไวรัสโนโรได้เมื่อเกิดปัญหาการระบาด ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์

ในการประเมินความเสี่ยงและแจ้งเตือนภัยสุขภาพต่อผู้บริโภค ป้องกันการเกิดปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุข กระตุ้นคุณภาพและศักยภาพห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล และนำไปวางแผนเชิงนโยบายสำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

วัสดุและวิธีการ

เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Rotor-Gene, Corbett RG 3000)
- Magnetic separator และ magnetic rack (Dynal)
- Shaking incubator 37 องศาเซลเซียส
- Water bath 60 องศาเซลเซียส
- Centrifuge
- Microcentrifuge
- Thermoshaker
- ตู้ปราศจากเชื้อ
- เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ
- Micropipette และ filter tip
- อุปกรณ์และเครื่องแก้วอื่น ๆ เช่น กรรไกร ปากคีบ ถุงมือยางชนิดไม่มีแป้ง หลอด PCR และหลอดสำหรับ

Centrifuge

สารเคมี

- Proteinase K 30U/mg (SIGMA)
- NucliSens lysis buffer และ NucliSens magnetic extraction reagents (BioMerieux, France)
- น้ำยาสำเร็จรูปสำหรับ mastermix (Bioline Ltd. UK)
- Primer (BioDesign) และ probe (Biosearch)

เชื้อควบคุม

Positive control ใช้สารละลายอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อไวรัสโนโร GI และ GII ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข

Negative control ใช้ตัวอย่างหอยนางรมที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสโนโร และน้ำชนิด nuclease free water

ตัวอย่าง

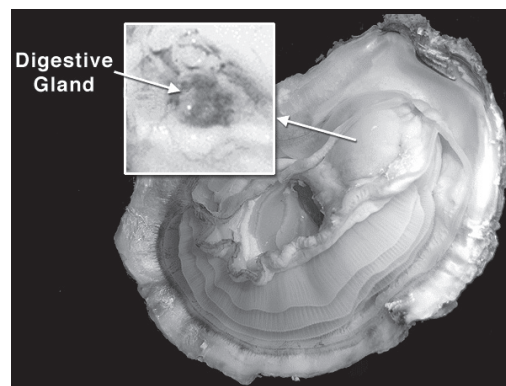
ใช้ตัวอย่างหอยนางรมที่แกะเปลือกแล้วบรรจุในถ้วยพลาสติกปิดสนิทหรือถุงพลาสติกที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตและตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล และในจังหวัดบริเวณชายฝั่งทะเลติดต่อไทย ได้แก่ จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และชลบุรี โดยตรวจตัวอย่างในช่วงเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนมีนาคม 2557 จำนวน 219 ตัวอย่าง

วิธีการ

ดำเนินการตามที่ระบุในวิธีมาตรฐานสากล ISO/TS 15216-2:2013⁽¹³⁾ Microbiology of food and animal feed-Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR-Part 2: Method for qualitative detection ดังนี้:-

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดไวรัส (sample preparation and virus extraction)

สุ่มหอยนางรมอย่างน้อย 10 ตัวต่อตัวอย่าง ตัดเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร (digestive gland) ตามภาพที่ 1 ใส่ในจานเพาะเชื้อ ตัดให้ละเอียด ซึ่งตัวอย่างดังกล่าว 2 กรัมใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลาย Proteinase K (30U/mg) เข้มข้น 100 µg/ml จำนวน 2 มิลลิลิตร บ่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 320 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที แล้วบ่มต่อใน Water bath ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ $3,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงเก็บเฉพาะส่วนใสใส่หลอดสำหรับสกัด RNA



ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อทางเดินอาหาร (digestive gland) ของหอยนางรม

การสกัด RNA (RNA extraction)

ใช้ NucliSens lysis buffer และ NucliSens magnetic extraction reagents โดยทำตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ เติมตัวอย่างที่สกัดไวรัสแล้วจำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มี NucliSens lysis buffer 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วเติม magnetic silica solution 50 ไมโครลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำปั่นเหวี่ยงที่ $1,500 \times g$ เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ต่อดังนั้นล้างด้วย wash buffer 1* ปริมาตร 400 ไมโครลิตร สองครั้ง ตามด้วย wash buffer 2* ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สองครั้ง และ wash buffer 3* ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกหนึ่งครั้ง โดยในการล้างแต่ละครั้งให้นำหลอดตัวอย่างใสใน magnetic rack แล้วแยก magnetic silica bead ด้วย magnetic separator ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วเติม elution buffer 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มและเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็ว 1,400 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำหลอดตัวอย่างไปทำการแยก magnetic silica bead ด้วย magnetic separator อีกครั้ง เก็บเฉพาะส่วนใสใส่หลอดสำหรับทำ real-time RT-PCR แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน (*wash buffer ใน NucliSens magnetic extraction reagents)

การทำ one step real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real time RT-PCR)

การทำ real time RT-PCR ใช้ forward primer, reverse primer และ probe ดังนี้ สำหรับ GI QNIF4 (5'-CGC TGG ATG CGN TTC CAT-3'), NV1LCR (5'- CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC-3'),

NVGG1p (FAM-TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-TAMRA) และสำหรับ GII QNIF2 (5'-ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA-3'), COG2R (5'-TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA-3'), QNIFs (FAM- AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-TAMRA)

การเตรียมสารเคมีสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR ให้เตรียมแยกคนละหลอดกันสำหรับการตรวจ GI และ GII โดยกำหนดความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ RNase free water 2.9 ไมโครลิตร, 2XTaq buffer 12.5 ไมโครลิตร, RT enzyme 0.5 ไมโครลิตร forward primer 1.25 ไมโครลิตร reverse primer 2.25 ไมโครลิตร และ probe 0.6 ไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติม RNA 5 ไมโครลิตร ได้แก่ตัวอย่าง RNA ของเนื้อหอยนางรม, positive control, negative control และน้ำ ใส่ในหลอดที่มีสารเคมีสำหรับปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยแยกคนละหลอดกันสำหรับการตรวจ GI และ GII นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Rotor-Gene, Corbett RG 3000) ตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 reverse transcription ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 preheating ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ ขั้นตอนที่ 3 denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 45 รอบ อ่านผลที่ช่องสัญญาณ FAM

ผล

การศึกษาตัวอย่างเนื้อหอยนางรมดิบ 219 ตัวอย่าง พบไวรัสโนโร 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.76 โดยเป็น GI ร้อยละ 0.91 (2/219 ตัวอย่าง) GII ร้อยละ 6.85 (15/219 ตัวอย่าง) และไม่พบผลบวกของเชื้อทั้งสอง genogroup ในตัวอย่างเดียวกัน (ตารางที่ 1) ช่วงเวลาที่ตรวจพบคือ เดือนตุลาคม พฤศจิกายน ธันวาคม 2556 คิดเป็นร้อยละ 12.9, 17.3 และ 2.6 ตามลำดับ ส่วนเดือนมกราคม กุมภาพันธ์ และมีนาคม 2557 ตรวจไม่พบไวรัสโนโร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมดิบ

	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ ไวรัสโนโร (%)		รวม
		Genogroup I	Genogroup II	
เนื้อหอยนางรมดิบ	219	2 (0.91)	15 (6.85)	17 (7.76)

ตารางที่ 2 ช่วงเวลาที่ตรวจพบไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมดิบ

เดือน ปี	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ (%)
ตุลาคม 2556	31	4 (12.9)
พฤศจิกายน 2556	69	12 (17.3)
ธันวาคม 2556	38	1 (2.6)
มกราคม 2557	28	-
กุมภาพันธ์ 2557	27	-
มีนาคม 2557	26	-

