

การจำแนกสายพันธุ์ และ จีโนมไทป์ ทางอนุชีวโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย



นายกมล สุวรรณการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

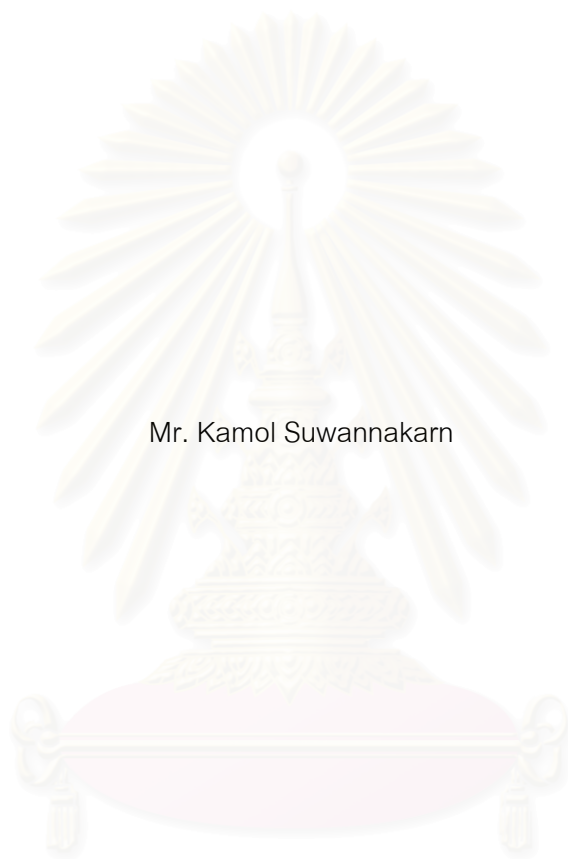
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4590-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENOTYPE OF HEPATITIS B VIRUS
IN THAILAND



Mr. Kamol Suwannakarn

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2005


ISBN 974-17-4590-7


หัวข้อวิทยานิพนธ์ การจำแนกสายพันธุ์ และ จีโนไทป์ ทางอนุชีวโมเลกุลของ
ไวรัสตับอักเสบ บี ที่พบในประเทศไทย
โดย นายกมล สุวรรณการ
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา ศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรนุช จงศรีสวัสดิ์

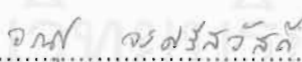
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวพันธ์ ภัทรโกศล)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรนุช จงศรีสวัสดิ์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

กมล สุวรรณการ : การจำแนกสายพันธุ์ และ จีโนไทป์ ทางอนุชีวโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย. (MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENOTYPE OF HEPATITIS B VIRUS IN THAILAND) อ. ที่ปรึกษา : ศ.นพ.ยง ภู่วรรณ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วรรณุช จงศรีสวัสดิ์, 408 หน้า. ISBN 974-17-4590 -7.

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ มีผู้ติดเชื้อเรื้อรังทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคน ประเทศไทยจัดเป็นประเทศที่มีความชุกชุมของไวรัสตับอักเสบบี สูง ปัจจุบันไวรัสตับอักเสบบี สามารถจำแนกออกได้เป็น 8 genotype โดยวิธีการอ่านรหัสพันธุกรรม และสามารถจำแนกออกด้วยทาง serotype เป็น subtype และพบการกระจายตัวของ genotype และ subtype แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก การศึกษาระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย ได้ทำการศึกษการจำแนก genotype และ subtype ของไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 6,239 ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลของรัฐทั้งหมดใน 4 จังหวัดตัวแทน ทั้ง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และ ภาคใต้ ของประเทศไทย ทำการตรวจด้วย ELISA พบว่าให้ผลบวกต่อ HBsAg ทั้งหมด 246 ตัวอย่าง (3.94%) โดยเหลือตัวอย่างที่สามารถทำการตรวจได้ทั้งหมด 201 ตัวอย่าง เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบว่ามีจำนวนตัวอย่าง 147 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR โดยสามารถจำแนกได้เป็น genotype C จำนวน 128 ตัวอย่าง (87.08%) genotype B จำนวน 17 ตัวอย่าง (11.56%) และ genotype A จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.36%) และพบ subtype เป็น adr จำนวน 124 ตัวอย่าง (84.35%) และ adw จำนวน 21 ตัวอย่าง (14.23%) และ ayw จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.36%) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของประเทศเวียดนาม จากตัวอย่างที่ทำการศึกษา พบว่ามีผู้ได้รับวัคซีนป้องกันแต่ยังพบการติดเชื้อทั้งหมด 43 ตัวอย่าง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในส่วน of 'a' determinant ซึ่งทำให้เกิด vaccine escape mutant ทั้งในกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 145 ของ HBsAg และตำแหน่งอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ พบตัวอย่างบางกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene จำนวน 14 ตัวอย่าง โดยเกิดการ deletion ในส่วนของ Pre-S1, Pre-S2 และเกิดการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 จากข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบถึงข้อมูลด้านระบาดวิทยาพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี และเพื่อทำความเข้าใจในการกลายพันธุ์ เพื่อนำเป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาการป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ต่อไปได้

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... กมล สุวรรณการ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... อ. ยง ภู่วรรณ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... อ. วรรณุช จงศรีสวัสดิ์

4774703530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: Hepatitis B virus / Genotype / Subtype / "a" determinant / Escape mutant

KAMOL SUWANNAKARN : MOLECULAR CHARACTERIZATION AND GENOTYPE OF HEPATITIS B VIRUS IN THAILAND. THESIS ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, MD., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. VORANUSH CHONGSRISAWAT, MD. , 85 pp. ISBN 974-17-4590-7.

More than 350 million people worldwide are chronically infected by the hepatitis B virus (HBV), Thailand is one of the high endemic areas for hepatitis B. Hepatitis B virus can be classified into 8 genotypes and subtypes by direct sequencing. The prevalence of specific genotypes varies geographically. In this study, 6,239 sera samples from 4 provinces of Northern, Northeast, Middle and Southern part of Thailand were 246 (3.94%) positive for HBsAg by ELISA. The 147 samples from 201 of HBsAg positive were positive for HBV- DNA by PCR method. All the HBV-DNA positive were classified in genotype C = 128 (87.08%), genotype B = 17 (11.56%), genotype A = 2 (1.36%), subtype adr = 124 (84.35%), adw = 21 (14.23%), ayw = 2 (1.36%) and the similarity of nucleotides were closed to Vietnam strain. Of those, 43 samples were vaccine failure and didn't show the "a" determinant mutation (cause of vaccine escape mutant at position 145). Fourteen samples results the mutation in Pre-S gene showing deletion in Pre-S1 or Pre-S2 and Pre-S2 point mutation at start codon. From this study the elucidation of the predominant viral strains might well prove crucial regarding the development and implementation of preventive measures. Hence, the investigation of HBsAg subtype and genotype distribution in Thailand, emphasizing the molecular characteristics of the HBV isolates examine.

Department Medical Science

Academic year 2005

Student's signature..... Kamol Suwannakarn

Advisor's signature..... Yong Poovorawan

Co-advisor's signature..... Voranush Chongsrisawat

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเมธีวิจัยอาวุโส ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี การศึกษา 2548

ขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาส ในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียงพอ และที่ กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรรณุช จงศรีสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณา ให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ ความรู้จนบรรลุวัตถุประสงค์ในระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษหน่วยวิจัยไวรัสระดับอักษบ คณะ แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ กำลังใจ ตลอดจน คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จ การศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อใน ระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
- กรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	3
- ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
- การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย.....	4
- คำสำคัญ.....	4
- ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
- เชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	5
- ไวรัสตับอักเสบบี.....	6
- ลักษณะทางไวรัสวิทยา.....	6
- การจำแนกกลุ่ม.....	6
- ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัส.....	7
- ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ.....	8
- Gene ของไวรัสตับอักเสบบี.....	9
- วงชีวิตชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี.....	12
- พยาธิกำเนิดของไวรัสตับอักเสบบี.....	13
- Genotype ของไวรัสตับอักเสบบี.....	14
- Subtype ของไวรัสตับอักเสบบี.....	16
- วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี.....	17
- Escape mutant.....	18

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
- รูปแบบการวิจัย.....	20
- ประชากรศึกษา.....	20
- เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	21
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	23
- วิธีการดำเนินการวิจัย.....	24
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	32
- ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant.....	33
- ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Pre-S1.....	34
- Phylogenetic analysis.....	37
- การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	43
- การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน.....	44
- ผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant.....	47
- ผลการแปลงรหัสพันธุกรรมในส่วนของ “a” determinant.....	49
- ผลการจำแนก subtype.....	50
- การตรวจสอบ vaccine escape mutant.....	51
- การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene.....	53
บทที่ 5 สรุปวิจารณ์ผลการทดลอง.....	66
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงลักษณะและตำแหน่งที่ใช้ในการจำแนก subtype ของไวรัสตับอักเสบ บี.....	16
2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง subtype และ genotype ของไวรัสตับอักเสบ บี และการกระจายตัว.....	17
3. แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของไวรัสที่กลายพันธุ์ ที่บริเวณ HBsAg ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ escape mutant.....	19
4. แสดงรายละเอียดของ primer ที่ใช้.....	26
5. แสดงส่วนผลสมของปฏิกิริยา PCR.....	26
6. แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR.....	27
7. แสดงส่วนผลสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing.....	28
8. แสดงส่วนผลสมของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับ vector.....	31
9. แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	32
10. แสดงผลการตรวจสอบซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี PCR.....	33
11. แสดงผลการจำแนก genotype ของตัวอย่างทั้งหมด 4 จังหวัด.....	43
12. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแต่ละ genotype.....	44
13. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน ของแต่ละ genotype.....	44
14. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของต่างประเทศ.....	46
15. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน กับกรดอะมิโนของต่างประเทศ.....	46
16. แสดงผลการจำแนก genotype ของตัวอย่างทั้งหมด 4 จังหวัด.....	50
17. ตัวอย่างที่มี genotype ไม่ตรงกับ subtype.....	50
18. แสดงข้อมูลการตรวจสอบกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 126 บริเวณ "a" determinant.....	51
19. แสดงข้อมูลผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี.....	52
20. แสดงการลักษณะกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา.....	53

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงภาพวาดแสดงลักษณะโครงสร้างและ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี.....	7
2 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี.....	8
3 แสดงลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี.....	9
4 แสดงภาพวาดแสดงโปรตีนทั้ง 3 ชนิดที่สร้างจาก pre-S1, pre-S2 และ S gene.....	10
5 แสดงวงชีวิตของไวรัสตับอักเสบ บี.....	13
6 แสดงการกระจายตัวของ genotype ของแต่ละกลุ่มตามแต่ละภูมิภาคของโลก.....	15
7 แสดงขั้นตอนการสกัด DNA.....	25
8 แสดงขั้นตอนการตกตะกอนที่ได้จากการเข้า cycle sequencing.....	28
9 แสดงการ transform เข้าสู่ competent cell.....	31
10 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV.....	33
11 แสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ Pre-S1 โดยโปรแกรม BLAST.....	34
12 แสดงตัวอย่างผลของโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของ Pre-S1.....	35
13 ตัวอย่างผลการตรวจสอบ genotype โดยใช้โปรแกรม genotyping tool.....	36
14 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด เชียงราย.....	38
15 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด นครศรีธรรมราช.....	39
16 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด อุตรดิตถ์.....	40
17 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด ชลบุรี.....	41
18 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา.....	42
19 แสดงตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ “a” determinant โดยโปรแกรมBLAST.....	47
20 แสดงตัวอย่างผลของโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของ “a” determinant.....	48
21 แสดงตัวอย่างผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ให้เป็นกรดอะมิโน ในส่วนของ “a” determinant.....	49
22 แสดง Clustal Analysis พบมีการ deletion ที่ตำแหน่งของ Pre-S2 เท่านั้น.....	54

ภาพที่	หน้า
23 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 ของตัวอย่าง CR-081.....	54
24 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนเนื่องจากเกิดการ deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์..	55
25 แสดงการ deletion กรดอะมิโนจำนวนของ polymerase gene ที่เกิดจากการ deletion ในส่วนของ Pre-S2.....	55
26 แสดงข้อมูล Chromatogram ของตัวอย่าง NK-394	56
27 แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสุ่มเลือก Clone ของ เชื้อตัวอย่าง NK-394...	57
28 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนจากการ clone ตัวอย่าง NK-394.....	58
29 แสดงการ deletion กรดอะมิโนของตัวอย่าง NK-394.....	58
30 แสดงการวิเคราะห์ด้วย Clustal Analysis พบการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2.....	59
31 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2.....	59
32 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนของ polymerase gene ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2.....	60
33 แสดงข้อมูล Chromatogram ของตัวอย่าง UDH-241.....	60
34 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ start codon ของ Pre-S2 ของตัวอย่าง UDH-241.....	61
35 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง start codon ของตัวอย่าง UDH-241.....	61
36 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Clustal Analysis ของข้อมูลตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์โดย Deletion ที่ Pre-S2 และ กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2.....	62
37 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 และการเปลี่ยนแปลง ที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 ของตัวอย่าง UD-402.....	62
38 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนจำนวน เนื่องจากเกิดการ deletion และการ เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2.....	63
39 แสดงการ deletion กรดอะมิโนจำนวน และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ของ polymerase gene ที่เกิดจากการการเปลี่ยนแปลงของของ Pre-S2.....	63
40 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S1 ของตัวอย่าง CHP-181.....	64
41 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโน เนื่องจากเกิดการ deletion ที่ Pre-S1.....	64
42 แสดงการ deletion กรดอะมิโนของ Polymerase gene เนื่องจาก เกิดการ deletion ที่ Pre-S1.....	65

ภาพที่	หน้า
43 แสดงตำแหน่งของ Pre-S1 ที่มีการขาดหายไป ของตัวอย่าง CHP-181.....	70
44 แสดงตำแหน่งของ Pre-S2 ที่มีการกลายพันธุ์ ทั้ง deletion และ point mutation.....	71



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B virus : HBV) เป็นเชื้อไวรัสที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคตับอักเสบบีและเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับ มีผู้ติดเชื้อแบบเรื้อรังทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคน (1, 2) อาการของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ส่วนใหญ่ จะเป็นการติดเชื้อแบบไม่มีอาการ มีเพียงส่วนน้อยที่จะพบอาการของโรคตับอักเสบบีซึ่งตรวจพบได้จากอาการแสดงทางคลินิก หรือตรวจได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ผู้ป่วยร้อยละ 0.5-1 ที่มีการติดเชื้อแบบรุนแรงจนเสียชีวิต ผู้ติดเชื้อร้อยละ 5-10 จะไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้และเกิดเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง โดยอาจจะเป็นพาหะของโรคโดยไม่มีอาการ (carrier) หรือเป็นโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis B) ผลที่ตามมาของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่รุนแรง (serious outcome) คือ การเกิดโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) โดยมักจะเกิดโรคตับแข็งภายในเวลา 10-20 ปี การดำเนินโรคต่อไปเป็นโรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาที่ติดเชื้อ อายุของผู้ป่วย สภาวะภูมิคุ้มกัน เป็นต้น และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมและถิ่นที่อยู่ของผู้ติดเชื้อด้วย (3, 4, 5, 6, 7) ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งตับมากกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อประมาณ 30-200 เท่า ขึ้นกับปัจจัยอื่นด้วย เช่น เชื้อชาติ (8)

ปัจจุบันประเทศไทย มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคตับในประเทศไทย เป็นจำนวนมาก หากไม่รวมมะเร็งตับ ส่วนใหญ่นั้นเสียชีวิตจากตับแข็ง โรคตับเรื้อรังและภาวะตับวาย การสูญเสียในการดูแลรักษาเป็นมูลค่ามากมาย นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งตับ ปีละไม่น้อยกว่า 10,000 ราย (ประมาณ 11,000-12,000 ราย/ปี) พบว่าร้อยละ 60 มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับไวรัสตับอักเสบบี แต่เดิมในอดีตประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความชุกชุมของไวรัสตับอักเสบบี สูง มีอัตราการเป็นพาหะในประชากรไทยประมาณร้อยละ 6-8 ในสตรีตั้งครรภ์จะเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบี ประมาณร้อยละ 6 ในจำนวนที่เป็นพาหะนี้จะตรวจพบ hepatitis B e antigen (HBeAg) ประมาณร้อยละ 40 กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มีนโยบายในการควบคุมป้องกันไวรัสตับอักเสบบี โดยเริ่มโครงการป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวัคซีน โดยวางแผนให้วัคซีนกับทารกทุกคนที่เกิดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 เป็นต้นไป

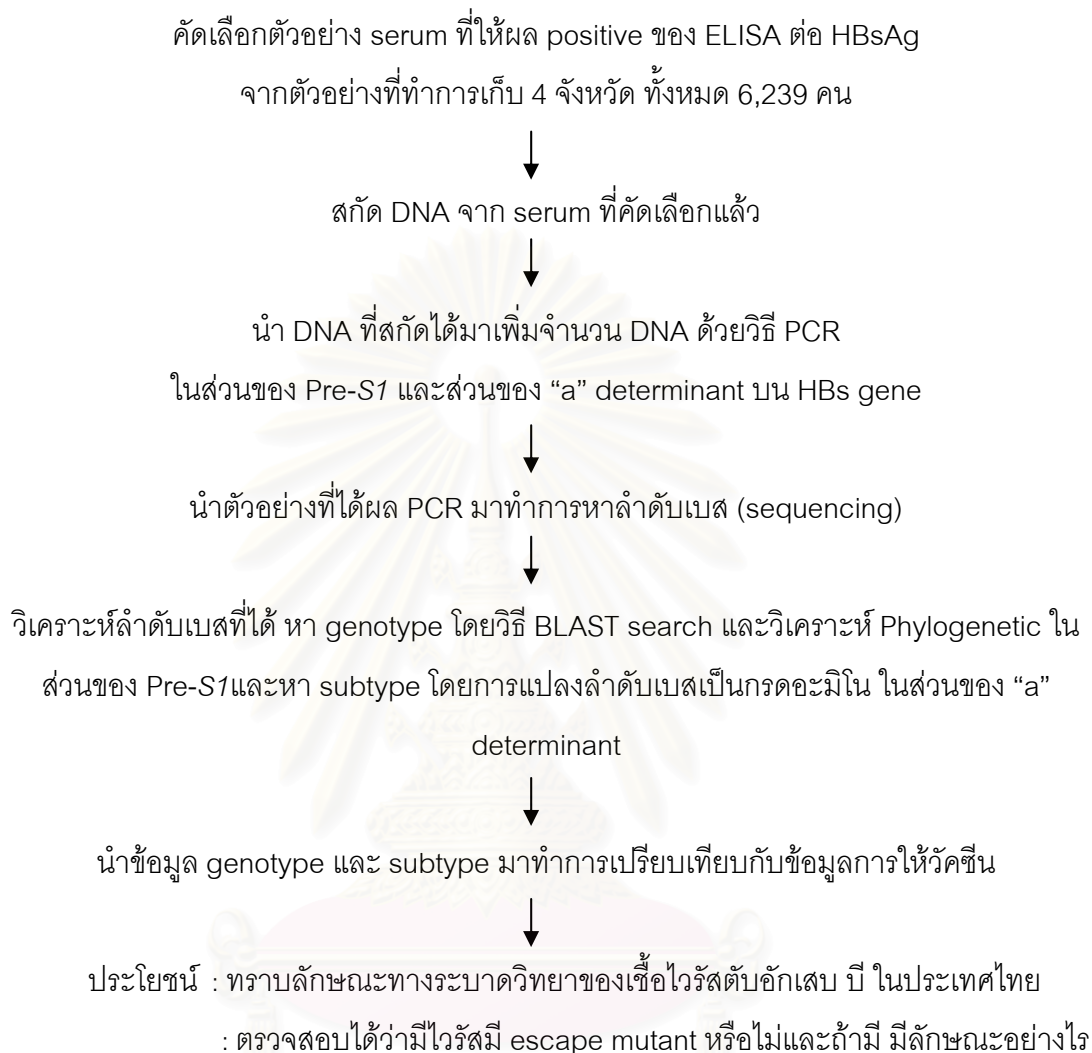
การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อดูระบาดวิทยาทางด้านพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี และ genotype และ subtype ใด เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการประเมินผลกระทบของการให้วัคซีน โดยทำการสุ่มประชากรตัวอย่างจาก ประชากรชาวไทย อายุระหว่าง 1-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ใน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดอุดรธานี จังหวัดชลบุรี และจังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดละประมาณ 1,500 ตัวอย่าง รวมประมาณ 6,000 ตัวอย่าง และทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ ELISA ให้ผล positive ต่อ HBsAg เพื่อมาทำการศึกษาในแนวลึกทางด้าน molecular epidemiology โดยการทำการ molecular characterization ของ ไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย การศึกษานี้อาจทำให้พบสายพันธุ์ใหม่ หรือลักษณะที่ผิดปกติจากปกติของไวรัสตับอักเสบบี เช่น deletion หรือ insertion ในส่วนของ HBsAg

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. จำแนก genotype และ subtype ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่ตรวจพบในประเทศไทย ด้วยวิธีการ sequencing จากกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบ HBsAg
2. ตรวจสอบ mutation ของไวรัส ในบริเวณส่วนของ “a” determinant
3. ตรวจสอบ HBs gene บริเวณ “a” determinant ของผู้ที่ได้รับวัคซีนแต่พบการติดเชื้อเพื่อหา escape mutant

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

- ปริมาณ serum ที่เหลืออยู่มีปริมาณไม่เพียงพอ ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองได้ในบาง specimens
- แบบสอบถาม อาจมีการกรอกข้อมูลไม่สมบูรณ์ทำให้ยากแก่การวิเคราะห์ข้อมูล

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definition)

-Genotype คือ การแบ่งกลุ่มของไวรัสตับอักเสบบี โดยวิธีการตรวจสอบจากรหัสพันธุกรรม

-Subtype คือ การแบ่งกลุ่มของไวรัสตับอักเสบบี โดยตรวจสอบจากลำดับของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant

คำสำคัญ (Key Words)

Hepatitis B virus

Genotype

Subtype

“a” determinant

Escape mutant

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected Benefit and Application)

1. ทำให้ทราบระดับความรุนแรงของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทย
2. สามารถนำข้อมูลไปเพื่อประกอบการวางแผนเพื่อติดตาม เฝ้าระวังและประเมินผลโรคไวรัสตับเรื้อรังที่มีผลมาจากไวรัสตับอักเสบบี ได้
3. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการพิจารณา เฝ้าติดตามด้านระบาดวิทยา โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อต่อวัคซีน และวางแผนในการใช้วัคซีน เพื่อป้องกันการระบาดของโรค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไวรัสตับอักเสบ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ (hepatitis virus) เป็นสาเหตุที่สำคัญที่สุดของโรคตับอักเสบ โดยมากกว่าร้อยละ 70-80 ของโรคตับอักเสบทั้งหมดเกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบ เชื้อไวรัสตับอักเสบแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในแง่ลักษณะทางพยาธิวิทยา ชนิดของเชื้อ และความสามารถในการก่อโรค ลักษณะทั่วไปที่พบในเชื้อกลุ่มนี้ คือ เซลล์ตับเป็นอวัยวะหลักของร่างกายที่ติดเชื้อได้ (hepatotropic) ซึ่งไวรัสในกลุ่มนี้ได้แก่

- เชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ (hepatitis A virus, HAV)
- เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี (hepatitis B virus, HBV)
- เชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี (hepatitis C virus, HCV)
- เชื้อไวรัสตับอักเสบ ดี (hepatitis D virus, HDV)
- เชื้อไวรัสตับอักเสบ อี (hepatitis E virus, HEV)
- เชื้อไวรัสตับอักเสบ จี (hepatitis G virus, HGV)
- เชื้อไวรัสทีที (TT virus, TTV)
- เชื้อไวรัสเซน (SEN virus)

อาจสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามลักษณะการติดต่อ คือ

1. กลุ่มที่ติดต่อทางการรับประทานเป็นหลัก (enterically-transmitted virus)
ได้แก่ เชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ และ อี
2. กลุ่มที่ติดต่อทางเลือดเป็นหลัก (parenterally-transmitted virus)
ได้แก่ เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ซี ดี จี ทีที และ เซน

เชื้อบางชนิดอาจจะสามารถติดต่อได้หลายทาง เช่น เชื้อไวรัส ทีที อาจจะติดต่อได้ทั้งทางการรับประทาน และทางเลือด เป็นต้น

ไวรัสตับอักเสบ บี

ไวรัสตับอักเสบ บี เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิด โรคตับอักเสบ ปัจจุบันมีประชากรมากกว่า 2,000 ล้านคนติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี และประมาณ 350 ล้านคนมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronically) และกลายเป็น carriers (9) ซึ่ง 3 ใน 4 ของประชากรโลก อาศัยอยู่ในเขตที่มีความชุกของการติดเชื้อสูง และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 1 ล้านคนต่อปี

ไวรัสตับอักเสบ บี ถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2509 (ค.ศ. 1966) โดย Professor Baruch Blumberg เป็นการค้นพบโดยบังเอิญ โดยการศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่างเลือดของประชากรกลุ่มต่างๆ โดยวิธี immunodiffusion พบ Australia antigen หรือ Au antigen สมมุติฐานว่าน่าจะเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบ ต่อมาจึงได้ทำการศึกษาด้วยการศึกษาการติดเชื้อร่วมกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อ Au antigen ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบ และการศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนร่วมกับการย้อมด้วยแอนติบอดี ทำให้สามารถสรุปได้ว่ามีเชื้อไวรัสเป็นต้นเหตุสำคัญที่ติดต่อทางเลือด จึงเรียกเชื้อชนิดนี้ว่า เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี (hepatitis B virus หรือ HBV) (10)

ลักษณะทางไวรัสวิทยา

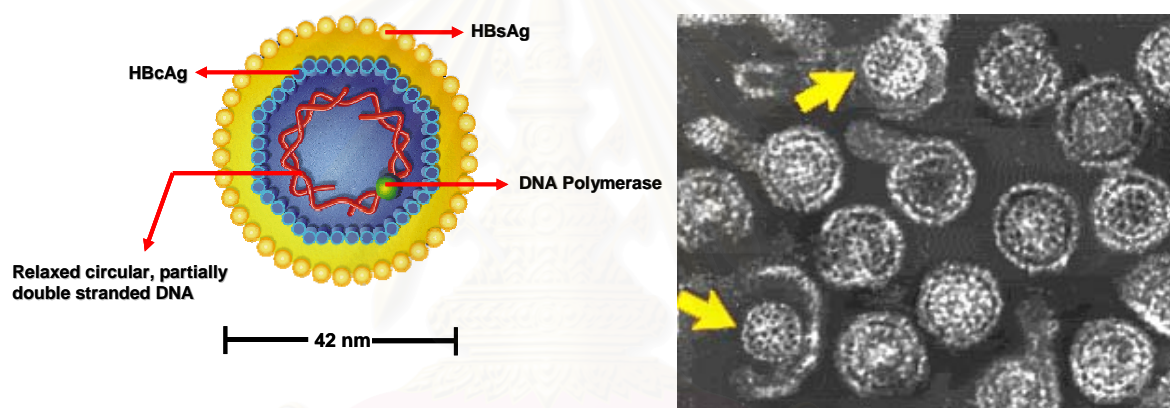
การจำแนกกลุ่ม

ไวรัสตับอักเสบ บี สามารถจำแนกได้อยู่ในตระกูล (family) *Hepadnaviridae* โดยอยู่ใน genus *Orthohepadnavirus* เนื่องจากเป็นเชื้อที่อยู่ในเซลล์ตับ (hepatocyte) และมีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA (hepa+DNA = hepadna)

เชื้อในตระกูล *Hepadnaviridae* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบในสัตว์หลาย species สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 genus คือ *Orthohepadnavirus* ประกอบด้วย Human hepatitis B virus, Woodchuck hepatitis virus (WHV) และ ground squirrel hepatitis virus (GSHV) ส่วนอีก genus คือ *Avihepadnavirus* ประกอบด้วย Heron hepatitis virus และ duck HBV นอกจากนี้ ไวรัสในตระกูลนี้ยังพบใน host ที่มี species ที่ใกล้เคียงกัน เช่น ใน chimpanzee, orangutan, gibbons, African green monkeys, rhesus monkeys และ woolly monkeys (9,11,12)

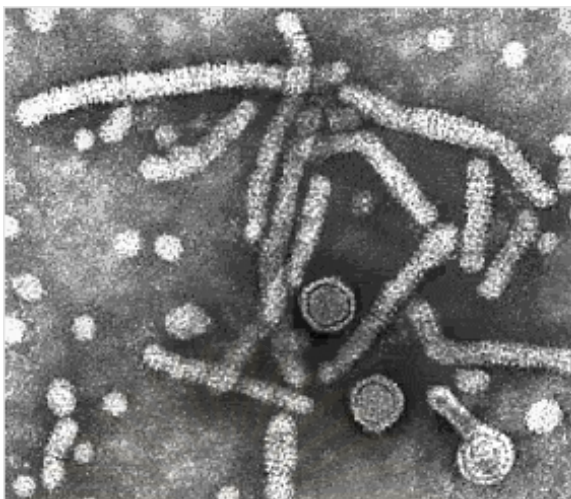
ลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัส

เมื่อศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน จะพบลักษณะ complete viral particle เรียกว่า Dane particle มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 42 nm โครงสร้างของเชื้อไวรัส ประกอบด้วย envelope protein ห่อหุ้มอยู่ เรียกว่า hepatitis B surface antigen (HBsAg) กับ lipid layer มีขนาดหนาประมาณ 4 nm ภายในตัวไวรัสมี internal nucleocapsid structure หรือ core มีลักษณะแบบ icosahedral nucleocapsid ขนาดประมาณ 27 nm ซึ่งประกอบด้วย viral genome (DNA) ร่วมกับ core protein หรือ hepatitis B core antigen (HBcAg) และยังมีโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ชนิด DNA polymerase และ reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) (13)



รูปที่ 1 แสดงภาพวาดแสดงลักษณะโครงสร้างและ ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

นอกจากนี้ไวรัสตับอักเสบบี ยังมีลักษณะพิเศษ คือ นอกจากพบ complete viral particle หรือ Dane particle แล้ว ยังสามารถพบ viral particle มีลักษณะ ทั้งรูปแบบทรงกลม (small sphere) และรูปแท่ง (rod) ขนาดประมาณ 22 nm และมีความยาวได้มากตั้งแต่ 50 nm ถึง 500 nm ซึ่ง particle เหล่านี้เป็น incomplete viral particle หรือ empty noninfectious particles ที่มีเฉพาะ envelope, HBsAg แต่ไม่มี viral genome



รูปที่ 2 แสดงภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงลักษณะของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งได้แก่ complete viral particle และ incomplete viral particle ชนิด sphere และ rod (WHO/CDS/CRS/LYO/2002.2:Hepatitis B)

โดยปกติแล้วมักจะมี incomplete viral particle เหล่านี้มากกว่า complete viral particle

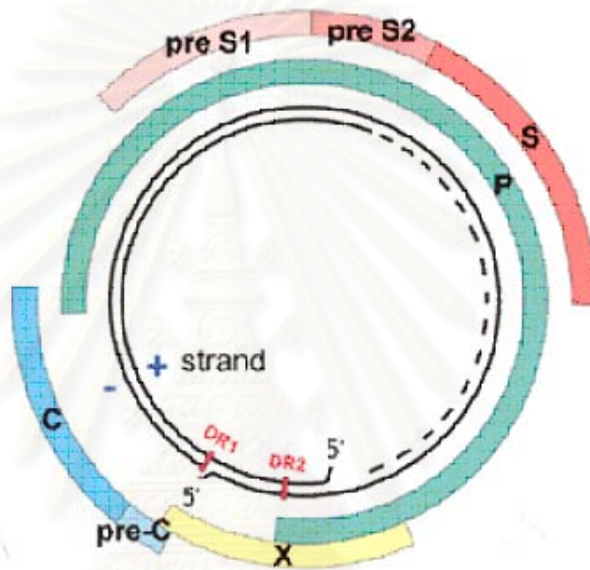
ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายคู่ มีขนาด genome ประมาณ 3.2 kb ประกอบด้วย open reading frame ซึ่งมีลักษณะซ้อนทับกันอยู่ (overlapping ORF) 4 open reading frame ทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน

Genome ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นสายคู่แบบไม่สมบูรณ์ (incomplete double strand) โดยสาย ลบ หรือ negative strand มีความยาวเต็มตลอด genome แต่สาย บวก หรือ positive strand มีความยาวไม่ครบ ซึ่งอาจแตกต่างกันได้ขึ้นอยู่กับเชื้อไวรัสแต่ละตัว (12) เนื่องจากสายบวกถูกสร้างขึ้นหลังสายลบ และกระบวนการสร้างสายบวกจะหยุดหลังจากที่สิ้นสุดขั้นตอน packaging ดังนั้นความยาวจะไม่แน่นอน ปลายด้าน 5' ของ genome สายลบและสายบวกมีความแตกต่างกัน โดยทางด้าน 5' ของสายลบจะจับอยู่กับโปรตีน แต่ทางด้านสายบวกจะจับอยู่กับ oligonucleotide ซึ่งมีบทบาทในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเชื้อ (14) เมื่อเชื้อไวรัส package กลายเป็น virion แล้ว ปลายด้าน 5' ของทั้งสายบวกและสายลบของ genome ของเชื้อ จะมีส่วนที่ complementary กัน ประกอบด้วย direct repeat 2 ตำแหน่ง ขนาดประมาณ 11-12 bp เรียกว่า DR1 และ DR2 โดยทั้งสองห่างกันประมาณ 225 bp และเป็นส่วนปลาย 5' ของ genome ทั้ง 2 สาย โดยปลายด้าน 5' ของสายลบอยู่ใน DR1 และปลายด้าน 5' ของสายบวกอยู่

ใน DR2 บริเวณ direct repeat นี้มีบทบาทในขั้นตอนการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนไวรัส โดยเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้าง genome สายใหม่ (15) รหัสพันธุกรรมของ DR1 และ DR2 แตกต่างกันในเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์

Genome สายลบที่มีขนาดเต็มจำนวนของ genome ไม่ได้ต่อเป็นสายคู่คอบวง แต่จะมีรอยแยกหรือ nick ระหว่างปลายด้าน 5' และ 3' ที่บริเวณ DR2 ซึ่ง genome สามารถคงรูปเป็นวงได้โดยอาศัยการจับคู่ complementary กับ genome สายบวก ซึ่งบริเวณนี้จะซ้อนทับอยู่ประมาณ 225 bp ในช่วงระหว่าง DR1 และ DR2



รูปที่ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และ open reading frame ซึ่งมีลักษณะซ้อนทับกัน (overlapping open reading frame)

Gene ของไวรัสตับอักเสบบี

gene ที่ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนทั้งหมด ได้แก่

1. S gene

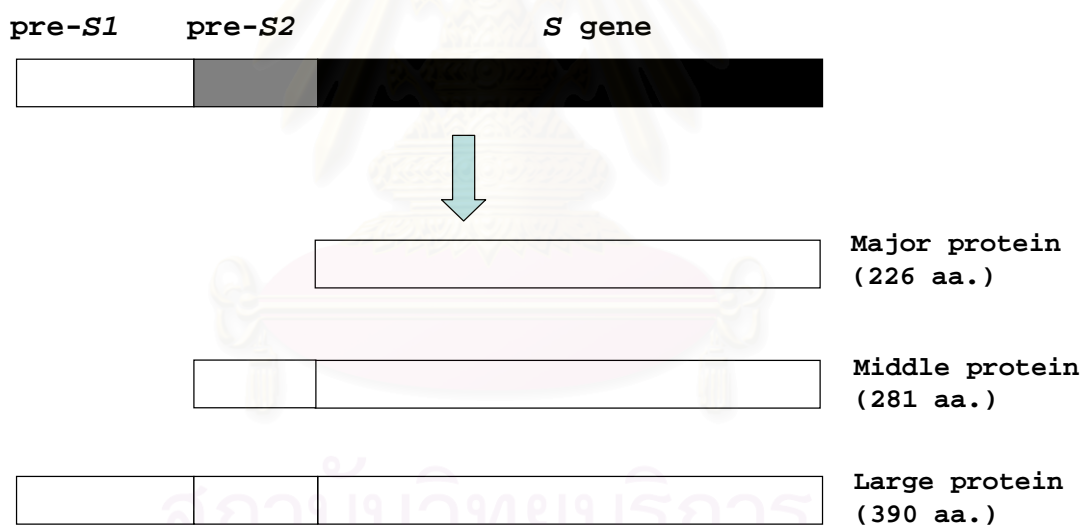
นอกจาก S gene แล้วยังมี open reading frame ที่อยู่บริเวณ 5' ของ S gene ได้แก่ pre-S1 และ pre-S2 ยีนที่บริเวณนี้ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสร้าง hepatitis B surface antigen (HBsAg) โดยสามารถใช้ในการเริ่มต้นสร้างโปรตีนได้ 3 บริเวณ ดังนั้นจึงสามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิด ได้แก่ major protein, middle protein และ large protein

Major protein สร้างจาก S open reading frame ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 226 ตัว โดยจะมี antigenic determinant ที่สำคัญ และเป็น group-specific determinant มีอยู่ในเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เกือบทุกสายพันธุ์และทุก serotype เรียกว่า "a" determinant เป็นส่วนที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดีมาก (16) จึงเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการผลิตวัคซีนในปัจจุบัน

Middle protein สร้างจากยีนส่วน pre-S2 และ S ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 281 ตัว หรือเพิ่มจาก major protein 55 ตัว เป็นส่วนประกอบของ envelope antigen

Large protein สร้างจากยีนส่วน pre-S1, pre-S2 และ S ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ประมาณ 380-400 ตัว มากกว่า middle protein และ major protein บริเวณส่วนของ pre-S1 ที่เพิ่มเข้ามานี้คาดว่าใช้ในการจับผิวของเซลล์เพื่อใช้ในการเข้าสู่เซลล์ตับ ซึ่งเป็นกลไกในการติดเชื้อในเซลล์ดังกล่าว (17)

โดยปกติแล้ว เชื้อไวรัสจะสร้างโปรตีนทั้ง 3 ชนิดเพื่อเป็น surface protein โดยเกาะอยู่ที่ผิวของไวรัส



รูปที่ 4 แสดงภาพวาดแสดงโปรตีนทั้ง 3 ชนิดที่สร้างจาก pre-S1, pre-S2 และ S gene

2. C gene

นอกจาก C gene แล้วยังมี open reading frame ที่อยู่บริเวณ 5' ของ C gene ได้แก่ pre-C ยีนที่ ทำหน้าที่ในการสร้าง hepatitis B core antigen (HBcAg) และ hepatitis B e antigen (HBeAg)

Core protein ที่สร้างขึ้นประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 183 ตัว เมื่อสร้างขึ้นจะไปทำการรวมตัวกับ DNA ของไวรัส ทำให้เกิด nucleocapsid เป็นลักษณะ icosahedral symmetric structure โดยส่วนของโปรตีนนี้จะทำหน้าที่ในการป้องกันสารพันธุกรรมจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ exogenous nuclease ที่จะย่อยสลาย DNA นอกจากนี้ยังเป็นแอนติเจนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี และมีบทบาทในการเกิดการอักเสบของตับเมื่อมีการติดเชื้อ

HBeAg เกิดจากการย่อยส่วนของ HBcAg ที่ปลายด้าน carboxyl และ amino ซึ่งโปรตีนที่ได้จะถูกหลั่งออกมาออกเซลล์ที่ติดเชื้อและสามารถตรวจพบได้ในเลือด (18) โดยไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามีบทบาทอย่างไรในกลไกการเกิดพยาธิสภาพของตับ แต่มีประโยชน์ในทางคลินิกโดยสามารถใช้ในการบ่งถึงการติดเชื้อระยะที่เชื้อไวรัสยังสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ (active viral replication marker)

3. P gene

ใช้ในการสร้างเอนไซม์ polymerase เป็น gene ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดใน genome มีส่วนที่ซ้อนทับกับ open reading frame อื่นๆ แต่อยู่คนละ reading frame กันจึงสร้างกรดอะมิโนแตกต่างกัน

เอนไซม์ polymerase ที่สร้างได้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 832 ตัว เป็นเอนไซม์ที่มีหลายหน้าที่ (multifunctional) โดยอาศัย functional domain ต่างๆ ปลายด้าน amino terminus มี domain ที่ทำหน้าที่เป็น protein primer ในการสร้าง DNA สายใหม่จาก RNA pre-genome intermediate ในขั้นตอน reverse transcription (19) และมี domain ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ DNA polymerase และ reverse transcriptase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส ตั้งแต่ขั้นตอนการสร้าง DNA สายบวกให้ครบเป็น complete strand และในขั้นตอน reverse transcription เพื่อสร้าง genome ขึ้นใหม่จาก RNA pre-genome intermediate

4. X gene

ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 154 ตัว ทำหน้าที่เป็น transcriptional trans-activator เรียกว่า X protein (HBx) ซึ่งมีความสำคัญในการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสภายในเซลล์ (20) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในขั้นตอน transcription ของ gene ต่างๆ ของเชื้อไวรัส

นอกจากนี้เชื่อว่ายังมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรคมะเร็งตับภายหลังจากที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรัง

วงชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี เข้าจับกับ receptor ของเซลล์ตับ (21) ปัจจุบันได้พบ receptor ที่ใช้ในการจับ เช่น transfer receptor, asialoglycoprotein receptor และ liver endonexin แต่กลไกการทำงานจับกันของ HBsAg กับ specific receptor ในการเข้าสู่ cell นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด เมื่อเชื้อเกาะกับ receptor ของเซลล์ตับแล้ว nucleocapsid จะเข้าสู่ cytoplasm และ viral genome จะเข้าไปใน nucleus ของเซลล์ (22)

หลังจาก viral genome เข้าสู่ nucleus จะเกิดการสร้าง genome สายบวกให้ครบเต็มสาย และจะอยู่ในรูปของ supercoiled DNA เรียกว่า covalently closely circular DNA หรือ cccDNA หลังจากนั้น genome สายลบจะถูก transcribe โดยเอนไซม์ RNA polymerase II ของเซลล์ตับให้เป็น RNA สายยาว มีขนาดประมาณ 3.4-3.5 kb เรียกว่า pregenomic RNA (pgRNA) และส่วนหนึ่งจะถูก transcript เพื่อเป็น template ในการ translate เป็น viral nucleocapsid และ precore antigen (C, pre-C), polymerase (P), envelope L ((large), M (medium), S (small)) และ transcriptional transactivating proteins (X) (21,22)

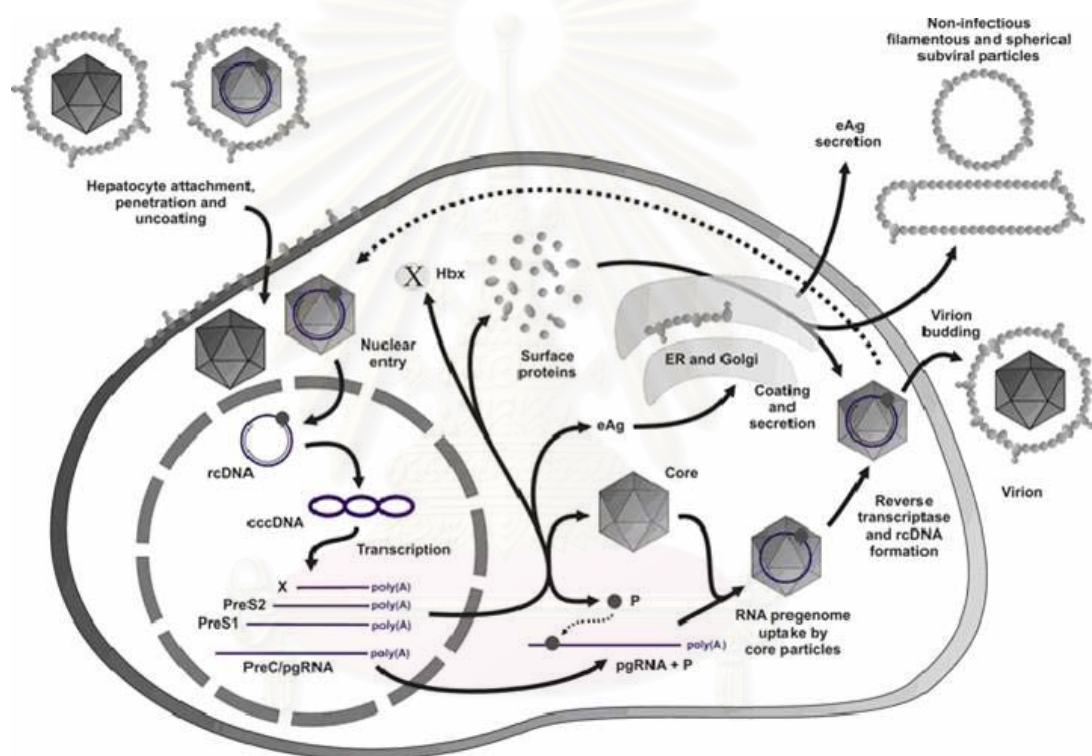
envelope protein จะทำการแทรกเข้าสู่ lipid membrane ของ endoplasmic reticulum (ER) ของเซลล์ ในลักษณะเป็น integral membrane protein

pregenomic RNA จะถูก encapsidate เข้ากับ เอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase ที่สร้างขึ้นจาก P ORF และกับ nucleocapsid (core) protein จากนั้นจะมีการสร้างสายลบที่เป็น DNA ซึ่งเป็นขั้นตอน reverse transcription ที่อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase) โดยใช้ pregenomic RNA เป็น template (21) เมื่อทำการสร้าง genome สายลบแล้ว pregenomic RNA ที่เป็น template จะถูกทำลายโดยเอนไซม์ RNaseH ที่อยู่ใน domain ของเอนไซม์ polymerase ของไวรัส ทำให้ได้ genomic DNA สายลบ และจะมีการสร้าง genomic DNA สายบวก หลังจาก

