บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

ลักษณะของไวรัส

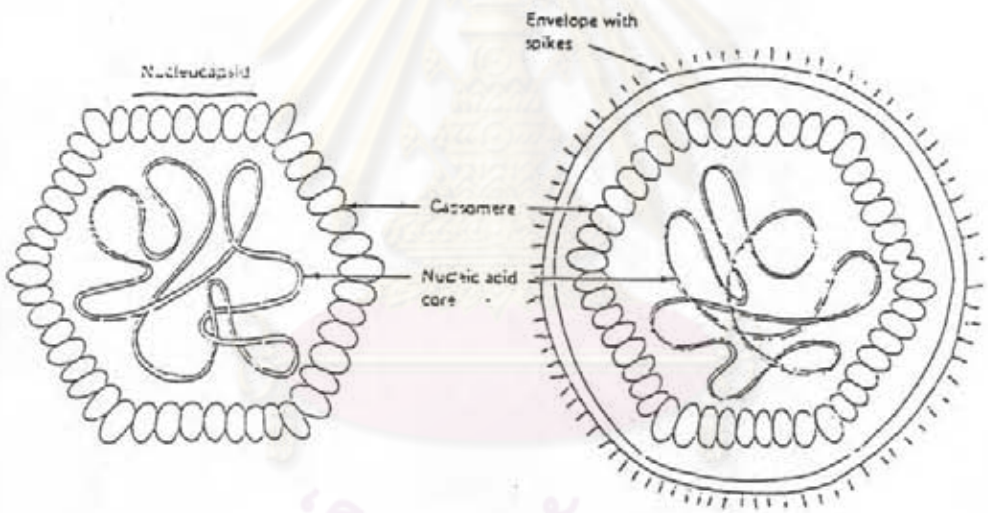
ไวรัสเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กมีขนาดประมาณ 20-300 นาโนเมตร ซึ่งวงจรชีวิตจะมี 2 ช่วง คือ อาศัยอยู่ภายใน และอยู่ภายนอกเซลสิ่งมีชีวิต ช่วงที่ไวรัสอาศัยอยู่ในเซลสิ่งมีชีวิตไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลของโฮสท์ที่เข้าไปดำรงอยู่สำหรับสร้างสิ่งต่างๆ ที่ต้องการขึ้นมา เช่น การสร้างโปรตีน การสร้างพลังงาน การเพิ่มจำนวนของกรดนิวคลีอิคแบบเดียวกับการพิมพ์จากแม่พิมพ์ ฯลฯ ดังนั้นอาจถือได้ว่า ไวรัสเป็นปรสิตที่แท้จริงชนิดหนึ่ง จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน ดูรูปที่ 2.1 ก ทำให้ทราบถึงรูปร่างลักษณะ และส่วนประกอบของไวรัสที่มีอนุภาคครบสมบูรณ์ (virion) ซึ่งประกอบด้วย กรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ที่ถูกหุ้มด้วยโปรตีนที่เรียกว่า แคพสิด (capsid) โมเลกุลย่อยๆ ของโปรตีนที่มาประกอบเป็นแคพสิด เรียกว่า แคพโซเมียร์ (capsomere) ส่วนแคพสิด และกรดนิวคลีอิกที่ถูกหุ้มไว้รวม เรียกว่า นิวคลีโอแคพสิด (nucleocapsid) ไวรัสบางชนิดจะมีเพียงนิวคลีโอแคพสิด ซึ่งจะเรียกไวรัสชนิดนี้ว่า naked viruses แต่ไวรัสบางชนิดจะเอาเซลของโฮสท์มาหุ้มนิวคลีโอแคพสิดไว้ เรียกไวรัสแบบนี้ว่า enveloped viruses ซึ่งส่วนของ envelops จะประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ดูรูปที่ 2.1 ข

กรดนิวคลีอิก จะมีจีโนม (genome) ซึ่งเป็นตัวถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัส โดยอาจเป็นชนิดดีเอ็นเอ (DNA) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ส่วนแคพโซเมียร์จะเป็นส่วนที่มองเห็นเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน ทำให้เห็นไวรัสมีรูปร่างแตกต่างกัน ดูรูปที่ 2.2

ไวรัสในน้ำ

น้ำที่ได้รับการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ มักจะมีไวรัสปรากฏอยู่เนื่องจากไวรัสเหล่านี้จะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับสิ่งขับถ่าย ไวรัสชนิดนี้ถูกเรียกว่าเอนเทอริกไวรัสเป็น

ไวรัสที่ไม่มี lipo-protein envelope จึงไม่ถูกน้ำดี (bile salt) ย่อยและทนต่อพีเอชต่ำได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังมีผลแพร่กระจายไปยังระบบประสาท ผิวหนัง ตับ หัวใจ ฯลฯ ชนิดของเอนเทอริกไวรัสที่พบในน้ำ และลักษณะอาการที่เกิดขึ้นเมื่อคนได้รับเชื้อ แสดงในตารางที่ 2.1 ส่วนพาหะที่จะเป็นตัวนำเอนเทอริกไวรัสเข้าสู่คน มีทางเป็นไปได้หลายทาง ดังแสดงในรูปที่ 2.3



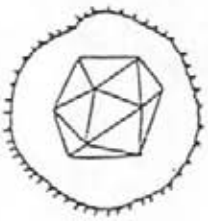
ก. naked viruses ข. enveloped viruses

รูปที่ 2.1 ภาพวาดแสดงลักษณะของไวรัส

ที่มา : George A. Wistreich and Max D. Lechtman. (1976)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก. Adenoviruses

