การติดเชื้อในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นในกลุ่มประชากรปกติ

Occult Hepatitis B virus infection in healthy people

สมหญิง งามอุรุเลิศ
อิสยา จันทร์วิทยานุชิต
สุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ
ประเสริฐ เอื้อวรากุล

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2552

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ได้อนุเคราะห์ซีรัมในครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

ชื่อเรื่อง การติดเชื้อในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นในกลุ่มประชากรปกติ
ผู้วิจัย สมหญิง งามอุรุเลิศ อิสยา จันทร์วิทยานุชิต สุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ ประเสริฐ เอื้อวรากุล
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์ 2557
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย 30 หน้า
คำสำคัญ Prevalence, occult hepatitis B virus, nested PCR
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของโลก มีผู้ติดเชื้อเป็นพาหะที่สามารถแพร่เชื้อต่อไปยังผู้อื่นได้ ประเทศไทยมีความชุกของไวรัสตับอักเสบบีสูงเช่นเดียวกับประเทศอื่น ๆ การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความชุกของนักศึกษาชั้นปีที่ 1 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ปี 2552-2554 จำนวน 4,593 ราย พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร้อยละ 1.38 ของนักศึกษา ซึ่งเป็นพาหะและมีโอกาสแพร่เชื้อได้ ในขณะที่พบความชุกของการติดเชื้อที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน เท่ากับร้อยละ 2.2 ความชุกของวัคซีนที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันเท่ากับร้อยละ 18.4 ของนักศึกษา กลุ่มที่ยังไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสตับอักเสบบีพบร้อยละ 78 ในขณะที่นักศึกษาที่คาดว่าอาจพบ ภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นร้อยละ 0.2 นำไปทดสอบโดยวิธี nested PCR พบว่าให้ผลลบทั้งหมด ซึ่งอาจเกิดจากข้อจำกัดในการทดสอบครั้งนี้ จากแนวโน้มในการศึกษาครั้งนี้ควรนำกลุ่มที่อาจมีภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นไปทำการหาลำดับเบสเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของยีนต่อไป

Research title	Occult Hepatitis B virus infection in healthy people
Researchers	Somying Ngamurulert, Isaya Janwithayanuchit, Sumonrat Chuwongwattana, Prasert Auewarakul
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2014
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	30 pages
Keywords	Prevalence, occult hepatitis B virus, nested PCR
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

Hepatitis B infection is one the most important problem in public health management. Currently, hepatitis B carrier rate in Thailand is as high as other countries. This research studied the prevalence of Hepatitis B among 4,593 first year students at Huachiew Chalermprakiet University between 2009-2011. The study found that hepatitis B carrier rate was 1.38% among the students while hepatitis B infection rate was 2.2%, the rate of immunologic stimulation by vaccination was 18.4%, and the rate of students who has no hepatitis B immune was 78%. Moreover, students were suspected to have occult hepatitis B virus infection about 0.2% thus these samples were tested with nested PCR and all results were negative. However, we recommended that all hepatitis B silent carriers should be tested for sequencing in order to study changes in gene.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	10
วิธีการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	15
บทที่ 5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	26
ประวัติย่อผู้วิจัย	30

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 การแปลผลการตรวจพบ HBV-serological markers แบบต่าง ๆ 8

3.1 แสดงลำดับเบสของ primers 11

4.1 แสดงจำนวนนักศึกษาที่พบ seromarkers ของไวรัสตับอักเสบบีตั้งแต่ปี 2552-2554 19

4.2 แสดงการแปลผลอาการทางคลินิกของไวรัสตับอักเสบบี 20

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 6

4.1 การทดสอบความไวของการตรวจหา s gene 16

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไวรัสตับอักเสบบี เป็น DNA virus ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดตับอักเสบเฉียบพลัน และผลระยะยาว ได้แก่ การเกิดตับอักเสบเฉียบพลัน และผลในระยะยาว ได้แก่ภาวะตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง และมะเร็งตับ ซึ่งเป็น ปัญหาสำคัญก่อนหน้าที่มีการใช้วัคซีนของกระทรวงสาธารณสุขของทุกๆ ประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย การเป็นพาหะของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นั้นมีอัตราสูงขึ้นมากกว่า ร้อยละ 5 ของประชากรประเทศไทย ซึ่งหมายถึงประชากรในประเทศไทยไม่น้อยกว่า 3 ล้านคน และยังรวมถึงผู้ที่เป็น ไวรัสตับอักเสบชนิดเรื้อรังด้วย ซึ่งจำนวนสูงถึง 3-5 ล้านคนของประชากรในประเทศ (กองทุนอโรคาเพื่อเผยแพร่โรคตับ. 2554)

Occult HBV infection หมายถึง การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บีแบบซ่อนเร้นในผู้ติดเชื้อที่ไม่พบ HBsAg ในเลือด แต่ตรวจพบหลักฐานการติดเชื้อไวรัสตับอั กเสบชนิดบีในร่างกาย โดยตรวจพบ HBV genomes ในเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย เช่นตับและเม็ดเลือดขาว เป็นต้น ซึ่งอาจเกิดจาก การมีการ replicate ของเชื้อน้อยหรือการกลายพันธ์ของ epitope บน S antigen ที่ตำแหน่ง amino acid ที่ 100-160 เรียกว่า S mutant หรือ S variants ปัจจุบันสามารถตรวจพบไวรัสในเลือดได้แม้มีปริมาณน้อย ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งผู้ป่วย occult HBV infection ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านพันธุกรรมของ S gene ทำให้มีผลยับยั้งการผลิต HBsAg หรือยับยั้งการแบ่งตัวของไวรัสในร่างกาย ในขณะที่ผู้ป่วยบางราย อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ HBV genomes และผลิต HBV S protein ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้ด้วย HBsAg assays ทั่วไป (Conjeevaram and Lok 2001 : 204-206 ; Allain. 2004 : 18-25 ; สุดา. 2552 : 1-8 ; Alavian et al. 2012; 6126)

การศึกษาเกี่ยวกับความชุกของ occult HBV infection ในแต่ละประเทศ พบว่ามีความแตกต่างกัน เนื่องจากกลุ่มประชากรและวิธีการตรวจหาโรคที่ใช้ในการศึกษาวิจัย การศึกษาเกี่ยวกับการดำเนินไปของโรคของ occult HBV infection พบว่าการติดเชื้อดังกล่าวนี้มีผลกระทบหลายอย่างทางคลินิก เช่น ความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ กา รแพร่เชื้อ HBV ในผู้ป่วยที่ได้รับเลือดและผลิตพันธุ์อื่น จากเลือด รวมถึงการปลูกถ่ายอวัยวะ จากผู้บริจาคที่มีการติดเชื้อ HBV แอบแฝงอยู่ ซึ่งอุบัติการณ์การติดเชื้อในผู้ป่วยกลุ่มนี้ยังขึ้นกับระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย นอกจากนั้นกา รติดเชื้อดังกล่าวยังเป็นปัญหาสำคัญในผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับยาเคมีบำบัดหรือผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ซึ่งอาจเกิดภาวะตับอักเสบจากการติดเชื้อไวรัส ตับอักเสบบีแอบแฝงในร่างกายได้ นอกจากนั้นปัจจุบันในงานวิจัยยังพบว่าผู้ป่วยที่มี occult HBV infection ร่วมกับการติด

เชื้อไวรัสตับอักเสบซี ร่วมด้วยจะมีการดำเนินของโรคตับที่รุนแรงในอนาคต จนกลายเป็นโรคตับแข็งชนิด hepatocellular carcinoma ในที่สุด (Lavanchy 2004 : 97-107 ; Raimondo et al. 2007 : 160-170 ; Taha et al. 2014) ดังนั้นการตรวจหา occult HBV infection ในกลุ่มประชากรปกติจึงเป็นปัจจัยสำคัญเบื้องต้นหนึ่งในการเฝ้าระวังโรค

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาแนวโน้มของ HBV seromarker ในนักศึกษามหาวิทยาลัย
2. เพื่อศึกษา HBV genome ในกลุ่มที่ตรวจพบ antiHBc เพียงอย่างเดียว

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีใน กลุ่มนักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียติชั้นปีที่ 1 ซึ่งมีภูมิลำเนาอยู่ทั่วประเทศ ตั้งแต่ปี 2552-2553
2. ศึกษาความชุกของกลุ่มตัวอย่างซึ่งพบเฉพาะ anti-HBc เพียงอย่างเดียว (ระยะ core window หรือเป็นพาหะเรื้อรัง แต่มีปริมา ณน้อยมากจนตรวจไม่พบเชื้อ) และตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีแอบแฝงในผู้ป่วยที่ไม่พบ HBsAg ในเลือดโดยวิธี Polymerase chain reaction

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาของแนวโน้ม HBV serological markers

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสที่ก่อโรคตับอักเสบ มีหลายชนิดได้แก่ ไวรัสตับอักเสบ เอ บี ซี ดี และอีแต่ไวรัสตับอักเสบบีที่มีความสำคัญทางการแพทย์มากที่สุดคือไวรัสตับอักเสบบี เชื้อนี้เป็นสมาชิกที่จัดเป็น prototype ของ family *Hepadnaviridae* และอยู่ใน genus *Orthohepadnavirus* ไวรัสตับอักเสบบี เข้าสู่ร่างกายทางผิวหนังที่มีรอยแทงทะลุหรือบาดแผล (percutaneous route) การติดต่อจากมารดาสู่ทารก และการติดต่อทางเพศสัมพันธ์โดยเชื้อเข้าทางเยื่อเมือก เชื้อไวรัสจะมีอยู่มากในเลือดและตับ น้ำอสุจิจะมีเชื้อไวรัสในจำนวนน้อยกว่า (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ และคณะ. 2540 : 4.1-4.16)