ได้ viral nucleocapsid แล้ว viral nucleocapsid จะสามารถเข้าสู่ assembly pathway หรือกลับเข้าสู่ nucleus ของเซลล์ใหม่เพื่อทำการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น

ในขั้นตอนของ assembly pathway นั้น viral nucleocapsid จะเข้าสู่ ER เพื่อทำการรวมกับ envelope protein ก่อนที่จะออกนอกเซลล์เป็นเชื้อไวรัสตัวใหม่ ส่วนของ surface protein จะผ่านกระบวนการ glycosylation ที่ golgi apparatus ก่อนที่จะออกนอกเซลล์ (21)

precore polypeptide จะ transport เข้าสู่ ER lumen หลังจากนั้นจะเกิดการตัดสายของ polypeptide ได้เป็น precore antigen (HBeAg) ทำการปล่อยออกนอกเซลล์



รูปที่ 5 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี

พยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบี สามารถทำให้เกิด cytopathic effect ต่อเซลล์ตับได้ และการทำลายเซลล์ตับสามารถเกิดได้จากการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อ จึงเกิดการอักเสบของตับและเกิดโรคตับอักเสบบี

เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำลายเซลล์ตับคือ cytotoxic T cell โดยมีแอนติเจนที่เป็นเป้าหมายหลักในการทำลายคือ ชิ้นส่วนของ HBcAg ที่ถูกนำมาเสนอร่วมกับ MHC class I บนผิว

ของเซลล์ที่ติดเชื้อ (23) โดยผ่านกระบวนการ antigen processing และ antigen presentation เมื่อ cytotoxic T cell ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนโดยอาศัย T cell receptor จะเกิดการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยกลไก direct cell killing และกลไก apoptosis หรือ programmed cell death ซึ่งอาศัยสารต่างๆ เช่น perforin, Fas ligand และ cytokine (24) นอกจากนี้ยังเกิดการทำลายโดยกลไกของ helper T cell โดยผ่าน MHC class II ได้ด้วย เช่น กลไกการทำลายโดย macrophage หรือ การหลั่งสาร cytokine เพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ และสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส

Genotype ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี สามารถแบ่งออกได้เป็น 8 genotype คือ ซึ่งเรียงตามลำดับอักษรคือ A ถึง H (25, 26, 27, 28) การจำแนกนี้อาศัยการใช้รหัสพันธุกรรมของ S gene โดยเฉพาะส่วนของ pre-S1 โดยวิธีที่แม่นยำมักต้องอาศัยการอ่านรหัสพันธุกรรม (sequencing) แล้วจึงวิเคราะห์ด้วยวิธี phylogenetic analysis

หลักการในการจำแนกนั้นอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำแนกโดยความแตกต่างมากกว่าหรือเท่ากับ 8% ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง genome ของเชื้อไวรัส หรือ ความแตกต่างมากกว่าหรือเท่ากับ 4.1% ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของทั้ง surface antigen gene ของเชื้อไวรัส (25,26)

จากการศึกษาทางด้านระบาดวิทยา พบว่าแต่ละ genotype นั้นมีการกระจายตัวแต่ละกลุ่มที่ต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก ดังนี้ (27,29)

Genotype A พบมากทางตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปยุโรป อินเดีย และ ทวีปแอฟริกา

Genotype B พบมากในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Genotype C พบมากในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย

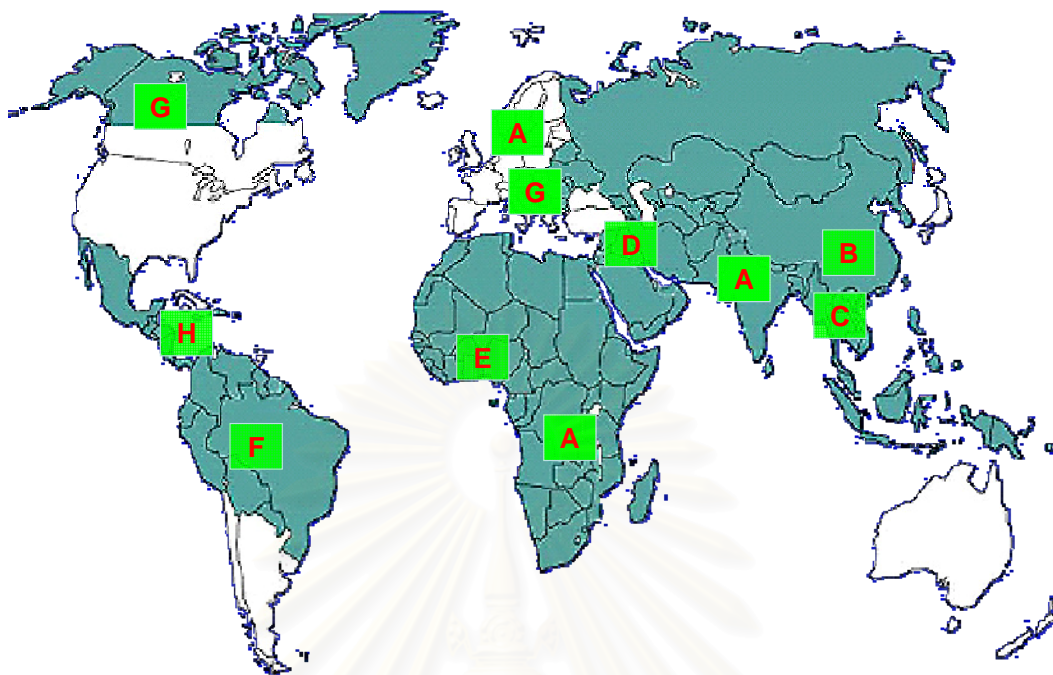
Genotype D พบได้ทั่วโลก แต่มักพบในบริเวณรอบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน

Genotype E พบได้ในทวีปแอฟริกา

Genotype F พบได้ในอเมริกากลาง และอเมริกาใต้

Genotype G พบรายงานในทวีปยุโรป และ อเมริกา

Genotype H พบในอเมริกากลาง



รูปที่ 6 แสดงการกระจายตัวของ genotype ของแต่ละกลุ่มตามแต่ละภูมิภาคของโลก

แต่ละ genotype นั้นอาจส่งผลต่อลักษณะทางคลินิก การดำเนินของโรค และการตอบสนองต่อยาต้านไวรัส จากรายงานพบตัวอย่างเช่น

- ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C จะมีอาการรุนแรง และให้ผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วย interferon ที่ต่ำกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B (30,31)
- ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C โดยมีลักษณะเป็นพาหะ มักตรวจพบ HBeAg สูงกว่า ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B (32)
- ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C จะมีอัตราการ positive ต่อ HBeAg และแสดงความเปลี่ยนแปลงในระยะแรกของ cirrhosis และ hepatocellular carcinoma มากกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B (33)
- ในอินเดีย ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype D จะมีอาการรุนแรงกว่า มีอาการเปลี่ยนเป็นมะเร็งตับได้เร็วกว่า และ ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีอายุน้อยกว่า ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype A (34)

- ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C และ genotype D มีอัตราการตอบสนองต่อการรักษาด้วย interferon- α น้อยกว่า ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype A และ genotype B (30, 35)
- ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B มีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านไวรัส lamivudine ที่ดีกว่า ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C (36)

Subtype ของไวรัสตับอักเสบบี

การตรวจทาง immunology โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแต่ละ subtype ตั้งแต่แรกในการศึกษาเกี่ยวกับ HBsAg สามารถแบ่งเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ออกได้เป็นกลุ่มโดยขึ้นกับ antigenic determinant ใน HBsAg ซึ่งจะอยู่บน major surface protein

Antigenic determinant ที่สำคัญ และเป็น group-specific determinant พบในเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทุกสายพันธุ์แยกตาม serotype เรียกว่า “a” determinant เป็นโปรตีนสร้างจาก codon ลำดับที่ 124-147 ของ major surface protein เป็นส่วนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดีมาก และพบการตอบสนองหลังจากการติดเชื้อตามธรรมชาติหลังจากได้รับวัคซีน (16, 37)

การจำแนกแยกออกไปเป็นไปตาม subtype determinant ทาง serology สามารถแบ่งออกได้เป็น d หรือ y determinant และ w หรือ r determinant ซึ่งเมื่อนำมาประกอบกันแล้วจะสามารถแยกออกได้เป็น subtype หลักๆ ได้ คือ adr, adw, ayr และ ayw และอาจสามารถแบ่งแยกย่อยของ subtype ต่างๆ ได้ เช่น ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4q-, adrq+, และ adrq- (38)

การกำหนดว่าเชื้อไวรัสแต่ละสายพันธุ์มี determinant เป็นชนิด d หรือ y ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 122 ว่าเป็นชนิด lysine (ลำดับนิวคลีโอไทด์ AAA หรือ AAG) จะเป็น d หรือ arginine (ลำดับนิวคลีโอไทด์ AGA หรือ AGG) จะเป็น y ส่วน determinant w หรือ r นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 160 ว่าเป็นชนิด lysine จะเป็น w หรือ arginine จะเป็น r

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะและตำแหน่งที่ใช้ในการจำแนก subtype ของไวรัสตับอักเสบบี

ตำแหน่ง	กรดอะมิโน	Subtype determinant
122	Lysine (K)	d
	Arginine (R)	y
160	Lysine (K)	w
	Arginine (R)	r

ความสัมพันธ์ระหว่าง subtype และ genotype ของไวรัสตับอักเสบบี แต่ละ subtype สามารถมีได้มากกว่าหนึ่ง genotype และมีลักษณะการกระจายตัวที่แตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก

ตารางที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง subtype และ genotype ของไวรัสตับอักเสบบี และการกระจายตัว (39)

Genotype	Subtype	การกระจายตัวในแต่ละภูมิภาค
A	adw2, ayw1	ยุโรป, อเมริกา, แอฟริกากลาง, อินเดีย
B	adw2	อินโดนีเซีย, จีน
	ayw1	เวียดนาม
C	adw2	เอเชียตะวันออก
	adrq+	เกาหลี, จีน, เวียดนาม, ไต้หวัน
	Adrq-, ayr, adr	Polynesia, เกาหลี, จีน, ญี่ปุ่น, ออสเตรเลีย, อเมริกา, เวียดนาม
D	ayw2, ayw3	บริเวณเมดิเตอร์เรเนียน
	ayw4	อินเดีย, รัสเซีย, อเมริกา
E	ayw4	แอฟริกาตะวันตก
F	adw4q-	Polynesia
	adw2, ayw4	อเมริกาใต้ และ อเมริกากลาง, ยุโรป
G	adw2	ยุโรป, อเมริกา
H	adw4	อเมริกาใต้ และ อเมริกากลาง

วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี

ในสมัยก่อนได้มีการพัฒนาวัคซีน โดยเตรียมจากเลือดของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยการนำมาแยกเอา HBsAg แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ หลังจากนั้นผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีเพื่อทำลายคุณสมบัติในการติดเชื้อของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และเชื้อไวรัสอื่นที่อาจปนเปื้อนมากับเลือด เรียกว่า plasma derived vaccine (40)

ปัจจุบันวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี เป็นชนิด recombinant DNA vaccine โดยการนำยีนที่ควบคุมการสร้าง HBsAg ใส่เข้าไปในพาหะชนิด expression vector แล้วใส่เข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน (host) เพื่อให้เซลล์เจ้าบ้านนั้นสร้าง HBsAg เซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ อาจเป็นยีสต์หรือ mammalian cell เช่น Chinese hamster ovarian (CHO cell) ก็ได้ แต่ปัจจุบันนิยมใช้ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) มากกว่า เมื่อ HBsAg ถูกสร้างออกมาทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปผลิตเป็นวัคซีนต่อไป (41, 42)

หลักในการให้วัคซีนนั้น จะให้เบื้องต้น 2-3 เข็มโดยห่างกันครั้งละ 1-2 เดือน และฉีดกระตุ้นอีกใน 6-12 เดือนต่อมา ขึ้นกับภาวะของผู้รับวัคซีนก่อนหรือหลังสัมผัสโรค ในกรณีให้วัคซีนก่อนสัมผัสเชื้อ (pre-exposure) ให้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อเดือนที่ 0, 1 หรือ 2 และ 6 เดือน และในกรณีให้วัคซีนหลังสัมผัสเชื้อ (post-exposure) ซึ่งต้องการให้เกิดภูมิคุ้มกันขึ้นเร็ว จะให้เบื้องต้น 3 เข็มห่างกันทุก 1 เดือน (ในเดือนที่ 0, 1, 2) และฉีดกระตุ้นในเดือนที่ 12

เนื่องจากประสิทธิภาพที่ดี และวัคซีนมีความปลอดภัยสูง ประเทศต่างๆจำนวนมาก โดยเฉพาะในเขตที่มีการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จึงให้ฉีดวัคซีนในเด็กแรกเกิดทุกราย ซึ่งได้ผลที่ดีเป็นอย่างมาก (43) ประเทศไทยได้ให้วัคซีนในเด็กแรกเกิดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 โดยบรรจุใน Expanded Program on Immunization (EPI) ซึ่งทำให้อัตราการตรวจพบ HBsAg ในเด็กลดลงมาก ในเด็กที่เกิดหลัง EPI มีอัตราการเป็นพาหะน้อยกว่าร้อยละ 1 ถึงแม้ว่าวัคซีนที่ให้จะเป็นชนิด ay ซึ่งผลิตตาม subtype ของต่างประเทศ แต่ก็สามารถป้องกันการติดเชื้อชนิด ad ที่พบในประเทศไทยได้ไม่แตกต่างกัน

Escape mutant

หลังจากที่ได้มีการใช้วัคซีนกันอย่างแพร่หลาย ได้มีการศึกษาผลของการใช้วัคซีนพบว่า มีผู้ที่ได้รับวัคซีนแต่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อได้มีการศึกษาต่อจึงพบว่ามี การกลายพันธุ์ หรือ mutation ที่บริเวณ S gene เนื่องจาก HBsAg เป็นแอนติเจนที่สำคัญมากของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และภูมิคุ้มกันต่อ HBsAg เป็น protective antibody ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ การเกิดการ mutation ในบริเวณนี้อาจทำให้เชื้อสามารถหลีกเลี่ยงการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน และอาจจะทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ที่เคยได้รับวัคซีนและ เรียกว่า escape mutant (44)

จากการศึกษาในผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เมื่อทำการอ่านรหัสพันธุกรรม (sequencing) ในส่วนของ HBsAg ของเชื้อดังกล่าว พบว่ามี mutation เกิดขึ้นในตำแหน่ง codon ที่ 145 โดยมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glycine (G) ไปเป็น arginine (R) เรียกว่า G145R และมีผลต่อ "a" determinant ซึ่งเป็น common epitope และเป็น protective epitope ของเชื้อ (45) นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในประชากรที่ได้รับวัคซีน อีกหลายตำแหน่งในส่วนของ "a" determinant นี้

ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของไวรัสที่กลายพันธุ์ ที่บริเวณ HBsAg ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ escape mutant

ตำแหน่งของกรดอะมิโน	สายพันธุ์เดิม	กลายพันธุ์
126	Thr (T)	Asn (N)
141	Lys (K)	Glu (E)
144	Asp (D)	Ala (A)
145	Gly (G)	Arg (R)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาต่อมาพบว่า escape mutant ใน S gene ยังพบได้ไม่บ่อยมากนัก และยังไม่เกิดปัญหาทางการแพทย์และสาธารณสุข รวมทั้งยังไม่เกิดการแพร่กระจายไปทั่วโลกอย่างที่หวาดกลัวกัน แต่ยังคงต้องมีการเฝ้าระวังกันต่อไป (46)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, Descriptive research) โดย การวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

ประชากรศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างจากประชากรชาวไทยในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาค กลาง และภาคใต้ ซึ่งทำการคัดเลือกจังหวัดในแต่ละภาคมาภาคละ 1 จังหวัด โดยใช้วิธีเลือกแบบ จำเพาะเจาะจง ได้แก่ จังหวัดเชียงราย อุตรดิตถ์ ชลบุรี และนครศรีธรรมราช แต่ละจังหวัดทำการ คัดเลือกโรงพยาบาลจำนวน 3 โรงพยาบาล ประกอบไปด้วย โรงพยาบาลจังหวัด (หรือโรงพยาบาล ศูนย์) 1 แห่ง และโรงพยาบาลชุมชน 2 แห่ง โดยการคัดเลือกไม่กระจุกอยู่ในส่วนใดส่วนหนึ่งของ จังหวัดนั้น ประชากรที่นำมาศึกษามีคุณสมบัติดังนี้

- เป็นประชาชนชาวไทย
 - มีภูมิลำเนาในจังหวัดที่เลือก
 - มีอายุระหว่าง 6 เดือนถึง 60 ปี
 - ไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคเอดส์ในระยะที่มี อาการของโรคชัดเจน ที่มีการทราบมาก่อนแล้ว หรือมีอาการชัดเจน โรคมะเร็งในเลือด โรคมะเร็ง ในต่อมน้ำเหลือง SLE
 - ไม่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเกินกว่า 1 เดือน ภายใน 1 ปีที่ผ่านมา (นับจากปัจจุบัน) เช่น steroids, immunosuppressive drugs, chemotherapy เป็นต้น
 - ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยเรื้อรัง ไม่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลเกินกว่า 1 เดือน ภายใน 1 ปีที่ผ่านมา (นับจากปัจจุบัน)
 - ไม่เป็นผู้ที่มีโรคประจำตัวหรือโรคเรื้อรัง รวมทั้งโรคที่เป็นอันตรายจากการเจาะเลือด ทั้งทางร่างกายและจิตใจ เช่น Hemophilia โรคหัวใจ โรคจิต เป็นต้น
- จำนวนตัวอย่างทั้งหมด
- จังหวัดเชียงราย รวมจำนวน 1,581 ตัวอย่าง
 - จังหวัดนครศรีธรรมราช รวมจำนวน 1,494 ตัวอย่าง

- จังหวัดอุดรธานี รวมจำนวน 1,727 ตัวอย่าง
 - จังหวัดชลบุรี รวมจำนวน 1,437 ตัวอย่าง
- รวมทั้งสิ้น 6,239 ตัวอย่าง

หลังจากทำการเก็บตัวอย่าง ได้มีการรวบรวมข้อมูลการวิจัย โดย การทำแบบสัมภาษณ์ ซึ่งประกอบไปด้วยข้อคำถามเกี่ยวกับประวัติการได้รับวัคซีนในอดีต ประวัติการเจ็บป่วยของผู้ป่วย และบุคคลในครอบครัว และข้อมูลพื้นฐาน อันประกอบด้วย ชื่อ-สกุล วัน เดือน ปี เกิด เพศ จำนวนพี่น้อง ที่อยู่ อาชีพตนเอง บิดา มารดา จากนั้นทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ใช้ซีรัมตัวอย่างของอาสาสมัครตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบบี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการตรวจด้วยวิธี ELISA เพื่อทำการหา แอนติบอดีไวรัสตับอักเสบบี บี และ ซี และแอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ แอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี บี จำนวนทั้งสิ้น

- จังหวัดเชียงราย จำนวน 107 ตัวอย่าง
- จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 34 ตัวอย่าง
- จังหวัดอุดรธานี จำนวน 70 ตัวอย่าง
- จังหวัดชลบุรี จำนวน 35 ตัวอย่าง

รวมจำนวน 246 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ แอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี บี มาทำการศึกษา โดยตัวอย่าง ซีรัม ที่เหลือจะทำการเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

- 1.1 Pipette tip : 10 μ l, 200 μ l และ 1,000 μ l (Elkay, Ireland)
- 1.2 Microcentrifuge tube : 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)
- 1.3 Polypropylene conical tube : 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- 1.4 Beaker : 50 ml, 1000 ml, 200 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA.)
- 1.5 Flask : 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA.)
- 1.6 Reagent bottle : 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.7 Pipette rack (Eppendorf, Germany)
- 1.8 Thermometer (Precision, Germany)
- 1.9 Parafilm (American National Can, USA)

- 1.10 Plastic wrap
- 1.11 Stirring-magnetic bar
- 1.12 Sequence ABI 310 kit (Perkin-Elmer, USA.)
- 1.13 Combs (Bio-RAD, Hercules, California, USA.)
- 1.14 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

2. อุปกรณ์

- 2.1 Automatic adjustable micropipette : P2 (0.1-2 μ l), P10 (0.5-10 μ l), P20 (5-20 μ l), P100 (20-100 μ l), P1000 (100-1,000 μ l) (Eppendorf, Germany)
- 2.2 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.3 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- 2.5 Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
- 2.6 Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)
- 2.7 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- 2.8 Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany)
- 2.9 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.10 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.11 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.12 Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)
- 2.13 Thermal paper (Bio-RAD, USA)
- 2.14 Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)
- 2.15 Freezer -20°C (Sanyo, Japan)
- 2.16 Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)
- 2.17 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)
- 2.18 ABIPRISM™ 310 Genetic (Perkin-Elmer, USA)
- 2.19 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
- 2.20 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป
 - 1.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)
 - 1.2 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)
 - 1.3 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
 - 1.4 Sucrose (USB, Hong Kong)
 - 1.5 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)
2. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (DNA extraction)
 - 2.1 Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)
 - 2.2 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)
 - 2.3 Disodium ethylenediamine tetracetic acid : EDTA (USB, Hong Kong)
 - 2.4 Tris base (USB, Hong Kong)
 - 2.5 Boric acid (USB, Hong Kong)
 - 2.6 Sodium acetate (Sigma, Singapore)
 - 2.7 Proteinase K (USB, Hong Kong)
 - 2.8 Phenol (Pierce, USA)
 - 2.9 Chloroform (Sigma, Singapore)
3. สารเคมีสำหรับการทำ PCR
 - 3.1 Eppendorf MasterMix (2.5x)(Hamburg, Germany)
4. สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์
 - 4.1 Perfect Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg, Germany)
 - 4.2 Isopropanol (Sigma, Singapore)
5. สารเคมีสำหรับการทำ DNA sequencing
 - 5.1 BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing RR-100 (Applied Biosystems (ABI), USA)
 - 5.2 BigDye terminator v.3.1 cycle 5x buffer (ABI, USA)
 - 5.3 Template suspension reagent : TSR (ABI, USA)

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. Control

1.1 Positive control

ได้ตัวอย่างจาก ผู้บริจาคโลหิตที่สภากาชาดไทย และตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี PCR