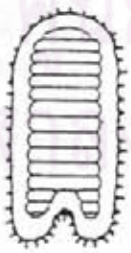


ข. Herpesviruses

ค. Plant viruses

ง. T (type)-even Bacteriophages

จ. Mumps viruses



ฉ. Rabies viruses

ช. Orf viruses

รูปที่ 2.2 แสดงรูปร่างของไวรัสชนิดต่างๆ

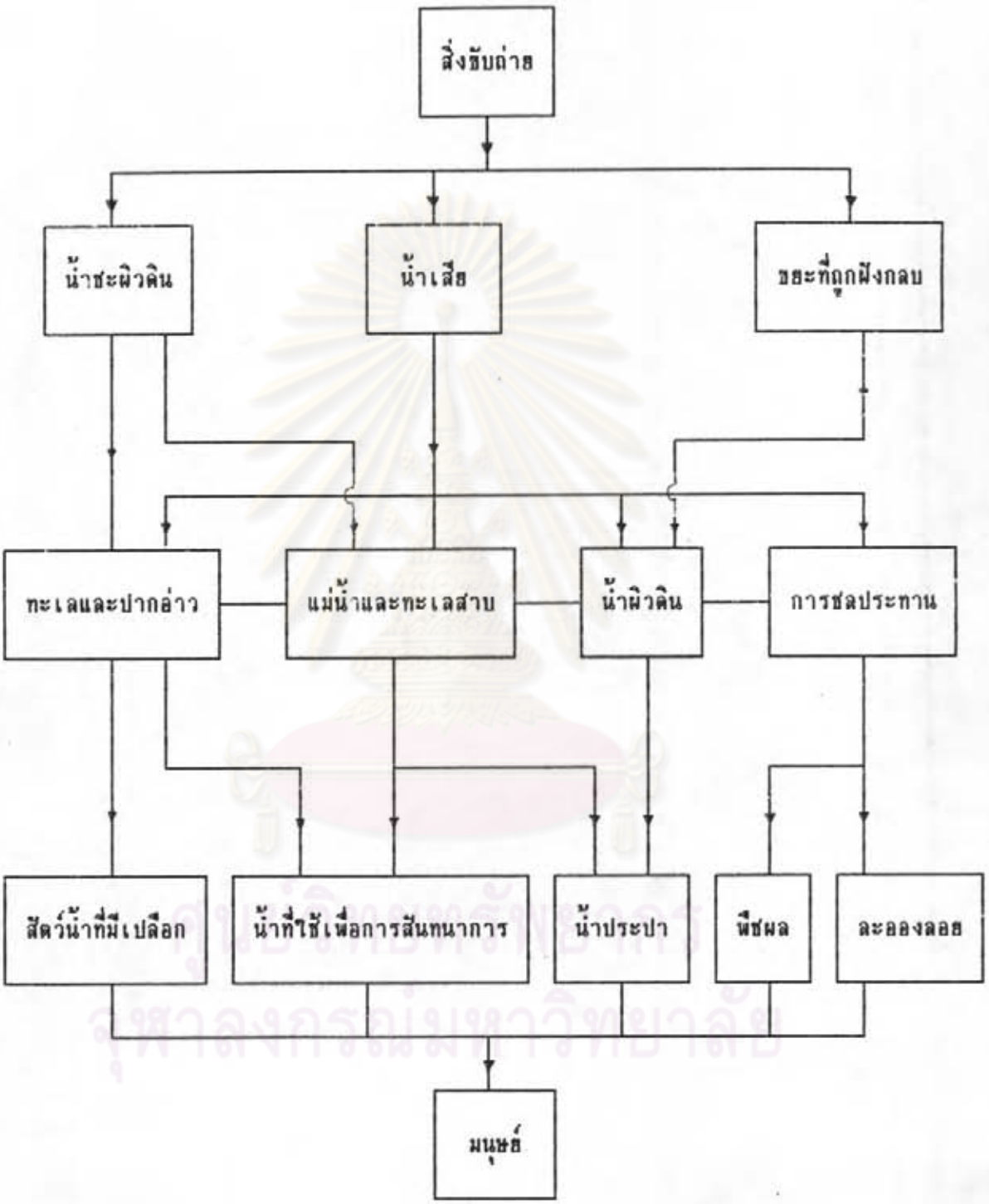
ที่มา : George A. Wistreich and Max D. Lechtman.(1976)

ตารางที่ 2.1 โรคต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นโดยเอนเทอริกไวรัสซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำ

Virus Family	Virus Group	จำนวนชนิด	อาการของโรค
Picornaviridae	Enteroviruses :		
	Poliovirus	3	อัมพาต ไขสันหลังอักเสบ เป็นไข้
	Echovirus	34	ไขสันหลังอักเสบ โรคทางเดินหายใจ โรคท้องร่วง เป็นไข้
	Coxsackievirus A	24	โรคทางเดินหายใจ ไขสันหลังอักเสบ เป็นไข้
	Coxsackievirus B	6	กล้ามเนื้อหัวใจอักเสบ ความผิดปกติของหัวใจที่มีมาแต่กำเนิด ผื่นที่ผิวหนัง เป็นไข้ เยื่อสมองอักเสบ โรคทางเดินหายใจ ปอดอักเสบ
	New enteroviruses	4	เยื่อสมองอักเสบ โรคทางเดินหายใจ เลือดไหลไม่หยุด เยื่อตาขาวอักเสบ เป็นไข้
	Hepatitis A	1	โรคตับอักเสบ
Reoviridea	Reovirus	3	ไม่ทราบแน่ชัด
	Rotavirus	4	อาเจียร และท้องร่วง มักเกิดกับเด็ก
Adenoviridae	Adenovirus	30	โรคทางเดินหายใจ เกิดอาการติดเชื้อที่ตา
ไม่ระบุ	Norwalk-Type Agent	2	อาเจียร ท้องร่วง เป็นไข้

ที่มา : Coulepis และ คณะ (1981) อ้างถึงใน Mathews , Francis E. (1983)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.3 แนวทางที่เป็นไปได้ของการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสสู่มนุษย์

ที่มา : Melnick และ คณะ (1978) อ้างถึงใน Mathews , Francis E.(1983)

การเลือกใช้แบคทีริโอฟาจเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของไวรัสในน้ำ

การจะระบุว่าคุณภาพของน้ำถูกสุขอนามัยได้นั้น ต้องมั่นใจว่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคถูกกำจัดออกจนไม่ก่อให้เกิดอันตราย จึงต้องมีการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนั้นซึ่งแต่เดิมจะตรวจหาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคโดยตรง แต่เนื่องจากวิธีการตรวจจะยุ่งยาก ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลามาก และต้องการผู้มีความรู้และทักษะในการตรวจ ดังนั้นการหาจุลินทรีย์ตัวแทน ซึ่งจะใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของไวรัสในน้ำ จึงเป็นสิ่งจำเป็นเช่นเดียวกับแบคทีเรีย Escherichia coli ถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของน้ำด้วยสิ่งขับถ่าย น้ำที่ตรวจไม่พบ E.coli จะรับรองได้ว่าน้ำนั้นไม่มีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่เข้าสู่คนโดยทางปาก (faecal-oral route) อย่างไรก็ตาม E.coli ไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของไวรัสได้เลย เพราะไวรัสมีความคงทนในธรรมชาติ และในระบบบำบัดน้ำเสียมากกว่า E.coli

จากข้อแนะนำของ Havelaar , A.H. (1985) ไวรัสที่จะเลือกให้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของไวรัสในน้ำได้ จะต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการ (Mossel 1978;1982)

1. ตัวบ่งชี้จะต้องตรวจพบในน้ำ เมื่อน้ำนั้นมีไวรัสที่ทำให้เกิดโรค และกรณีที่ในน้ำไม่มีไวรัสที่ทำให้เกิดโรค ตัวบ่งชี้ก็ต้องตรวจไม่พบเช่นกัน

2. ตัวบ่งชี้สามารถเป็นตัวกำหนดการทำงานของระบบบำบัดได้ เช่น จากกฎของ Koch จะกำหนดได้ว่า น้ำที่ผ่านระบบการกรองช้าด้วยทรายจะมีแบคทีเรีย 100 โคโลนี ต่อมิลลิลิตร

แนวคิดของ Mossel ที่กล่าวมาข้างต้นถูกใช้กับงานจุลชีววิทยาในการผลิตอาหาร เมื่อจะนำมาใช้กับงานจุลชีววิทยาของน้ำจึงต้องมีการปรับปรุง โดยอาศัยหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำ (Olivieri 1982) ดังนี้

1. ตัวบ่งชี้จะต้องตรวจพบเมื่อในน้ำมีไวรัสที่ทำให้เกิดโรค และตัวบ่งชี้จะต้องมีในปริมาณมาก

2. ตัวบ่งชี้จะต้องมีแหล่งกำเนิดเดียวกับไวรัสที่ทำให้เกิดโรค และไม่มีการเพิ่มจำนวนในน้ำ