ตับอักเสบ (Hepatitis) เป็นภาวะที่มีการอักเสบของตับที่มี เกิดการทำลายของเซลล์ตับ ทำให้การทำหน้าที่ต่าง ๆ ของตับ ผิดปกติ ร่างกายมีการเจ็บป่วย เคยมีรายงานการระบาดในแถบทวีปเอเชียและ แอฟริกา และโดยเฉพาะแถบประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ประมาณ 1 ใน 3 ของประชากรโลกพบผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีประมาณ 2 พันล้านคน รวมทั้งมีผู้ที่เป็นพาหะเรื้อรัง 350 ล้านคนพบได้ในทุกวัยทั้งชายและหญิง ส่วนใหญ่เป็นโรคตับอักเสบเฉียบพลัน (acute hepatitis) และหายได้ส่วนน้อยอาจเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) เป็นผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคตับแข็ง โรคตับวาย มะเร็งตับ นอกจากเซลล์ตับแล้วไวรัสตับอักเสบ บี ยังเพิ่มจำนวนในเซลล์ชนิดอื่นได้ด้วย เ ช่น mononuclear cell, lymphoblastoid cell, bile duct epithelial, endothelial cell, smooth muscle cell, pancreatic acinar cell และ emulsified corneal tissue ยังพบไวรัสได้ในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ต่อมน้ำเหลือง ม้าม ไต ต่อมไธรอยด์ ต่อมอะดรีนัล และต่อมอื่น ๆ เชื้อไวรัสมีระยะฟักตัวนาน 75 วัน (40-150 วัน) โดยเฉลี่ยผู้ติดเชื้อบางรายไม่แสดงอาการแต่บางรายแสดงอาการป่วย ผู้ป่วยบางรายเป็นตับอักเสบและมีอาการดีซ่าน แต่ บางรายเป็นตับอักเสบโดยไม่มีอาการ หลังการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบร้อยละ 90 จะหายขาดจากการติดเชื้อและมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นตลอดชีวิต ร้อยละ 5-10 มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง โดยผู้ติดเชื้อไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสให้หมดไปจากร่างกายได้ มีการเพิ่มจำนวนของไวรัสอยู่ตลอดเวลา พบในผู้ติดเชื้อ การติดเชื้อในคนอายุน้อยมักเป็นการติดเชื้อเรื้อรัง ตับอักเสบรุนแรง (fulminant hepatitis) พบได้ในผู้ติดเชื้อร้อยละ 0.5 เกิดขึ้นในผู้ใหญ่มากกว่าเด็ก (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ และคณะ. 2536 : 4.1-4.16 ; Hollinger. 2001 : 2738-2750 ; Tan et al. 2007 : 263-267)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบ ซ่อนเร้นพบว่าปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viral load) มักพบว่ามีค่าน้อยกว่า 100 copies/ml ในขณะที่กลุ่มที่เป็นพาหะเรื้อรังของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือด มากกว่า 100 copies/ml เป็นต้นไป อย่างไรก็ตามปริมาณไวรัสในกระแสเลือดในกลุ่มที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบซ่อนเร้น (occult HBV infection, OBI) จะพบได้ในตับซึ่งมี

ระดับที่สูงกว่าใน serum ซึ่งการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบ ซ่อนเร้น นี้จะตรวจไม่พบ HBsAg โดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา แต่จะพบ HBV-DNA โดยวิธี NAT (nucleic acid test) ลักษณะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบ ซ่อนเร้น แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ โดยใช้ anti-HBs และ anti-HBc ในการแยก คือ seropositive และ seronegative ซึ่งจะพบว่า seropositive ยังแบ่งได้อีกเป็น 3 กลุ่ม คือ ตรวจพบ anti-HBs อย่างเดียว, ตรวจพบ anti-HBc อย่างเดียวและตรวจพบทั้ง anti-HBs และ anti-HBc ส่วน seronegative จะตรวจไม่พบทั้ง anti-HBs และ anti-HBc การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบ ซ่อนเร้นจะพบได้บ่อยในผู้ที่ตรวจพบ anti-HBc เพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามสามารถพบในผู้ป่วยที่มี anti-HBs อย่างเดียว ประมาณ ร้อยละ 35 และในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบ marker ใดๆ นอกจาก HBV-DNA พบได้ร้อยละ 20 (Torberson and Thomas. 2002 : 479-486 ; Chemin and Trepo. 2005 : 15-21 ; Raimondo et al. 2007 : 160-170 ; Raimondo et al. 2010 : 254-257) ในงานวิจัยต่างๆ พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบ ซ่อนเร้นได้ในผู้ป่วยโรคต่าง ๆและผู้ที่มีสุขภาพดี เช่น การศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัส ตับอักเสบ บี แบบ ซ่อนเร้น ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ซึ่งพบว่าในผู้ป่วยโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ตรวจพบ HBV-DNA ร้อยละ 11ในขณะที่ตรวจ ไม่พบ HBsAg ร้อยละ 8.2 และตรวจพบ Anti-HBc ร้อยละ 47 (Tahereh et al. 2005 : 147-151 ; Carrena et al. 2008 : 139-157) การศึกษาความชุกของ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบ ซ่อนเร้น ในผู้ป่วยมะเร็งตับที่ตรวจไม่พบ HBsAg โดยไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ร่วมด้วย พบว่ามีความชุกถึง ร้อยละ 2.1 (Hidenori et al. 2004 : 195-199) ขณะที่ความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบซ่อนเร้น ในผู้ป่วยที่รอการปลูกถ่ายไต พบว่ามีความชุกร้อยละ 3.3 โดยในทวีปเอเชียคิดเป็น ร้อยละ 33.3 ทวีปแอฟริกาคิดเป็น ร้อยละ 6.25 (Stratta et al. 2009 : 1132-1137) ได้ทำการศึก ษาความชุกของ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบ ซ่อนเร้น ในผู้ป่วยโรคตับเรื้อรังโดยไ ม่ทราบสาเหตุ , ผู้ป่วยมะเร็งตับที่ตรวจไม่พบ HBsAg และ ผู้ที่สุขภาพดี พบว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบ ซ่อนเร้นคิดเป็นร้อยละ 28.3, ร้อยละ 70.4 และ 10.16 ตามลำดับ (Fang et al. 2009 : 383-388) สำหรับวิธีการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบซ่อนเร้น ที่เป็น gold standard คือ การสกัด DNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากตับ แต่ในกรณีที่ไม่สามารถทำได้ก็ให้ใช้เลือดแทน และเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบ ซ่อนเร้นนั้น การตรวจทาง Serology ไม่สามารถยืนยันได้ เพราะมีเพียง HBV-DNA เท่านั้นที่เป็น marker ที่เชื่อถือได้มากที่สุด ดังนั้นในการตรวจหา HBV-DNA จะต้องอาศัยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลที่มี ความไว (sensitivity) และ ความจำเพาะ (specificity) สูง ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจก็คือ real time PCR และ nested PCR โดยใช้ specific oligonucleotide primer (Valsamakis. 2007 : 10-13 ; Echevarria and Avellon. 2008 : 66-74)

วิธี Nested PCR เป็นวิธีทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้งโดยใช้ primer 2 คู่ ที่อยู่ในตำแหน่งภายใน ดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น โดย primer คู่ที่ 2 มีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้น DNA ที่ได้จาก primer คู่แรก เริ่มทำ PCR ตามปกติโดยใช้ primer คู่ที่ 1 เมื่อได้ผลผลิต PCR แล้วจึงนำมาทำ PCR ครั้งที่ 2 อาจใช้ primer คู่ใหม่ซึ่ง

มีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ครั้งแรก ผลที่ได้ครั้งที่ 2 นี้จะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดเล็กลง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความไวและความจำเพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายนั้น ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากการทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง มีความยุ่งยากและอาจมีการปนเปื้อนจากการดูดสารละลายจากหลอดหนึ่งมายังอีกหลอดหนึ่ง แต่มีข้อดีคือ product DNA ที่ได้มีความจำเพาะมากขึ้น (พรทิพย์. 2552 : 90-95)

ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายคู่ ขดเป็นวงกลม ดีเอ็นเอสายบวกไม่สมบูรณ์โดยขาดหายไป 15-50% (partial ds DNA) มีขนาดของยีโนมประมาณ 3200 คู่เบส ประกอบด้วย open reading frame ซึ่งซ้อนทับกันอยู่ (overlapping ORF) ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน 4 ชนิด คือ S ORF, C ORF, P ORF และ X ORF

S ORF มีรหัสสำหรับใช้ในการสร้าง surface protein หรือ HBsAg ซึ่งยีนนี้มีบริเวณที่สามารถใช้ในการเริ่มต้นสร้างโปรตีนได้ 3 บริเวณ ดังนั้นจึงสามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิด คือ Major protein (surface protein) สร้างจากยีนส่วน S gene ซึ่งจะเป็นส่วนที่จะใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบัน Middle protein (M protein) สร้างจากยีนส่วน S และ pre S2 gene ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ envelope antigen ของเชื้อ และ Large protein (L protein) สร้างจากยีนส่วน Pre S1, Pre S2 และ S gene ซึ่งโปรตีนชนิดนี้คาดว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการจับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์ตับ โดยปกติแล้วเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะสร้างโปรตีนทั้งสามชนิดนี้เพื่อเป็น surface protein โดยที่มีสัดส่วนของ Major protein : Middle protein : Large protein ประมาณ 4 : 1 : 1

S ORF เป็นรหัสในการสร้าง hepatitis B surface antigen(HBsAg) ซึ่งเดิมเรียกว่า Australia antigen (Au antigen), serum hepatitis antigen , hepatitis antigen หรือ hepatitis associated antigenยีนนี้มีบริเวณที่สามารถใช้ในการเริ่มต้นสร้างโปรตีนได้ 3 บริเวณ ดังนั้นจึงสามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิด คือ major protein, middle protein และ large protein

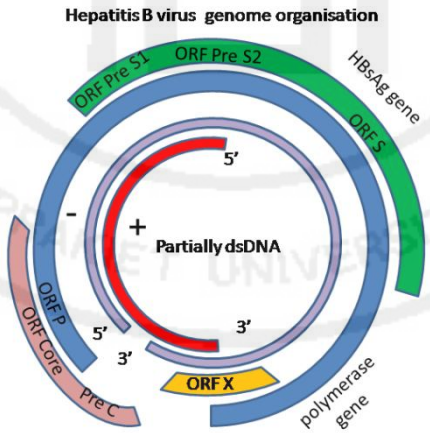
Major protein สร้างจาก S ORF ที่ใช้จุดเริ่มต้นที่อยู่ด้าน 3’ ที่สุดเรียกว่า s gene ประกอบด้วยกรดอะมิโน 226 ตัว เป็นส่วนหลักที่เรียกว่า hepatitis B surface antigen และเป็นส่วนที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบันเนื่องจากภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นต่อโปรตีนนี้เป็น protective immunity

Middle protein สร้างจากยีนส่วน *pre*S2 และ S ประกอบด้วยกรดอะมิโน 281 ตัว หรือเพิ่มจาก major protein 55 ตัว เป็นส่วนประกอบของ envelope antigen ของเชื้อนี้

Large protein สร้างจากยีนส่วน *pre*S1, *pre*S2 และ S โดยใช้จุดเริ่มต้นที่อยู่ด้าน 5’ ที่สุด ประกอบด้วยกรดอะมิโน 389 หรือ 400 ตัว บริเวณส่วนที่ *pre*S1 ที่เพิ่มเข้ามานี้ มีบริเวณที่คาดว่าเชื้อไวรัสใช้ในการจับกับผิวของเซลล์เพื่อใช้ในการเข้าสู่เซลล์ตับ ซึ่งเป็นกลไกในการติดเชื้อดังกล่าว ดังนั้นlarge protein ที่มีกรดอะมิโนจำนวน 389 ตัวนี้ จะมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-108 จากยีน *pre*S1,

ตำแหน่งที่ 109-163 จากยีน *pre*S2 และตำแหน่งที่ 164-389 จากยีน S HBsAg ที่สร้างจากยีนหลักของ S ORF และเป็นส่วนประกอบของทั้ง major protein, middle protein และ large protein นี้ เป็นแอนติเจนสำคัญของเชื้อไวรัสและสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ดี

C ORF มีรหัสสำหรับใช้ในการสร้าง nucleocapsid protein หรือ core protein (HBcAg และ HBeAg) core protein มี 2 domain หลัก โดยทางด้าน amino terminus มีบทบาทในการเกิดการรวมตัวกันระหว่างแต่ละโมเลกุลหรือ polymerization ให้เกิดเป็นรูปร่าง ส่วนทางด้าน carboxyl terminus เป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน arginine มาก มีบทบาทในการจับกับยีโนมของเชื้ อไวรัส (sequence non-specific nucleic acid interaction) core protein จะไปรวมกับ HBV DNA ทำให้เกิด nucleocapsid ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของ core protein ประมาณ 180 ชิ้นเป็น icosahedral symmetric structure โดยส่วนของโปรตีนนี้จะทำหน้าที่ในการป้องกันสารพันธุกรร มจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ exogenous nuclease ที่ย่อยสลาย DNA นอกจากนี้ core protein ยังเป็นแอนติเจนที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีและมีบทบาทสำคัญในการเกิดการอักเสบของตับที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การตรวจพบ HBeAg ในเลือดของผู้ป่วยสามารถบ่งบอกได้ว่าไวรัสมีการเพิ่มจำนวนอยู่ และสามารถแพร่กระจายเชื้อไวรัสได้ดี (พิไลพันธ์ และคณะ. 2536 : 4.1-4.16 ; สิริฤกษ์. 2543 : 150-160 ; Wright. 2001 : 2738-2750)



รูปที่ 2.2 : แสดงโครงสร้างและตำแหน่งของ genome

(A diagram of the genome organisation of Hepatitis B virus. 2007 : online)

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจซีรั่มเพื่อหา viral markers ต่าง ๆ เป็น anti-HBc IgM วิธีที่ใช้แพร่หลายจนปัจจุบัน markers ที่มีความสำคัญได้แก่ HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBc และ anti-HBe ในปัจจุบันมีการตรวจหา HBV-DNA และ HBV DNA polymerase เพื่อความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วมากขึ้น

HBsAg เป็น marker ที่แสดงว่าผู้นั้นกำลังติดเชื้อ ในผู้กำลังมีอาการจะตรวจพบ marker นี้ได้ร้อยละ 90 และมักตรวจพบได้ตลอดเวลาที่แสดงอาการของโรค ส่วนอีกร้อยละ 10 ที่ตรวจไม่พบอาจเป็นเพราะสามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้หมดไปก่อนที่จะแสดงอาการ เนื่องจากโรคมีระยะฟักตัวนานมาก

Anti-HBc โดยทั่วไปจะหมายถึง total anti-HBc ในห้องปฏิบัติการมีการตรวจทั้ง anti-HBc IgG และ anti-HBc IgM การตรวจพบ anti-HBc IgM เป็น marker ที่แสดงว่าผู้ป่วยกำลังติดเชื้อ นอกจากนี้การวินิจฉัยแยกระหว่างการติดเชื้อเฉียบพลันและการติดเชื้อเรื้อรังก็อาศัยการตรวจหา anti-HBc IgM เช่นกัน เพราะ มักพบ HBsAg ได้ในทั้ง 2 กรณี แต่ถ้าเป็นการติดเชื้อเรื้อรังจะตรวจพบ total anti-HBc โดยไม่พบ anti-HBc IgM ในขณะที่การติดเชื้อเฉียบพลันจะพบ anti-HBc ทั้ง 2 ชนิด

ในซีรั่มบางรายอาจตรวจพบ anti-HBc เพียงอย่างเดียวซึ่งแปลผลได้ดังนี้ คือ

1. อยู่ในระยะ core window หมายถึงช่วงเวลาที่ HBsAg ลดระดับลงจนตรวจไม่พบ และยังตรวจไม่พบ anti-HBs ด้วยเช่นกัน ในกรณีเช่นนี้ควรเจาะเลือดตรวจซ้ำอีกครั้งในเวลา 6 เดือนต่อมา ซึ่งควรตรวจพบ anti-HBs ถ้าเป็นการติดเชื้อชนิดเฉียบพลัน

2. เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และมีภูมิคุ้มกันหรือ anti-HBs เกิดขึ้นแล้ว แต่ระดับ anti-HBs ลดต่ำลงจนตรวจไม่พบ ในกรณีนี้ถ้าฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบบี จะเหมือนกับเป็นการ booster ให้ anti-HBs ปรากฏขึ้นอีกในระดับสูงในเวลาอันรวดเร็วเป็น anamnestic response

3. เป็นพาหะเรื้อรัง แต่ HBsAg มีอยู่ในปริมาณน้อยมาก ตรวจไม่พบด้วยวิธีและน้ำยาที่มีอยู่ในปัจจุบันซึ่งเป็นรูปแบบที่พบมากในกรณีติดเชื้อแบบซ่อนเร้น (occult HBV infection) ในกรณีนี้การฉีดวัคซีนจะไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง anti-HBs ได้

4. ในกรณีทารกแรกคลอด อาจเป็น maternal antibody ที่ได้รับผ่านรกมาจากมารดา

5. เป็นผลบวกปลอม ในกรณีนี้ควรตรวจเลือดเดิมซ้ำอีกครั้ง หรือเจาะเลือดตรวจใหม่ ผลบวกปลอมจะเปลี่ยนเป็นผลลบ และถ้าฉีดวัคซีนจะพบ anti-HBs ค่อย ๆ สูงขึ้นในลักษณะของการแรกตอบสนองต่อวัคซีน (พิไลพันธ์ พุธวัฒนะและคณะ. 2536 : 4.1-4.16 ; สิริฤกษ์. 2543 : 37-75 ; Lee. 1997 : 1733-1745 ; Chan and Lok. 1999 ; 291-307 ; Hoofnagle and Dibisceglie. 1991 ; 73-83)

HBeAg เป็น marker ที่บอกการติดเชื้อของซีรั่มมักเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับ HBsAg แต่อาจลดระดับลงเร็วกว่า การตรวจพบ HBeAg แสดงว่าไวรัสกำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (active replication) ในผู้ติดเชื้อเรื้อรังอาจพบ HBeAg ร่วมกับ HBsAg และ anti-HBc ได้

Anti-HBs เป็น marker ที่แสดงว่ามีภูมิคุ้มกันต่อโรคตับอักเสบบี ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันภายหลังจากหายจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ ควรจะตรวจพบ anti-HBs, anti-HBc และ anti-HBe ทั้ง 3 markers ในซีรั่ม แต่ถ้ามีภูมิคุ้มกันจากการฉีดวัคซีนจะมี anti-HBs เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 การแปลผลการตรวจพบ HBV-serological markers แบบต่างๆ

Serologic marker			การแปลผล
HBsAg	**anti-HBc**	**anti-HBs**	
-	-	-	ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อน ควรฉีดวัคซีน
+	+	-	มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเฉียบพลัน
+	+	-	มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง
-	+	-	มีภูมิคุ้มกันแล้วจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี
-	-	+	มีภูมิคุ้มกันแล้วจากการฉีดวัคซีน

(ดัดแปลงจาก CDC. MMWR Recomm Report : 2006)

การป้องกันโรค

ทำการตรวจกรองเลือดก่อนนำไปใช้ ในเวลานี้ธนาคารเลือดทุกแห่งตรวจหา HBsAg ในเลือดทุกหน่วยก่อนนำไปให้กับผู้ป่วย ทำให้อุบัติการของโรคตับอักเสบภายหลังการรับเลือด (post-transfusion hepatitis) ลดลงอย่างชัดเจน การให้วัคซีน ใช้วิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 3 เข็ม ในเดือนที่ 0, 1 และ 6 วัคซีนสามารถกระตุ้น neutralizing antibody ได้มากกว่าร้อยละ 90 ในผู้ป่วยที่ไม่สร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน (nonresponder) เช่น คนสูบบุหรี่จัด และผู้มีภูมิคุ้มกันต่ำ ควรให้วัคซีนเพิ่มอีก 1 ชุด และอาจแนะนำให้เปลี่ยนยี่ห้อวัคซีน (Maynard. 1990 : 18-20 ; Poovorawan et al. 2001 : 18-25)

ระบาดวิทยา

คนเป็นพาหะ (carrier) ที่สำคัญของเชื้อไวรัสนี้พบเชื้อนี้ในประชากรโลกกว่า 200 ล้านคน ประเทศไทยมีความชุกคนของพาหะร้อยละ 8 - 10 คือ ประมาณ 5 ล้านคนที่มีเชื้อไวรัสนี้ในร่างกาย พบเชื้อได้ในเลือด น้ำเหลือง สิ่งคัดหลั่งของผู้ติดเชื้อ เช่น น้ำอสุจิ น้ำในช่องคลอด น้ำลาย น้ำตา น้ำนม เป็นต้น ทำให้มีโอกาสแพร่ เชื้อได้หลายทาง ระยะฟักตัวของเชื้อนี้ 30 - 180 วัน เฉลี่ย 60 - 90 วัน ร้อยละ 90 ของผู้ป่วยตับอักเสบเฉียบพลันจากไวรัสนี้จะหายเป็นปกติ ที่เหลือเป็นพาหะของเชื้อต่อไป พาหะของเชื้อไวรัสตับอักเสบนี้ อาจไม่มีอาการแต่แพร่เชื้อต่อไป ส่วนหนึ่งอาจป่วยเป็นตับอักเสบเรื้อรัง ตับแข็ง

มะเร็งตับได้ ผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อนี้มีโอกาสเสี่ยงของมะเร็งตับสูงกว่าคนทั่วไปถึง 22 เท่า (Lavanchy. 2004 : 97-107 ; Pollcino et al. 2007 : 277-285)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 สารเคมี

- ชุดตรวจสำเร็จรูป HBsAg , anti-HBs และ anti-HBc ของไวรัสตับอักเสบบี (Alcon)
- ชุด Blood extraction kit GF-I® (Vivantis)
- ชุด 2x Taq Master Mix ซึ่งประกอบด้วย PCR buffer, dNTPs, *Taq* DNA polymerase และ $MgCl_2$ (Vivantis)
- TBE powder (Promega)
- Agarose powder (Promega)
- 100 bp DNA ladder marker (Fermentas)
- Taq DNA polymerase (Invitrogen)
- dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Invitrogen)
- Primer (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 : แสดงลำดับเบสของ primer จำเพาะต่อตำแหน่ง S gene, Core gene และ β-globin gene

Primer	**ลำดับเบส (5'→ 3')**	**ตำแหน่ง**	**ขนาด (bp)**
S-gene			
ES-F (Outer sense)	5'TGCTGCTATGCCTCATCTTC3'	nt. 414-433	409
ES-R (Outer antisense)	5'CA(G/A)AGACAAAAGAAAATTGG3'	nt. 803-822	
IS-F (Nested sense)	5'CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCC3'	nt. 455-477	324
HBsAg (Nested antisense)	5'GATGTTGTACAGTGTTGGC 3'	nt. 760-778	
Core-gene			
EC-R (Outer sense)	5'TCGCATGGAGACCACCGTGA3'	nt. 1604-1623	473
EC-F (Outer antisense)	5'ATAGCTTGCCTGAGTGC3'	nt. 2060-2076	
IC-R (Outer sense)	5'CATAAGAGGACTCTTGGACT3'	nt. 1653-1672	322
IC-F (Outer antisense)	5'GGAAAGAAGTCAGAAGGC3'	nt. 1957-1974	
β-globin			
K-HuGroHo (sense)	5'TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA3'	nt. 5559-5580	436
K-HuGroHo (antisense)	5'CCACTCACGGATTCTGTTGTGTTTC3'	nt. 5965-5992	

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Stuyver et al. และได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ .ดร. สุดา ลุยศิริโรจนกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล)

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์

- เครื่อง PCR machine (GenAmp PCR system 2700)
- Microcentrifuge
- Auto pipette ขนาด 1,000, 200, 50, 20 และ 5 µl
- Tip ขนาด 1,000, 200 และ 10 µl
- ชุด run gel electrophoresis
- เครื่อง UV-transilluminator (GelDoc)
- Microcentrifuge tube ขนาด 1 ml, 0.5 ml และ 0.2 ml
- เครื่อง Vortex mixer
- เครื่อง Water bath

2. วิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่าง

ซีรั่มของนักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติชั้นปีที่ 1 ตั้งแต่ปี 2552-2554 จากนักศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติโดยทำการตรวจ HBsAg, anti-HBs และ anti-HBc ของไวรัสตับอักเสบบี โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูปหลักการ gelatin particle agglutination test (GPA) ยี่ห้อ Alcon ของบริษัทในสหรัฐอเมริกา นักศึกษาที่พบ anti-HBc ให้ผลบวกเพียง marker เดียว จำนวน 10 รายนำไปตรวจเพิ่มเติม และหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยวิธี immunoassay การศึกษานี้ได้ผ่านการขอจริยธรรมจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

เจาะเลือดปริมาตร 6 ml แบ่งใส่ EDTA tube และ clot blood tubeปริมาตร 2 ml

Serum เตรียมโดยนำ clot blood tube ปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนของ serum ปริมาตร 200 µl

Plasma เตรียมโดยนำ EDTA tube ไปปั่นที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนของ plasma ปริมาตร 200 µl และส่วน buffy coat ปริมาตร 200 µl

นำตัวอย่างที่ได้ทั้ง 3 ชนิดไปสกัด DNA ในขั้นตอนต่อไป

2.2 วิธีสกัด DNA จากสิ่งส่งตรวจ

นำ serum, plasma และ buffycoat ปริมาตร 200 µl สกัดด้วยวิธี GF-1 blood DNA extraction kit (Vivantis, USA) โดยเติม buffer 200 µl, เติม proteinase K 20 µl นำไป mix ด้วย vortex mixer นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 200 µl แล้ว mix ทันที จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน column นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที เทน้ำส่วน

ใสทิ้ง ล้างด้วย washing buffer 1 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที เทน้ำส่วนใสทิ้ง แล้วล้างด้วย washing buffer 2 ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 2 นาที 2 รอบ นำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 3 นาที นำ column ใส่ลงใน microcentrifuge tube อันใหม่ จากนั้นเติม elution buffer 50 µl ทิ้งไว้ 2 นาทีนำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 2 นาทีเก็บที่อุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C จนกว่าจะนำไปใช้

2.3 การหา HBV genome โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

2.3.1 การตรวจหา S gene ของไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี nested PCR

ใช้ชุดน้ำยา 2X Taq PCR kit บริษัท Vivantis โดยในการทำ PCR ครั้งที่ 1 หรือ primary PCR ทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย 2X Taq PCR mix ปริมาตร 12.5µl, primer ES-F ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 1.5 µl, primer ES-R ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 1.5 µl, DNA template ปริมาตร 4 µl เติม sterilized distilled water ปริมาตร 5.5 µl จากนั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่อง PCR จำนวน 36 รอบ ประกอบด้วย

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ในรอบ nested PCR นำ PCR product จากรอบแรกจำนวน 2 µl ใช้เป็น template ในปฏิกิริยารอบ nested PCR โดยเปลี่ยนเฉพาะ forward primer (IS-F) และ reverse primer (HBsAg) เพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่อง PCR จำนวน 36 รอบ เหมือนขั้นตอนแรก เปลี่ยนเฉพาะขั้นตอน annealingโดยใช้อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 45 วินาที

2.3.2 การตรวจหา Core gene ของไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี nested PCR

ใช้ชุดน้ำยา 2X Taq PCR kit บริษัท Vivantis โดยในการทำ PCR ครั้งที่ 1 หรือ primary PCR ทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย 2X Taq PCR mix ปริมาตร 12.5µl, primer EC-F ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 1.5 µl, primer EC-R ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 1.5 µl, DNA Template ปริมาตร 4 µl เติม sterilized distilled water ปริมาตร 5.5 µl จากนั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่ อง PCR จำนวน 36 รอบ ประกอบด้วย

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

ในรอบ nested-PCR นำ PCR product จากรอบแรกจำนวน 0.5 µl ใช้เป็น template ในปฏิกิริยารอบที่ 2 โดยใช้ primer IC-F ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 1.5 µl, primer IC-R ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 1.5 µl, 2X Taq PCR kit บริษัท Vivantis ปริมาตร 12.5µl, เติม sterilized distilled water ปริมาตร 9 µl เพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่อง PCR จำนวน 36 รอบ เหมือนขั้นตอนแรก

2.3.3 การตรวจหา β-globin gene โดยวิธี PCR

ใช้ชุดน้ำยา 2X Taq PCR kit บริษัท Vivantis ที่ปริมาตรรวม 25 µl ประกอบด้วย 2X Taq PCR mix ปริมาตร 12.5µl, K-HuGroHo-F ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 0.2 µl, K-HuGroHo-R ปลาย ความเข้มข้น 10 µM ปริมาตร 0.2 µl, DNA Template ปริมาตร 2 µl เติม sterilized distilled water ให้ได้ปริมาตร 25 µl จากนั้นเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่อง PCR จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย

1. Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

2.4 การตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

นำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 6 X loading dye ปริมาตร 1 µl มาแยกขนาดของสายดีเอ็นเอบน 1.5 % agarose gel ใน 0.5 X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 1ชั่วโมงเปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอกับ 100 base pair DNA ladder marker จากนั้นนำ ไปย้อมสี ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพภายใต้เครื่ อง UV-transilluminator

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การตรวจ seromarker ของไวรัสตับอักเสบบี

ผลการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของนักศึกษาชั้นปีที่ 1 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ โดยการตรวจหา HBsAg, anti-HBs และ anti-HBc ในกลุ่มนักศึกษาปีพ.ศ. 2552-2554 (แสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2) พบความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแล้วแต่ยังไม่มีภูมิคุ้มกันซึ่งมีโอกาสแพร่เชื้อได้ เท่ากับร้อยละ 1.38 (22/5,886) ความชุกของการติดเชื้อที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน เท่ากับร้อยละ 2.2 (130/5,886) และความชุกของวัคซีนที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันเท่ากับร้อยละ 18.4 (1,083/5,886) ในขณะที่นักศึกษาที่ยังไม่มีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสตับอักเสบบีเท่ากับร้อยละ 78 ซึ่งนักศึกษากลุ่มนี้จะแนะนำให้ต้องมาฉีดวัคซีน ส่ วนกลุ่มที่คาดว่าอาจจะมีภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นจำนวน 12 ราย ส่งตรวจเพิ่มเติมด้วยการ หาปริมาณ HBsAg, anti-HBs และ anti-HBc ด้วยวิธี immunoassay พบว่าให้ผลตรงกับวิธีทางภูมิคุ้มกัน ในขณะที่มีค่า anti-HBs ต่ำกว่า 10 IU/L ทั้ง 10 ราย นักศึกษาจำนวน 10 รายนี้นำมาตรวจหา HBV-DNA โดยวิธี nested PCR จากสิ่งส่งตรวจทั้ง 3 ชนิดคือ serum, plasma และ buffy coat

ตารางที่ 4.1 แสดงจำนวนนักศึกษาที่พบ seromarker ของไวรัสตับอักเสบบี ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2552-2554

รูปแบบที่	Seromarker			จำนวนนักศึกษาปี พ.ศ.			รวมนศ.ทั้งหมด (ร้อยละ)
	HBsAg	anti-HBc	anti-HBs	2552	2553	2554	
1.	-	-	-	1,450 (76.4)	1,235 (80)	1,908 (78)	4,593 (78.0)
2.	-	-	+	351(18.5)	243 (15.8)	489 (20)	1,083 (18.4)
3.	-	+	+	54 (2.85)	50 (3.3)	26 (1.06)	130 (2.2)
4.	+	+	-	28 (1.5)	11 (0.7)	19 (0.77)	58 (1.0)
5.	-	+	-	8 (0.4)	2 (0.1)	2 (0.09)	12 (0.2)
6.	+	-	-	5 (0.3)	2 (0.1)	1 (0.04)	8 (0.14)
7.	+	-	+	1 (0.05)	0 (0)	0 (0)	1(0.02)
8.	+	+	+	0 (0)	0 (0)	1 (0.04)	1 (0.02)
				1,897	1,543	2,446	5,886 (100)

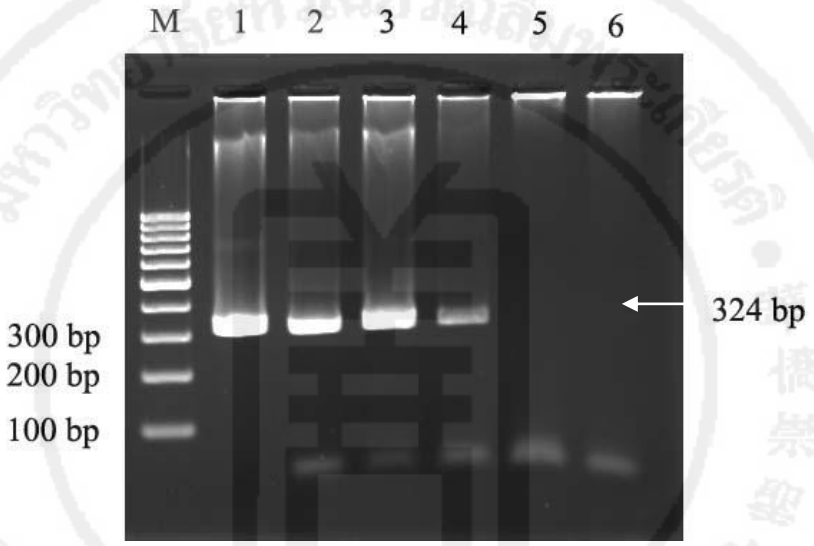
ตารางที่ 4.2 แสดงการแปลผลของไวรัสตับอักเสบบี

อาการทางคลินิก	**จำนวนนักศึกษาทั้งหมด (ร้อยละ)**
ไม่เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาก่อนและยังไม่มีภูมิคุ้มกัน (all negative)	78.0
มีภูมิคุ้มกันแล้วจากการฉีดวัคซีน (anti-HBs alone)	18.4
มีภูมิคุ้มกันแล้วจากการติดเชื้อ (anti-HBs และ anti-HBc)	2.2
มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg และ anti-HBc)	1.0
เคยมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (anti-HBc alone) (อาจมีการติดเชื้อตับอักเสบบีแบบแอบแฝง)	0.2
มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg alone)	0.14
มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg และ anti-HBs)	0.02
มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรือมีภูมิคุ้มกันแล้วจากการติดเชื้อ (HBsAg, anti-HBs และ anti-HBc)	0.02

4.2 การตรวจหา HBV-DNA ในบริเวณ s gene โดยวิธี nested PCR

ทดสอบความไวของการตรวจหา s gene โดยวิธี nested PCR โดยนำ serum ที่ทราบจำนวน copies/ml ของไวรัสตับอักเสบบี ความเข้มข้นคือ $1.1X10^4$ copies/ml นำไปเจือจางโดยทำ 5-fold dilution หลังจากนั้นนำ product จากการทำ dilution ไปทำ nested PCR ใช้ส่วนผสมของน้ำยา (PCR mixture) และใช้สภาวะที่เหมาะสมเหมือนในวิธีการทดลอง และขนาดของ band ที่ต้องการคือ 324 bp จากการทดสอบได้ค่าความไวของการทดสอบเท่ากับ 88 copies/mL ดังรูปที่ 4.1

นำ serum, plasma และ buffy coat จากนักศึกษาทั้ง 10 รายที่ มาทำการทดสอบไม่พบ HBV genome ทั้ง primer S และ C gene



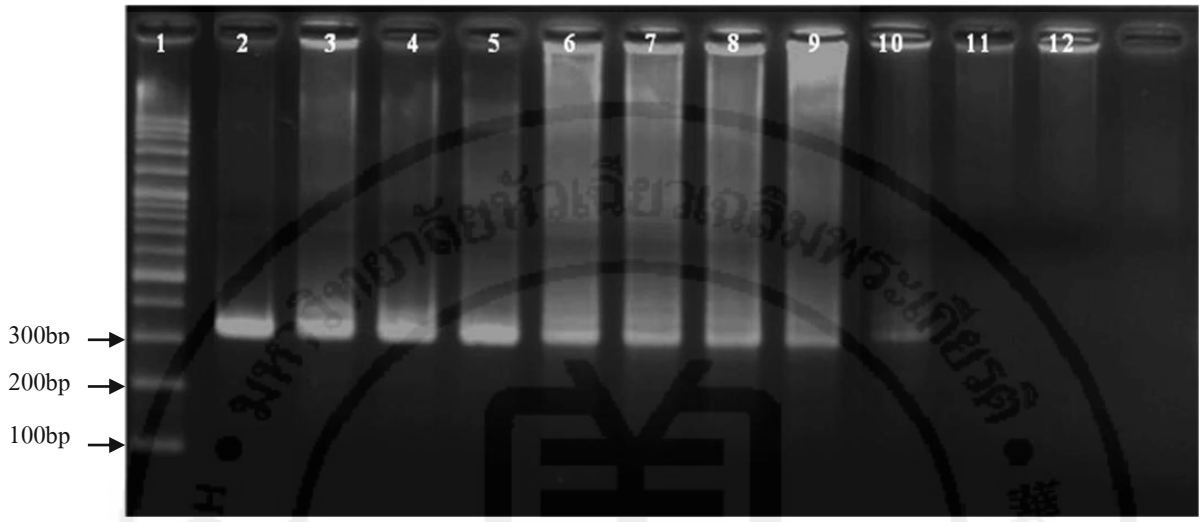
ภาพที่ 4.1 : การทดสอบความไวของการตรวจหา s gene โดยวิธี nested PCR lane M : 100 bp DNA marker lane 1-5 คือสิ่งส่งตรวจที่ทราบจำนวนเชื้อเท่ากับ $1.1X10^4$, $2.2X10^3$, $4.4X10^2$, 8.8X10, 1.76X10 copies/mL ตามลำดับ และ lane 6 คือ negative control

4.3 การตรวจหา HBV-DNA ในบริเวณ core gene โดยวิธี nested PCR

ทดสอบความไวของการตรวจหา core gene โดยวิธี nested PCR โดยนำ serum ที่ทราบจำนวน copies/ml ของไวรัสตับอักเสบบี ความเข้มข้นคือ $3.8X10^7$ copies/ml นำไปเจือจางโดยทำ 5-fold dilution หลังจากนั้นนำ product จากการทำ dilution ไปทำ nested PCR ใช้ส่วนผสมของน้ำยา (PCR mixture) และใช้สภาวะที่เหมาะสมเหมือนในวิธีการทดลอง และขนาดของ band ที่ต้องการคือ 322 bp จากการทดสอบได้ค่าความไวของการทดสอบเท่ากับ 88 copies/mL ดังรูปที่ 4.3

นำ serum, plasma และ buffy coat จากนักศึกษาทั้ง 10 รายที่คาดว่าน่าจะมีภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝง มาทำการทดสอบพบว่าให้ผลลบทั้งหมดทุกรายและทุกสิ่งส่งตรวจ ดังรูปที่ 4.4

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學



ภาพที่ 4.3 : การทดสอบความไวของการตรวจหา core gene โดยวิธี nested PCR lane 1 : 100 bp DNA marker, lane 2-12 คือสิ่งส่งตรวจที่ทราบจำนวนเชื้อ ความเข้มข้นเท่ากับ 3.8×10^{7}, 7.6×10^{6} , 1.52×10^{6}, 3.04×10^{5} ,6.08×10^{4} , 1.2×10^{4} , 2.4×10^{3} , 4.8×10^{2} , 96, 19.2 Copies/ml ตามลำดับ และหลุมที่ 12 negative control

4.4 การตรวจหา β-globin gene จาก buffy coat

การตรวจ β-globin gene จาก buffy coat ก่อนเพื่อทดสอบว่าสิ่งส่งตรวจนั้นมีปริมาณ cell อยู่จริง โดยวิธี PCR ขนาด product ที่ต้องการเท่ากับ 436 bp. ก่อนนำไปทดสอบหา s gene และ core gene พบว่าให้ผลบวกทั้งหมด แสดงว่าสิ่งส่งตรวจมีปริมาณเซลล์อยู่จริง ดังแสดงในภาพที่ 4.5

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ภาพที่ 4.5 : ผล 1.5% agarose gel electrophoresis ในการตรวจหา β-globin gene โดย lane 1 : 100 bp DNA marker, lane 2-7 คือนักศึกษารายที่ 1-6, lane 8 และ 9 คือ negative, positive control ตามลำดับ

เมื่อนำสิ่งส่งตรวจที่เป็น plasma และ buffy coat มาทำการทดสอบหา HBV-DNA ทั้งในส่วน s gene และ core gene ก็ไม่พบทั้ง 2 gene ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับใน serum

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของโลก ในปัจจุบันพบว่าประชากรทั่วโลกประมาณ 1 ใน 3 หรือมากกว่า 2 พันล้านคนมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ประชากรกว่า 400 ล้านคนทั่วโลกมีการติดเชื้อแบบเรื้อรังซึ่งผู้ที่ติดเชื้อเหล่านี้เป็นพาหะที่สามารถแพร่เชื้อต่อไปยังผู้อื่นได้ ประเทศไทยมีความชุกของไวรัสตับอักเสบบีสูงเช่นเดียวกับประเทศอื่นๆ ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีน และแอฟริกา ในปัจจุบันพบว่ามีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประชากรไทยประมาณร้อยละ 4 เนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและโรคตับต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ตับแข็ง และมะเร็งตับ เป็นปัญหาที่สำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศไทย โดยก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและสังคมของประเทศเป็นอย่างมาก (กนกพร สุนทรขจิต . 2556 : ออนไลน์) (เครือมัน สาวแดง และ ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. 2555 : 83-91) ดังนั้น การป้องกันการติดเชื้อด้วยวิธีต่าง ๆ โดยเฉพาะการฉีดวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มเสี่ยงจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดวิธีหนึ่งในการป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่อาจตามมาภายหลัง ผลของการฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสอย่างทั่วถึง (Universal หรือ Mass immunization program) ทำให้อัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมทั้งอุบัติการณ์ของมะเร็งตับในเด็กลดลงเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

จากการที่รัฐบาลไทยกำหนดให้ทารกแรกเกิดทุกคนต้องได้รับวัคซีนตับอักเสบบี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 เป็นต้นมา ทำให้สถานการณ์โรคไวรัสตับอักเสบในประเทศไทยค่อนข้างคงที่มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 จากรายงานการเฝ้าระวังของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ปี พ.ศ. 2553 แต่ก็ยังพบว่าโรคไวรัสตับอักเสบที่พบส่วนใหญ่ยังคงเป็นไวรัสตับอักเสบบี ร้อยละ 57.03 เมื่อเทียบจากการติดเชื้อตับอักเสบทุกชนิด รายงานการศึกษาของวรนุช จงศรีสวัสดิ์และคณะ พบความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทยหลังจากนโยบายการฉีดวัคซีนตับอักเสบบีแล้ว ร้อยละ 5-6 ในผู้ที่มีอายุมากกว่า 16 ปีขึ้นไป และพบเพียงร้อยละ 0.3–2.7 ในผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 16 ปี แสดงให้เห็นว่าการได้รับวัคซีนตับอักเสบบีที่มีประสิทธิภาพทำให้อัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในคนไทยลดลงอย่างเห็นได้ชัด (Chongsrisawat et al. 2006 : 1496-1502) แต่การได้รับวัคซีนอาจจะยังไม่ครอบคลุมทั้งประเทศ แม้ว่าจะได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีมาแล้วก็ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำได้ เพราะอาจได้รับวัคซีนที่ด้อยคุณภาพ วัคซีนไม่ครอบคลุมทุก genotype หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งขึ้นอยู่กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละบุคคล การศึกษาในหลายแห่งพบว่าน้ำยาที่ใช้ในการตรวจหา HBsAg ที่ใช้ในปัจจุบันไม่สามารถตรวจหา HBsAg ในระดับต่ำๆ ได้ (Louisirirotchanakul et

al. 2011 : 1532-1540 ; Togashi et al. 2008: 17-24) จึงต้องมีการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี NAT ร่วมด้วย เพื่อเพิ่มความปลอดภัยสำหรับผู้ป่วยที่ต้องรับเลือด ส่วนประกอบของเลือดหรืออวัยวะบริจาค

มหาวิทยาหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติได้ทำการตรวจสุขภาพให้แก่นักศึกษาชั้นปีที่ 1 ทุกปีการศึกษา โดยเฉพาะไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้เก็บข้อมูล ระหว่างปีการศึกษา 2552-2554 พบว่าความชุกของการติดเชื้อเท่ากับร้อยละ 1.38 ในขณะที่ความชุกของ HBsAg ในประเทศไทย พบประมาณ ร้อยละ 3-10 ร้อยละ 4-10 พบในผู้ใหญ่ และร้อยละ 2-6 ในเด็กปฐมวัยรวมทั้งการศึกษาที่ศึกษาความชุกของ HBsAg ในบุคลากรทางการแพทย์พบประมาณ ร้อยละ 4 และความชุกของ anti-HBs ผลเป็นบวกในประชากรทั่วไปในประเทศไทยประมาณ ร้อยละ 20-40 ในการศึกษาครั้งนี้พบความชุกของ HBsAg ผลเป็นบวกคือ ร้อยละ 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับในประชากรทั่วไป นอกจากนี้ความชุกของ anti-HBs ผลเป็นบวกในการศึกษานี้คือ ร้อยละ 20 ซึ่งใกล้เคียงความชุกของ anti-HBs ผลเป็นบวกของประชากรทั่วไปในประเทศไทย เหตุผลส่วนหนึ่งเกิดจากการมีภูมิคุ้มกันไวรัสตับอักเสบบีจากการฉีดวัคซีนมากขึ้น ภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการฉีดวัคซีนพบประมาณ ร้อยละ 18 ในขณะที่ผู้ที่มีประวัติได้รับวัคซีนมีผล anti-HBc เป็นบวก มีเหตุผลจากการได้รับวัคซีนไม่ครบ หรือ ในวัยผู้ใหญ่ช่วงที่ได้รับวัคซีนอาจอยู่ในช่วงระยะแฝงของโรค คือ ช่วงที่ได้รับเชื้อโรคแต่ยังไม่มีอาการของโรค (latent period) หรืออยู่ในช่วงที่ได้รับเชื้อแต่ตรวจไม่พบภูมิคุ้มกันในเลือดได้ (window period) ซึ่งการได้รับวัคซีนหลังจากระยะที่การติดเชื้อกระตุ้นการสร้าง anti-HBs ทำให้ตรวจพบ หรือ ไม่พบร่องรอยของเชื้อไวรัส (viral maker) ขณะได้รับวัคซีนกระตุ้นได้ (จีรนันท์ จันทร์เมฆา. 2554: 112-119 ; นิภาพร ลี้ตระกูล และคณะ . 2556 : 72-80 ; Chimparlee N. et al. 2011: 609-615 ; Chongsrisawat et al. 2006 : 1496-1502) ในขณะที่การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น พบได้หลายรูปแบบ ผู้ติดเชื้อที่มี anti-HBc เพียงอย่างเดียว พบมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบได้ในผู้ที่ไม่มี serological marker ของ HBV พบในผู้ที่มีแอนติบอดีจำเพาะต่อ HBV (anti-HBc และ/หรือ anti-HBs) แล้วก็ได้ ในประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นได้ร้อยละ 4 ของผู้ติดเชื้อ HBV เรื้อรังทั้งหมด ในกลุ่มนักศึกษาครั้งนี้พบร้อยละ 0.2 การตรวจไม่พบ HBsAg แต่ HBV DNA ให้ผลบวก ถ้าไม่ใช่เกิดปัญหาจากเทคนิคผิดพลาดแล้ว สามารถเกิดได้ หลายกรณี คือ 1) ติดเชื้อ HBV เรื้อรังที่อยู่ในระยะเชื้อสงบ (anti-HBc เพียงอย่างเดียว) โดยปริมาณเชื้อมีระดับต่ำกว่าความไวของชุดตรวจทาง immunoassay จับได้ ถือว่าเป็นการติดเชื้อแบบ occult HBV พบมากสุด 2) ระยะแรกของการติดเชื้อในช่วง pre HBsAg window period ที่มีปริมาณไวรัสต่ำ และไม่พบ serological markers ใดๆ 3) เชื้อไวรัสกลายพันธุ์ตรงบริเวณ ‘a’ determinant โดยเฉพาะในตำแหน่ง G145R ซึ่งมีผลกระทบกับต่อการตรวจไม่พบ HBsAg ด้วยชุดตรวจที่ใช้ monoclonal antibody ที่ตำแหน่งตรงกัน 4) เกิด immune complex โดยมี anti-HBs จับกับ HBsAg และ; 5) ติดเชื้อร่วมกับไวรัสตับอักเสบซี หรือไวรัสตับอักเสบดี ซึ่งเชื้อไวรัสไปกดการสร้างหรือลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นการพัฒนาความไวของชุดตรวจHBsAg และความจำเพาะของ nucleic acid testing จึงมีความสำคัญในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นนี้ (สุดา ลุยศิริโรจนกุล. 2556)

สำหรับในการศึกษาครั้งนี้นักศึกษากลุ่มที่คาดว่าอาจจะมีภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นจำนวน 10 ราย ส่งตรวจยืนยันด้วยวิธี chemiluminescence หาปริมาณ HBsAg, anti-HBs และ anti-HBc พบว่าให้ผลตรงกับวิธีทางภูมิคุ้มกัน ในขณะที่มีค่า anti-HBs ต่ำกว่า 10 IU/L ทั้ง 10 ราย นักศึกษาจำนวน 10 รายนี้นำมาตรวจหา HBV-DNA โดยวิธี nested PCR จากสิ่งส่งตรวจทั้ง 3 ชนิดคือ serum, plasma และ buffy coat

จากการศึกษาการตรวจหา HBV-DNA ในส่วนของ s gene ในผู้ป่วยที่คาดว่าจะติดเชื้อ ไวรัสตับอักเสบ บี แบบซ่อนเร้น (Occult hepatitis B virus : OBI) โดยวิธี nested PCR ที่สามารถตรวจพบ HBV-DNA ไวรัสได้ ถึงแม้จะมีการติดเชื้อไวรัสในปริมาณที่น้อย คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาในกลุ่มผู้ที่มี HBsAg negative, Anti-HBc positive และ Anti-HBs positive หรือ negative ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่ อาจมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น โดยทำการตรวจในส่วนของ s gene ที่มีบทบาทสำคัญเนื่องจากในส่วน s gene นี้มีการกลายพันธุ์ได้บ่อยทำให้เชื้อมีความสามารถที่จะหลีกเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้ไม่สามารถตรวจเจอได้ โดยวิธีทาง serology จากการศึกษาส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจหา HBV-DNA ในส่วนของ S gene โดยวิธี nested PCR พบว่าค่า ความไวของการศึกษาครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 88 copies/ml เมื่อเปรียบเทียบเทียบกับการศึกษาของ Stuyver และคณะ (Stuyver et al. 2000 : 702-707) ซึ่งใช้ primer ชุดเดียวกันแต่ส่วนประกอบของปฏิกิริยาต่างกันได้ค่าความไวเท่ากับ 60 copies/ml ในขณะที่ HBV-DNA ในส่วนของ core gene โดยวิธี nested PCR พบว่าค่าความไวของการทดสอบ นี้มีค่าอยู่ที่ 100 copies/ml ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่าง ที่เป็นซีรัม พลาสมา และ buffy coat ส่วนของนักศึกษาที่ตรวจสุขภาพประจำปีการศึกษา 2552- 2554 ในมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่มี marker Anti-HBc positive, HBsAg negative และ Anti-HBs positive หรือ negative ซึ่งสงสัยว่าน่าจะมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น นั้นกลับให้ผลลบทั้งหมด ดังนั้นจึงแสดงว่าตัวอย่างตรวจนี้ไม่มี HBV-DNA ก็แสดงว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น หรืออาจจะมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบซ่อนเร้นอยู่ก็ได้ แต่มีปริมาณของ HBV-DNA ในปริมาณที่ต่ำกว่า 88 และ 100 copies/ml ในส่วนของ S และ core gene ตามลำดับซึ่งเป็นค่าความไวที่จำกัดในการทดสอบนี้

จากงานวิจัยของสุดา และคณะ พบว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นส่วนใหญ่จะพบ viral load ต่ำ ส่วนมากต่ำกว่า 10^4 IU/ml เป็นประจำและบางครั้งอาจพบต่ำกว่า 100 IU/ml ได้ จากงานวิจัยของ Santos และคณะ รายงานว่าร้อยละ 35 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอดส์มี anti-HBc เพียงอย่างเดียวและความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น ประมาณร้อยละ 10 ความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้นในผู้ป่วยที่ได้รับการฟอกไตอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 0-58 (สุดา ลุยศิริโรจน กุล. 2556; Santos. 2003 : 92-98) ความแตกต่างในอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีซ่อนเร้น อาจสะท้อนให้เห็นถึงความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีความหลากหลายในประเทศที่แตกต่างกัน ความไวของเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ใน การตรวจระดับอณูชีวโมเลกุล ขนาดและคุณสมบัติที่ เกี่ยวกับไวรัสวิทยาของกลุ่มผู้ป่วย ดังนั้นในการตรวจหา HBV-DNA จึงควรใช้หลักการทางอณูชีวโมเลกุลที่มีความไว และความจำเพาะสูงๆ เช่นวิธี

nested PCR วิธี Real time PCR เป็นต้น ปัจจุบันโดยเฉพาะในการรับถ่ายเลือด ได้นำวิธี NAT (nucleic acid testing) มาใช้ในการช่วยตรวจวินิจฉัยเพื่อแก้ปัญหากรณีที่ HBsAg อาจจะต่ำกว่าค่า detection limit หรือเชื้อที่ mutant รวมทั้งอาจเป็นระยะ window period ทำให้ชุดน้ำยาที่ใช้ตรวจทาง serology ไม่สามารถตรวจพบได้ Stalmer et al. 2011 : 236-247) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งเป็น endemic area มีผู้ติดเชื้อเป็นล้านคน ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อขึ้นใหม่จึงมีความเป็นไปได้สูง ทางเลือกสำหรับการแก้ปัญหาการติดเชื้อ คงไม่มีทางเลือกอื่นนอกการตรวจโดยวิธี NAT ร่วมกับวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา เพื่อลดความเสี่ยงและการติดเชื้อโดยเฉพาะในกลุ่มวัยรุ่นหรือนักศึกษา เพื่อให้อัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมทั้งอุบัติการณ์ของมะเร็งตับให้ลดลงหรือหมดไป สำหรับประเทศไทยเริ่มมีการทดลองใช้ NAT ในการตรวจกรองโลหิตบริจาคในปี พ.ศ. 2544 โดยศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในปัจจุบันน้ำยาที่ใช้ในการตรวจกรองโลหิตบริจาคในประเทศไทยโดยวิธี NAT assays ต้องผ่านการรับรองคุณภาพจาก FDA ของประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อเป็นการประกันคุณภาพน้ำยาที่นำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ สภากาชาดไทยร่วมกับสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์กระทรวงสาธารณสุขสำหรับเป็นแนวทางให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับงานบริการโลหิตของประเทศพิจารณาถึงความเหมาะสม ในการนำวิธี NAT assays มาใช้เป็นมาตรฐานงาน วิเคราะห์ของ HBV, HCV และ HIV-1 มาศึกษาและทดลองใช้ในการตรวจกรองโลหิตบริจาคทุกยูนิต ช่วยเพิ่มความปลอดภัยและลดความเสี่ยงของผู้ป่วยที่มีความจำเป็นต้องรับการรักษาโดยการให้เลือดได้เป็นอย่างมาก (Lui et al. 2006 : 33-44 ; Pikulsod et al. 2009 : 1126-1135 ; Sakuldamrongpanich et al. 2012 : 93-100) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อในปริมาณต่ำๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น จึงมีความสำคัญม าก เพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก หรือโรงพยาบาลทั่วไปได้ต่อไป

บรรณานุกรม

กนกพร สุนทรขจิต . (2556) “การตรวจคัดกรองและการให้คำปรึกษาก่อนสมรส : ไวรัสตับอักเสบบี” วงการแพทย์. [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.wongkarnpat.com/upfilecme/CME%20401.pdf (25 ตุลาคม 2557).

กองทุนอโรคยาเพื่อเผยแพร่ความรู้โรคตับ. (2008) **โรคตับอักเสบจากไวรัสตับอักเสบ บี** . [ออนไลน์] แหล่งที่มา : http://www.thaihealth.or.th/node/6704.pdf (2 มิถุนายน 2554).

เครือมัน สาวแดง และ ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. (เมษายน-มิถุนายน 2555) “ความชุกของการติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสตับอักเสบซี และซิฟิลิส ในผู้บริจาคโลหิต : การเฝ้าระวังเพื่อพัฒนาการคัดกรองผู้บริจาคโลหิต” **วารสารโลหิตวิทยา และ เวชศาสตร์บริการโลหิต**. 22 : 83-91.

จีรนันท์ จันทร์เมฆา. (2554) “ความชุกและปัจจัยเสี่ยงของภาวะภูมิคุ้มกันในโรคไวรัสตับอักเสบ บี ในบุคลากรทางการแพทย์ไทย” **ศรีนครินทร์เวชสาร**. 26 (2) : 112-119.

นิภาพร ลี้ตระกูล และคณะ. (2556) “การตรวจหา HBV prof ile ในระยะ occult HBV infection ในผู้บริจาคโลหิตของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่” **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่**. 46 (1) : 72-80.

พรทิพย์ พึ่งม่วง. **เอกสารประกอบคำสอนวิชาอณูชีววิทยา.** (2552) สมุทรปราการ: ศูนย์เทคโนโลยีการศึกษามหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ . (2540) “ไวรัสตับอักเสบ” ใน **ไวรัสวิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 4.1-4.16. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ อักษรสมัย.

ศรีวิไล ตระกูลเกษมศิริ และเจริญศักดิ์ ทัพโยธา. (พฤษภาคม 2555) “ความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี ชนิดซี เอชไอวี และ ซิฟิลิส ในผู้บริจาคโลหิตครั้งแรกของโรงพยาบาลสมเด็จพระบรมราชเทวี ณ ศรีราชา สภากาชาดไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2550-2554” **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่**. 45 (2) : 15-21.

สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล . (2543) “ไวรัสตับอักเสบบี” ใน **ตับอักเสบจากไวรัส.** หน้า 37-75. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์บางกอกบล๊อก.

สุดา ลุยศิริโรจนกุล. (2552) “Occult HBV in thai blood donor” **ในงานประชุม Roche molecular scientific days 2009 เรื่อง Update on Clinical Applications and New Challenges.** หน้า 1-8. เพชรบุรี : โรงแรมไฮแอท รีเจนซี่.

สุดา ลุยศิริโรจนกุล. (เมษายน-มิถุนายน 2556) “ภัยเงียบไวรัสตับอักเสบบีแบบซ่อนเร้น” **จุลสารเทคนิคการแพทย์**. 6 (25) : 4.

Alavian, S.M.et al. (2012) " Occult hepatitis B (OBH) in clinical settings" **Hepatitis Monthly.** 12 (8) : 6126.

Allain, J.P. (2004) "Occult hepatitis B virus infection" **Trasfusion Clinique et Biologique.** 11: 18-25.

Carreno, V. et al. (2008) "Occult hepatitis B virus and hepatitis C virus infections" **Review in Medical Virology**. 18 (3) : 139-157.

Centers for disease control and prevention. (2006) " Immunization of adults" **Morbidity and Mortality Weekly**. 55 : 1-33.

Chan, H.L. and Lok, A.S. (1999) "Hepatitis B in adults. A clinical perspective" **Clinical Liver Disease.** 3: 291-307.

Chemin, I. and Trepo, C. (2005) "Clinical impact of occult HBV infections" **Journal of Clinical Virology**. 34 : 15-21.

Chimparlee, N. et al. (2011) "Hepatitis B and hepatitis C virus in Thai blood donors" **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 42 : 609-615.

Chongsrisawat, V. et al. (2006) "Hepatitis B seroprevalence in Thailand: 12 years after hepatitis B vaccine integration into the national expanded programme on immunization" **Trop Med Int Health**. 11 : 1496-1502.

Conjeevaram, H.S and Lok, A.S. (2001) "Occult Hepatitis B virus infection: A hidden menace?" **Hepatology**. 34 : 204-206.

Echevarria, J.M. and Avellon, A. (2008) "Utility of molecular biology in the microbiological diagnosis of viral hepatitis" **Enferm Infecc Microbiol Clin**. 26 : 66-74.

Fang, Y.et al. (2009) "Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China" **Journal of Infection**. 58 : 383-388.

Hidenori, T. et al. (2004) "Prevalence and clinical implications of occult hepatitis B viral infection in hemophilia patients in Japan" **Journal of Medical Virology**. 73 : 195-199.

Hollinger, F.B. (2001) "Hepadnaviridae" in **Virology**. page 2738-2750. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hoofnagle J.H. and Di Bisceglie S. (1991) "Serologic diagnosis of acute and chronic hepatitis" **Seminar in Liver Disease Journal**. 11 : 73-83.

Hou, J. et al. (2005) "Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection" International **Journal Medicine Medical Science**. 2 (1) : 50-57.

Lavanchy, D. (2004) “Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures” **Journal of Viral Hepatology**. 11: 97-107.

Lee, W.M. (1997) “Hepatitis B virus infection” **The New England and Journal of Medicine**. 337 : 1733-1745.

Louisirirotchanakul S., Oota S. and Khuponsarb K. et al. (2011) “Occult hepatitis B virus infection in Thai blood donors” **Transfusion**. 51: 1532-1540.

Lui, C.J., Chen, D.S. and Chen, P.J. (2006) “Epidemiology of HBV infection in Asian blood donors: emphasis on occult HBV infection and the role of NAT” **J Clin Virol**. 36 : S33-44.

Maynard, J.E. (1990) “Hepatitis B. Global importance and need for control” **Vaccination**. 8 : 18-20.

Pikulsod, S. et al. (2009) “One-year experience of nucleic acid technology testing for human immunodeficiency virus Type 1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in Thai blood donations” **Transfusion**. 49 : 1126-1135.

Poovorawan, Y. et al. (2001) “Problems and prevention of viral hepatitis in Thailand” **Journal of Medical Association Thailand**. 84 : 18-25.

Pollicino, T. et al. (2007) “Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma” **Hepatology**. 45 (2) : 277-285.

Raimondo, G. et al. (2007) “Occult hepatitis B virus infection” **Journal of Hepatology**. 46 : 160-70.

Raimondo, G. (2010) “A 2010 update on occult hepatitis B infection” **Pathologie Biologie.** 58 (4) : 254–257.

Raimondo, G. et al. (2007) “Occult hepatitis B virus infection” **Journal of Hepatology.** 46 (1) : 160-70.

Sakuldamrongpanich, T. et al. (2012) “NAT screening for human immunodefi ciency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus in blood donations at the national blood centre and regional blood centre of the Thai Red Cross” **J Hematol Transfus Med**. 22 : 93-100.

Santos, E.A. et al. (2003) “Frequent occult hepatitis B virus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1” **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 22 : 92-98.

Stramer, S.L. et al. (2011) “Nucleic acid testing to detect HBV infection in blood donors” **The New England and Journal of Medicine**. 364 : 236-247.

Stratta, P. et al. (2009) " Prevalence and Clinical Relevance of occult Hepatitis B Virus Infection in Patients on the Waiting List for Kidney Transplantation" **Transplantation proceedings**. 41 : 1132-1137.

Stuyver, L. et al. (2000) "Line probe assay for monitoring drug resistance in Hepatitis B virus infected patients during antiviral therapy" **Journal of clinical microbiology**. 8 : 702-707.

Suwannakarn, K. et al. (2008) "Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes" **Hepatology Research**. 38 : 244-51.

Taha, S.E. et al. (2013) "Detection of occult HBV infection by nested PCR assay among chronic hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma" **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**. 14 : 353–360.

Tahereh, Z. et al**.** (2005) "Characteristics and prevalence of occult hepatitis B virus infection in patients with hepatitis C in Iran" **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran**. 19 : 147-151.

Tan, J. et al. (2006) "Update on viral hepatitis" **Current Opinion in Gastroenterology.** 23 (3) : 263-267.

Timvickers "A diagram of the genome organisation of Hepatitis B virus. ORF stands for Open Reading Frame" [En. Wikipedia Online] Available : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HBV_genome.png (14 November 2007).

Togashi, H. et al. (2008) "What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit?". **J Hepatol**. 49 : 17-24.

Torbenson, M. and Thomas, D.L. (2002) Occult hepatitis B" **Lancet Infection Diseases**. 2(8) : 479-486.

Tran, T.T. (2009) "Understanding cultural barriers in hepatitis B virus infection" **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. 3 : 10-13.

Valsamakis A. (2007) "Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B" **Clinical Microbiology Reviews**. 20 (3) : 426-39.

ประวัติย่อผู้วิจัย

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสมหญิง งามอุรุเลิศ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
	วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
	ปร.ด. (จุลชีววิทยาการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1221

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางอิสยา จันทร์วิทยานุชิต
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล
	วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1221

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นางสุมลรัตน์ ชูวงษ์วัฒนะ
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
	วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
สถานที่ติดต่อ	กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์
	มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
	โทรศัพท์ 02-312-6300 ต่อ 1221

ผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล	นายประเสริฐ เอื้อวรากุล
ประวัติการศึกษา	M.D. (Mahidol University, Thailand), Dr.med. (Germany)
สถานที่ติดต่อ	ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
	มหาวิทยาลัยมหิดล
	โทรศัพท์ 02-4127000 ต่อ 7059