1.2 Negative control

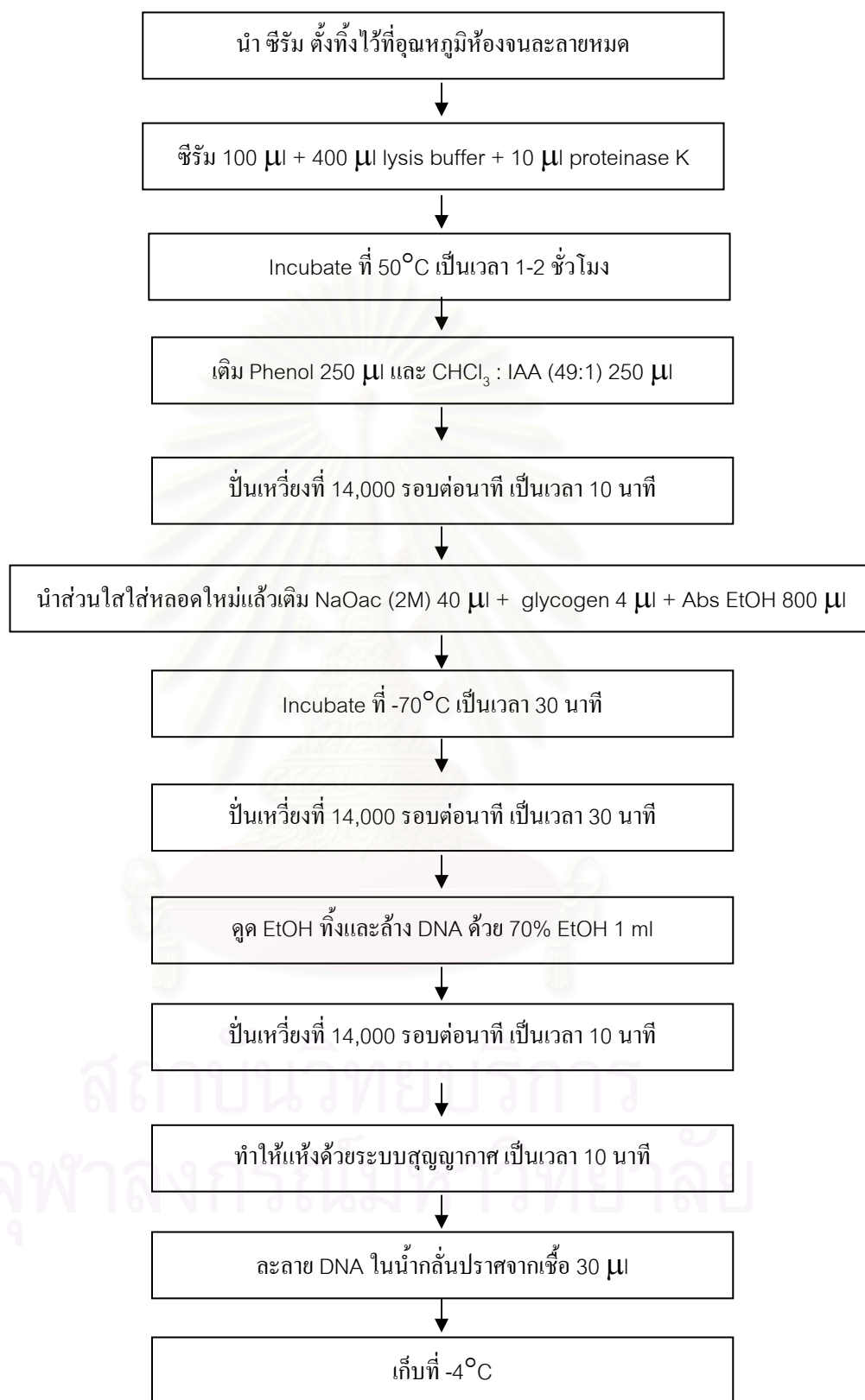
เนื่องจาก HBV เป็น DNA ไวรัส เพราะฉะนั้น Negative control ในการศึกษาครั้งนี้ คือ น้ำ ที่ปราศจากเอนไซม์ย่อย DNA (DNase) คือ Distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ใช้ ซีรัม ปริมาณ 100 μ l ในการสกัด DNA ด้วยวิธี phenol/chloroform ดังแสดงในรูปที่ 7



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการสกัด DNA

3. เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant โดยวิธี PCR ใช้ primer ที่ ครอบคลุมบริเวณของ Pre-S1 และ “a” determinant (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงรายละเอียดของ primer ที่ใช้

Primers	ลำดับเบส	ตำแหน่ง	T _m (°C)
Pre-S1 F (forward primer)	5' TCACCATATTCTTGGGAACAAGA 3'	2,817-2,839*	64
R4 (reverse primer)	5' ATGGCACTAGTAAACTGAGCC 3'	689-668*	62

*เปรียบเทียบกับตำแหน่งบนลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ HBV accession number AB115417

ทำการเตรียมส่วนผสมของสารเรียงตามลำดับลงใน microtube ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant

สารละลาย	ปริมาตร (volume/tube)
Distilled water	12 μ
Eppendorf MasterMix (Hamburg, Germany)	10 μ
Pre-S1 F primer (10 pmol)	0.5 μ
R4 primer (10 pmol)	0.5 μ
DNA Template	2 μ
Total volume	25 μ

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังตารางที่ 5 ทั้งหมดใส่ในเครื่อง Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany) โดยมีอุณหภูมิและเวลาดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant

PCR Cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Pre-denaturation	94	1 นาที
	55	1 นาที
	72	1 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
	55	30 วินาที
	72	1 นาที 30 วินาที
	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ
Post extension	72	7 นาที

ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR โดยการนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดผสมกับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมของ 2% agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ marker 100 bp เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ นำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำมาเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (Gel Doc) ขนาดของผลผลิตคือ 1,088 bp

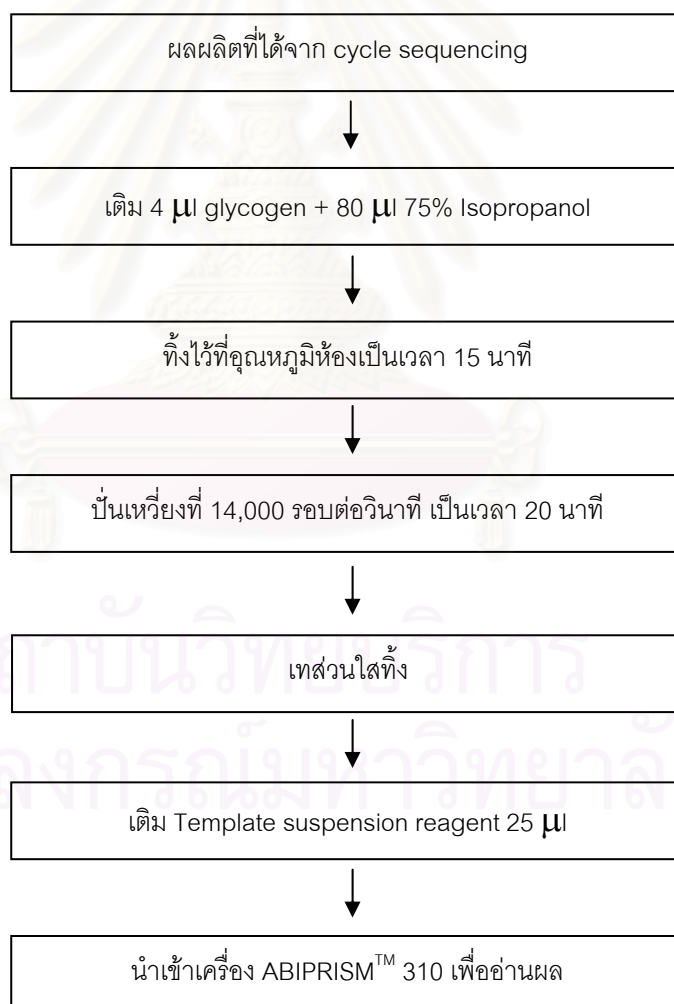
4. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยการตัด gel ในส่วนแถบ DNA ที่ต้องการจาก gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Perfect Gel Cleanup kit แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตที่ได้ 5 μ l ทำการตรวจด้วย gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่งว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการหรือไม่และเพื่อตรวจสอบว่าไม่มี DNA อื่นเจือปน หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาทำ cycle sequencing การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะใช้ primer Pre-S1 F เพื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Pre-S1 และใช้ primer R4 เพื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ “a” determinant โดยผสมสารที่ใช้ทำ cycle sequencing ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing

สารละลาย	ปริมาณ (μ l)
Distilled water	5.33
5X buffer	2
BigDye RR-100	4
Primer (Pre-S1 F หรือ R4)	0.67
ผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	8
Total volume	20

หลังจากผ่านการทำ cycle sequencing แล้ว นำผลผลิตที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการตกตะกอนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABIPRISM™ ดังนี้



รูปที่ 8 แสดงขั้นตอนการตกตะกอนที่ได้จากการเข้า cycle sequencing

ทำการอ่านผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เปรียบเทียบผลการทำ PCR กับ ผลการทำ ELISA โดยแสดงผลเป็นร้อยละ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ ไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของ Pre-S1 และ “a” determinant เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward primer หรือ reverse primer เรียบร้อยแล้ว ทำการวิเคราะห์โดย

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Pre-S1 :

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนก genotype โดยการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี แต่ละ genotype ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ โปรแกรม Genotyping tool
- ทำการเปรียบเทียบความเหมือน หรือ ความต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ด้วยวิธี cluster analysisโดยใช้โปรแกรม Clustal X Ver3ion 1.83 และ Bioedit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- สร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 และ MEGA3.1 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี แต่ละ genotype ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- วิเคราะห์คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน (genetic distance) ระหว่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ของต่างประเทศที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม เพื่อหาความสัมพันธ์ โดยใช้ โปรแกรม MEGA3.1

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ “a” determinant :

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนก subtype โดยการ แปลงรหัสพันธุกรรมในส่วนของ “a” determinant ให้เป็น กรดอะมิโน จากนั้นดูลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่ง 122 และ ตำแหน่ง 160 ว่าเป็น subtype ไດ ดังตารางที่ 1
- เปรียบเทียบผลจากการทำ genotype และ subtype
- เปรียบเทียบกับข้อมูลการให้วัคซีน ว่ามีผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่ยังไม่พบการติดเชื้อหรือไม่ และตรวจสอบดูในส่วนของ “a” determinant ว่ามีการกลายพันธุ์ escape mutant หรือไม่ในตำแหน่ง ดังตารางที่ 3

6. เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ program Sequin version 6.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin>) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

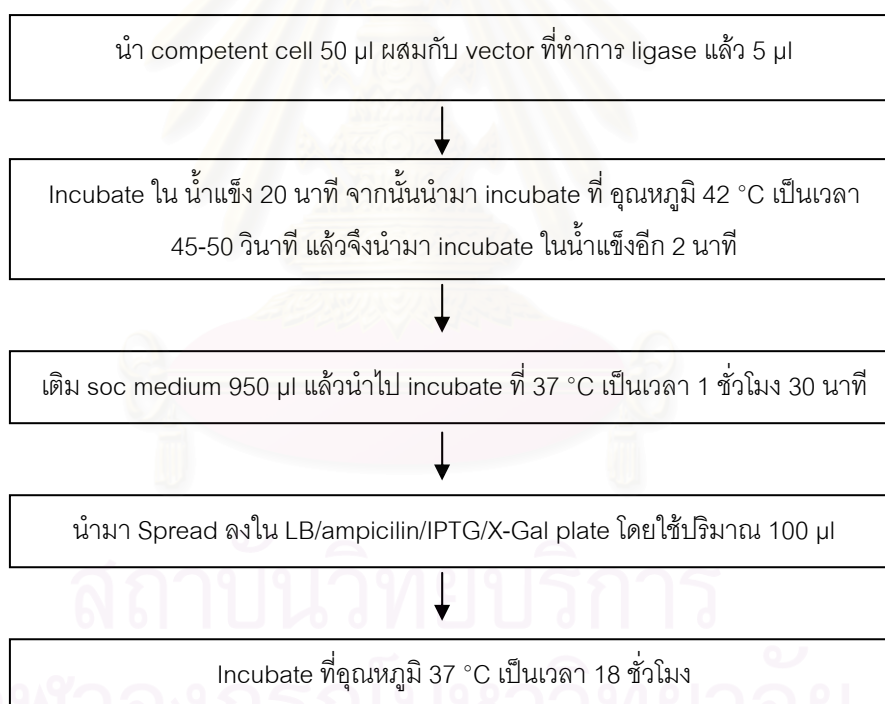
7. การแยกเชื้อทั้ง 2 ชนิดออกจากกันโดยการ cloning

จากการอ่านข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ หากพบลักษณะการซ้อนทับกันของรูป chromatogram ซึ่งอาจเกิดจากการการมีเชื้อ 2 ชนิดอยู่ในตัวอย่างเดียวกัน จึงทำการทดสอบโดยการ Clone เพื่อทำการแยกเชื้อ 2 ชนิดออกจากกัน โดยผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยการตัด gel ในส่วนแถบ DNA ที่ต้องการ ที่ได้จากการทำ gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Perfect Gel Cleanup แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตที่ได้ 5 μ l ทำการตรวจด้วย Gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่งว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการหรือไม่และเพื่อตรวจสอบว่าไม่มี DNA อื่นเจือปน นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ มาทำการเชื่อมต่อกับ vector โดยใช้ pGEM[®]-T Easy Vector System I (Promega) โดยผสมสารดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับ vector โดยใช้ pGEM[®]-T Easy Vector System I

สารละลาย	ปริมาณ (μl)
pGEM [®] -T Easy Vector	1
T4 DNA Ligase	1
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5
ผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	3
รวม	10

นำส่วนผสมที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ที่ 4°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการ transform เข้าสู่ competent cell (*E.coli* strain DH5- α) และทำการคัดเลือก clone ดังนี้



รูปที่ 9 แสดงการ transform เข้าสู่ competent cell โดยใช้ pGEM[®]-T Easy Vector System I

หลังจาก incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะพบ colony สีขาว และ สีฟ้า เชียเลือก colony สีขาวขึ้นมา ใส่ใน LB broth/ampicilin จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สกัด plasmid ที่ได้ใน LB broth/ampicilin โดยใช้ FastPlasmid Mini จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธี PCR แล้วจึงนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างซีรัมจากประชากรชาวไทย อายุระหว่าง 1-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ในจังหวัด เชียงราย อุดรธานี ชลบุรี และนครศรีธรรมราช ได้จำนวนทั้งหมด 6,239 คน จากนั้นได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างซีรัมจากผู้ให้ผลบวกต่อแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี ELISA จำนวนทั้งหมด 246 คน แต่เนื่องจากผลการตรวจด้วย ELISA จากห้องปฏิบัติการพบว่า จำเป็นต้องมีการตรวจซ้ำ จึงเป็นเหตุให้ปริมาณซีรัมตัวอย่าง บางตัวอย่างไม่มีซีรัมในการตรวจเพียงพอ จึงทำการคัดเลือก ซีรัมตัวอย่างที่สามารถนำมาทำการศึกษา ทั้งหมด 201 คน ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

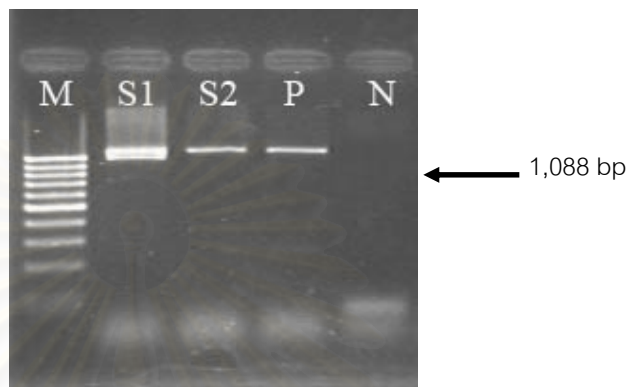
จังหวัด	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อELISA	จำนวนที่ใช้ในการศึกษา
เชียงราย	1,581	107	93
นครศรีธรรมราช	1,494	34	25
อุดรธานี	1,727	70	59
ชลบุรี	1,437	35	24
รวม	6,239	246	201

จากตาราง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้มีจำนวน 201 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างได้ทำการใส่ Code ด้วย รหัสจังหวัด ตามด้วย รหัสตัวอย่าง ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant

จากการทำ PCR จาก HBV DNA ในส่วน ของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant ด้วย primer PreS1F และ R4 จะได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 1,088 bp ตามรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ “a” determinant ด้วย primer PreS1F และ R4 ได้ผลผลิตขนาด 1,088 bp โดย M คือ 100 bp marker, S1 คือ ตัวอย่างที่ 1, S2 คือ ตัวอย่างที่ 2, P คือ positive control และ N คือ negative control

จากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR จาก ซีรัม ตัวอย่างทั้งหมด ได้ผลบวกทั้งหมด 147 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 73.13%

ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจสอบซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี PCR

จังหวัด	จำนวนที่ใช้ในการศึกษา	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ PCR	คิดเป็นร้อยละ (%)
เชียงใหม่	93	62	66.67
นครศรีธรรมราช	25	20	80.00
อุดรธานี	59	46	77.97
ชลบุรี	24	19	79.17
รวม	201	147	73.13

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Pre-S1

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Pre-S1 โดยได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย primer Pre-S1 F เมื่อนำไป ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่ามีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ทุกตัวอย่าง

ผลการตรวจสอบ genotype โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Genotyping tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) พบว่าสามารถแยก genotype ของเชื้อตัวอย่างได้เป็น Genotype C, B และ A

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 22212851 gb AF529308.1 Hepatitis B virus isolate H1 surface	1473	0.0
gi 21218023 dbj AB074839.1 Hepatitis B virus gene for large ...	1449	0.0
gi 21218025 dbj AB074840.1 Hepatitis B virus gene for large ...	1441	0.0
gi 22212853 gb AF529309.1 Hepatitis B virus isolate H2 surface	1425	0.0
gi 50540997 gb AY665572.1 Hepatitis B virus isolate B13 pre-S/S	1370	0.0
gi 50540995 gb AY665571.1 Hepatitis B virus isolate B12 pre-S/S	1360	0.0
gi 50540993 gb AY665570.1 Hepatitis B virus isolate B10 pre-S/S	1330	0.0
gi 15340845 gb AY040804.1 Hepatitis B virus L966-B1 HBsAg gene,	1330	0.0
gi 15340843 gb AY040803.1 Hepatitis B virus L966-A7 HBsAg gene,	1330	0.0
gi 15340841 gb AY040802.1 Hepatitis B virus L966-A4 HBsAg gene,	1330	0.0
gi 11041687 dbj AB042247.1 Hepatitis B virus s gene for larg...	1330	0.0
gi 11041681 dbj AB042245.1 Hepatitis B virus s gene for larg...	1330	0.0

รูปที่ 11 ตัวอย่างผลจากการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปจะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Hepatitis B virus ในส่วนของ surface antigen gene

```

> gi|22212851|gb|AF529308.1 Hepatitis B virus isolate H1 surface protein gene, complete cds
Length=1203

Score = 1473 bits (743), Expect = 0.0
Identities = 779/791 (98%), Gaps = 0/791 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 20 AACCTCGACAAGGCATGGGGACGAACCTTTCTGTGCCCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCG 79
      |||
Sbjct 20 AACCTCGACAAGGCATGGGGACGAACCTTTCTGTGCCCAATCCTCTGGGATTCTTTCCCA 79

Query 80 GTCACCAGTTGGACCCAGCGTTCCGGAGCCAATTCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACC 139
      |||
Sbjct 80 GTCACCAGTTGGACCCAGCGTTCCGGAGCCAATTCAAACAATCCAGATTGGGACTTCAACC 139

Query 140 CCAACAAGGATCAATGGCCAGCGCAAAACCAGGTAGGAGTGGGATCATTGGGCCAGGGT 199
      |||
Sbjct 140 CCAACAAGGATCAATGGCCAGCGCAAAATCAGGTAGGAGTGGGATCATTGGGCCAGGGT 199

Query 200 TCACTCCACCCACGGCAATCTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATATTGACAA 259
      |||
Sbjct 200 TCACTCCACCCACGGCAGTCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAGGCTCAGGGCATATTGACAA 259

Query 260 CAGTGCCAGCAGCGCCTCCTCCTGCCCTCCACCAATCGGCAGTCAGGAAGACAGCCTACTC 319
      |||
Sbjct 260 CAGTGCCAGCAGCGCCTCCTCCTGCCCTCCACCAATCGGAAGTCAGGAAGACAGCCTACTC 319

Query 320 CCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAACTCCAGCACAT 379
      |||
Sbjct 320 CCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATGCAGTGGAACTCCAGCACAT 379

Query 380 TCCACCAAGCTCTGTAGATCCCAGAGTGAGAGGGCCTATACTTTCCCTGCTGGTGGCTCAA 439
      |||
Sbjct 380 TCCACCAAGCTCTGTAGATCCCAGAGTGAGAGGGCCTATACTTTCCCTGCTGGTGGCTCAA 439

Query 440 GTTCCGGAAACAGTAAACCCCTGTTCCGACCCTGCCTCTCCCATATCGTCAATCTTCTCGA 499
      |||
Sbjct 440 ATTCCGGAAACAGTAAACCCCTGTTCCGACTACTGCCTCTCCCATATCGTCAATCTTCTCGA 499

Query 500 GGACTGGGGACCCCTGCACCGAATATGGAGAGCACCACATCAGGATTCTAGGACCCCTGC 559
      |||
Sbjct 500 GGACTGGGGACCCCTGCACCGAATATGGAGAGCACCACATCAGGATTCTAGGACCCCTGC 559

Query 560 TCGTGTTACAGGGGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGCTAG 619
      |||
Sbjct 560 TCGTGTTACAGGGGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGCTAG 619

Query 620 ACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTCCTGGCCAAAATT 679
      |||
Sbjct 620 ACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTCCTGGCCAAAATT 679

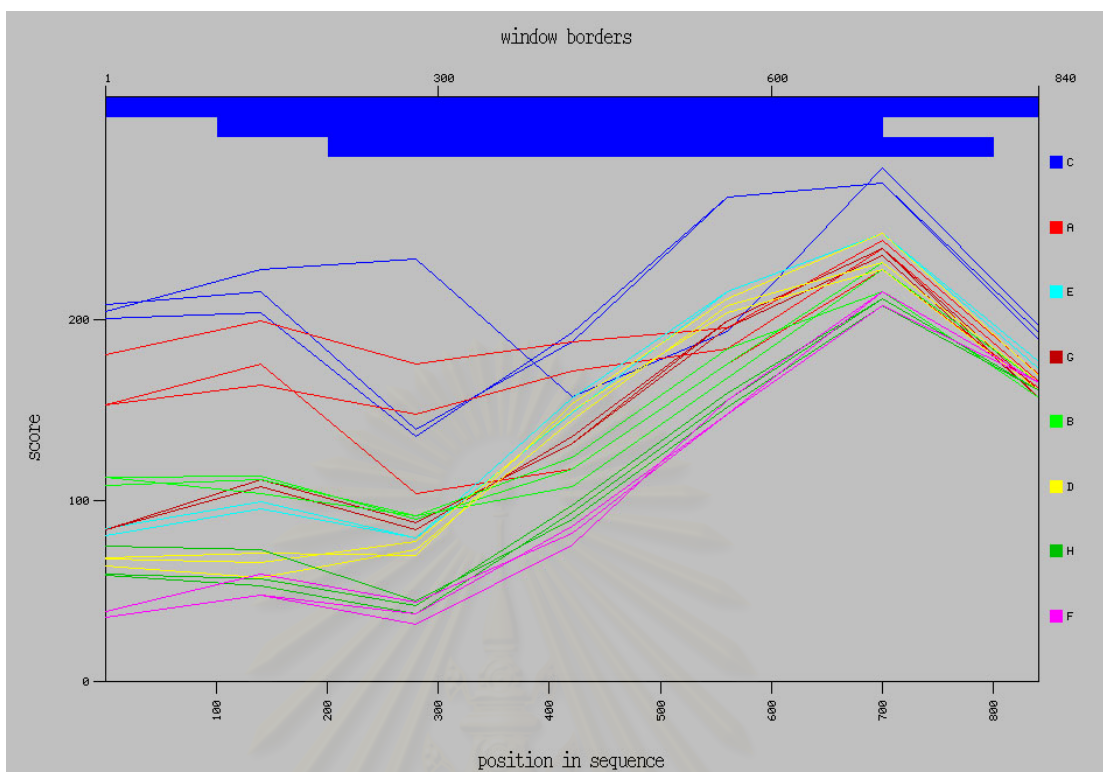
Query 680 TGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCTCCAATTTGTCTGGTTATC 739
      |||
Sbjct 680 TGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCTCCAATTTGTCTGGTTATC 739

Query 740 GCTGGATGTGTCTGCGCGTTTTATCATCTTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCT 799
      |||
Sbjct 740 GCTGGATGTGTCTGCGCGTTTTATCATCTTCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCT 799

Query 800 TCTTGATGGTT 810
      |||
Sbjct 800 TCTTGTTGGTT 810