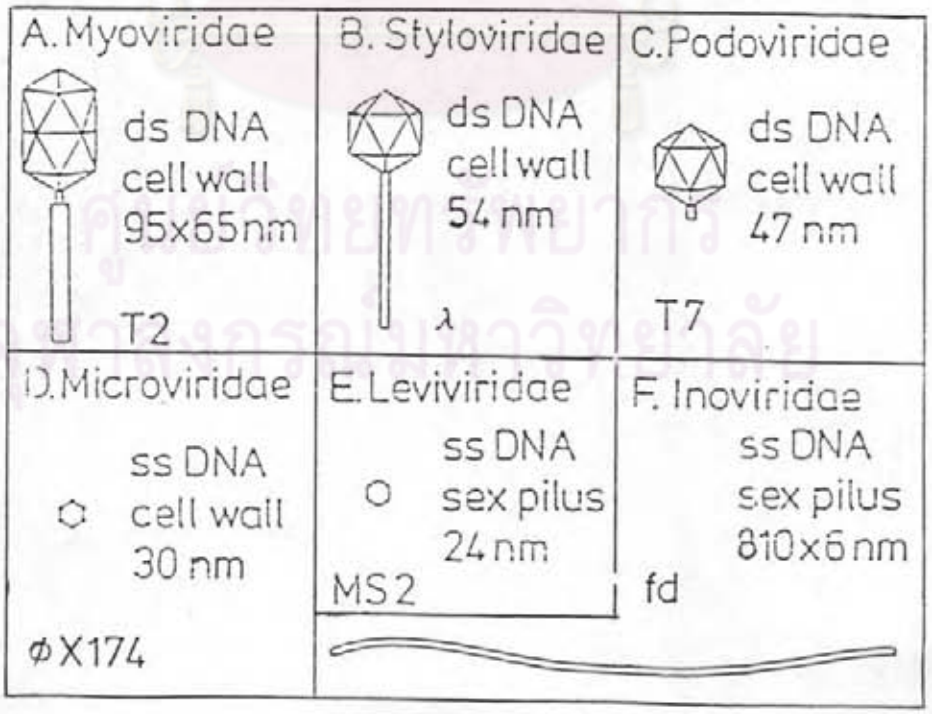
3. ตัวบ่งชี้จะต้องมีความทนทานในธรรมชาติ และในระบบบำบัดน้ำเสีย เท่ากับหรือมากกว่าไวรัสที่ทำให้เกิดโรค

4. วิธีการตรวจหาง่าย ได้ค่าถูกต้อง และไม่แพง

แบคทีริโอฟาจถูกเลือกใช้เป็นตัวบ่งชี้ เนื่องจากมีโครงสร้าง ส่วนประกอบ รูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับเอนเทอริกไวรัส มีความต้านทานในกระบวนการผลิตน้ำสะอาดกระบวนการฆ่าเชื้อโรคได้ใกล้เคียงกับเอนเทอริกไวรัส ถึงแม้ว่าจำนวนแบคทีริโอฟาจที่นับได้จะไม่สามารถครอบคลุมจำนวนเอนเทอริกไวรัสในน้ำได้ทั้งหมด แต่วิธีการตรวจหาแบคทีริโอฟาจจะง่าย น่าเชื่อถือ รวดเร็ว และเป็นวิธีที่ประหยัด (BERG 1978)

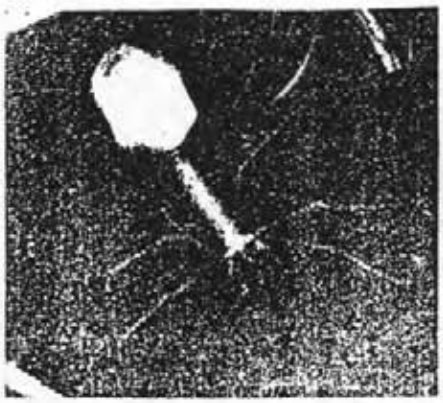
ลักษณะของแบคทีริโอฟาจ

ส่วนประกอบของแบคทีริโอฟาจ จะมีกรดนิวคลีอิค และแคพสิด การแบ่งกลุ่มของแบคทีริโอฟาจ จะแบ่งตามลักษณะรูปร่างของแคพสิดที่มองเห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และธรรมชาติของกรดนิวคลีอิค ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 10 แฟมมิลี (families) (Matthews 1982 ; 1985) แต่จะมีเพียง 6 แฟมมิลีที่พบได้บ่อย รูปร่างและ ขนาดดูได้จากรูป 2.4 หรือรูปที่ 2.5 และจากตารางที่ 2.2



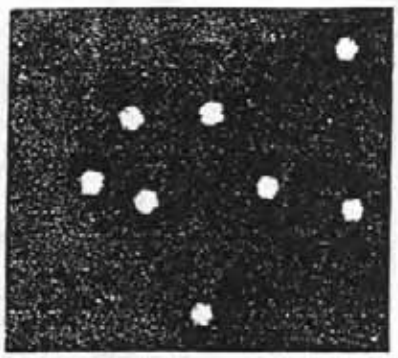
รูปที่ 2.4 แสดงชื่อ รูปร่าง ลักษณะ ขนาด ของแบคทีริโอฟาจที่พบได้บ่อย

ที่มา : Havelaar, A.H. (1985)



ก. T4

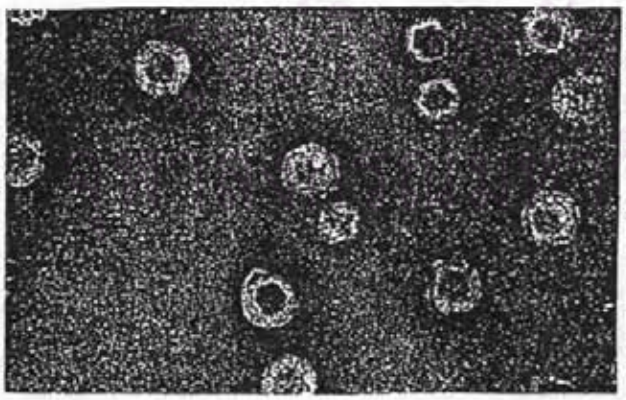
ข. λ



ค. ϕx174

ง. M13

จ. T7



ฉ. ϕ6

ช. MS-2

รูปที่ 2.5 รูปร่าง ลักษณะ ของแบคทีริโอฟาจที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ที่มา : Freifelder, D.M.(1983)

ตารางที่ 2.2 ลักษณะและขนาดของไวรัสในแบคทีเรีย

ไวรัส	ขนาด (นาโนเมตร)	
	ส่วนหัว	ส่วนหาง
ก. ฟาจมีหางที่สามารถหดได้		
Alcaligenes faecalis A6	90	16x110
Bacillus subtilis SPO1	90	30x210
Escherichia coli E1	75	17x210
Escherichia coli T2 T4 T6	65x95	25x110
Lactobacillus 206	72	16x138
Myxococcus xanthus MX1	75	25x100
Proteus hauseri 78	61	16x89
Pseudomonas aeruginosa PB1	75	20x140
ข. ฟาจมีหางที่ไม่สามารถหดได้		
Escherichia coli lambda	54	10x150
Escherichia coli T1	50	10x150
Escherichia coli T3 T7	60	10x15
Escherichia coli T5	65	10x170
Pseudomonas Po	65	10x160
Staphylococcus 6	40x92	10x300
Streptococcus 3ML	40x55	9x100
Typhoid 1	75	9x180
Typhoid S1 BL	50	10x130

ที่มา : Knight , C.A. (1975)

วิธีการตรวจหาไวรัส

การตรวจหา (detect) ไวรัสในน้ำ จะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ การทำให้ความเข้มข้นของไวรัสในน้ำสูงขึ้น และกระบวนการตรวจหาปริมาณไวรัส ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. การทำให้ความเข้มข้นของไวรัสในน้ำสูงขึ้น จากการรวบรวมของ Christon, J.H. และคณะ (1989) สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1.1 พาสสีฟ แอดซอร์พชัน (Passive adsorption)

วิธีนี้อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าวิธี Gauze Pad เนื่องจากใช้แผ่นรองซึ่งประกอบด้วยผ้าโปร่งอย่างเดียว หรือ ผ้าโปร่งผสมผ้าฝ้าย เป็นตัวดูดซับน้ำตัวอย่างบางส่วนที่มีไวรัสแขวนลอยอยู่เข้ามายังแผ่นรอง วิธีนี้ได้เริ่มคิดค้นขึ้นโดย Macculum ซึ่งได้ดัดแปลงมาจากวิธีการดูดซับแบคทีเรียออกจากน้ำของ Moore สำหรับไวรัสที่ถูกดูดติดบนผิวของผ้าที่ใช้จะถูกทำให้หลุดออกโดยใช้ของเหลวบางชนิดซึ่งเรียกว่า สารชะล้าง (eluent) มาคลุกเคล้ากับแผ่นรอง กระบวนการที่ใช้นี้เรียกว่าการชะ (elution) ส่วนของเหลวที่ได้หลังจากการทำการชะเรียกว่า eluate จากการศึกษาจะพบว่าวิธีการนี้ให้ประสิทธิภาพในการดูดติดไวรัสในน้ำต่ำ

1.2 ไดเรกท์ แอดซอร์พชัน (Directed Adsorption)

ไวรัสจะถูกดูดติดบนผิวตัวกรองหรือ Granular-Solid หลังจากนั้นไวรัสจะถูกแยกออกจากน้ำโดยการกรองหรือใช้การหมุนเหวี่ยง (centrifugation) แล้วจึงใช้สารชะล้างปริมาณน้อยๆ เติมลงในตัวกรองเพื่อให้ไวรัสหลุดออกมาอยู่ในสารชะล้าง วิธีไดเรกท์แอดซอร์พชัน เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการทำให้ปริมาณความเข้มข้นของไวรัสในน้ำสูงขึ้นทั้งจากน้ำประปาและน้ำดิบที่มีปริมาณมาก

1.3 อัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration)

เป็นการกรองน้ำผ่านเยื่อกรองที่มีขนาดรูพรุนเล็กมาก ซึ่งจะยอมให้น้ำและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำผ่าน แต่ไวรัสและสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะติดค้างบนแผ่นเยื่อกรองและทำให้ไวรัสหลุดออกโดยกระบวนการชะ

1.4 การรวมตะกอนโดยวิธีเคมีกายภาพ และวิธีแยกเฟส (Direct Physicochemical Flocculation & Phase separation)

เทคนิคในการทำให้ความเข้มข้นของไวรัสสูงขึ้น โดยใช้วิธีเคมีกายภาพ วิธีที่เหมาะสมมีหลายวิธี วิธีหนึ่งที่ใช้กันทั่วไป คือ การเติมสารเคมีลงในตัวอย่างน้ำเพื่อให้เกิดการรวมตัวกันเป็นฟล็อก แล้วทิ้งให้ตกตะกอน สารเคมีที่ใช้ทำให้เกิดตะกอนได้แก่ อลูมินัมไฮดรอกไซด์ อลูมินัมฟอสเฟต และแคลเซียมฟอสเฟต หรืออาจเติม Proteinaceous material ส่วนการทำให้ตะกอนตก ทำได้โดยเติม Protamine sulfate หรือ ลดพีเอชลง ไวรัสจะรวมตัวกันเข้มข้นขึ้นในตะกอน

ส่วนวิธีการทำให้ความเข้มข้นของไวรัสสูงขึ้น โดยใช้วิธีการแยกเฟสจะใช้โพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) ใน 2 รูปแบบ

วิธีที่ 1 เริ่มด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ เดกซ์ทรานซัลเฟต (Dextran sulfate) และโพลีเอทิลีนไกลคอลลงในตัวอย่างน้ำ โซเดียมคลอไรด์จะทำให้เกิดประจุที่แตกต่างกันในน้ำและแยกตัวอย่างน้ำออกเป็น 2 ชั้น ชั้นแรกส่วนใหญ่จะเป็นเดกซ์ทรานซัลเฟต อีกชั้นจะมีโพลีเอทิลีนไกลคอลเป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งทั้ง 2 ชั้นมีความหนาแน่นแตกต่างกันมากพอที่จะแยกออกจากกันโดยอาศัยแรงโน้มถ่วงของโลกในการแยก ไวรัสจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นในของเหลวชั้นใดชั้นหนึ่งที่แยกออกมาได้

วิธีที่ 2 วิธีนี้จะใส่ตัวอย่างน้ำลงในไดแอลิซิสแบก (Dialysis bag) ซึ่งบรรจุโพลีเอทิลีนไกลคอลที่เป็นของแข็ง ไวรัสจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการซับน้ำออกจากถุง

1.5 อัฟฟินิตี โครมาโทกราฟฟี (Affinity Chromatography)

จะเป็นการผ่านตัวอย่างน้ำลงในคอลัมน์ (column) ที่บรรจุโพลีเซคคาไรด์เจล (Polysaccharide gel) และแอนติบอดีบริสุทธิ์ซึ่งสามารถเลือกจับไวรัส หรือแอนติเจนที่ต้องการจากตัวอย่างได้ ไวรัสที่ถูกดูดติดจะหลุดออกมา โดยการเติมสารละลายอีกชนิดหนึ่งปริมาณเพียงเล็กน้อยผ่านคอลัมน์ สารละลายที่เติมครั้งหลังจะต่างจากสารละลายตัวแรกในเทอมของความแข็งแรงของอิออน และปฏิกิริยาการดูดติดของแอนติเจน-แอนติบอดี ข้อจำกัดของวิธีนี้ คือ ค่าใช้จ่ายสูง ต้องการเวลาในการเตรียมอุปกรณ์ และต้องการเวลาทดลองมาก

จาก 5 วิธีดังกล่าวข้างต้น วิธีไดเรกท์ แอดซอร์พชัน ปัจจุบันได้มีการศึกษา และพัฒนามากขึ้นเพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจหาไวรัสในน้ำ ซึ่งจะได้กล่าวถึงรายละเอียดของวิธีนี้ต่อไป

2. กระบวนการตรวจวัดปริมาณไวรัส โดยทั่วไปเราจะตรวจดูว่าไวรัสนั้นทำให้เกิดโรคได้หรือไม่ โดยการเพาะเชื้อไวรัสนั้นลงในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการมากกว่าจะเพาะเชื้อไวรัสลงในเซลของสัตว์ที่มีชีวิตอยู่ สมศักดิ์ พันธุวัฒนา (2521) ได้กล่าวถึงวิธีการตรวจดูความสามารถในการทำให้ติดเชื้อของไวรัสไว้ว่าอาจจะทำได้ 2 แบบคือ

2.1 แบบตรวจนับปริมาณ (Quantitative assay)

จากการที่เคยชินกับการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารแข็ง จึงมีผู้คิดค้นดัดแปลงวิธีมาใช้กับไวรัส เพื่อจะได้ใช้นับผลได้ละเอียดและถูกต้องมากขึ้น วิธีที่ถูกดัดแปลงมาใช้กับไวรัสโดยอาศัยการนับนี้ เช่น การนับจำนวนพอค (Pocks) บน Chorion ของเอ็มบริโอไก่ การนับจำนวนพลักบน monolayer ของเซลที่เลี้ยงไว้

2.1.1 พลักแอสเซ (Plaque assay)

โดยการเอาตัวอย่างน้ำที่มีไวรัสใส่ลงไปบนเซลของโฮสท์ที่เพาะไว้ในอาหารแข็งบางๆ แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมงเพื่อให้เวลาที่อนุภาคไวรัสถูกพาเข้าไปหรือหาทางเข้าไปสู่เซล จากนั้นถ่ายตัวอย่างน้ำออก แล้วใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ปนด้วยวุ้น (agar) สำหรับทำให้อาหารเพาะเลี้ยงนั้นหนืดมากๆ เป็นการจำกัดการกระจายตัวของอนุภาคไวรัสรุ่นลูก (progeny virion) ให้อยู่บริเวณนั้นไม่เคลื่อนที่ไปที่อื่นตามแรงของโมเลกุลของน้ำ เพียงแต่เชื้อจะติดต่อขยายออกไปรอบๆ สู่เซลที่อยู่ติดกันเท่านั้น ทำให้เกิดหย่อมของเซลที่ได้รับการติดเชื้อไวรัส ถ้าหากบริเวณของเซลเหล่านี้ใหญ่พอ โดยทิ้งไว้สัก 2-4 วัน ก็พอจะมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า แต่ถ้าไม่ใช้การย้อมเซลก็อาจจะดูได้ยาก จึงมีการเอาสีบางชนิดที่ย้อมติดเฉพาะเซลที่มีชีวิต (vital dye) เช่น สีนิวทรัลเรด (Neutral red) หรือสีบางชนิดที่ย้อมติดเฉพาะเซลที่ตายแล้วเช่น Trypan blue หรือบางทีก็อาจใช้สีพวกคริสตัลไวโอเล็ต (crystal violet) ย้อมก็ได้ ถ้าเผื่อใช้สีที่ย้อมเซลที่มีชีวิตอยู่ ก็จะเห็นบริเวณที่ไม่ติดสีเป็นหย่อมๆ ชัดๆ สีตัดกับบริเวณ

ที่ย้อมติดเป็นพื้นเห็นได้ชัด หรือถ้าสีที่ย้อมติดเฉพาะเซลที่ตายก็จะเห็นเป็นกลุ่มที่ติดสีอยู่ท่ามกลางพื้นที่จางๆ ไม่ติดสี หย่อมเซลที่ได้รับการติดเชื้อนี้สามารถนับได้เป็น พลัก ฟอร์มมิง ยูนิต (plaque forming unit)

พวกสารที่ทำหน้าที่คล้ายวุ้นเพื่อทำให้อาหารที่เพาะเลี้ยงมีความหนืดก็มีผู้ทดลองใช้หลายประการด้วยกัน เช่น วุ้น เมทิลเซลลูโลส Tragacanth และ Strach gel ที่มีผู้นิยมใช้กันมากคือ วุ้น แต่มีข้อเสียอยู่บ้าง คือในวุ้น มีพวก Sulfated polysaccharides ซึ่งสามารถไปห้าม หรือยับยั้งการเจริญเพิ่มจำนวนของไวรัสบางชนิด แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติอันนี้สามารถป้องกันได้โดยใช้สารพวก Deae-Dextran ใส่ปนเข้าไปในวุ้น

สำหรับพวกไวรัสที่เข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนในเซลของโฮสท์ แต่ไม่แสดงให้เห็นว่าเซลของโฮสท์นั้นถูกทำลาย ก็อาจใช้วิธีอื่นในการนับจำนวนไวรัสเช่น ใช้ Hemadsorption Interference หรือ Fluorescent antibody staining และไวรัสบางชนิดที่มีระยะฟักตัวนาน และเจริญเพิ่มจำนวนช้า เช่น Herpes viruses , Pox viruses ไวรัสพวกนี้ ถึงแม้จะใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่เป็นของเหลวธรรมดาโดยไม่มีวุ้นปนก็ทำให้เกิดพลักได้บนเซลโฮสท์ในอาหารแข็งเพราะว่าไวรัสที่เกิดขึ้นมาใหม่จะอยู่ภายในเซล อาจจะติดไปยังเซลที่ชิดกันได้ แต่มันไม่หลุดออกมานอกเซล และถูกโมเลกุลของน้ำพัดพาไปเหมือนไวรัสทั่วไป

2.1.2 ทรานส์ฟอร์เมชันแอสเซ (Transformation assay)

วิธีนี้เป็นอีกวิธีหนึ่งในแบบการตรวจนับปริมาณคล้ายวิธีพลักแอสเซ แต่ใช้กับพวกไวรัสที่ไม่ทำให้เซลตาย โดยเฉพาะไวรัสที่สามารถกระตุ้นให้เซลเปลี่ยนสภาพ (Transform) เซลเหล่านี้ไม่ถูกฆ่า แต่ว่าพฤติกรรมของเซลเปลี่ยนแปลงไปมีคุณสมบัติเหมือนกับเซลที่เป็นมะเร็ง เมื่อเปรียบกับเซลปกติแล้ว เซลที่เปลี่ยนแปลงสภาพนี้จะเจริญเพิ่มจำนวนได้เรื่อยๆ ทำให้เป็นก้อนเนื้อย่อย หรือกลุ่มของเซลที่แบ่งตัวซ้อนทับกันได้ มองเห็นเป็นหย่อมๆ ของเซลคล้ายๆ ลักษณะเนื้องอกเล็กๆ นั่นเอง ซึ่งสังเกตได้ง่าย ส่วนเซลในบริเวณที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงสภาพไปโดยไวรัสก็จะคงเป็นเซลชั้นเดียว ฉะนั้นจึงสามารถนับแต่ละหย่อมของเซลได้ด้วยคาเปล่าเป็น โฟกัส ฟอร์มมิง ยูนิต (focus forming units) เช่นเดียวกัน

2.1.3 พอคแอชเช (Pock assay)

วิธีนี้เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจนับปริมาณ แทนอนุภาคไวรัสได้โดยการใช้ chorion ของเอ็มบริโอไก่สำหรับเพาะเชื้อไวรัสพวก Poxviridae อนุภาคไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่จะลามไปติดยังเซลข้างๆ กัน ทำให้เป็นลักษณะที่เรียกว่า พอค (Pock) อยู่เป็นหย่อมๆ เราสามารถนับได้แบบเดียวกับวิธีพลักแอชเช

2.2 แบบตรวจว่ามีหรือไม่มี (Quantal assay)

นอกเหนือจากวิธีตรวจนับปริมาณอนุภาคไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่อยู่ในตัวอย่าง แล้วยังมีวิธีอื่นๆ อีกที่ใช้อาศัยตรวจดูว่ามีหรือไม่มีอนุภาคไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้ออยู่ในตัวอย่าง แต่บอกไม่ได้ว่ามีอยู่กี่อนุภาคในตัวอย่างนั้น วิธีนี้จำเป็นต้องใช้การเจือจางด้วยอัตราคงที่เป็นขั้นๆ แล้วใช้แต่ละอัตราส่วนเจือจางใส่เข้าไปในโฮสท์อย่างน้อยหลายๆ โฮสท์ที่เหมือนกันประมาณ 5-10 โฮสท์ ทิ้งระยะเวลาให้ไวรัสเจริญเพิ่มจำนวนในโฮสท์เหล่านั้นให้พอที่จะทำให้โฮสท์แสดงอาการ หรือตาย แล้วก็คอยสังเกตดูว่าโฮสท์นั้นๆ มีอาการ หรือตาย หรือไม่ เช่น ถ้าใช้เซลก็ดูว่ามี CPE หรือไม่ ถ้าใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู ก็อาจดูว่าหนูตายหรือไม่ เป็นต้น วิธีนี้อาศัยดูว่าตัวอย่างที่ใช้นั้นพอเพียงที่จะทำให้โฮสท์แสดงอาการ หรือ ตาย

ในการคำนวณหาจุดยุติ โดยดูว่าอัตราส่วนการเจือจางใดทำให้เกิดการติดเชื้อ แล้วโฮสท์แสดงอาการร้อยละ 50 ของโฮสท์ที่ได้รับอัตราส่วนการเจือจางนั้นๆ แล้วใช้หน่วยเป็น 50% infectious dose (ID_{50}) ต่อมิลลิลิตร หรือ 50% lethal dose (LD_{50}) ต่อมิลลิลิตร

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการดูดติดผิวของไวรัสบนแผ่นเยื่อกรอง

Thomas, W.M. (1987) อธิบายถึงปัจจัยที่มีผลในการดูดติดผิวของไวรัสบนแผ่นเยื่อกรองไว้ว่า เนื่องจากคุณสมบัติของแผ่นเยื่อกรองและผิวของไวรัสเอง ผิวของไวรัสจะมีโปรตีนเป็นตัวห่อหุ้ม (capsid) หรืออาจจะมีเอ็นเวลลอบ (envelope) ซึ่งประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนทำให้บางส่วนของไวรัสมีประจุ และแสดงศักย์ทางไฟฟ้าซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยา

กับผิวของแผ่นเยื่อกรองหลายแบบดังนี้

1. แรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic bonding)

กรดอะมิโนในโปรตีนหลายชนิดไม่มีศักย์ทางไฟฟ้า ทำให้เกิดการดูดติดกับโมเลกุลที่ไม่มีศักย์ไฟฟ้าด้วยกัน ซึ่งพลังงานที่ต้องใช้ในการแยกโมเลกุลที่ไม่มีศักย์ไฟฟ้าออกจากกันมากกว่าพลังงานที่ใช้แยกโมเลกุลที่รวมตัวกันด้วยแรงวันเดอวาลส์ (Van der waals) เพียงอย่างเดียว แม้ว่ากลุ่มที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (Hydrophobic group) ของไวรัสส่วนใหญ่จะอยู่ภายในโมเลกุล แต่ก็มีโอกาสที่ไวรัสกับผิวของแผ่นเยื่อกรองที่ไม่มีศักย์ไฟฟ้าจะดูดติดกันด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิก โดยเฉพาะเมื่อไวรัสไม่มีเอ็นเวลลอบ ปัจจัยที่มีผลส่งเสริมการดูดติดด้วยแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกของผิวแผ่นเยื่อกรอง

1.1 ให้โอกาสกับโมเลกุลไฮโดรโฟบิกของไวรัส ได้สัมผัสกับแผ่นเยื่อกรอง

1.2 การใช้อิออนในการลดผลของแรงปฏิกริยาทางไฟฟ้าระหว่างไวรัสกับแผ่นเยื่อกรอง

1.3 การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการทำให้ความไม่เป็นระเบียบของระบบสูงขึ้น (entropy state สูงขึ้น)

1.4 เลือกใช้แผ่นเยื่อกรองที่มีจุดไอโซอิเลคทริค (Isoelectric point) ใกล้เคียงกับไวรัส

1.5 ปรับพีเอชให้ใกล้เคียงกับจุดไอโซอิเลคทริคของทั้งไวรัสและแผ่นเยื่อกรอง เพื่อลดแรงยึดเหนี่ยวทางไฟฟ้าและเป็นการเพิ่มแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิกในการรวมตัวของไวรัสและการดูดติดของไวรัสกับแผ่นเยื่อกรอง

2. แรงยึดเหนี่ยวทางไฟฟ้า

โปรตีนหลายชนิดสร้างรูปแบบของตัวเองให้มีศักย์ไฟฟ้าสูง เช่น กรดอะมิโน และโพลีเปปไทด์ จากการศึกษาเมื่อไม่นานนี้ พบว่าไวรัสที่อยู่ในน้ำส่วนใหญ่จะเป็นไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic segment) การดูดติดจะเกิดด้วยแรงของประจุไฟฟ้า แรงยึดเหนี่ยวไฮโดรเจน (hydrogen-bonding) และแรงยึดเหนี่ยวทางไฟฟ้า มากกว่าจะเกิดจากแรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิก

การดูดติดระหว่างไวรัสกับแผ่นเยื่อกรองจะขึ้นอยู่กับประจุของไวรัส และประจุของแผ่นเยื่อกรอง ซึ่งประจุของไวรัสสามารถเปลี่ยนได้โดยการปรับพีเอช เมื่อปรับพีเอชให้เท่ากับไอโซอิเลคทริคพีเอช (Isoelectric pH) ประจุของไวรัสจะเป็นกลาง เรียกจุดนี้ว่า จุดไอโซอิเลคทริค ไวรัสที่มีพีเอชต่ำกว่าไอโซอิเลคทริคพีเอชจะมีประจุเป็นบวก ควรใช้แผ่นเยื่อกรองประจุลบในการดูดติด ส่วนแผ่นเยื่อกรองประจุบวกก็ใช้ดูดติดไวรัส เมื่อไวรัสอยู่ในสภาพพีเอชสูงกว่าไอโซอิเลคทริคพีเอช และเมื่อประจุไฟฟ้าของไวรัสกับแผ่นเยื่อกรองเหมือนกัน การเติมสารเคมีเช่น อลูมินัมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ จะทำให้เกิดสะพานเชื่อมระหว่างไวรัสกับแผ่นเยื่อกรอง ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่สำคัญในการเพิ่มการดูดติดของไวรัสบนผิวของแผ่นเยื่อกรอง

3. <u>การดูดติดของสารอื่นๆ</u>

สารอินทรีย์ และโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำที่มีไวรัสอยู่มักจะมีประจุเป็นลบที่พีเอชเป็นกลาง มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าไวรัส แต่การแพร่กระจายดีกว่าไวรัส ทำให้บางครั้งเป็นตัวกีดขวางการดูดติดผิวของไวรัสบนแผ่นเยื่อกรอง ซึ่งการแก้ไขทำได้โดยให้มีการบำบัดน้ำก่อน (pretreatment) เพื่อกำจัดสารอินทรีย์ และโปรตีนออก วิธีการบำบัดก่อนที่ใช้ต้องเลือกวิธีที่จะไม่กำจัดไวรัสออกไปด้วย ถ้าจะนำตัวอย่างนั้นมาหาปริมาณไวรัส

ถ้าแผ่นเยื่อกรองถูกเคลือบ (precoat) ด้วยสารพวกเซรุ่ม Whey protein หรือ Pyprollidone การดูดติดผิวบนแผ่นเยื่อกรองของไวรัสจะถูกขัดขวาง และเป็นการยากที่ไวรัสจะเข้าไปแทนที่สารพวกนี้

<u>การชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรอง</u>

การชะ (Elution) เป็นการแยก หรือทำให้ไวรัสหลุดออกจากแผ่นเยื่อกรองปัจจัยที่ช่วยให้กระบวนการนี้ได้ผล คือ

1. การปรับค่าพีเอชให้อยู่ในจุดที่ประจุของไวรัส และประจุของแผ่นเยื่อกรองเหมือนกันจะทำให้เกิดแรงผลักให้ไวรัสหลุดออกจากแผ่นเยื่อกรอง เช่น ที่พีเอชเป็นด่างทั้งไวรัส และแผ่นเยื่อกรองจะมีประจุลบ จากการศึกษาของ Wallis et al.(1972) พบว่าที่พีเอชมาก

กว่า 11.5 ไวรัสจะหลุดออกจากผิวของแผ่นเยื่อกรองได้มาก

2. แทนที่ไวรัสที่ถูกดูดติดด้วยสารที่ใช้เคลือบแผ่นเยื่อกรอง เช่น เซรุ่ม นิวเทรียนท์ บรอธ และ cell culture extracts

3. การใช้อลูมินัมคลอไรด์เป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติดของไวรัสบนผิวของแผ่นเยื่อกรอง เมื่อปรับพีเอชให้สูงขึ้น Al^{3+} ซึ่งเป็นแอมโฟเทอริก (amphoteric) จะมีประจุเป็นลบอยู่ในรูปของ $Al(OH)_4^-$ มีผลให้เกิดการแตกตัวของ filter-cation-virus complex

4. วิธีการแยกไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรองมีหลายวิธีดังนี้

4.1 แช่แผ่นเยื่อกรองลงในสารชะล้าง (Cliver 1965)

4.2 แช่ และ sonication แผ่นเยื่อกรองในสารชะล้าง (Berg et al.1971)

4.3 Homogenising แผ่นเยื่อกรองในสารชะล้าง (Wallis and Melnick 1967)

4.4 บดแผ่นเยื่อกรองให้ละเอียดในภาชนะโดยเติม glass-powder หลังจากนั้นจึงเติมสารชะล้าง เพื่อให้ไวรัสหลุดออกจากเมมเบรน (Metcalf 1961 , Wallis and Melnick 1967 , Moore et al 1970)

4.5 กรองสารชะล้างผ่านแผ่นเยื่อกรองโดยใช้เครื่องสูบสุญญากาศ (Rao et.al 1972)

4.6 กรองสารชะล้างผ่านแผ่นเยื่อกรองหลายๆ ครั้ง (Wallis and Melnick 1967)

สารที่จะใช้เป็นสารชะล้างจะต้องทำให้แรงดึงดูดของไวรัสและแผ่นเยื่อกรองลดลงไม่ว่าจะเป็นแรงดึงดูดที่เกิดจากแรงยึดเหนี่ยวทางไฟฟ้า หรือ แรงยึดเหนี่ยวไฮโดรโฟบิก นอกจากนี้อาจใช้สารที่มีความสามารถในการเข้าแทนที่ไวรัสที่ถูกดูดติดบนแผ่นเยื่อกรองเป็นสารชะล้างได้ บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชสูงก็สามารถใช้เป็นสารชะล้างได้ สำหรับไวรัสบางชนิดที่ทนต่อสภาพพีเอชสูงโดยไม่ inactivate หรือถ้าต้องการจะใช้ก็อาจจะลดการ inactivate ของไวรัสโดยการปรับพีเอชลงมาอย่างรวดเร็ว ส่วนสารชะล้างที่ใช้แทนบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชสูงได้ เช่น

เบสิคอมิโนเอซิด , casein , ทริปโทส , ฟอสเฟตบรอธ , นิวเทรียนท์บรอธ , bovine serum albumin , chaotropic agents , บีฟเอกซ์แทรกท์ , ยูเรีย ฯลฯ

ผลการศึกษาที่ผ่านมา

Wallis,C. and Melnick (1967) พบว่าการดูดติดของไวรัสบนแผ่นเยื่อกรองจะลดลงเมื่อมีการเติมสารอินทรีย์หรือ proteinaceous material เช่น เซรุ่ม , นิวเทรียนท์ และ cell culture extracts ลงในน้ำ สารเหล่านี้จะไปเคลือบผิวแผ่นเยื่อกรองแย่งพื้นที่ในการดูดติดผิวของไวรัสบนแผ่นเยื่อกรอง และยังได้ทดลองใช้แผ่นเยื่อกรองของบริษัท Millipore ทำจากเซลลูโลสไนเตรตที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน กรองโปลิโอไวรัสขนาด 0.025 ไมครอน พบว่าไวรัสจะถูกดูดติดบนผิวของแผ่นเยื่อกรอง เมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ โดยมีการกำจัดสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำออกก่อนด้วยการผ่านเรซิน

Fattal, B. et al.(1977) ได้วิเคราะห์และเปรียบเทียบวิธีการ adsorption-elution ในการทำให้ความเข้มข้นของโปลิโอไวรัสสูงขึ้น ผลการทดลองที่ได้เป็นดังตารางที่ 2.3

Samuel, R.F., Sagar, M.G. และคณะ (1978) ศึกษาการทำให้ความเข้มข้นของโปลิโอไวรัส ชนิดที่ 1 สูงขึ้นด้วยการเติมอลูมินัมคลอไรด์ความเข้มข้น $2x10^{-5}$ โมลต่อมิลลิลิตร ลงในน้ำประปาที่ใช้ทดลอง ที่พีเอชเป็นกลาง ทำให้เกิดตะกอน ซึ่งจะดูดติดไวรัสและทำให้ติดค้างอยู่บนแผ่นเยื่อกรอง (Filterite filter) จากนั้นจึงชะไวรัสออกด้วย ไกลซีน 0.05 โมล ที่พีเอช 11.0 พบว่าสามารถนำไวรัสกลับคืนมาได้ 70 %

Sagar, M.G. และคณะ (1980) ได้ศึกษาหาวิธีแก้ไขกระบวนการ adsorption-elution ที่นิยมใช้ซึ่งจะทำได้โดยการลดพีเอชของตัวอย่างน้ำให้ได้ 3.5 และเติม Trivalent salt ก่อนนำไปกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองแล้วจึงชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรองด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชสูง แต่เนื่องจากแบคทีริโอฟาจไม่สามารถทนสภาพที่มีพีเอชสูง หรือต่ำมากได้จึงได้มีการทดลองใช้ Filterite Filter ซึ่งเป็นแผ่นเยื่อกรองที่มีประจุลบเมื่อพีเอชเป็นกลาง

ตารางที่ 2.3 แสดงผลการทำให้ความเข้มข้นของโปลิโอไวรัสสูงขึ้น

วิธีการทดลอง	% การนำกลับ
ใช้แผ่นเยื่อกรองชนิดเซลลูโลสไนเตรตในการดูดติดโปลิโอไวรัสและใช้ไกลซีนบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 11.5 ในการชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรอง	77 %
ใช้แผ่นเยื่อกรองชนิดเซลลูโลสไนเตรตในการดูดติดโปลิโอไวรัสและใช้บีฟเอกซ์แทรกท์ 3% ที่พีเอช 8 ในการชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรอง	65 %
โพลีอิเล็คโทรไลต์ (PE 60)	70 %
การตกตะกอนด้วยอลูมินัมไฮดรอกไซด์	50 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และจะมีประจุเป็นบวกเมื่อพีเอชลดลง เช่นเดียวกับแบคทีริโอฟาจ ในการกรองแบคทีริโอฟาจที่มีอยู่ในน้ำเสีย และน้ำประปา ซึ่งมีการเติมอลูมินัมคลอไรด์ 0.0002 โมล ที่พีเอช 5 และ 6 พบว่าสามารถดูดติดไวรัสได้ 99-100 % โดยใช้สารชะล้างดังนี้ทริปโทนฟอสเฟตบรอธ (Tryptone phosphate broth) , ทริปติเคสซอยบรอธ (Trypticase soy broth) , Fetal calf serum , ไกลซีน , ไกลซีน + EDTA พบว่าประสิทธิภาพในการชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรองต่ำมาก จึงได้มีการเปลี่ยนมาใช้แผ่นเยื่อกรองที่มีประจุบวก ในการดูดติดไวรัสที่พีเอชเป็นกลาง พบว่าสามารถดูดติด แบคทีริโอฟาจ ได้ 99.99 % และ การชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรองจะมีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้ บีฟเอกซ์แทรกท์ 3 % กับตัวอย่างน้ำที่มีปริมาตรน้อย แต่ถ้าตัวอย่างน้ำมีปริมาตรมากการชะล้างจะให้ประสิทธิภาพดีเมื่อใช้บีฟเอกซ์แทรกท์ 8% ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 1 โมล ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งวิธีการชะล้างไวรัสสำหรับน้ำประปาจะใช้วิธีกรองสารชะล้างผ่านแผ่นเยื่อกรอง แต่สำหรับน้ำเสียจะต้องมีการใช้สารชะล้างล้างย้อนด้วย

Morris, R. และ Waite, W.M. (1980) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแผ่นเยื่อกรอง 3 ชนิด ในการนำโปลิโอไวรัส ชนิด 2 (Poliovirus type 2) กลับคืนจากน้ำประปา และน้ำในแม่น้ำ การศึกษาผลของ Al^{+3} ที่มีต่อประสิทธิภาพการนำกลับคืน (recovery) ซึ่งจะปรับพีเอชของตัวอย่างน้ำให้เท่ากับ 3.5 ก่อนนำมากรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง และชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรองด้วยบีฟเอกซ์แทรกท์ 3% ที่พีเอช 9.5 ผลการทดลองที่ได้ดังตารางที่ 2.4

Mark, D.S. และคณะ (1981) ได้ศึกษาการตรวจหาไวรัสโดยใช้วิธี adsorption-elution เปรียบเทียบการใช้แผ่นเยื่อกรองประจุบวก กับแผ่นเยื่อกรองประจุลบในการดูดติดโปลิโอไวรัสที่พีเอช 7.5 และ 3.5 ตามลำดับ โดยประจุลบจะแยกการทดลองเป็น 2 กรณี คือ กรณีที่มีการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์ และไม่เติมแมกนีเซียมคลอไรด์ ผลการศึกษาพบว่าการใช้แผ่นเยื่อกรองประจุบวกมีประสิทธิภาพในการดูดติดไวรัสได้ดีกว่า และวิธีการทดลองยังสะดวกกว่าด้วย เพราะไม่ต้องมีการเติมสารเคมีเพื่อให้มีสภาพเป็นกรด และการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดติด ส่วนการชะไวรัสออกจากแผ่นเยื่อกรองโดยใช้บีฟเอกซ์แทรกท์-ไกลซีน (BE-GLY) พบว่าให้ประสิทธิภาพต่ำ

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแผ่นเยื่อกรอง 3 ชนิด และ Al^{+3} ในการนำโปลิโอไวรัสชนิดที่ 2 กลับคืนจากน้ำตัวอย่าง

แผ่นเยื่อกรอง	เซลลูโลสไนเตรตขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน		epoxy fiberglass (Balson type)		epoxy fiberglass (Whatman)	
ชนิดน้ำ	$+Al^{+3}$	$-Al^{+3}$	$+Al^{+3}$	$-Al^{+3}$	$+Al^{+3}$	$-Al^{+3}$
น้ำประปา	40.8	46.4	45.0	17.7	40.8	10.0
น้ำในแม่น้ำ	21.7	32.6	32.2	8.5	35.1	5.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Juan, J. B. และคณะ (1991) ได้ศึกษาการทำให้ไวรัสมีความเข้มข้นสูงขึ้นด้วยวิธี Viradel Technique (Adsorption-elution) โดยการดัดแปลงแผ่นเยื่อกรองที่มีประจุลบมาใช้ในการดูดติดไวรัส เพราะได้มีการศึกษาพบว่าแผ่นเยื่อกรองประจุบวกจะเกิดการอุดตันเร็ว ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้กับการเพิ่มความเข้มข้นของไวรัสในน้ำปริมาณมาก ผลการศึกษาพบว่าแผ่นเยื่อกรองประจุลบที่มีประสิทธิภาพดูดติดไวรัสได้สูง ดังตารางที่ 2.5

<u>การศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของไวรัสในน้ำในประเทศไทย</u>

Sakchai Suddevgrai (1985) ศึกษาผลของการดูดติดโคลิฟาจบนทราย ดิน และฟลอค พบว่าโคลิฟาจดูดติดบนทราย และดิน 0-10 % แต่จะถูกดูดติดเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติม Ca^{+2} หรือ Mg^{+2} ที่พีเอช 7.0 ส่วนการศึกษาผลการดูดติดของโคลิฟาจบน $Mg(OH)_2$ ที่พีเอช 11.0 พบว่าถูกดูดติด 99.6% ที่ความเข้มข้นของ $Mg(OH)_2$ 0.002 โมล/ลิตร และโคลิฟาจที่อยู่ในตะกอน $Mg(OH)_2$ แยกออกได้โดยการเติมบีฟเอกซ์แทรกท์

Supanya Yonpiam (1986) ศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดโคลิฟาจของระบบบำบัดน้ำจำลอง พบว่าการรวมตะกอน และการตกตะกอนสามารถกำจัดโคลิฟาจได้ 93% เมื่อใช้สารส้ม 320 มิลลิกรัม/ลิตร โดยความขุ่นของน้ำ และเวลาในการเกิดตะกอนไม่มีผลต่อการกำจัดโคลิฟาจ ส่วนเครื่องกรองทรายแบบกรองเร็วสามารถกำจัดโคลิฟาจได้ 2.3-38.6% และเมื่อนำน้ำที่ผ่านระบบฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีนมาตรวจด้วยวิธีพลักแอชเชไม่พบโคลิฟาจ

จากการศึกษาที่ผ่านมา การทำให้ความเข้มข้นของไวรัสสูงขึ้นโดยใช้วิธีกรองผ่านแผ่นเยื่อกรองแล้วใช้สารชะล้างชะออก มักจะใช้โปลิโอไวรัสในการทดลอง แต่เนื่องจากโปลิโอไวรัสเป็น เอนเทอริกไวรัส ที่ทำให้เกิดโรคในคน จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้งานในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพน้ำโดยทั่วไป ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกแบคทีริโอฟาจซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของน้ำด้วยไวรัส และไม่เป็นอันตรายกับคนมาใช้ในการศึกษา

ตารางที่ 2.5 แสดง % การดูดติดโคลิฟาจของแผ่นเยื่อกรองประจุลบ

ชนิดเยื่อกรอง	% การดูดติดโคลิฟาจ	
	จากน้ำออกของระบบโปรยกรอง	จากน้ำเสีย
แผ่นเยื่อกรองเซลลูโลสไนเตรตขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แช่ในโพลีเอทิลีนอิมีน 2 ชั่วโมงแล้วทำให้แห้งก่อนนำมาใช้กรอง	99.4±0.5	99.2±0.34
แผ่นเยื่อกรอง epoxy fiberglass เคลือบด้วย diatomaceous earth แล้วจึงนำไปแช่ใน Nalco	91.9±1.9	92.8±3.14