วิจารณ์

การศึกษานี้เป็นการหาไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมดิบที่บรรจุในถ้วยพลาสติกปิดสนิทหรือถุงพลาสติก เนื่องจากเป็นอาหารที่นิยมรับประทานกันทั่วไป มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ราคาไม่แพงมาก หาซื้อได้ง่ายตามตลาดสด หรือซูเปอร์มาร์เก็ตโดยผู้บริโภคสามารถนำไปรับประทานได้เลย ไม่ต้องนำไปปรุงให้สุกก่อน ซึ่งอาจจำหน่ายพร้อม เครื่องเคียง ถ้ามีการปนเปื้อนของไวรัสโนโร อาจทำให้มีความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภคหรืออาจเกิดการระบาดได้ ดังเช่นการระบาดของไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมแช่แข็งในประเทศออสเตรเลีย⁽⁸⁾ หอยนางรมที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอ และหอยนางรมแช่แข็งในสหรัฐอเมริกา⁽⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีการระบาดจากหอยนางรมทอดในประเทศญี่ปุ่นด้วย⁽¹⁴⁾

การตรวจตามวิธีของ ISO/TS 15216-2:2013 มี 3 ขั้นตอนคือ การสกัดไวรัส การสกัด RNA และ real-time RT-PCR การสับตัวอย่างใช้เฉพาะ digestive gland ซึ่งมีการศึกษาพบว่ามีปริมาณเข้มข้นของไวรัสมากกว่า ในอวัยวะส่วนอื่นๆ⁽¹⁵⁾ และเป็นการกำจัด RT-PCR inhibitor ได้แก่ polysaccharide และ glycogen ที่มีใน เนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของหอยนางรม ซึ่งสามารถยับยั้งการตรวจวิธี real-time RT-PCR ทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative)⁽¹⁶⁾ การสกัดไวรัสออกจากตัวอย่างอาหารมีหลายวิธีตามชนิดตัวอย่าง สำหรับการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากตัวอย่าง เป็นอาหารทะเลจึงใช้ Proteinase K^(17, 18) เพื่อทำลายเนื้อเยื่อของหอยนางรมแล้วปล่อยไวรัสลงในสารละลาย

การสกัด RNA ใช้ NucliSens lysis buffer และ NucliSens magnetic extraction reagents^(18, 19) โดย lysis buffer ที่มี guanidine thiocyanate จะทำให้เซลล์แตกแล้วปล่อย RNA ออกมา ต่อจากนั้น magnetic silica จะไปจับ RNA เมื่อผ่านขั้นตอนการล้างจะได้ RNA ที่บริสุทธิ์ เพื่อทำ RT-PCR

การทำ real-time RT-PCR ประกอบด้วยสองปฏิกิริยาเกิดต่อเนื่องภายในหลอดเดียวกัน คือ ปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสร้าง complementary DNA (cDNA) จากแม่พิมพ์ RNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และตามด้วยปฏิกิริยา PCR ซึ่ง cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์ เพื่อเพิ่มจำนวน DNA เป้าหมายแบบทวีคูณโดยใช้ primer และ probe ที่มีความจำเพาะกับ GI หรือ GII การตรวจวิเคราะห์ทำแยกหลอดกัน (singleplex) ระหว่าง GI และ GII ไม่ใช้วิธี multiplex ในหลอดเดียวกัน เป็นการเพิ่มความไวและความจำเพาะในการตรวจหาไวรัสโนโรในแต่ละ genogroup⁽²⁰⁾

การตรวจไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมครั้งนี้พบการปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 7.76 พบ GII มากกว่า GI เช่นเดียวกับการรายงานของประเทศอื่นๆ เช่น ประเทศฝรั่งเศส สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย⁽²¹⁻²⁵⁾ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจในอุจจาระของผู้ป่วยในประเทศไทย⁽²⁶⁾ และทั่วโลก⁽⁵⁾ พบว่า GII เป็น genogroup ที่พบมากที่สุด โดยเฉพาะ GII.4 ไวรัสโนโรจะถูกขับออกมากับอุจจาระของผู้ป่วยได้มากกว่าสิบล้าน อนุภาคต่ออุจจาระหนึ่งกรัม⁽²⁷⁾ เมื่อถูกทิ้งลงในแหล่งน้ำ ถึงแม้จะมีการบำบัดน้ำเสีย ก็ไม่สามารถกำจัดไวรัสโนโร ได้หมด⁽¹⁹⁾ จึงถูกปล่อยลงสู่แม่น้ำและทะเล หอยนางรมที่อยู่ในแหล่งน้ำนั้นจึงสะสมเชื้อในทางเดินอาหารจากการกรอง กินน้ำ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าในขั้นตอนการผลิตหอยสองฝาโดยการลดจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธีทำความสะอาด หอยและพักหอย (depuration) สามารถลดปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้รวดเร็วและลดได้เกือบหมดภายใน 2 วัน แต่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าในการลดปริมาณการปนเปื้อนของไวรัสโนโร⁽²⁸⁾

ช่วงเวลาที่ตรวจพบไวรัสโนโรคือเดือนตุลาคม ถึงเดือนธันวาคม 2556 ซึ่งอากาศเย็น เช่นเดียวกับหลายๆ ประเทศซึ่งตรวจพบมากในฤดูหนาวและตรวจพบบ้างในฤดูอื่นๆ เนื่องจากไวรัสโนโรทนต่ออุณหภูมิต่ำได้มากกว่า อุณหภูมิสูง มีการศึกษาพบว่าไวรัสโนโรทั้ง GI และ GII จะลดจำนวนลงที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส มากกว่าที่ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส⁽²⁹⁾

ในการศึกษานี้ ถึงแม้จะพบปริมาณไวรัสโนโรไม่สูงมากนัก แต่ก็อาจทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ เนื่องจาก ไวรัสโนโรที่มีปริมาณน้อยเพียง 100 อนุภาคก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อได้⁽⁶⁾ รวมทั้งยังไม่มียารักษาหรือวัคซีน ป้องกัน⁽³⁰⁾ ผู้ที่ต้องการบริโภคหอยนางรมดิบควรเลือกที่สดสะอาดมาจากแหล่งที่เชื่อถือได้ การรับประทานหอยนางรม

หรือหอยนางรมสดที่มีเครื่องเคียงพร้อมมะนาว ไม่สามารถทำลายไวรัสโนโรได้ เนื่องจากไวรัสโนโรสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรด นอกจากนั้นยังมีชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิในตู้เย็นและอุณหภูมิแช่แข็ง และทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส ผู้ที่อยู่ในกลุ่มเสี่ยงจึงไม่ควรรับประทานหอยนางรมดิบ ต้องปรุงให้ถูกสุขลักษณะโดยใช้ความร้อนให้อุณหภูมิภายในหอยนางรมเป็น 90°C นาน 90 วินาที⁽¹²⁾

ข้อมูลการปนเปื้อนของไวรัสโนโรในอาหารของประเทศไทยมีน้อยมาก ควรมีการศึกษาเพื่อเก็บรวบรวมเป็นฐานข้อมูลของประเทศ โดยทำการสำรวจในอาหารที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนไวรัสโนโร ได้แก่ หอยสองฝา ผัก ผลไม้สด และอาหารพร้อมบริโภค เพื่อแจ้งเตือนภัยให้ประชาชนได้เพิ่มความระมัดระวังในการบริโภคอาหารเหล่านี้ เป็นการคุ้มครองผู้บริโภคภายในประเทศ ตลอดจนเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตหอยสองฝาให้ได้มาตรฐานสากลเพื่อการส่งออกต่างประเทศ

สรุป

การตรวจหาการปนเปื้อนไวรัสโนโรในเนื้อหอยนางรมดิบครั้งนี้ พบมีการปนเปื้อนร้อยละ 7.76 เป็น GI ร้อยละ 0.91 GII ร้อยละ 6.85 และตรวจพบในช่วงอากาศเย็น จึงมีความเสี่ยงต่อผู้บริโภคที่จะได้รับเชื้อเมื่อรับประทานหอยดิบหรือหอยสุก ๆ ดิบ ๆ ที่ผ่านความร้อนเพียงเล็กน้อย ไม่เพียงพอที่จะทำลายไวรัสได้ การตรวจหาไวรัสโนโรที่พบปริมาณการปนเปื้อนในปริมาณน้อยต้องใช้วิธีทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่พบการปนเปื้อนข้ามตามมาตรฐานสากลเพื่อให้มั่นใจว่าผลการทดสอบมีความถูกต้อง แม่นยำเชื่อถือได้ สร้างความพึงพอใจแก่ผู้รับบริการและเป็นการคุ้มครองผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณนางเพ็ญศรี รอดมา อดีตผู้ทรงคุณวุฒิกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้แนวคิดในการศึกษาวิจัย และตรวจทานต้นฉบับ นายมงคล เจนจิตติกุล อดีตรองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และผู้อำนวยการสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร ที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณ และขอขอบคุณนางนงลักษณ์ วิไลภูมิบัณฑิต ที่ช่วยเตรียมและสกัดตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

1. Koo HL, Ajami N, Atmar RL, DuPont HL. Noroviruses: the principal cause of foodborne disease worldwide. *Discov Med* 2010; 10(50): 61-70.
2. Gibson KE, Ricke SC. Human noroviruses and food safety. *Agric Food Anal Bacteriol* 2012; 2(1): 25-34.
3. อภิรติ เทียมบุญเลิศ, ทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์ และชย ภูววรรณ. ท้องเสียจากไวรัส. *ว. กุมารเวชศาสตร์* 2555; 55(2): 84-90
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated norovirus outbreak management and disease prevention guideline. *MMWR* 2011; 60(3): 1-15.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney - United States, 2012. *MMWR* 2013; 62(3): 55.
6. FAO/WHO. Viruses in food: scientific advice to support risk management activities, meeting report. Microbiological risk assessment series 13. Geneva: FAO and WHO; 2008.
7. Bellou M, Kokkinos P, Vantarakis A. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. *Food Environ Virol* 2013; 5(1): 13-23.

8. Webby RJ, Carville KS, Kirk MD, Greening G, Ratcliff RM, Crerar SK, et al. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. *Clin Infect Dis* 2007; 44(8): 1026-31.
9. Alfano-Sobsey E, Sweat D, Hall A, Breedlove F, Rodriguez R, Greene S, et al. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol Infect* 2012; 140(2): 276-82.
10. McIntyre L, Galanis E, Mattison K, Mykytczuk O, Buenaventura E, Wong J, et al. Multiple clusters of norovirus among shellfish consumers linked to symptomatic oyster harvesters. *J Food Prot* 2012; 75(9): 1715-20.
11. Atmar RL. Noroviruses – state of the art. *Food Environ Virol* 2010; 2(3): 117-26.
12. CAC/GL 79-2012. Guideline on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food [online]. 2012 [cited 2015 Jun 23]; [13 screens]. Available from: URL: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/download/standards/13215/CXG_079e.pdf
13. ISO/TS 15216-2:2013. Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR – Part 2: method for qualitative detection. Geneva, Switzerland: ISO; 2013.
14. Infection Agents Surveillance Report (IASR). Norovirus food poisoning in Japan as of 2011 [online]. 2011 Dec [cited 2015 Jun 23]; 32(12). Available from: URL: <http://www.nih.go.jp/niid/en/iasr-e.html>
15. Maalouf H, Schaeffer J, Parnaudeau S, Le Pendu J, Atmar RL, Crawford SE, et al. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(10): 3189-96.
16. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 2012; 113(5): 1014-26.
17. Stals A, Baert L, Coillie EV, Uyttendaele M. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int J Food Microbiol* 2012; 153(1-2): 1-9.
18. Uhrbrand K, Myrmel M, Maunula L, Vainio K, Trebbien R, Norrung B, et al. Evaluation of a rapid method for recovery of norovirus and hepatitis A virus from oysters and blue mussels. *J Virol Methods* 2010; 169(1): 70-8.
19. Rajko-Nenow P, Waters A, Keaveney S, Flannery J, Tuite G, Coughlan S, et al. Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during in seasonal peak of infections in Ireland in 2010. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(8): 2578-87.
20. EFSA Panel of Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA J* 2012; 10(1): 2500.
21. Schaeffer J, Le Saux JC, Lora M, Atmar RL, Le Guyader FS. Norovirus contamination on French marketed oysters. *Int J Food Microbiol* 2013; 166(2): 244-8.
22. Woods JW, Burkhardt W. Occurrence of norovirus and hepatitis A virus in U.S. oysters. *Food Environ Virol* 2010; 2(3): 176-82.
23. Ma LP, Zhao F, Yao L, Li XG, Zhou DQ, Zhang RL. The presence of genogroup II norovirus in retail shellfish from seven coastal cities in China. *Food Environ Virol* 2013; 5(2): 81-6.
24. Nishida T, Kimura H, Saitoh M, Shinohara M, Kato M, Fukuda S, et al. Detection, quantitation and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(10): 5782-6.

25. Brake F, Ross T, Holds G, Kiermeier A, McLeod C. A survey of Australian oysters for the presence of human noroviruses. *Food Microbiol* 2014; 44: 264-70.
26. Chaimongkol N, Khamrin P, Malasao R, Thongprachum A, Kongsricharoern T, Ukarapol N, et al. Molecular characterization of norovirus variants and genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in Thailand. *J Med Virol* 2014; 86(7): 1210-8.
27. Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(10): 1553-7.
28. Love DC, Lovelace GL, Sobsey MD. Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *Int J Food Microbiol* 2010; 143(3): 211-7.
29. Flannery J, Rajko-Nenow P, Keaveney S, O'Flaherty V, Dore W. Simulated sunlight inactivation of norovirus and FRNA bacteriophage in seawater. *J Appl Microbiol* 2013; 115(3): 915-22.
30. Morillo SG, Timenetsky Mdo C. Norovirus: an overview. *Rev Assoc Med Bras* 2011; 57(4): 453-8.

Detection of Norovirus in Raw Oyster Meat by Using Real Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)

Chamrieng Poonyaprasit Nutthakan Tiyasiwaporn and Atcha Satjapala

Bureau of Quality and Safety of Food, Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Nonthaburi 11000 Thailand.

ABSTRACT Norovirus is an important causative agent of gastroenteritis and food poisoning associated with oyster consumption. Because of its filter feeder, oysters can accumulate norovirus from growing water contaminated with norovirus. Consumption of raw or undercooked oysters may cause illness. Norovirus cannot be cultivated to date, thus detection relies on molecular method. This study was undertaken to investigate norovirus in raw oyster meat from fresh markets and supermarkets in Bangkok and peripheral areas, Samut Sakhon, Samut Songkhram and Chon Buri province, between October 2013 to March 2014, by using real-time RT-PCR method. The results showed that norovirus was detected in 17 out of 219 samples (7.76%), of which two samples (0.91%) belonged to genogroup I (GI) and 15 samples (6.85%) belonged to genogroup II (GII). The detection of higher incidence of GII over GI is relevant to the trend of incidence of norovirus in feces of Thai patients. This data can be used to evaluate risks and to inform national health alert to consumers.

Key words: detection, norovirus, raw oyster meat, real time RT-PCR