```

รูปที่ 12 ตัวอย่างการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัส พันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปจะพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Hepatitis B virus ในส่วนของ surface antigen gene โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย



รูปที่ 13 ตัวอย่างผลการตรวจสอบ genotype โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Genotyping tool จากรูปพบว่าตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาศึกษานั้นเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) มีความเหมือนกับ genotype C มากที่สุด จึงสามารถจำแนกได้เป็น genotype C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Phylogenetic Analysis

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษามาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี phylogenetic analysis แล้วเราจะสามารถจัดกลุ่มได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษานั้นอยู่ใน genotype ใด โดยทำการเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบ genotype ซึ่งมีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบ genotype ซึ่งมีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่

Genotype A: X70185, V00866, Z35717

Genotype B: D23677, D23678, D23679

Genotype C: X75665, M38636, V00867

Genotype D: X72702, X65257, AF043593

Genotype E: X75657, X75664

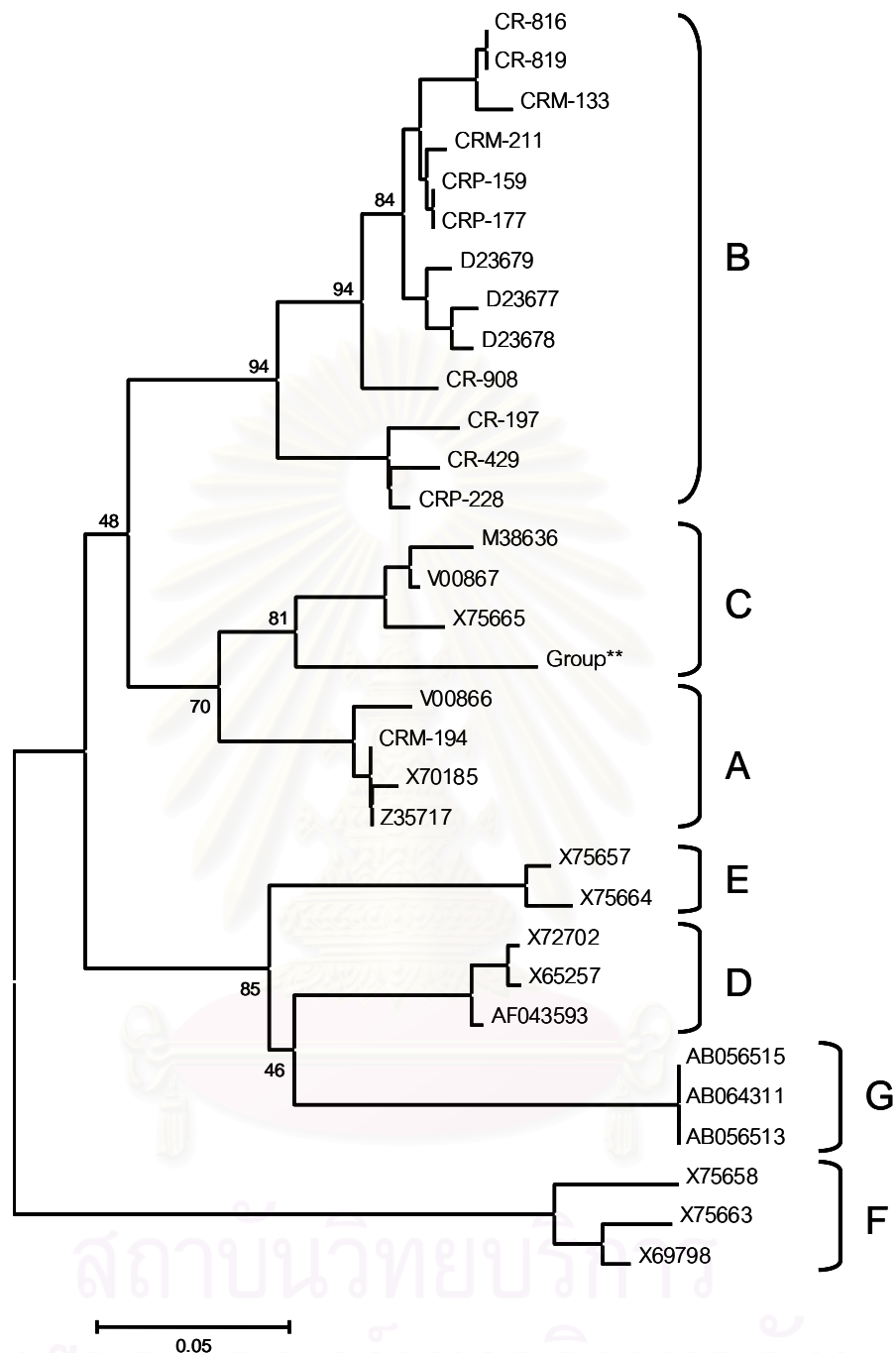
Genotype F: X75658, X75663, X69798

Genotype G: AB064311, AB056513, AB056515

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบ genotype ซึ่งมีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ด้วยวิธี Cluster analysis โดยโปรแกรม ClustalX version 1.83 วิธี Multiple Alingment จากนั้นนำผลที่ได้มาทำ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 โดยวิธี Neighbor-Joining Method และใช้แบบจำลองเป็น Kimura 2-parameter

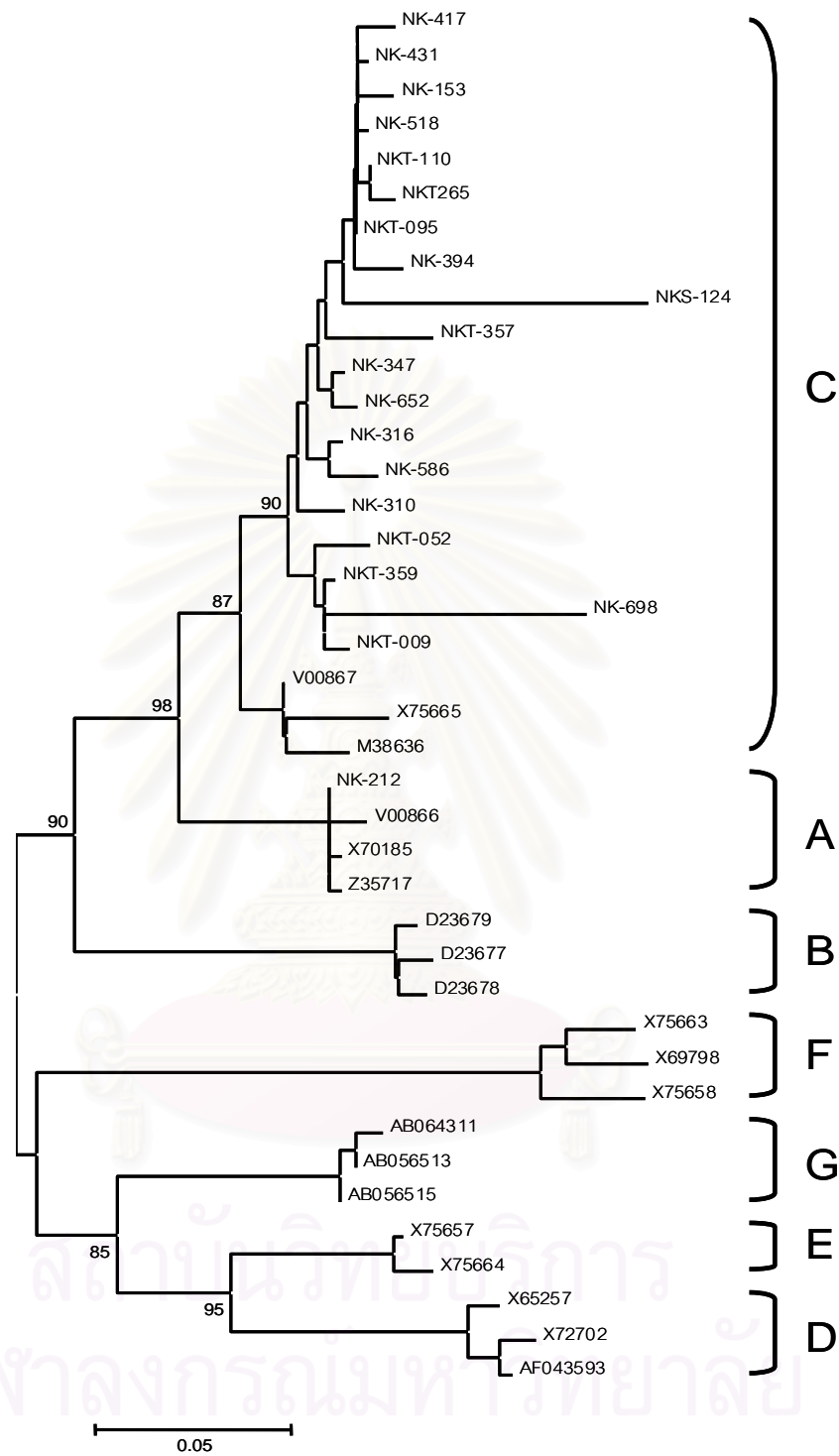
จากการศึกษาได้ทำ phylogenetic analysis ทั้ง 4 จังหวัด และรวมทั้งหมดดังรูปที่ 14-18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

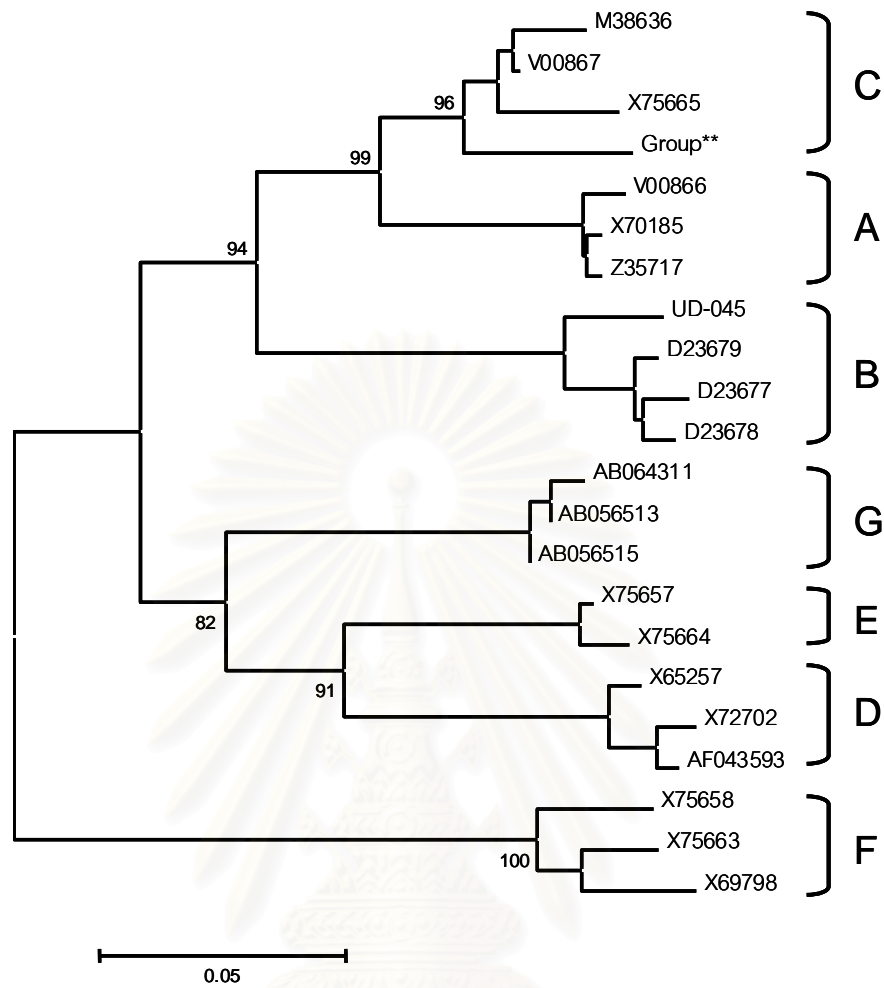


รูปที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด เชียงราย จากกลุ่ม ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype A, B, C

**Group = CR-081, CR-082, CR-174, CR-194, CR-219, CR-239, CR-244, CR-260, CR264, CR-285, CR-307, CR-353, CR-354, CR-380, CR-393, CR-408, CR-441, CR-470, CR-476, CR-485, CR-538, CR-550, CR-551, CR-559, CR-589, CR-753, CR-777, CR-837, CR-857, CR-870, CR-871, CRM-003, CRM-014, CRM-068, CRM-097, CRM-105, CRM-123, CRM-129, CRM-148, CRM-172, CRM-205, CRM-236, CRP-010, CRP-019, CRP-020, CRP-042, CRP-063, CRP-110, CRP-194, CRP-200, CRP-316

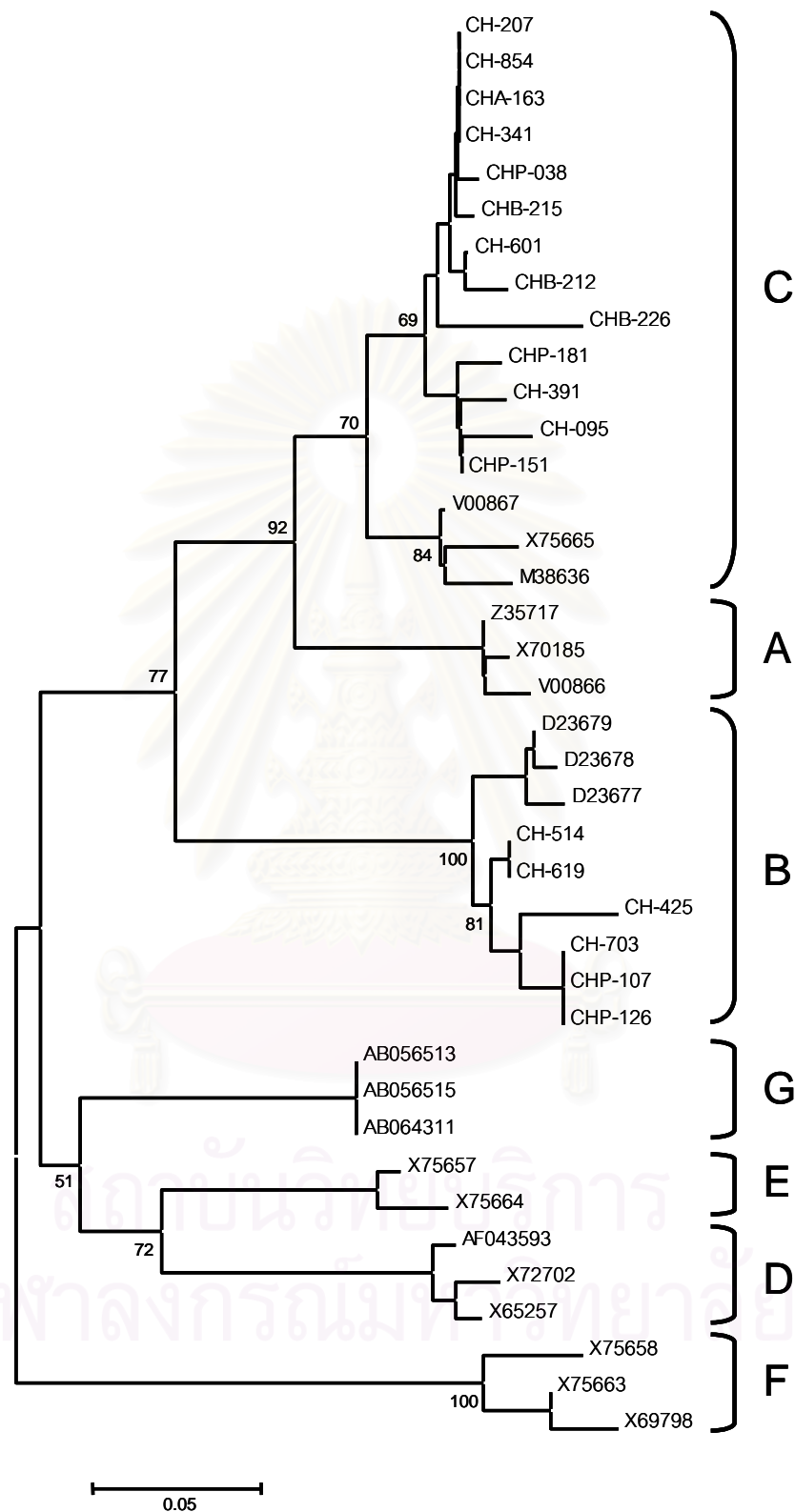


รูปที่ 15 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด นครศรีธรรมราช จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype A, C

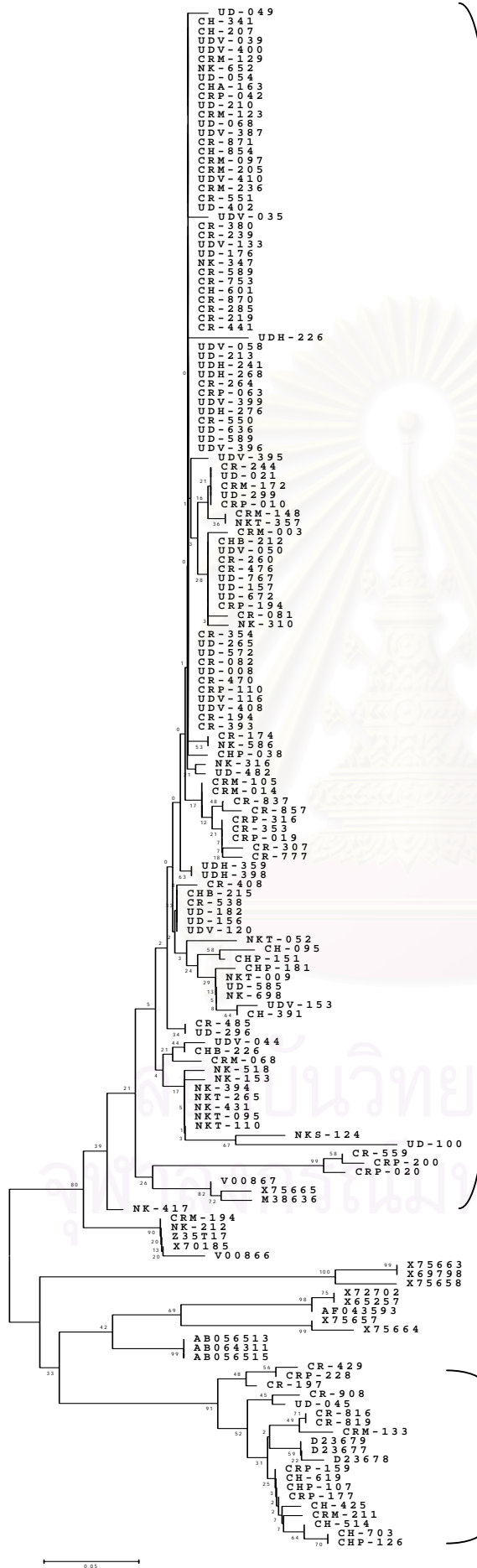


รูปที่ 16 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด อุตรดิตถ์ จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype B, C

**Group = UD-008, UD-021, UD-049, UD-054, UD-068, UD-100, UD-156, UD-157, UD-176, UD-182, UD-210, UD-213, UD-265, UD-296, UD-299, UD-402, UD-482, UD-572, UD-585, UD-589, UD-636, UD-672, UD-767, UDH-226, UDH-241, UDH-268, UDH-276, UDH-359, UDH-398, UDV-035, UDV-039, UDV-044, UDV-050, UDV-058, UDV-116, UDV-120, UDV-133, UDV-153, UDV-387, UDV-395, UDV-396, UDV-399, UDV-400, UDV-408, UDV-410



รูปที่ 17 แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของจังหวัด ชลบุรี จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype B, C



C

A
F
D
E
G

B

รูปที่ 18 แสดงการวิเคราะห์
phylogenetic ของตัวอย่างลำดับ
นิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จาก
การศึกษา

ผลการจำแนก genotype จากผลการตรวจสอบ genotype โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม Genotyping tool และการวิเคราะห์ด้วย phylogenetic analysis ทั้งหมด 4 จังหวัด สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการจำแนก genotype ของตัวอย่างทั้งหมด 4 จังหวัด

จังหวัด	Genotype (%)			รวม
	A	B	C	
เชียงใหม่	1 (1.61)	10 (16.13)	51 (82.26)	62
นครศรีธรรมราช	1 (5.00)	-	19 (95.00)	20
อุดรธานี	-	1 (2.17)	45 (97.83)	46
ชลบุรี	-	6 (31.58)	13 (68.42)	19
รวม	2 (1.36)	17 (11.56)	128 (87.08)	147

การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการศึกษานี้ได้เผยแพร่ โดยการส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ไปยังฐานข้อมูลธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาไวรัสตับอักเสบบี ต่อไป ซึ่งฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถเข้าไปค้นคว้าได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> โดยมีหมายเลขประจำลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number) ตั้งแต่หมายเลข DQ361314-DQ361535

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน

จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA3.1 โดยใช้ แบบจำลองของ Kimura 2-parameter ตารางที่ 12 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแต่ละ genotype

	%ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)			
	เชียงใหม่	นครศรีธรรมราช	อุดรธานี	ชลบุรี
Genotype C				
เชียงใหม่	3.08±0.76	-	-	-
นครศรีธรรมราช	4.46±0.83	4.29±1.33	-	-
อุดรธานี	2.61±0.45	4.20±0.83	2.06±0.53	-
ชลบุรี	3.21±0.69	4.59±0.96	2.85±0.65	2.80±1.05
Genotype B				
เชียงใหม่	4.76±1.45	-	-	-
อุดรธานี	5.30±1.29	-	-	-
ชลบุรี	4.98±1.09	-	4.80±1.57	1.92±1.09
Genotype A				
เชียงใหม่	-	-	-	-
นครศรีธรรมราช	1.03±0.48	-	-	-

ตารางที่ 13 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน ของแต่ละ genotype

	%ความแตกต่างกรดอะมิโน (%)			
	เชียงใหม่	นครศรีธรรมราช	อุดรธานี	ชลบุรี
Genotype C				
เชียงใหม่	2.56±1.07	-	-	-
นครศรีธรรมราช	5.51±1.45	4.28±1.98	-	-
อุดรธานี	3.14±0.76	5.60±1.54	2.96±0.86	-
ชลบุรี	3.01±0.90	5.44±1.67	3.52±0.99	1.06±0.73
Genotype B				
เชียงใหม่	2.78±1.77	-	-	-
อุดรธานี	2.12±0.90	-	-	-
ชลบุรี	3.97±1.52	-	1.91±1.15	3.74±2.72
Genotype A				
เชียงใหม่	-	-	-	-
นครศรีธรรมราช	0.41±0.19	-	-	-

เมื่อทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของตัวอย่างที่ทำการศึกษา เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต่างประเทศ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่

Genotype C

ประเทศอินโดนีเซีย ได้แก่ AB033557

ประเทศเวียดนาม ได้แก่ AF223955, AB112063, AB112065, AB111946

ประเทศไต้หวัน ได้แก่ AY167099, AY167096, AY167092, AY167091

ประเทศจีน ได้แก่ DQ246215, AB205123

ประเทศญี่ปุ่น ได้แก่ AB014399, AB014398, AB006449, AB014372

Genotype B

ประเทศอินโดนีเซีย ได้แก่ AB033554, D00331

ประเทศเวียดนาม ได้แก่ AB100695, AB073835, AF121251, AF121247, AF121248

ประเทศไต้หวัน ได้แก่ AB073836, AB073840, AB073831, AB073839, AB073832

ประเทศจีน ได้แก่ AY217359, AF479684, X97851, AF279464, AF282917

ประเทศญี่ปุ่น ได้แก่ AB073856, AB073850, D23677, AB073855

Genotype A

ประเทศจีน ได้แก่ AY862867

ประเทศญี่ปุ่น ได้แก่ AB116081, AB116080, AB116079

หมายเหตุ : Genotype A ไม่พบข้อมูลของ ประเทศอินโดนีเซีย, เวียดนาม, ไต้หวัน อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

ตารางที่ 14 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของต่างประเทศ

	%ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)				
	อินโดนีเซีย	เวียดนาม	ไต้หวัน	จีน	ญี่ปุ่น
Genotype C					
เซียงราย	7.10±2.11	4.62±1.34	6.85±1.57	7.70±1.91	8.85±2.23
นครศรีธรรมราช	6.75±1.79	5.57±1.34	7.15±1.51	8.30±1.88	9.14±2.15
อุดรธานี	6.73±2.04	4.41±1.34	6.58±1.54	7.47±1.90	8.45±2.22
ชลบุรี	6.71±1.95	4.52±1.27	6.75±1.53	7.70±1.87	8.84±2.22
Genotype B					
เซียงราย	9.95±1.67	4.43±0.91	4.18±0.86	4.06±0.83	4.58±1.00
อุดรธานี	9.22±2.42	4.20±1.44	3.94±1.46	3.42±1.38	3.81±1.43
ชลบุรี	8.89±2.42	3.11±0.89	1.88±0.64	2.01±0.71	3.49±1.15
Genotype A					
เซียงราย	-	-	-	0.64±0.44	0.00±0.00
นครศรีธรรมราช	-	-	-	0.75±0.45	0.03±0.01

ตารางที่ 15 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน กับกรดอะมิโนของต่างประเทศ

	%ความแตกต่างของกรดอะมิโน (%)				
	อินโดนีเซีย	เวียดนาม	ไต้หวัน	จีน	ญี่ปุ่น
Genotype C					
เซียงราย	5.99±3.37	3.52±1.31	8.34±2.48	7.93±2.69	11.37±4.42
นครศรีธรรมราช	6.35±2.83	5.95±1.81	9.13±2.38	8.94±2.68	11.30±0.04
อุดรธานี	6.34±3.25	4.09±1.29	8.80±2.32	8.37±2.57	12.01±4.49
ชลบุรี	6.22±3.39	3.70±1.28	8.55±2.52	8.05±2.64	12.01±4.49
Genotype B					
เซียงราย	4.64±2.51	3.47±1.34	3.47±1.20	2.70±0.98	4.36±2.21
อุดรธานี	3.85±2.76	2.30±1.24	1.52±0.93	0.76±0.53	2.39±2.06
ชลบุรี	7.36±3.34	5.66±2.28	3.57±1.77	3.97±2.07	5.85±2.90
Genotype A					
เซียงราย	-	-	-	0.95±0.94	0.84±0.50
นครศรีธรรมราช	-	-	-	1.01±0.92	0.92±0.89

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant โดยได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย primer R4 เมื่อนำไป ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่ามีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ทุกตัวอย่าง

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(Bits)	Value
gi 21624234 dbj AB074756.1 	Hepatitis B virus DNA, complete geno	1102	0.0	
gi 21624227 dbj AB074755.1 	Hepatitis B virus DNA, complete geno	1102	0.0	
gi 4206634 gb AF068756.1 AF068756	Hepatitis B virus, complete ge	1102	0.0	
gi 70610057 gb DQ089789.1 	Hepatitis B virus isolate HK926, comp	1100	0.0	
gi 70610027 gb DQ089783.1 	Hepatitis B virus isolate HK1402, com	1096	0.0	
gi 70610022 gb DQ089782.1 	Hepatitis B virus isolate HK2032, com	1096	0.0	
gi 70610017 gb DQ089781.1 	Hepatitis B virus isolate HK1476, com	1096	0.0	
gi 12247009 gb AF223961.1 AF223961	Hepatitis B virus strain C-18	1096	0.0	
gi 12246993 gb AF223959.1 AF223959	Hepatitis B virus strain C-18	1096	0.0	
gi 12246977 gb AF223957.1 AF223957	Hepatitis B virus strain C-18	1096	0.0	
gi 12246969 gb AF223956.1 AF223956	Hepatitis B virus strain C-18	1096	0.0	
gi 12246953 gb AF223954.1 AF223954	Hepatitis B virus strain C-18	1096	0.0	
gi 34221973 dbj AB105173.1 	Hepatitis B virus gene for S prot...	1096	0.0	
gi 21218025 dbj AB074840.1 	Hepatitis B virus gene for large ...	1096	0.0	
gi 41152694 dbj AB117758.1 	Hepatitis B virus DNA, complete geno	1094	0.0	
gi 70610072 gb DQ089792.1 	Hepatitis B virus isolate HK870, comp	1092	0.0	
gi 70609923 gb DQ089762.1 	Hepatitis B virus isolate HK1644, com	1092	0.0	
gi 70610032 gb DQ089784.1 	Hepatitis B virus isolate HK1285, com	1088	0.0	
gi 70610007 gb DQ089779.1 	Hepatitis B virus isolate HK554, comp	1088	0.0	
gi 70609967 gb DQ089771.1 	Hepatitis B virus isolate HK1629, com	1088	0.0	
gi 70609957 gb DQ089769.1 	Hepatitis B virus isolate HK430, comp	1088	0.0	
gi 70609938 gb DQ089765.1 	Hepatitis B virus isolate HK428, comp	1088	0.0	
gi 70609933 gb DQ089764.1 	Hepatitis B virus isolate HK967, comp	1088	0.0	

รูปที่ 19 ตัวอย่างผลจากการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปจะพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ สิ่งมีชีวิตอื่น พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Hepatitis B virus ในส่วนของ surface antigen gene

```

> gi|21624234|dbj|AB074756.1 Hepatitis B virus DNA, complete genome, isolate:HBV-Th55
   Length=3215

   Score = 1102 bits (556), Expect = 0.0
   Identities = 571/576 (99%), Gaps = 0/576 (0%)
   Strand=Plus/Minus

Query 13  CCATAGGAATCTTGC GAAAAGCCCAAGATGATGGGATGGGAATACAAGTGC AATTTCCGTC 72
      |||
Sbjct 643  CCATAGGAATCTTGC GAAAAGCCCAAGATGATGGGATGGGAATACAAGTGC AATTTCCGTC 584

Query 73  CGAAGGTTTTGTACAGCAACAAGAGGGAAACATAGAGGTTCCCTTGAGCAGGAATCGTGCA 132
      |||
Sbjct 583  CGAAGGTTTTGTACAGCAACAAGAGGGAAACATAGAGGTTCCCTTGAGCAGGAATCGTGCA 524

Query 133 GGTCTTGCATGGTCCC GTCGCTGGTAGTTGATGTTCTCGGAAGTAGAGGACAAAACGGGCAA 192
      |||
Sbjct 523  GGTCTTGCATGGTCCC GTCGCTGGTAGTTGATGTTCTCGGAAGTAGAGGACAAAACGGGCAA 464

Query 193  CATACCTTGGTAGTCC AGAAGAACCACAAGAAGATGAGGCATAGCAGCAGGATGAAGAG 252
      |||
Sbjct 463  CATACCTTGGTAGTCC AGAAGAACCACAAGAAGATGAGGCATAGCAGCAGGATGAAGAG 404

Query 253  GAAGATGATAAAAACG CCGCAGACACATCCAGCGATAACCAGGACAAAATTGGAGGACAAGA 312
      |||
Sbjct 403  GAAGATGATAAAAACG CCGCAGACACATCCAGCGATAACCAGGACAAAATTGGAGGACAAGA 344

Query 313  GGTGGTGAGTGATTGG AGGTTGGGGACTGCAAAATTTGGCCAGGACACGTGGGTGCTCC 372
      |||
Sbjct 343  GGTGGTGAGTGATTGG AGGTTGGGGACTGCAAAATTTGGCCAGGACACGTGGGTGCTCC 284

Query 373  CCCTAGAAAATTGAGAG AAGTCCACCACGAGTCTAGACTCTGTGGTATTGTGAGGATTCT 432
      |||
Sbjct 283  CCCTAGAAAATTGAGAG AAGTCCACCACGAGTCTAGACTCTGTGGTATTGTGAGGATTCT 224

Query 433  TGTCACAAGAAAAACC CCGCTGTAACACGAGCAGGGGTCC TAGGAATCCTGATGTGGT 492
      |||
Sbjct 223  TGTCACAAGAAAAACC CCGCTGTAACACGAGCAGGGGTCC TAGGAATCCTGATGTGGT 164

Query 493  GCTCTCCATATTCGGT GCAGGGTCCCCAGTCTCGAGAAGATTGACGATATGCCAGAGGC 552
      |||
Sbjct 163  GCTCTCCATATTCGGT GCAGGGTCCCCAGTCTCGAGAAGATTGACGATATGGGAGAGGC 104

Query 553  AGTAGTCCGAACAGGG TTTACTGCTCCTGAACTTGA 588
      |||
Sbjct 103  AGTAGTCCGAACAGGG TTTACTGCTCCTGAACTTGA 68

```

รูปที่ 20 ตัวอย่างผลจากการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปจะพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ สิ่งมีชีวิตอื่น พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Hepatitis B virus ในส่วนของ surface antigen gene บริเวณ “a” determinant โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย

ผลการแปลงรหัสพันธุกรรมในส่วนของ “a” determinant

ทำการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.4.1 พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant จำนวน 41 กรดอะมิโน

CRP-019	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
CRP-020	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
CRP-042	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
CRP-063	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
CRP-110	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
CRP-159	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSMAFAK
CRP-177	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSMAFAK
CRP-194	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
CRP-200	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAK
CRP-228	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSMAFAK
CRP-316	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-153	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-212	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSMAFAK
NK-310	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-316	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-347	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-394	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-417	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-431	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-518	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-586	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-652	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NK-698	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKS-124	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-009	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-052	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-095	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-110	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-265	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-357	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
NKT-359	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
UD-008	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
UD-021	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
UD-045	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSMAFAK
UD-049	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR
UD-054	PCKTCTIPAQGTSMFPPSCCCTKPSDGNCTCIPIPSSMAFAR

รูปที่ 21 แสดงตัวอย่างผลการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ให้เป็นกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0.4.1 จะพบว่าในบริเวณนี้จะมีกรดอะมิโนทั้งหมด 41 กรดอะมิโน

ผลการจำแนก subtype

จากการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant ให้กลายเป็นกรดอะมิโนแล้ว จำแนก subtype โดยดูจากกรดอะมิโนในตำแหน่ง 122 และ 160 จะสามารถแยก subtype ออกได้เป็น adr, adw และ ayw ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงผลการจำแนก genotype ของตัวอย่างทั้งหมด 4 จังหวัด

	Subtype (%)			รวม
	adr	adw	ayw	
เชียงราย	49 (79.03)	12 (19.35)	1 (1.61)	62
นครศรีธรรมราช	19 (95.00)	1 (5.00)	-	20
อุดรธานี	45 (97.83)	-	1 (2.17)	46
ชลบุรี	11 (57.89)	8 (42.11)	-	19
รวม	124 (84.35)	21 (14.23)	2 (1.36)	147

โดยทั่วไป ไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ genotype C จะมี subtype เป็น adr genotype B จะมี subtype เป็น adw และ genotype A มักพบ subtype เป็น adw (47) จากการจำแนก subtype นั้นพบว่า subtype เมื่อทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการจำแนก genotype แล้ว พบว่า genotype C ส่วนใหญ่จะมี subtype เป็น adr genotype B มี subtype เป็น adw และ genotype A มี subtype เป็น adw แต่พบว่ามีบางตัวอย่างที่มี genotype ไม่ ตรงกับ subtype จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าเป็น genotype C มี subtype เป็น adw และ genotype มี subtype เป็น ayw ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ตัวอย่างที่มี genotype ไม่ตรงกับ subtype โดยทั่วไป aa 122 และ aa 160 หมายถึงกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 122 และ 160 ในบริเวณ “a” determinant ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้ในการจำแนก subtype

CODE	Cnum	genotype	subtype	aa 122	aa 160
CR	559	C	adw	K	K
CR	908	B	ayw	R	K
CRP	200	C	adw	K	K
UD	045	B	ayw	R	K
CHB	226	C	adw	R	K
CHP	038	C	adw	R	K

การตรวจสอบ Vaccine escape mutant

การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant ในตำแหน่ง 126, 141, 144, 145 พบว่าทำให้เกิด การกลายพันธุ์ escape mutant ดังตารางที่ 3

จากการตรวจสอบผลของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant พบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant ในตำแหน่ง 126 จาก Threonine (T) เป็น Asparagine (N) จำนวน 4 คน เมื่อทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากแบบสอบถามการได้รับวัคซีน พบข้อมูลดังที่ได้แสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลการตรวจสอบกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 126 บริเวณ “a” determinant เกิดการกลายพันธุ์ จาก Threonine (T) เป็น Asparagine (N) และข้อมูลการได้รับวัคซีน

CODE	CNum	ได้รับ Vaccine	กรดอะมิโนตำแหน่ง 126
NK	652	X	Asn (N)
NKT	052	√	Asn (N)
NKT	110	X	Asn (N)
UD	767	√	Asn (N)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งอื่นมาทำการตรวจสอบ พบว่าไม่พบการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่งอื่น เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของลำดับกรดอะมิโน ในส่วนของ “a” determinant กับข้อมูลที่ได้จากแบบสอบถาม การได้รับวัคซีน พบว่ามีผู้ที่ได้รับวัคซีนแต่ยังพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จำนวน 43 คน ดังตารางที่ 19

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลผู้ที่ได้รับวัคซีน แต่พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี จำนวน 43 คน ข้อมูลแสดงกรดอะมิโนบริเวณ “a” determinant ในตำแหน่ง 126, 141, 144, 145 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถกลายพันธุ์ ให้เกิด escape mutant ได้ โดย หากเกิดการกลายพันธุ์จะมีลักษณะ T126N, K141E, D144A, G145R

CODE	Age	Num	Genotype	Subtype	aa 126	aa 141	aa 144	aa 145
CR	17	197	b	adw	T	K	D	G
CR	28	239	c	adr	I	K	D	G
CR	54	264	c	adr	I	K	D	G
CR	2	380	c	adr	I	K	D	G
CR	17	429	b	adw	T	K	D	G
CR	48	485	c	adr	I	K	D	G
CR	31	538	c	adr	I	K	D	G
CR	42	551	c	adr	I	K	D	G
CR	45	559	c	adw	T	K	D	G
CR	7	816	b	adw	T	K	D	G
CR	9	871	c	adr	I	K	D	G
CR	7	908	b	ayw	T	K	D	G
CRM	23	097	c	adr	I	K	D	G
CRM	36	105	c	adr	I	K	D	G
CRM	22	123	c	adr	I	K	D	G
CRM	30	129	c	adr	I	K	D	G
CRM	24	133	b	adw	T	K	D	G
CRM	10	236	c	adr	I	K	D	G
CRP	22	042	c	adr	I	K	D	G
NK	45	153	c	adr	I	K	D	G
NK	35	394	c	adr	T	K	D	G
NK	21	518	c	adr	I	K	D	G
NKT	13	110	c	adr	N	K	D	G
NKT	33	265	c	adr	I	K	D	G
UD	11	049	c	adr	I	K	D	G
UD	18	068	c	adr	I	K	D	G
UD	18	636	c	adr	I	K	D	G
UD	8	767	c	adr	N	K	D	G
UDH	22	226	c	adr	I	K	D	G
UDH	27	241	c	adr	I	K	D	G
UDV	25	039	c	adr	I	K	D	G
UDV	31	050	c	adr	T	K	D	G
UDV	34	058	c	adr	I	K	D	G
UDV	48	153	c	adr	I	K	D	G
UDV	26	400	c	adr	T	K	D	G
CH	4	095	c	adr	T	K	D	G
CH	8	207	c	adr	I	K	D	G
CH	15	341	c	adr	I	K	D	G
CH	21	703	b	adw	T	K	D	G
CH	7	854	c	adr	I	K	D	G
CHA	19	163	c	adr	I	K	D	G
CHB	39	212	c	adr	I	K	D	G
CHP	28	038	c	adw	T	K	D	G

การวิเคราะห์ การกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene

จากการวิเคราะห์เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Cluster analysis โดยโปรแกรม ClustalX version 1.83 วิธี Multiple Alingment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา บางตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงการลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา

Code	Cnum	ลักษณะการกลายพันธุ์
CR	081	deletion ที่ Pre-S2
CR	485	mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
CR	559	mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
CRM	097	deletion ที่ Pre-S2
CRP	228	deletion ที่ Pre-S2
NK	394	deletion ที่ Pre-S2
NK	586	deletion ที่ Pre-S2
NKT	052	mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
UD	402	deletion ที่ Pre-S2, mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
UDV	039	deletion ที่ Pre-S2, mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
UDH	241	mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
UDH	359	deletion ที่ Pre-S2, mutation ที่ start codon ของ Pre-S2
CHB	226	deletion ที่ Pre-S2
CHP	181	deletion ที่ Pre-S1

ลักษณะของ การกลายพันธุ์สามารถแยกได้เป็น 4 ลักษณะ ได้แก่

1. deletion ที่ Pre-S2
2. กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2
3. deletion ที่ Pre-S2 และ กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2
4. deletion ที่ Pre-S1

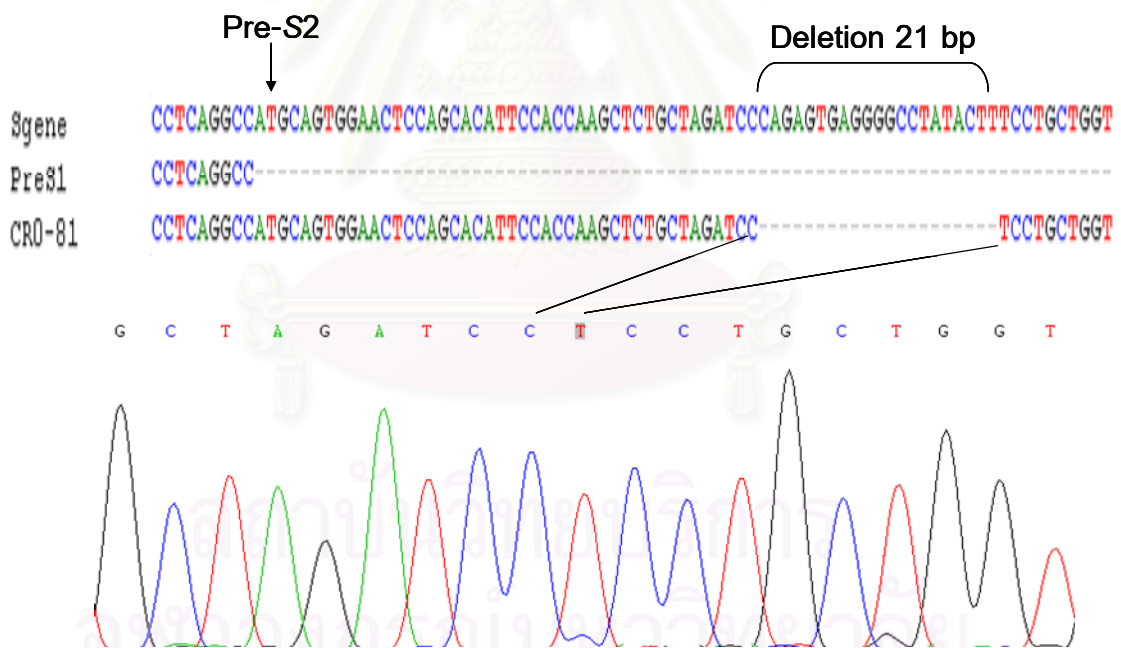
หลังจากพบการกลายพันธุ์ ทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำในส่วนที่สงสัย เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์โดย Deletion ที่ Pre-S2

จากการวิเคราะห์ด้วย Clustal Analysis พบมี deletion ที่ Pre-S2 เท่านั้น ซึ่งได้แก่ ตัวอย่าง CR-081, CRM-097, CRP-228, NK-586, CHB-226



รูปที่ 22 แสดง Clustal Analysis การ deletion ที่ตำแหน่งของ Pre-S2 เท่านั้น



รูปที่ 23 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 ของตัวอย่าง CR-081จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ S gene ที่ปกติ จะพบ deletion จำนวน 21 bp ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion หายไป

เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าลักษณะของกรดอะมิโนมีการ deletion ไป ซึ่งการขาดหายไป ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

	Pre-S2	Deletion
Sgene	ISPPLRDSHPQAMQWNSSTFHQALLDPRVRGLYF	EAGGSSSGTVNVPVPTT
PreS1	ISPPLRDSHPQA	~~~~~
CR-081	ISPPLRDSHPQAMQWNSSTFHQALLDPR	EAGGSSSGTVNVPVPTT
CRM-097	ISPPLRDSHPQAMQWNSSTFHP	EAGGSSSGTVNVPVPTT
CRP-228	LSPPLRDTHPQAMQWNSTTFHQTL	EAGGSSSGTVNVPVQNT
NK-586	ISPPLRDSHPQAMQWNSSTFH	EAGGSSSGTVNVPVPTT
CHB-226	ISPPLRDSHPQAMRWNSSE	EAGGSSSGTVSPVPTT

รูปที่ 24 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนจำนวน 7 ตำแหน่ง เนื่องจากเกิดการ deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากรูปไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

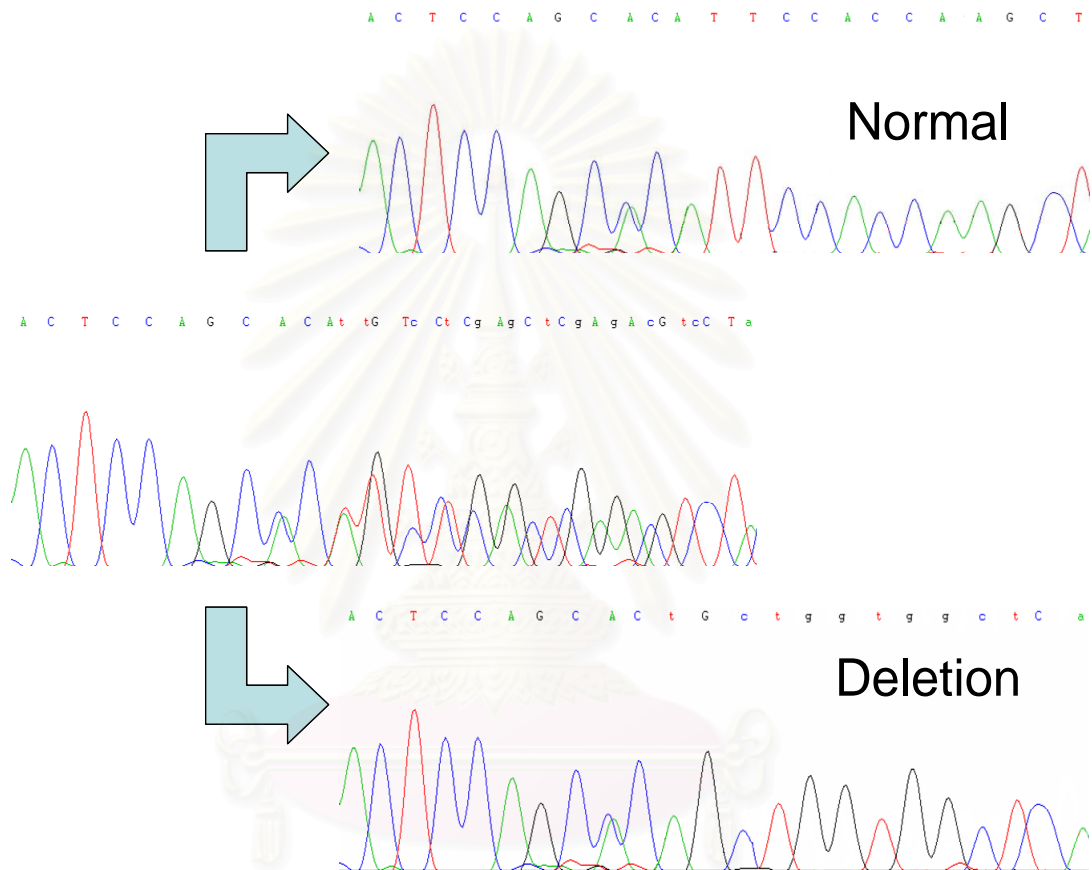
เนื่องจากส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ของ polymerase gene นั้นมีส่วนที่ overlap กับ Pre-S2 ด้วย และมีการ overlap กับส่วนที่ทำการศึกษา เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนของ polymerase พบว่าเกิดการกลายพันธุ์โดยมี ขาดหายไปของกรดอะมิโน แต่ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือเกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

	Deletion
P	DHLSTSNRQSSSGHAVELHNFPPSSARPQIEGPVLS
CR-081	SHLSTSKRQSSSGHAVELQHIPPSSARS
CRM-097	SHLSTSKRQSSSGHAVELQHIPP
CRP-228	SPVSTSKRHSSSGHAVELHHVPPNS
NK-586	SHLSTSKRQSSTGHAVELKHIP
CHB-226	SHLSTSKRQSSSGHAVELQ

รูปที่ 25 แสดงการ deletion กรดอะมิโนจำนวนของ polymerase gene

NK-394

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง NK-394 พบว่าข้อมูล Chromatogram มีลักษณะที่ผิดปกติ โดย รูป Chromatogram มีลักษณะที่ซ้อนทับกัน จากการตรวจสอบสามารถแยก ข้อมูลออกได้เป็น 2 แบบ แบบแรกเป็นลักษณะที่ปกติ แบบที่สอง เป็นลักษณะที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2



รูปที่ 26 แสดงข้อมูล Chromatogram ของตัวอย่าง NK-394 โดยมีลักษณะที่ซ้อนทับกัน เมื่อทำการแยกข้อมูลออกมาทำให้สามารถแยกออกได้เป็น 2 แบบ คือแบบที่เป็นปกติ ไม่มีการกลายพันธุ์ กับแบบที่มีการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2

จากข้อมูลที่ซ้อนทับกันทำให้คาดว่าน่าจะเกิดจาก มีเชื้อไวรัส 2 ชนิดด้วยกัน โดย ชนิดแรกมีลักษณะปกติ ส่วนชนิดที่ 2 มีลักษณะกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 จึงทำการแยกเชื้อทั้ง 2 ชนิดออกจากกันโดยการ Cloning จำแนกเชื้อออกมา ทำการสุ่มเลือก Colony ทั้งหมด 10 Colony และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด พบว่า จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 10 ลำดับ มีเพียง 1 clone เท่านั้นที่มีลักษณะปกติ ได้แก่ clone หมายเลข 2 มี 8 clone ที่มีลักษณะกลายพันธุ์

โดย deletion ที่ Pre-S2 จำนวน 48 bp ตำแหน่งที่ 8 ถึง ตำแหน่งที่ 55 ได้แก่ clone หมายเลข 1,3,4,5,6,8,9,10 และมี 1 ลำดับที่มีลักษณะกลายพันธุ์โดย deletion ที่ Pre-S2 จำนวน 36 bp ตำแหน่งที่ 1 ถึง ตำแหน่งที่ 36 เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์กับ HBV accession number AB115417 ได้แก่ clone หมายเลข 7

	Pre-S2	Deletion
sgene	TCAGGCCATGCAGTGGAACTCCAGCACATCCACCAAGCTCTGCTAGATCCCAGAGTGAGGGGCCTATACTTTCCTGCTGGTGG	
Pre31	TCAGGCC-----	
Clone1	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone2	TCAGGCCATGCAGTGGAACTCCAGCACATCCACCAAGCTCTGCTAGATCCCATAGTGAGGGGTCTAAATTTTCCTGCTGGTGG	
Clone3	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone4	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone5	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone6	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone7	TCAGGCCACGCAGTGGAA-----TGTGAGGGGTCTGCTTTCCTGCTGGTGG	
Clone8	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone9	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	
Clone10	TCAGGCCATGCGGTGGAACTCCAGC-----CCTGCTGGTGG	

รูปที่ 27 แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสุ่มเลือก Clone ของ เชื้อตัวอย่าง NK-394 พบว่า มี 8 clone ที่มีลักษณะกลายพันธุ์โดย deletion ที่ Pre-S2 จำนวน 48 bp มี 1 clone ที่มีลักษณะกลายพันธุ์โดย deletion ที่ Pre-S2 จำนวน 36 bp และอีก 1 clone ที่มีลักษณะ ปกติ

เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่า clone ที่ 1,3,4,5,6,8,9,10 มีลักษณะของกรดอะมิโนมีการ deletion ไป 16 ตำแหน่ง และ clone ที่ 7 มีลักษณะของกรดอะมิโนมีการ deletion ไป 12 ตำแหน่ง ซึ่งทั้งหมด ไม่เกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างไร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

	Pre-S2	Deletion
Sgene	PTPISPPPLRDSHPQAMQWNSSSTFHQALLDPRVRLGLYFPAGGSNSGTVNVPV	
PreS1	PTPISPPPLRDSHPQA	
Clone1	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP
Clone2	PTPISPPPLRDSHPQAMQWNSSSTFHQALLDPIVRLGNFPAGGSSFLTRSADP	
Clone3	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP
Clone4	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP
Clone5	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP
Clone6	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP
Clone7	PTPISPPPLRDSHPQATQWN	VRGLCFPAGGSSSGTVNVPV
Clone8	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTENPVP
Clone9	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP
Clone10	PTPISPPPLRDSHPQAMRWNSS	PAGGSSSGTVSPVP

รูปที่ 28 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนจำนวน 16 ตำแหน่ง และ จำนวน 12 ตำแหน่ง เนื่องจากเกิดการ deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากรูปไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนของ polymerase พบว่าเกิดการกลายพันธุ์โดย clone ที่ 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 มีการ deletion ของกรดอะมิโนไป 16 ตำแหน่ง และ clone ที่ 7 มีการ deletion ของกรดอะมิโนไป 12 ตำแหน่ง แต่ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือเกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

	Deletion
P	SSSGHAVELHNFPPSSARPQIEGVLSCWTLQFRNSK
Clone1	SSSGHAVEL
Clone2	SSSGHAVELQHIPPSSARSHSEGSKFSCWTLIFRNRE
Clone3	SSSGHAVEL
Clone4	SSSGHAVEL
Clone5	SSSGHAVEL
Clone6	SSSGHAVEL
Clone7	SSSGHAVEC
Clone8	SSSGHAVEL
Clone9	SSSGHAVEL
Clone10	SSSGHAVEL

รูปที่ 29 แสดงการ deletion กรดอะมิโนจำนวน 16 และ 12 ตำแหน่ง ของ polymerase gene

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2

จากการวิเคราะห์ด้วย Clustal Analysis พบมีการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 เท่านั้น ซึ่งได้แก่ตัวอย่าง CR-485, CR-559, NKT-052

Start codon Pre-S2

S	AGTCATCCTCAGGCC ATG CAGTG
PreS1	AGTCATCCTCAGGCC-----
CR-485	AGTCATCCTCAGGCC ATA CAGTG
CR-559	AGTCATCCTCAGGCC ATA CAGTG
NKT-052	AGTCATCCTCGGGCC GCT CAGTG

รูปที่ 30 แสดงการวิเคราะห์ด้วย Clustal Analysis พบการกลายพันธุ์ที่ start Codon ของ Pre-S2

เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก M เป็น I และ A โดยไม่เกิดเป็น stop codon แต่อย่างใดดังแสดงในรูปที่ 31

Start codon Pre-S2

S	PPLRDSHPQ A MQWNSSTFH
PreS1	PPLRDSHPQ A ~~~~~
CR-485	PPLRDSHPQ A IQWNSNTFH
CR-559	PPLRDSHPQ A IQWNSITFH
NKT-052	PPLRDSHP R AQWNSSTFH

รูปที่ 31 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2

สถาบันวิจัยชีววิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เนื่องจากส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ของ polymerase gene นั้นมีส่วนที่ overlap กับ start codon ของ Pre-S2 เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนของ polymerase พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเท่านั้น ไม่เกิดการกลายพันธุ์โดยกลายเป็น stop codon

P	Q S A D T K T A H D H L S T S N R Q S S S G H A V E L H N F P P
CR-485	Q S A V R K T A Y S H L S T S K R Q S S S G H T V E F Q H I P P
CR-559	Q S A V R E A A Y S H F S T S K R Q S S S G H T V E L H N I S S
NKT-052	H S A V R K T A Y S H L S T S K R Q S S S G R S V E F Q H I P P

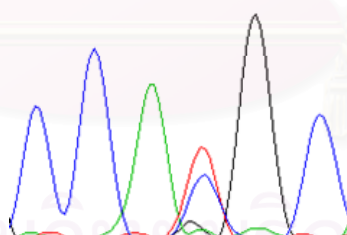
รูปที่ 32 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนของ polymerase gene โดยมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเท่านั้น

UDH-241

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง UDH-241 พบว่าข้อมูล Chromatogram มีลักษณะที่มีการซ้อนทับกันโดยในที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 จากการตรวจสอบสามารถแยก ข้อมูลออกได้เป็น 2 แบบ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น ATG และ ACG

Start codon Pre-S2

C C A T C G C



รูปที่ 33 แสดงข้อมูล Chromatogram ของตัวอย่าง UDH-241 จากรูปพบว่าการซ้อนทับกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

จากข้อมูลที่ซ้อนทับกันทำให้คาดว่าน่าจะเกิดจาก มีเชื้อไวรัส 2 ชนิดด้วยกัน โดย ชนิดแรกมีลักษณะ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ start codon ของ Pre-S2 เป็น ATG ส่วนชนิดที่ 2 เป็น ACG จึงทำการแยกเชื้อทั้ง 2 ชนิดออกจากกันโดยการ Cloning จำแนกเชื้อออกมา ทำการสุ่มเลือก Colony ทั้งหมด 7 Colony และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด พบว่า จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง 7 ลำดับ มี 1 clone ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ start codon ของ Pre-S2 เป็น ACG ได้แก่ เท่านั้นที่มีลักษณะปกติ อีก 7 colony มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ start codon ของ Pre-S2 เป็น ATG

Start codon Pre-S2

S	CCTCAGGCCATGCAGTGGAA
Pre-S1	CCTCAGGCC-----
Clone1	CCTCAGGCCATGCAGTGGAA
Clone2	CCTCAGGCCATGCAGTGGAA
Clone3	CCTCAGGCCATGCAGTGGAA
Clone4	CCTCAGGCCATGCAATGGAA
→ Clone5	CCTCAGGCCACGCAATGGAA
Clone6	CCTCAGGCCATGCAGTGGAA
Clone7	CCTCAGGCCATGCAGTGGAA

รูปที่ 34 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ start codon ของ Pre-S2 มี 1 colony ที่มีลักษณะเป็น ACG

เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน โดยไม่เกิดเป็น stop codon แต่อย่างไร

Start codon Pre-S2

↓

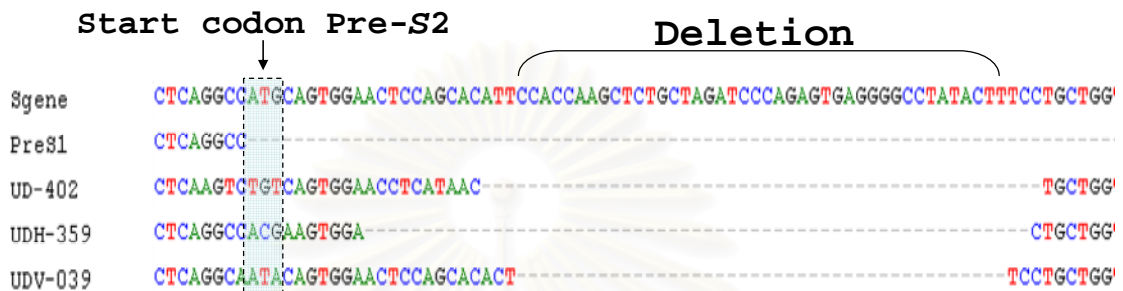
S	FISPPLRDSHPQAMQWNSSTFHQA
Pre-S1	FISPPLRDSHPQA-----
Clone5	FISPPLRDSHPQATQWNSSTSHHA

รูปที่ 35 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2

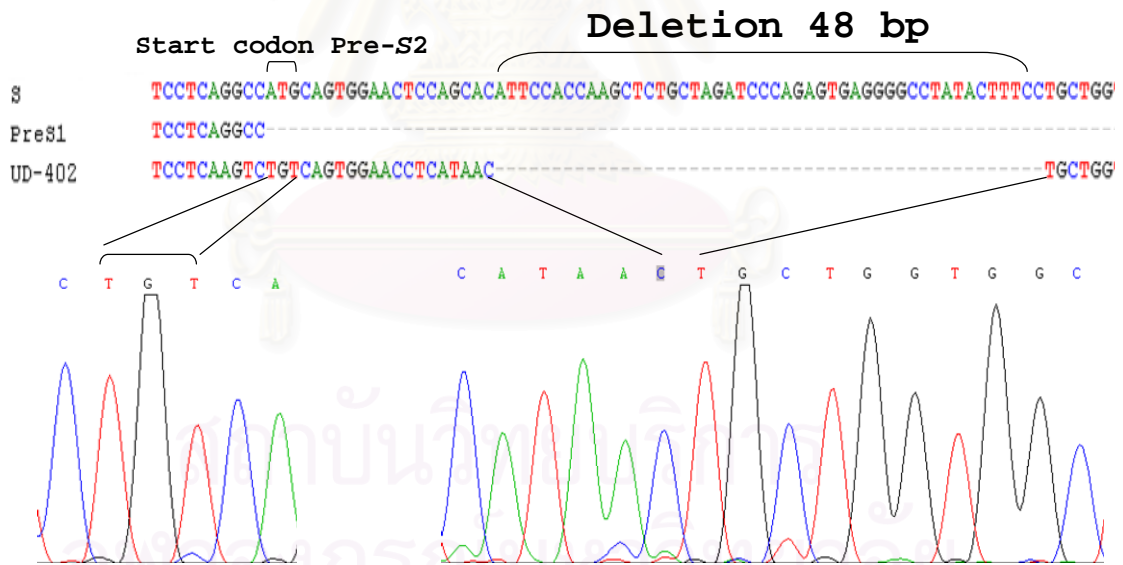
เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนของ polymerase พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน แต่อย่างไร

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์โดย Deletion ที่ Pre-S2 และ กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2

จากการวิเคราะห์ด้วย Clustal Analysis พบมี deletion ที่ Pre-S2 และ กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 ซึ่งได้แก่ตัวอย่าง UD-402, UDH359 และ UDV039

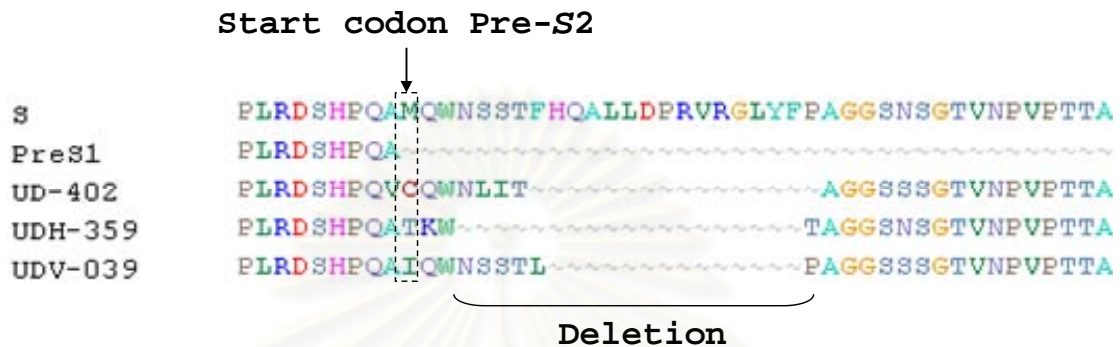


รูปที่ 36 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Clustal Analysis ของข้อมูลตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์โดย deletion ที่ Pre-S2 และ กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2



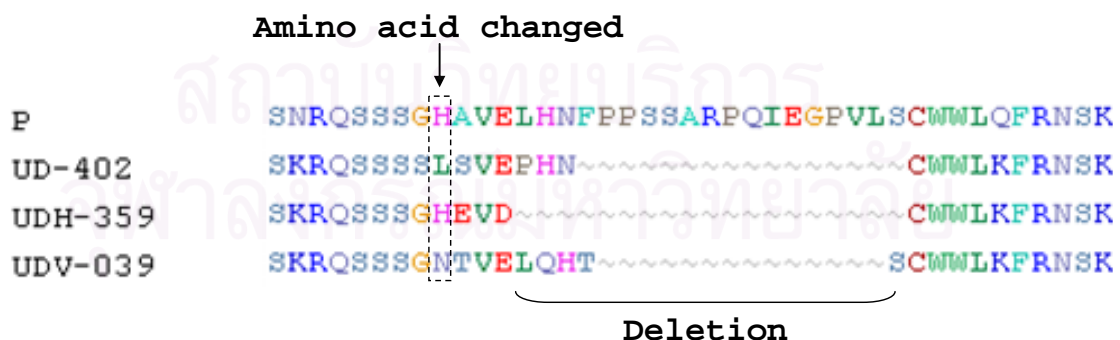
รูปที่ 37 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S2 และการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 ของตัวอย่าง UD-402 จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ S gene ที่ปกติ จะพบ deletion จำนวน 48 bp ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion หายไป และที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าลักษณะของกรดอะมิโนมีการขาดหายไป และมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 ซึ่งไม่เกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด



รูปที่ 38 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนจำนวน เนื่องจากเกิดการ deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง start codon ของ Pre-S2 จากรูปไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

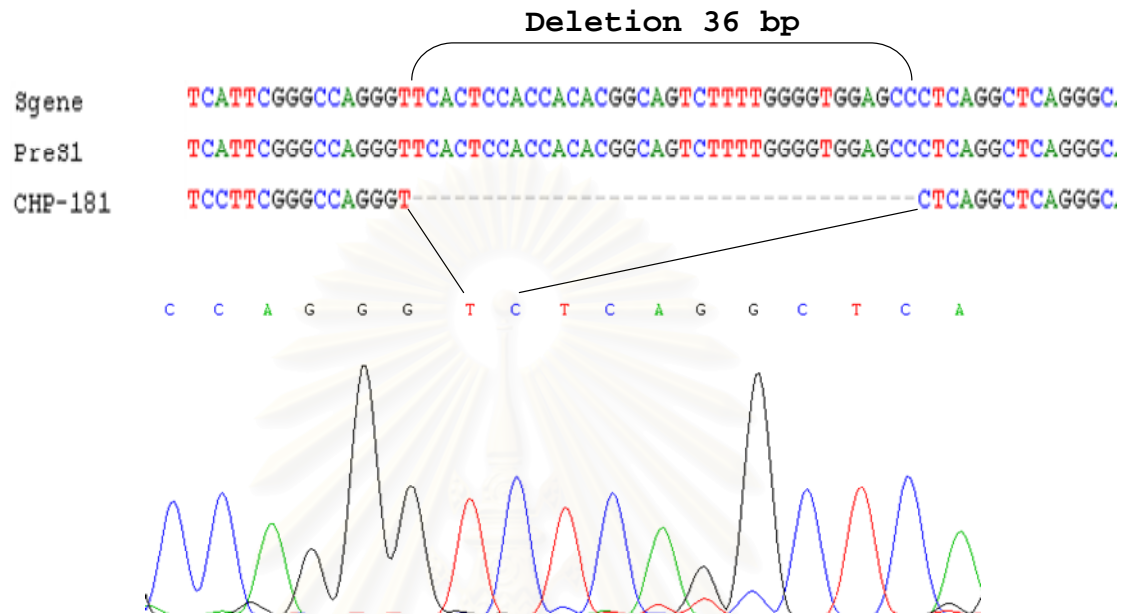
เนื่องจากส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ของ polymerase gene นั้นมีส่วนที่ overlap กับ Pre-S2 ด้วย และมีการ overlap กับส่วนที่ทำการศึกษา เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนของ polymerase พบว่าเกิดการกลายพันธุ์โดยมี deletion ไป 16 ตำแหน่ง และมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเท่านั้น ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือเกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด



รูปที่ 39 แสดงการ deletion กรดอะมิโนจำนวน และการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ของ polymerase gene ที่เกิดจากการการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Pre-S2

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์โดย Deletion ที่ Pre-S1

จากการวิเคราะห์ด้วย Clustal Analysis พบมี deletion ที่ Pre-S1 ซึ่งได้แก่ตัวอย่าง CHP-181 พบว่ามีการ deletion จำนวน 36 bp



รูปที่ 40 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ Pre-S1 ของตัวอย่าง CHP-181 จากรูปจะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ S gene ที่ปกติ จะพบ deletion จำนวน 36 bp ซึ่งจากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion หายไป

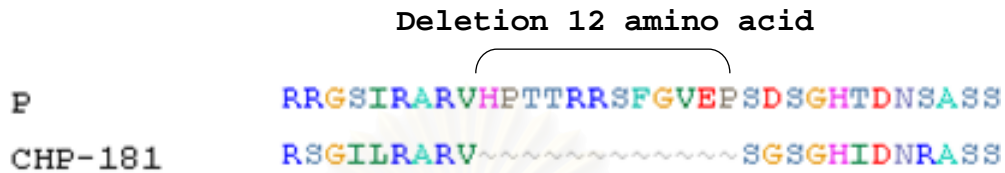
เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าลักษณะของกรดอะมิโนมีการ deletion ไป 12 ตำแหน่ง ซึ่งไม่เกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

Deletion 12 amino acid

Sgene	NQVGVGSF GGP GFTPPHGSLLGWSPQAQGILTT'
PreS1	NQVGVGSF GGP GFTPPHGSLLGWSPQAQGILTT'
CHP-181	NQVGVGSF GGP -----SQAQGILTT'

รูปที่ 41 แสดงการ deletion ของกรดอะมิโนจำนวน 12 ตำแหน่ง เนื่องจากเกิดการ deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากรูปไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างใด

เนื่องจากส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ของ polymerase gene นั้นมีส่วนที่ overlap กับ Pre-S1 ด้วย และมีการ overlap กับส่วนที่ทำการศึกษา เมื่อทำการตรวจสอบกรดอะมิโนของ polymerase พบว่าเกิดการกลายพันธุ์โดยมี deletion ไป 12 ตำแหน่ง ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือเกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon แต่อย่างไร



รูปที่ 42 แสดงการ deletion กรดอะมิโนจำนวน 12 ตำแหน่งของ polymerase gene



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความชุกชุมของไวรัสตับอักเสบบี สูง กระทรวงสาธารณสุขจึงได้กำหนดนโยบายในการควบคุมและป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ด้วยการให้วัคซีน โดยวางแผนไว้ในแผนที่ 7 ของกระทรวงฯ ในปี พ.ศ. 2535 และได้บรรจุใน Expanded Program on Immunization (EPI) โดยให้วัคซีนแก่เด็กทารกเมื่อแรกเกิด 2 และ 6 เดือน พร้อมกับ วัคซีนรวมป้องกันคอตีบ บาดทะยัก และไอกรน (DTP) ผลของแผนการให้วัคซีนพบว่า มีแนวโน้มของผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ลดลง จากอัตราการตรวจพบพาหะในผู้บริจาคโลหิตรายใหม่ที่มาบริจาคโลหิตที่ศูนย์บริการโลหิตสภากาชาดไทย ในปี พ.ศ. 2530 ถึงปีพ.ศ. 2534 ที่มีแนวโน้มลดลงจาก 8.2% เหลือ 6.6% (48) การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากการประเมินผลกระทบของการให้วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบบี ในประชากรไทย เพื่อทำการศึกษาในแนวลึกทางด้าน molecular epidemiology โดยการทำการ molecular characterization ของ ไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย ผลของการศึกษานี้ทำให้พบสายพันธุ์ใหม่ หรือลักษณะที่ผิดแปลกจากปกติของไวรัสตับอักเสบบี เช่น deletion และ point mutation ในส่วนของ HBsAg

การศึกษาจากตัวอย่างประชากรจำนวน 6,239 ตัวอย่าง ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากประชากรชาวไทย อายุระหว่าง 1-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และ ภาคใต้ แห่งละ 1 จังหวัด รวม 4 จังหวัด โดยใช้วิธีการเลือกแบบจำเพาะเจาะจงได้แก่จังหวัด เชียงราย อุตรดิตถ์ ชลบุรี และนครศรีธรรมราช ทำการเก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2547 พบว่ามีอัตราผู้ติดเชื้อที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg ด้วยวิธี ELISA จำนวน 246 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 3.94

เนื่องจากผลการตรวจด้วย ELISA จากห้องปฏิบัติการพบว่า จำเป็นต้องมีการตรวจซ้ำ จึงเป็นเหตุให้ปริมาณซีรัมของตัวอย่างบางตัวอย่างไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการศึกษานี้ โดยจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg ด้วยวิธี ELISA ทั้งหมด 246 ตัวอย่าง ได้ทำการเลือกตัวอย่างทั้งหมดที่พอจะสามารถตรวจสอบได้เหลือ 201 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างมาทำการตรวจสอบเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ "a" determinant ปรากฏว่าให้ผลบวกจำนวน 147 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 73.13 ผลการตรวจ DNA ด้วยวิธี PCR ที่ได้ผลบวกลบนั้นเมื่อหาความสัมพันธ์กับ อายุ, เพศ, ปริมาณของ HBsAg และ antiHBe จากผลของการทำ ELISA นั้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาของ Kaneko และคณะ (49) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรัง จำนวน 31 ราย พบว่า

มีผู้ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR จำนวน 26 ราย และผู้ป่วยที่มีผลบวกของ HBeAg จะให้ผลบวกต่อวิธี PCR ด้วย ผลของ PCR นั้น มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับช่วงระยะการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส (active HBV replication) ซึ่งสามารถตรวจด้วยการหา HBeAg เนื่องจาก HBeAg มักพบในระยะการแบ่งตัวของเชื้อ และเป็นระยะที่สามารถแพร่เชื้อได้สูง เนื่องจากเชื้อมีการแบ่งตัวและมีเชื้อไวรัสอยู่ในซีรัม ดังนั้นจึงอาจสามารถตรวจซีรัมแล้วให้ผลบวกต่อ HBsAg ด้วยวิธี ELISA เนื่องจากเชื้อไวรัสจะมีการสร้างโปรตีน HBsAg ออกมาอยู่ในซีรัม แต่อาจให้ผลลบต่อวิธี PCR เนื่องจากเชื้อไม่อยู่ในระยะการแบ่งตัวและไม่มีเชื้อไวรัสอยู่ในซีรัม จากการศึกษาครั้งนี้ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี PCR นั้นสันนิษฐานว่าอาจเกิดจากเชื้อไวรัสไม่ได้อยู่ในระยะการแบ่งตัว ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี PCR ได้

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Pre-S1 โดยจากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย primer Pre-S1F เพื่อหา genotype ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม genotyping tool และ วิธี Phylogenetic analysis พบว่าจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR 147 ตัวอย่าง สามารถจำแนกอยู่ใน genotype C มากที่สุดจำนวน 128 ตัวอย่าง (87.08%) genotype B จำนวน 17 ตัวอย่าง (11.56%) และ genotype A จำนวน 2 ตัวอย่าง (1.36%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Theamboonlers และคณะ (50) ในปี พ.ศ. 2541 ซึ่งได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทยที่ได้เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาฯ จำนวน 68 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนก genotype C (54.4%) genotype B (23.5%) และ genotype A (22.1%) และจากการศึกษาของ Tangkijvanich และคณะ (33) ในปี พ.ศ. 2548 ได้ทำการศึกษาการจำแนก genotype ในผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทยจำนวน 470 ตัวอย่าง สามารถจำแนก genotype C (73%) genotype B (21%) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทยเป็น genotype C มากที่สุด และตามด้วย genotype B และ A ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์และการจัดกลุ่มด้วย Phylogenetic analysis พบว่าเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์สร้างโครงสร้างความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) การจัดกลุ่ม (cluster) ของ genotype ของแต่ละจังหวัดนั้นไม่มีการจัดกลุ่มแยกตามจังหวัดอย่างชัดเจน นั่นคือแต่ละ genotype ของทุกจังหวัดไม่มีการแยกออกเป็นกลุ่มย่อยตามจังหวัด และเมื่อวิเคราะห์ค่าเปเปอร์เซ็นความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของแต่ละจังหวัดเปรียบเทียบกัน พบว่ามีค่าเปเปอร์เซ็นความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมในส่วน Pre-S1 ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ตามแต่ละภูมิภาคของประเทศไทยมีความใกล้เคียงกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าเปเปอร์เซ็นความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของการศึกษาครั้งนี้ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ในส่วนเดียวกันของประเทศใกล้เคียงที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) พบว่ามีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศเวียดนาม สอดคล้องกับรายงานของ Huy และ Abe (51) ที่ได้รายงานลักษณะ molecular epidemiology ของไวรัสตับอักเสบบี และ ซี ในประเทศแถบเอเชีย โดยกลุ่มของ genotype ที่พบโดยทั่วไปในประเทศเวียดนาม มีความคล้ายคลึงกับของประเทศไทย

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant เพื่อทำการจำแนก subtype โดยการแปลงให้เป็นลำดับกรดอะมิโนและจำแนกโดยดูกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 กับ 160 สามารถจำแนก subtype ออกได้เป็น adr, adw และ ayw โดยทั่วไป ไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ genotype C จะมี subtype เป็น adr ส่วน genotype B จะมี subtype เป็น adw และ genotype A มักพบ subtype เป็น adw (47) จากการศึกษา ข้อมูล subtype ที่ได้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลจากการจำแนก genotype แล้วพบว่า genotype C ส่วนใหญ่จะมี subtype เป็น adr ส่วน genotype B มี subtype เป็น adw และ genotype A มี subtype เป็น adw แต่พบว่ามีบางตัวอย่างที่มี genotype ไม่ ตรงกับ subtype ที่พบโดยทั่วไปในประเทศไทย ผลการศึกษาพบ genotype C ซึ่งมี subtype adw จำนวน 4 ตัวอย่าง และ genotype B ซึ่งมี subtype ayw จำนวน 2 ตัวอย่าง จากรายงานของ Norder (47) และคณะ ได้ทำการศึกษา genetic diversity ของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบทั่วโลก รายงานว่า genotype C ที่พบส่วนใหญ่จะมี subtype เป็นชนิด adr หรือ adr-q- แต่มีรายงานในประเทศ ญี่ปุ่น, จีน, อินโดนีเซีย, และ เวียดนาม โดยพบบางตัวอย่างเท่านั้นที่มี subtype เป็น adw ส่วน genotype B ที่พบส่วนใหญ่จะมี subtype เป็น adw2 หรือ adw3 ส่วน genotype B ที่มี subtype เป็น ayw นั้นมีรายงานในกลุ่มของประเทศเวียดนาม ถึงอย่างไรก็ตามการจำแนก subtype ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนบน HBsAg เพียงบางตำแหน่งเท่านั้น บางครั้ง subtype อาจสามารถเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียวบน S gene (39) โดยไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางคลินิกแต่อย่างใด

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าตัวอย่างที่จำแนกอยู่ในกลุ่ม genotype C พบว่ามีปริมาณของ HBsAg (299.82 ± 100.28) สูงกว่าตัวอย่างที่จำแนกอยู่ในกลุ่ม genotype B (396.09 ± 136.05) อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.001$) โดยวัดปริมาณของ HBsAg จากผลของการทำ ELISA ในหน่วยของ S/N (Sample Rate/Index Calibrator Mean Rate) ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังในกลุ่มของ genotype C มักพบผลการตรวจอัตราการผลิต HBeAg มากกว่าในกลุ่มของ genotype B (32) จากผลการศึกษาของ Tangkijvanich และคณะ (33) ที่ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยคนไทยพบว่าผู้ป่วยในกลุ่มของ genotype C จะมีอัตราการทำให้ผลบวกต่อ

HBeAg มากกว่าผู้ป่วยในกลุ่มของ genotype B ซึ่ง HBeAg เป็น marker ที่ใช้บ่งบอกถึง viral replication (52) ดังนั้นไวรัสจึงอาจมีการสร้าง HBsAg ออกมามาก ทำให้ผู้ป่วยในกลุ่มของ genotype C ซึ่งมีอัตราการให้ผลบวกต่อ HBeAg มากกว่าจึงอาจทำให้ตรวจพบ HBsAg ได้ในปริมาณที่มากกว่า

จากการตรวจสอบ vaccine escape mutant โดยการตรวจสอบลำดับของกรดอะมิโนบน HBsAg ในส่วนของ "a" determinant เปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากแบบสอบถาม การได้รับวัคซีน พบว่ามีผู้ที่ได้รับวัคซีนแต่ยังพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จำนวน 43 คน คิดเป็นร้อยละ 21.39 จากจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg ทั้งหมด จากการตรวจสอบกรดอะมิโน พบการกลายพันธุ์ ณ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 126 จาก Threonine (T) เป็น Asparagine (N) จำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลการได้รับวัคซีนพบว่ามี 2 ตัวอย่างได้รับวัคซีน และมี 2 ตัวอย่างที่ไม่ได้รับวัคซีน ดังนั้นจากข้อมูลจึงไม่สามารถสรุปได้ว่ามีเกิดการ escape mutant และเมื่อตรวจสอบในตำแหน่งอื่นพบว่าไม่พบการกลายพันธุ์ ทั้งกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 145 (G145R) และที่ตำแหน่งอื่นแต่อย่างใด เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลผลของ ELISA พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลลบต่อ antiHBs แสดงให้เห็นว่าไม่เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมา ผลจากการที่ผู้ป่วยได้รับวัคซีนแต่ยังพบการติดเชื้อนั้น สันนิษฐานว่าอาจเป็นผลมาจากการล้มเหลวในการให้วัคซีน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากหลายสาเหตุ ยกตัวอย่างเช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดา เป็นต้น

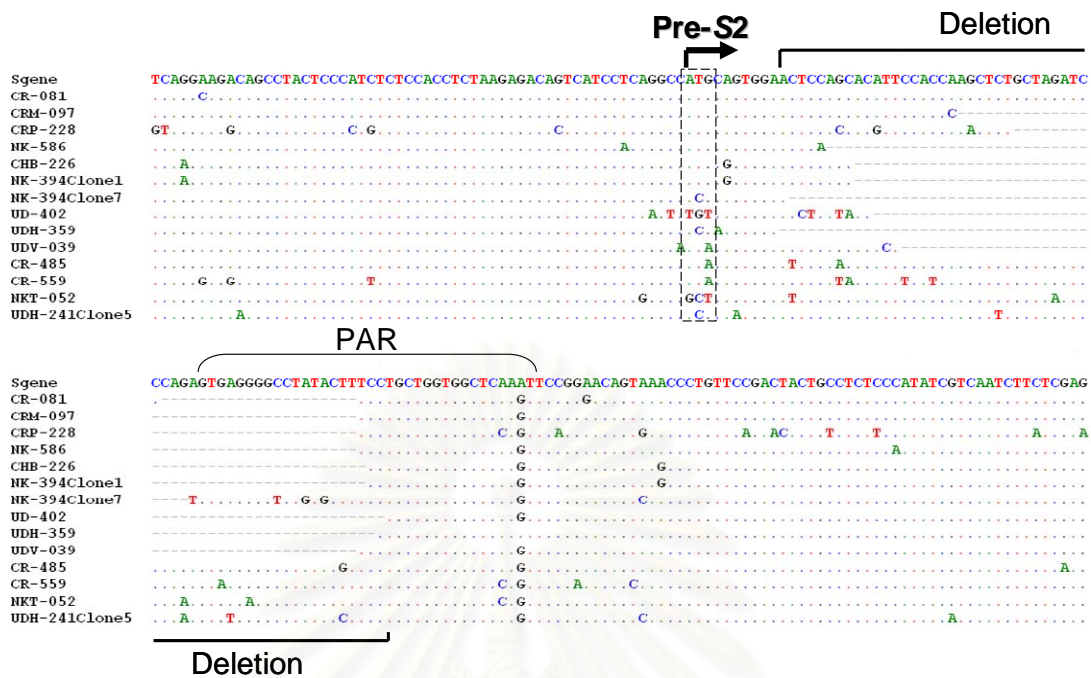
การกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene จากการศึกษานี้พบว่าสามารถจำแนกการกลายพันธุ์ออกเป็น 4 ลักษณะ ได้แก่ Deletion ที่ Pre-S2, กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2, Deletion ที่ Pre-S2 และ กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 และ Deletion ที่ Pre-S1 และไม่ก่อให้เกิด frame shift mutation แต่อย่างใด จำนวนทั้งสิ้น 14 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Huy และคณะ (53) ซึ่งได้ทำการศึกษานี้ในตัวอย่างจากประเทศต่างๆ รวม 12 ประเทศ รวมถึงประเทศไทยด้วย ทั้งหมด 387 ตัวอย่าง พบว่า สามารถจำแนกการกลายพันธุ์ออกเป็น 4 ลักษณะ เช่นเดียวกันกับการศึกษานี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลของตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ พบว่า ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์จะมีปริมาณของ HBsAg เฉลี่ย 378.77 ± 64.42 S/N ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ปกติมีปริมาณของ HBsAg เฉลี่ย 305.66 ± 111.00 พบว่าปริมาณสูงกว่าตัวอย่างที่ปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.017$) และตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์พบว่ามีอายุเฉลี่ย 41.21 ± 11.39 ปี ซึ่งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์มีอายุเฉลี่ย 32.34 ± 14.98 ปี พบว่าตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์มีอายุสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.033$) ซึ่งการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S gene อาจมีบทบาทสำคัญในการเกิดตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และกระบวนการการเกิดมะเร็งตับ (53)

Pre-S1 และ Pre-S2 gene ทำหน้าที่สำคัญในการสร้าง HBsAg ซึ่งมี receptor ที่สำคัญที่ทำหน้าที่จับกับผิวของเซลล์ตับ ลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ Pre-S1 จากการศึกษานี้พบว่าตำแหน่งที่เกิด deletion อยู่ในบริเวณ binding site ของ transcription factor ของ S promoter (รูปที่ 43) ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 3045-3180 (53) ซึ่งอาจส่งผลทำให้การสร้าง HBsAg ลดลง (54) แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลของตัวอย่าง CHP181 ซึ่งเกิดการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ตำแหน่ง Pre-S1 พบว่าปริมาณของ HBsAg จากผลของการทำ ELISA มีปริมาณ 349.95 S/N เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เกิด deletion บริเวณ Pre-S1 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการกลายพันธุ์ในการศึกษาในครั้งนี้อาจส่งผลอย่างอื่น หรืออาจมีปัจจัยอื่นทำให้ปริมาณของ HBsAg ในตัวอย่างนี้ไม่แตกต่างกับตัวอย่างอื่น



รูปที่ 43 แสดงตำแหน่งของ Pre-S1 ที่มีการขาดหายไป ของตัวอย่าง CHP-181 ซึ่งอยู่ในบริเวณ binding site ของ transcription factor ของ S promoter

จากการศึกษาของ Kondo และคณะ (55) ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง เมื่อทำการตรวจสอบพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ start codon ของ Pre-S2 gene และเกิด deletion ในส่วนของ Pre-S2 gene ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ (รูปที่ 44) เมื่อทำการศึกษาหาความสัมพันธ์กับการทำงานของ polymerized albumin receptor (PAR) ที่พบที่ผิวของเซลล์ตับ ซึ่งเป็น receptor ที่ไวรัสใช้ในการเข้าสู่เซลล์ตับ พบว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของ Pre-S2 gene ทั้งในส่วนของ start codon และ การเกิด deletion นั้นส่งผลให้ต่อการทำงานของ PAR ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งการทำงานของ PAR นั้นสัมพันธ์กับระดับของ HBV DNA polymerase ทำให้มีระดับลดลง ส่งผลต่อ viral replication



รูปที่ 44 แสดงตำแหน่งของ Pre-S2 ที่มีการกลายพันธุ์ ทั้ง deletion และ point mutation ซึ่งการเกิด deletion จะอยู่ในบริเวณของ PAR

ปัจจุบันยังพบว่ามีการระบาดของไวรัสตับอักเสบบี อยู่ในประเทศไทย จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ทำให้ทราบถึงระบาดวิทยาโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย ซึ่งไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็น genotype C และ subtype adr มากที่สุด ปัญหาของการให้วัคซีน ยังไม่พบปัญหาจากการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิด escape mutant แต่อาจเกิดปัญหาจากความล้มเหลวในการให้วัคซีน (vaccine failure) ทำให้ไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ และพบการกลายพันธุ์ในส่วน of Pre-S gene ในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งควรมีการศึกษาในเชิงลึกต่อไปเพื่อทำให้ทราบและเข้าใจกลไกของไวรัสตับอักเสบบี มากขึ้น ผลของการศึกษาในครั้งนี้ทำให้สามารถนำเป็นข้อมูลประกอบในการพัฒนาแผนการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ต่อไปได้

รายการอ้างอิง

1. Lok, A. S. Hepatitis B infection: Pathogenesis and management. H Hepatol 32 (2000): 89-97.
2. Purcell, R. H. The discovery of the hepatitis viruses. Gastroenterology 104 (1993): 955-963.
3. Beasley, R. P.; Hwang, L. Y.; Lin, C. C.; Chien, C. S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. Lancet ii (1981): 1129-1133.
4. Lok, A. S. K.; Lai, C. L. A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. Hepatology 8 (1988): 1130-1133.
5. Fattovich, G.; Guistina, G.; Schalm, S. W. et al. Occurance of hepatocellular carcinoma and decompensation in western European patients with cirrhosis type B. Hepatology 21 (1995): 77-82.
6. Liaw, Y. F.; Tai, D. I.; Chu, C. M.; Chen, T. J. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis. A prospective study. Hepatology 8 (1988): 493-496.
7. Villeneuve, J. P.; Desrochers, M.; Infante-Rivard, C. et al. A long-term follow-up study in asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal. Gastroenterology 106 (1994): 1000-5.
8. McMahon, B. J.; Alberts, S. R.; Wainwright, R. B.; Bulkow, L.; Lanier, A. P. Hepatitis B-related sequelae: prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers. Arch Intern Med 150 (1990): 151-154.
9. Hollinger, F. B.; Liang, T. J. Hepatitis B virus. In D. M. Knipe et al. (eds.), Fields virology. 4th ed., pp. 2971-3036. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
10. Purcell, R. H. The discovery of hepatitis viruses. