RESEARCH ARTICLE

Effect of Microwave, Ultraviolet Light, Clorox® and Dettol® on Inactivation of Newcastle Disease Virus but Allowing Detection of Its RNA

Tawatchai Pohuang[1*], Kanlaya Chuachan[1], Kingkarn Sarachu[1], Varaporn Sukolapong[2]

Abstract

Objective — To investigate the effect of microwave, ultraviolet (UV) light, Clorox® or Dettol® on inactivation of Newcastle disease virus (NDV) but allowing detection of its ribonucleic acid (RNA)

Materials and Methods — The study was divided into three experiments. In the first experiment, the virus was treated by microwave at an intensity of 900 watts for 5, 20, 40, or 60 minutes. In the second experiment, UV light from a biological safety cabinet class 2 at a wave length of 254 nanometers was used for 30, 60, or 120 minutes. Lastly, in the third experiment, the virus was exposed to Clorox® or Dettol® at the concentration of 1:6.25 or 1:25, and 1:20 or 1:40, respectively. The infectivity of treated NDV was detected by inoculated into embryonated chicken eggs. After that, the allantoic fluid was collected and confirmed for the presence of NDV by hemagglutination test and hemagglutination inhibition test. The RNA of treated NDV was detected by semi-nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction (semi-nested RT-PCR).

Results — The results showed that a minimum of 20 minutes and 30 minutes was required for microwave and UV light expose to inactivate NDV, respectively. Moreover, exposure of the virus for over 40 minutes to microwave, and over 30 minutes to UV light also destroyed the viral RNA; therefore, the viral RNA could not be detected by semi-nested RT-PCR. Additionally, every concentration of Clorox® and Dettol® used was efficient to inactivate the virus. Moreover, at the concentration of 1:6.25, Clorox® also destroyed the viral RNA.

Conclusion — The treatment of NDV using microwave for 20-40 minutes, UV light for 30 minutes, Clorox® at the concentration of 1:25, or Dettol® at the concentration of 1:20 to 1:40 is efficient to inactivate the virus, while the viral RNA is still stable and can be detected by molecular biological techniques.

KKU Vet J. 2010;20(2):165-177 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords: Newcastle disease virus; microwave; ultraviolet light; Clorox®; Dettol®; RNA

[1]Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

***Corresponding Author**: ptawat@kku.ac.th

ผลของไมโครเวฟ แสงอัลตราไวโอเลต คลอร็อกซ์® และเดทตอล® ต่อการฆ่าเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล แต่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อ

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง[1*], กัลยา เจือจันทร์[1], กิ่งกาญจน์ สาระชู[1], วราภรณ์ ศุกลพงศ์[2]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของไมโครเวฟ แสงอัลตราไวโอเลต คลอร็อกซ์® และเดทตอล® ต่อการฆ่าเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus; NDV) แต่สามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) ของเชื้อ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อยดังนี้ การทดลองย่อยที่ 1 ศึกษาผลการฆ่าเชื้อด้วยไมโครเวฟ โดยใช้ระดับความร้อน 900 วัตต์ เป็นเวลา 5 20 40 หรือ 60 วินาที การทดลองย่อยที่ 2 ศึกษาผลการฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยให้เชื้อสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตจากตู้ biological safety cabinet class 2 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 30 60 หรือ 120 นาที การทดลองย่อยที่ 3 ศึกษาผลการฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ โดยใช้คลอร็อกซ์® ความเข้มข้น 1:6.25 หรือ 1:25 และเดทตอล® ความเข้มข้น 1:20 หรือ 1:40 ตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ โดยการฉีดเชื้อเข้าสู่ไข่ไก่ฟักแล้วเก็บ allantoic fluid เพื่อตรวจหาเชื้อ NDV ด้วยวิธี hemagglutination test และ hemagglutination inhibition test และตรวจหา RNA ของเชื้อด้วยวิธี semi-nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction ผลการศึกษา การใช้ไมโครเวฟเป็นเวลา 20-40 วินาที สามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้ โดยยังสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อ ถ้าใช้แสงอัลตราไวโอเลตควรให้เชื้อได้สัมผัสแสงนาน 30 นาที ซึ่งนอกจากจะฆ่าเชื้อได้แล้วยังสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อได้ ส่วนการใช้คลอร็อกซ์® หรือเดทตอล® ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบสามารถฆ่าเชื้อได้และสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อได้ ยกเว้นคลอร็อกซ์® ที่ความเข้มข้น 1:6.25 จะมีผลทำลาย RNA ของเชื้อด้วย

ข้อสรุป การใช้ไมโครเวฟเป็นเวลา 20-40 นาที หรือการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที หรือการใช้คลอร็อกซ์® ที่เจือจาง 1:25 หรือการใช้เดทตอล® ที่เจือจาง 1:20 ถึง 1:40 สามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้ โดยยังสามารถตรวจหา RNA ของเชื้อได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553;20(2):165-177 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ: เชื้อไวรัสนิวคาสเซิล ไมโครเวฟ แสงอัลตราไวโอเลต คลอร็อกซ์® เดทตอล® อาร์เอ็นเอ

[1]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

[2]ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* **ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ:** ptawat@kku.ac.th

บทนำ

โรคนิวคาสเซิล (Newcastle disease) เป็นโรคติดต่อที่มีความสำคัญโรคหนึ่งสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ สาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล (Newcastle disease virus; NDV) จัดอยู่ใน family Paramyxoviridae และ genus Avulavirus มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ (ribonucleic acid; RNA) ชนิดสายเดี่ยว [1] พบการระบาดของโรคในหลายประเทศทั้งเอเชีย อัฟริกา และอเมริกา [2] ส่วนทวีปยุโรปพบการแพร่ระบาดของโรคเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ.1991 [3] เชื้อ NDV มีความสามารถในการก่อโรครุนแรงมาก ไก่ที่ติดเชื้อมีอัตราการตายสูง 50-100% อัตราการเจริญเติบโตช้าลง มีรายงานการเกิดโรคในสัตว์ปีกหลายชนิด เช่น ไก่งวง นกยูง ไก่ฟ้า นกกระทา นกพิราบ เป็นต้น ส่วนเป็ดและห่าน ติดเชื้อได้แต่อาการป่วยไม่รุนแรง [4] นอกจากนี้เชื้อ NDV ยังสามารถก่อโรคในคนได้โดยพบอาการตาแดง (conjunctivitis) ในคนที่ได้รับเชื้อ [5] เนื่องจากเชื้อ NDV เป็นเชื้อที่สามารถก่อโรครุนแรง การตรวจวินิจฉัยโรคอย่างถูกต้องแม่นยำจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่อการควบคุมและป้องกันโรค อย่างไรก็ตามในการส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ หรือการส่งตัวอย่างเพื่อตรวจยืนยันเชื้อระหว่างห้องปฏิบัติการ มีโอกาสที่จะเกิดการแพร่กระจายของเชื้อโรคระหว่างการขนส่ง ดังนั้นการทำให้เชื้อไวรัสหมดฤทธิ์ แต่ยังสามารถตรวจยืนยันเชื้อได้จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสม

Suarez และคณะ [6] ได้รายงานผลการศึกษาไว้ว่า น้ำยาฆ่าเชื้อหลายชนิด เช่น phenolic disinfectant, quaternary ammonium compound, chlorine compound, น้ำยาฟอกขาว (household bleach) ที่มีส่วนประกอบของ sodium hypochlorite, น้ำยา Virkon S ซึ่งอยู่ในกลุ่ม peroxygen compound สามารถฆ่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (avian influenza virus; AIV) สายพันธุ์ H5N9 และสายพันธุ์ H7N3 นอกจากนี้ยังพบว่า phenolic disinfectant และ quaternary ammonium compound ไม่ทำลาย RNA ของเชื้อ ส่วนน้ำยาฟอกขาว และน้ำยา Virkon S เมื่อถูกเจือจางไป 1/100 เท่าและ 1/1000 เท่าตามลำดับ จะไม่ทำลาย RNA ของเชื้อ สำหรับในประเทศไทย ทวีศักดิ์และคณะ [7] พบว่าน้ำยาฆ่าเชื้อหลายชนิดรวมถึงคลอร็อกซ์® (Clorox®) และเดทตอล® (Dettol®) สามารถฆ่าเชื้อ AIV สายพันธุ์ H5N1 แต่ไม่ได้ศึกษาผลต่อการคงอยู่ของ RNA ของเชื้อ นอกจากการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อแล้วยังมีรายงานผลการศึกษาการฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพอื่น เช่น การใช้เตาไมโครเวฟ (domestic microwave oven) ฆ่าเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อ (infectious bronchitis virus) และเชื้อนิวโมไวรัสในสัตว์ปีก (avian pneumovirus) โดยยังสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์ (reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR) [8] การใช้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet light) ฆ่าเชื้อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย (foot-and-mouth disease virus) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลต่อ RNA ของเชื้อ [9]

วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของไมโครเวฟ แสงอัลตราไวโอเลต คลอร็อกซ์® และเดทตอล® ต่อการฆ่าเชื้อ NDV แต่สามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปปฏิบัติจริงในห้องปฏิบัติการ รวมถึงนำไปปรับใช้กับเชื้อไวรัสที่มีโครงสร้างเหมือนกับเชื้อ NDV เช่น เชื้อ AIV ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเพิ่มจำนวนและการตรวจหาเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลโดยการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก

เชื้อ NDV ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นเชื้อที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองในจังหวัดหนึ่งของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ที่แสดงอาการป่วยและตายด้วยโรคนิวคาสเซิล

นำสารละลายที่ต้องการตรวจหาเชื้อ NDV ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน โดยฉีดเข้าตำแหน่ง allantoic cavity ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร (มล.) ต่อฟอง จำนวน 5 ฟองต่อตัวอย่าง นำไข่ไก่ฟักเข้าตู้ฟักไข่ และตรวจดูการตายของตัวอ่อนทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตายมาทำการเก็บ allantoic fluid (AF) ส่วนไข่ฟองที่ตัวอ่อนยังไม่ตายให้รอเก็บ AF หลังฟักไข่ครบ 4 วัน จากนั้นยืนยันการพบเชื้อ NDV ด้วยวิธี hemagglutination (HA) test และ hemagglutination inhibition (HI) test ตามลำดับ ในกรณีการตรวจหาเชื้อภายหลังจากการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ นั้น หากไม่พบเชื้อ NDV ในการฉีดไข่ชุดที่ 1 ให้เก็บ AF ของไข่ทั้ง 5 ฟองในตัวอย่างเดียวกันรวมกันแล้วฉีดเข้าไข่ไก่ฟักชุดที่ 2 โดยเริ่มต้นทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนแรก หากตรวจไม่พบเชื้อ NDV อีก จึงจะสามารถรายงานได้ว่าไม่พบเชื้อ NDV ในตัวอย่างส่งตรวจ [10]

การหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัส

นำ AF ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส มาตรวจวัดความเข้มข้นของเชื้อไวรัส โดยเจือจาง AF ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (phosphate buffered saline; PBS) ลงไปครั้งละ 1/10 (10^{-1}) เท่าจากตั้งต้น จนถึงความเข้มข้น 10^{-10} จากนั้นฉีดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นเข้าในไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ความเข้มข้นละ 5 ฟอง ฟองละ 0.1 มล. นำไข่ไก่ฟักเข้าตู้ฟักไข่ และตรวจดูการตายของตัวอ่อนทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไข่ไก่ฟักที่ตัวอ่อนตาย มาทำการเก็บ AF ส่วนไข่ฟองที่ตัวอ่อนยังไม่ตายจะรอเก็บ AF หลังฟักไข่ครบ 4 วัน จากนั้นยืนยันการพบเชื้อ NDV ด้วยวิธี HA test และ HI test ตามลำดับ นำผลการทดสอบมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อในหน่วย embryo infectious dose 50% (EID_{50}) ตามวิธีที่กำหนดไว้ใน Poultry Disease Subcommittee and Committee on Animal Health Agriculture Board [11] ซึ่งความเข้มข้นของเชื้อ NDV ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ $10^6 EID_{50}$/มล.

การศึกษาผลการฆ่าเชื้อไวรัสนิวคาสเซิลด้วยไมโครเวฟ แสงอัลตราไวโอเลต และน้ำยาฆ่าเชื้อ

แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองย่อย โดยใช้วิธีการฆ่าเชื้อแตกต่างกันได้แก่ ไมโครเวฟ แสงอัลตราไวโอเลต และน้ำยาฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคภายหลังจากผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีต่างๆ โดยการฉีดเชื้อเข้าสู่ไข่ไก่ฟักดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนสารละลายเชื้อที่เหลือจากการฉีดไข่ไก่ฟักนำไปเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจหา RNA ของเชื้อ NDV ด้วยวิธี semi-nested RT-PCR

การทดลองที่ 1 การใช้ไมโครเวฟ

1. จุ่มไม้พันสำลี (เบอร์ M จุของเหลวได้ประมาณ 500 ไมโครลิตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในสารละลายเชื้อ NDV ที่มีความเข้มข้น $10^6 EID_{50}$/มล. จำนวน 20 ก้าน จากนั้นแบ่งใส่ถุงพลาสติกที่ใหม่และสะอาด ถุงละ 4 ก้าน แล้วนำไปเข้าเตาไมโครเวฟ (ยี่ห้อ LG รุ่น MS-202 W) โดยใช้ระดับความร้อนสูงสุด (900 วัตต์) และใช้เวลาในแต่ละกลุ่มทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมบวก (positive control) ไม่นำเข้าเตาไมโครเวฟ

กลุ่มที่ 2 ใช้เวลา 5 วินาที

กลุ่มที่ 3 ใช้เวลา 20 วินาที

กลุ่มที่ 4 ใช้เวลา 40 วินาที

กลุ่มที่ 5 ใช้เวลา 60 วินาที

กลุ่มที่ 6 กลุ่มควบคุมลบ (negative control) ใช้ไม้พันสำลีจำนวน 4 ก้าน จุ่ม PBS ใส่ในถุงพลาสติกแล้วนำเข้าเตาไมโครเวฟเป็นเวลา 60 วินาที

2. นำก้านสำลีจากแต่ละกลุ่มใส่ลงในหลอดทดลอง เติม PBS หลอดละ 6 มล. เขย่าอย่างแรง แล้วนำไปตรวจหาเชื้อ NDV ด้วยวิธีฉีดเข้าไข่ไก่ฟักและวิธี semi-nested RT-PCR

การทดลองที่ 2 การใช้แสงอัลตราไวโอเลต

1. นำสารละลายเชื้อ NDV ที่มีความเข้มข้น $10^6 EID_{50}$/มล. ใส่ในถุงพลาสติกใสถุงละ 2 มล. ปิดผนึกปากถุงให้สนิท จากนั้นวางแผ่ให้แบนที่พื้นตู้ biological safety cabinet class 2 แล้วเปิดแสงอัลตราไวโอเลตซึ่งมีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมบวก ไม่ให้สัมผัสแสงอัลตราไวโอเลต โดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 120 นาที

กลุ่มที่ 2 สัมผัสแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 30 นาที

กลุ่มที่ 3 สัมผัสแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 60 นาที

กลุ่มที่ 4 สัมผัสแสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 120 นาที

2. ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดเก็บสารละลายเชื้อจากถุงพลาสติกใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไปตรวจหาเชื้อ NDV ด้วยวิธีฉีดเข้าไข่ไก่ฟักและวิธี semi-nested RT-PCR

การทดลองที่ 3 การใช้น้ำยาฆ่าเชื้อ

น้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิดคือ คลอร็อกซ์® และเดทตอล® ทั้งนี้ส่วนประกอบของน้ำยาฆ่าเชื้อและขนาดที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

คลอร็อกซ์® มีส่วนประกอบคือ sodium hypochlorite 6% และส่วนผสมอื่นๆ อีก 94% สำหรับความเข้มข้นที่แนะนำไว้ในฉลากคือ 1:25 ส่วนความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ 2 ระดับคือ ที่ความเข้มข้น 1:6.25 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ฆ่าเชื้อ AIV สายพันธุ์ H5N1 ในการทดลองของทวีศักดิ์และคณะ [7] และที่ความเข้มข้น 1:25 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่แนะนำไว้ในฉลาก

เดทตอล® มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ chloroxylenol 4.8% และ isopropyl alcohol B.P. 12% โดยปริมาตร สำหรับความเข้มข้นที่แนะนำไว้ในฉลากเพื่อฆ่าเชื้อไวรัสคือ 1) 1:20 สำหรับเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา ชนิดเอ (influenza virus type A) เชื้อไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ (herpes simplex virus)

เชื้อไวรัสซารส์โคโรนาไวรัส (SARS coronavirus) เชื้อไวรัสเอชไอวี (human immunodeficiency virus; HIV) หรือ 2) 1:40 สำหรับเชื้อ AIV สายพันธุ์ H5N1 ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นทั้ง 2 ระดับ คือ ที่ความเข้มข้น 1:20 และ 1:40

1. ใช้ไมโครปิเปต ดูดน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในหลอดทดลองปริมาณ 1 มล. จากนั้นเติมสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้น $10^6 EID_{50}$/มล. ใส่ตามลงไปหลอดละ 1 มล. เท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ก่อนนำไปฉีดเข้าไข่ไก่ฟักอายุ 10 วัน ตามวิธีตรวจหาเชื้อ NDV โดยการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 7 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมบวก ส่วนผสมคือน้ำกลั่น 1 มล. และสารละลายเชื้อ 1 มล. ทำการเจือจางส่วนผสมที่ได้ลงครึ่งหนึ่งด้วย PBS ก่อนฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก เพื่อให้ปริมาณเชื้อที่ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักเท่ากับกลุ่มที่ 2

กลุ่มที่ 2 มีคลอร็อกซ์® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:6.25 โดยนำคลอร็อกซ์® ที่เจือจางไว้ในสัดส่วน 2:6.25 ปริมาณ 1 มล. ผสมกับสารละลายเชื้อ 1 มล. ทำการเจือจางส่วนผสมที่ได้ลงครึ่งหนึ่งด้วย PBS ก่อนฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก เนื่องจากในการทดสอบเบื้องต้นพบว่า คลอร็อกซ์® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:6.25 สามารถทำให้ตัวอ่อนในไข่ไก่ฟักตายได้

กลุ่มที่ 3 มีคลอร็อกซ์® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:25 โดยนำคลอร็อกซ์® ที่เจือจางไว้ในสัดส่วน 1:12.5 ปริมาณ 1 มล. ผสมกับสารละลายเชื้อ 1 มล.

กลุ่มที่ 4 มีเดทตอล® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:20 โดยนำเดทตอล® ที่เจือจางไว้ในสัดส่วน 1:10 ปริมาณ 1 มล. ผสมกับสารละลายเชื้อ 1 มล.

กลุ่มที่ 5 มีเดทตอล® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:40 โดยนำเดทตอล® ที่เจือจางไว้ในสัดส่วน 1:20 ปริมาณ 1 มล. ผสมกับสารละลายเชื้อ 1 มล.

กลุ่มที่ 6 มีเฉพาะคลอร็อกซ์® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:6.25 โดยนำคลอร็อกซ์® ที่เจือจางไว้ในสัดส่วน 2:6.25 ปริมาณ 1 มล. ผสมกับ PBS 1 มล. จากนั้นเจือจางส่วนผสมที่ได้ลงครึ่งหนึ่งด้วย PBS ก่อนฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก เพื่อให้มีความเข้มข้นของคลอร็อกซ์® ที่ฉีดเข้าไข่ไก่ฟักเท่ากับกลุ่มที่ 2

กลุ่มที่ 7 มีเฉพาะเดทตอล® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:20 โดยนำเดทตอล® ที่เจือจางไว้ในสัดส่วน 1:10 ปริมาณ 1 มล. ผสมกับ PBS 1 มล.

2. ส่วนผสมของแต่ละกลุ่มทดลองที่เหลือจากการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก นำไปตรวจหา RNA เชื้อ NDV ด้วยวิธี semi-nested RT-PCR

การตรวจหา RNA ของเชื้อไวรัสนิวคาสเซิล

การสกัด RNA

นำตัวอย่างจำนวน 200 ไมโครลิตร มาสกัด RNA โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป Viral Nucleic Acid Extraction Kit (Real Biotech, Taiwan) ตามคำแนะนำของผู้ผลิต แล้วเก็บ RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

Primer

ใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน F ของเชื้อ NDV ดังนี้ forward primer FOP1 (TAC ACC TCA TCC CAG ACA GGG TC) [12] ส่วน reverse primer ทำการออกแบบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของยีน F ของเชื้อ NDV ที่มีรายงานใน GenBank database เป็นต้นแบบ ซึ่ง primer ที่ออกแบบได้แก่ RENDV 359 (GAG AGC TAC ACC ACC GAT AAT GG) และ RENDV 371 (TGT TGC AAC CCC GAG AGC TAC AC)

การทำปฏิกิริยา RT-PCR

ปฏิกิริยา RT-PCR ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแบบ semi-nested RT-PCR โดยใช้ AccessQuickTM RT-PCR System (Promega, USA) ดังนี้

ปฏิกิริยาขั้นที่หนึ่ง นำ RNA ที่ได้จากการสกัดมาเข้าสู่ปฏิกิริยา โดยใช้ primer FOP1 ร่วมกับ primer RENDV 371 เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา reverse transcription ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที และที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ โดยแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ polymerization 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อครบ 35 รอบแล้ว ในขั้นตอน final polymerization กำหนดอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ปฏิกิริยาขั้นที่สอง นำผลผลิตจากปฏิกิริยาขั้นที่หนึ่งมาเจือจาง 1:20 ด้วย RNase-free water จากนั้นนำผลผลิตที่เจือจางแล้ว 1 ไมโครลิตรมาเข้าสู่ปฏิกิริยา โดยใช้ primer FOP1 ร่วมกับ primer RENDV 359 เริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบ โดยแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ polymerization 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เมื่อครบ 35 รอบแล้ว ในขั้นตอน final polymerization กำหนดอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR

นำผลผลิตจาก PCR ที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ผลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มล. แล้วนำไปตรวจสอบด้วยกล้อง ultraviolet transilluminator ซึ่งจะได้ผลผลิตที่ขนาด 225 คู่เบส (base pairs, bp)

ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลการฆ่าเชื้อด้วยไมโครเวฟ

จากการทดลองพบว่าการใช้ไมโครเวฟเป็นเวลาตั้งแต่ 20 วินาทีขึ้นไปสามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้ และสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อได้เมื่อใช้ไมโครเวฟเป็นเวลา 5 20 และ 40 วินาที (**Table 1**, **Figure 1**)

การทดลองที่ 2 ผลการฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

จากการทดลองพบว่าการใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นเวลาตั้งแต่ 30 นาทีขึ้นไปสามารถฆ่าเชื้อได้ แต่สามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อเฉพาะกลุ่มที่ฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาทีเท่านั้น (กลุ่มที่ 2) (**Table 1**, **Figure 2**)

การทดลองที่ 3 ผลการฆ่าเชื้อด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ

จากการทดลองพบว่า ทั้งคลอร็อกซ์® และเดทตอล® ในระดับความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาสามารถฆ่าเชื้อได้ และยังคงตรวจพบ RNA ของเชื้อเมื่อฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:25 (กลุ่มที่ 3) หรือฆ่าเชื้อด้วยเดทตอล® ที่เจือจางในสัดส่วน 1:20 (กลุ่มที่ 4) หรือ 1:40 (กลุ่มที่ 5) (**Table 1**, **Figure 3**)

Table 1. Isolation of NDV and Detection of Its RNA After Treated with Microwave, Ultraviolet Light, Clorox® or Dettol®[a]

Treatment	Virus Isolation	RNA Detection
Trial 1		
gr.1 NDV, non-microwave	+	+
gr.2 NDV, microwave 5 sec	+	+
gr.3 NDV, microwave 20 sec	-	+
gr.4 NDV, microwave 40 sec	-	+
gr.5 NDV, microwave 60 sec	-	-
gr.6 no NDV, microwave 60 sec	-	-
Trial 2		
gr.1 NDV, no UV	+	+
gr.2 NDV, UV 30 min	-	+
gr.3 NDV, UV 60 min	-	-
gr.4 NDV, UV 120 min	-	-
Trial 3		
gr.1 NDV, no disinfectant	+	+
gr.2 NDV, Clorox® 1:6.25	-	-
gr.3 NDV, Clorox® 1:25	-	+
gr.4 NDV, Dettol® 1:20		- +
gr.5 NDV, Dettol® 1:40		- +
gr.6 no NDV, Clorox®	-	-
gr.7 no NDV, Dettol®	-	-

[a]NDV was detected by HA and HI tests. Its RNA was detected by semi-nested RT-PCR.

+ = positive for the virus isolation or positive for RNA detection depending on corresponding columns

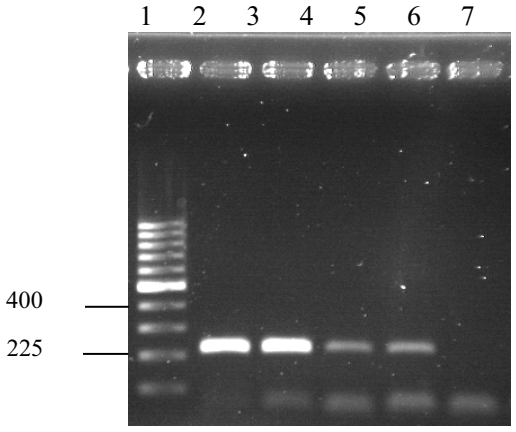
- = negative for the virus isolation or negative for RNA detection depending on corresponding columns

Abbreviations: NDV = Newcastle disease virus, UV = ultraviolet light

วิจารณ์

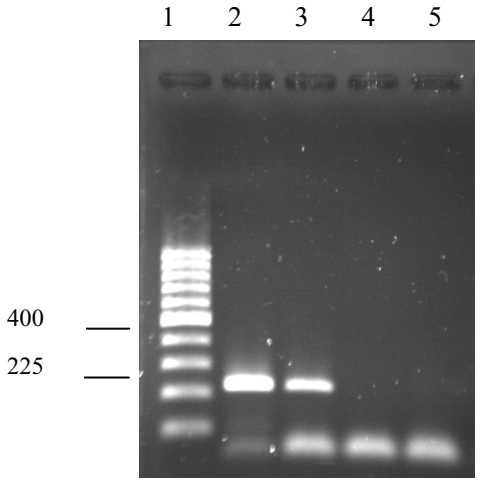
การส่งตัวอย่างส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการ หรือการส่งตัวอย่างระหว่างห้องปฏิบัติการเป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญและพึงระวังความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น เช่น การหกหล่นของตัวอย่าง การแตกเสียหายของภาชนะที่บรรจุ หากตัวอย่างส่งตรวจนั้นเป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญไม่ว่าจะก่อโรคในคน ในสัตว์ หรือก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ เมื่อเกิดความผิดพลาดอย่างใดอย่างหนึ่งดังกล่าวจึงเป็นการเพิ่มโอกาสการแพร่กระจายของเชื้อโรค เบื้องต้นเชื้ออาจเป็นอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน หรืออาจแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกห้องปฏิบัติการได้ในที่สุด ดังนั้นผลการศึกษาในครั้งนี้จะช่วยให้คำตอบแก่ผู้ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้อง หากมีความจำเป็นจะต้องส่งตัวอย่างเชื้อโรคไปยังห้องปฏิบัติการอื่นภายนอกหน่วยงาน เพื่อตรวจยืนยัน ตรวจเพิ่มเติม หรือเป็นเครื่องมือในการปรับเทียบมาตรฐานการวินิจฉัยของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง เพื่อให้ทราบถึงวิธีในการฆ่าเชื้อ NDV โดยยังสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

Figure 1. RT-PCR Products After Microwave Treatment



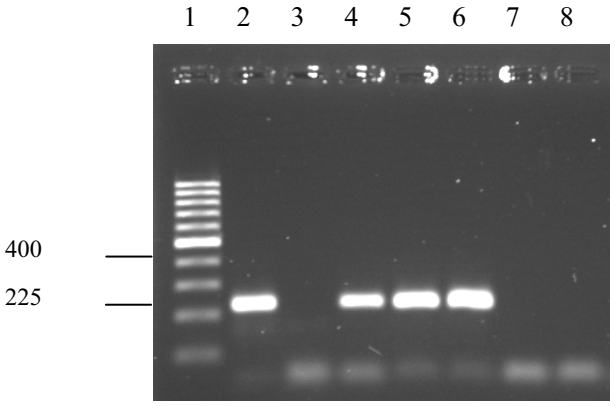
Lane assignments: lane 1, 100 bp marker; lane 2, NDV untreated (gr.1); lane 3, 4, 5 and 6 NDV after 5, 20, 40 and 60 sec microwave treatment (gr.2, 3, 4 and 5); lane 7, negative control (gr.6)

Figure 2. RT-PCR Products After UV Light Treatment



Lane assignments: lane 1, 100 bp marker; lane 2, NDV untreated (gr.1); lane 3, 4, and 5 after 30, 60, and 120 min UV treatment (gr.2, 3 and 4).

Figure 3. RT-PCR Products After Disinfectants Treatment



Lane assignments: lane 1, 100 bp marker; lane 2, NDV untreated (gr.1); lane 3 and 4, NDV after Chlorox® treatment (gr.2 and 3); lane 5 and 6, NDV after Dettol® treatment (gr.4 and 5); lane 7 and 8, negative control (gr.6 and 7).

ไมโครเวฟ เป็นเครื่องมือที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป ราคาไม่แพง ใช้งานง่าย ทำให้เกิดความร้อนตามที่ต้องการได้ภายในระยะเวลารวดเร็ว และจากการทดลองนี้จะเห็นว่า เมื่อใช้ความร้อน 900 วัตต์ นาน 20 วินาทีขึ้นไป สามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้ แต่ไม่ควรใช้เวลาเกิน 40 วินาที มิฉะนั้นความร้อนจะทำลาย RNA ของเชื้อ ทำให้ตรวจไม่พบสารพันธุกรรมของเชื้อด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา ผลการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากของ Elhafi และคณะ[8] ที่รายงานไว้ว่าการใช้ไมโครเวฟที่ระดับความร้อน 900 วัตต์เท่ากันนานแค่ 5 วินาที สามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้รวมถึงเชื้อไวรัสหลอดลมอักเสบติดต่อและเชื้อนิวโมไวรัสในสัตว์ปีกโดยยังคงสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อได้ด้วยวิธี RT-PCR ยกเว้นเชื้อ NDV ที่ไม่ได้ทดสอบต่อด้วยวิธีดังกล่าว อย่างไรก็ตามเพื่อป้องกันอันตรายที่อาจจะเกิดขึ้นจากเชื้อโรค ควรเลือกใช้เวลาให้นานที่สุดในการฆ่าเชื้อ แต่ยังคงสามารถนำตัวอย่างไปตรวจวินิจฉัยต่อได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งในกรณีของเชื้อ NDV ควรใช้เวลาไม่น้อยกว่า 20 วินาที แต่ไม่ควรเกิน 40 วินาทีที่ระดับความร้อน 900 วัตต์

การใช้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อทำลายเชื้อจุลชีพ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ฆ่าเชื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ รวมถึงใช้ฆ่าเชื้อที่อาจล่องลอยในอากาศในห้องปฏิบัติการได้ด้วย ตู้ biological safety cabinet ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปจะมีการติดตั้งแหล่งที่ให้แสงอัลตราไวโอเลตไว้ ซึ่งผู้ปฏิบัติงานมักเปิดแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อฆ่าเชื้อที่อาจตกค้างในตู้และพื้นผิวปฏิบัติงาน โดยใช้เวลานานตามที่บริษัทผู้ผลิตตู้กำหนด ตู้ biological safety cabinet class 2 ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ให้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และผู้ผลิตแนะนำให้เปิดเพื่อฆ่าเชื้อนาน 30 นาที ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการทดสอบว่า แสงอัลตราไวโอเลตจากตู้ในช่วงความยาวคลื่นและเวลาที่กำหนดไว้นั้นจะสามารถฆ่าเชื้อ NDV ที่อาจตกค้างภายหลังการปฏิบัติงานได้หรือไม่ ซึ่งผลพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที สามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้จริง และยังคงสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อได้ แต่เมื่อใช้เวลา 60 นาที และ 120 นาทีพบว่ามีผลทำลาย RNA ของเชื้อด้วย ซึ่งข้อมูลของ Prince และ Prince [13] ใช้ยืนยันผลที่เกิดขึ้นนี้ได้ เพราะได้กล่าวไว้ว่าแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 240-280 นาโนเมตร สามารถทำลายสารพันธุกรรมของจุลชีพได้ อย่างไรก็ตาม Muhmmad และคณะ [14] พบว่าไม่สามารถฆ่าเชื้อ AIV สายพันธุ์ H7N3 ได้เมื่อให้เวลาสัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตนานสูงสุด 45 นาที ในขณะที่ Chumpolbanchorn และคณะ [15] พบว่าเชื้อ AIV สายพันธุ์ H5N1 ที่อยู่ในมูลไก่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้เมื่อให้สัมผัสกับแสงอัลตราไวโอเลตนาน 240 นาที แม้ข้อมูลของ Muhmmad และคณะ [14] และ Chumpolbanchorn และคณะ [15] จะไม่สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ นั่นอาจเป็นเพราะเชื้อที่นำมาทดสอบเป็นคนละชนิดกัน แต่ทำให้ได้ข้อสังเกตว่า สิ่งเจือปนในตัวอย่างมีผลต่อการคงอยู่ของเชื้อไวรัสด้วย

สำหรับการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อทำลายจุลชีพนั้นมีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ทั้งนี้เชื้อ NDV ถูกทำลายได้ง่ายด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อหลายชนิด เช่น formalin, β-propiolactone [12], glutaraldehyde, hydrogen peroxide (H_2O_2), quaternary ammonium compound, phenolic disinfectant, iodine [16] เนื่องจากน้ำยาฆ่าเชื้อแต่ละชนิดมีกลไกในการออกฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น phenolic disinfectant และ

quaternary ammonium compound มีผลทำให้โปรตีนหรือไขมันที่ผิวเชื้อไวรัสเสียสภาพ (denature) ช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อไวรัสจับกับเซลล์ของโฮสต์ได้ [17] ในขณะที่ chlorine compound และ peroxygen compound มีผลต่อสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสได้ด้วย จึงช่วยป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้ [18,19] จากการศึกษาของทวีศักดิ์และคณะ [7] ที่พบว่าคลอร็อกซ์® และเดทตอล® สามารถฆ่าเชื้อ AIV ได้แต่ไม่ได้ศึกษาผลต่อการคงอยู่ของ RNA ของเชื้อ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาผลของน้ำยาฆ่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อเชื้อ NDV เนื่องจากเป็นน้ำยาฆ่าเชื้อที่หาซื้อได้ง่ายและมีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ซึ่งผลพบว่าหากใช้ในความเข้มข้นตามที่ผู้ผลิตกำหนดไว้ในฉลาก จะฆ่าเชื้อ NDV ได้โดยไม่ทำลาย RNA ของเชื้อ

การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การใช้ไมโครเวฟที่ระดับความร้อน 900 วัตต์ เป็นเวลา 20-40 วินาที หรือการใช้แสงอัลตราไวโอเลตในตู้ biological safety cabinet class 2 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 30 นาที หรือการใช้คลอร็อกซ์® ที่เจือจาง 1:25 หรือการใช้เดทตอล® ที่เจือจาง 1:20 ถึง 1:40 สามารถฆ่าเชื้อ NDV ได้ โดยยังสามารถตรวจพบ RNA ของเชื้อได้ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้คณะฯ ประจำปี 2549

เอกสารอ้างอิง

1. Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch Virol.* 2002;147: 1655-1656.
2. Spradbrow PB. Geographical distribution. In: Alexander DJ, editor. *Newcastle Disease.* Boston: Kruwer Academic Publ; 1988. p. 247-255.
3. Alexander DJ. Newcastle disease in countries of the Uropean Union. *Avian Path.* 1995;24: 545-551.
4. Sasipreeyajan J. *Management and important diseases in broilers.* 3rd ed. Bangkok: Tana Press & Graphic; 2004.
5. Alexander DJ. Newcastle disease. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougal LR, Swayne DE, editors. *Diseases of poultry.* 11th ed. Iowa: Iowa State Press. 2003. p. 64-87.
6. Suarez DL, Spackman E, Senne DA, Bulaga L, Welsch AC, Froberg K. The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis.* 2003;47:1091-1095.
7. Songserm T, Jamon R, Saeheng N, Meemak N. Stability and survival of avian influenza virus in different conditions and sensitivity to disinfectants. Final report submitted to The Thailand research fund (TRF); 2005.

8. Elhafi G, Naylor CJ, Savage CE, Jones RC. Microwave or autoclave treatments destroy the infectivity of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus but allow detection by reverse trancriptase-polymerase chain reaction. *Avian Path.* 2004;33(3):303-306.
9. Nuanualsuwan S, Thongtha P, Kamolsiripichaiporn S, Subhrat S. UV inactivation and model of UV inactivation of foot-and-mouth disease viruses in suspension. *Int J Food Micro.* 2008;127:84-90.
10. Office International des Epizooties (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 [Internet] [revised 2008 July 17; cited 2009 January 20]. Available from: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.14_NEWCASTLE_DIS.pdf.
11. Poultry Disease Subcommittee and Committee on Animal Health Agriculture Board. Methods for the Examination of Poultry Biologic. 2nd edi. National Academy of Science, National Research Council. Washington, DC. 1963. p. 25-29.
12. Kho CL, Mohd-Azmi ML, Arshad SS, Yusoff K. Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J. Virol. Methods.* 2000;86:71-83.
13. Prince HN, Prince DL. Principles of viral control and transmission. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th edi. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 543-571.
14. Muhmmad K, As PD, Aqoob TY, Iaz AR, Anzoor RM. Effect of physico-chemical factors on survival of avian influenza virus (H7N3 type). *Inter. J. of Agri. and Bio.* 2001;3(4):416-418.
15. Chumpolbanchorn K, Suemanotham N, Siripara N, Puyati B, Chaichoune K. The effect of temperature and UV light on infectivity of avian influenza virus (H5N1, Thai field strain) in chicken fecal manure. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2006;37(1): 102-105.
16. Ruano M, El-Attrache J, Villegas P. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. *Avian Dis.* 2001;45(4):972-977.
17. King DJ. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Dis.* 1991;35:505-514.
18. Block SS. Peroxygen compounds. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* 5th edi. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 185-204.
19. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, editor. *Disinfection, Stererilization, and Preservation.* 5th edi. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2001. p. 135-157.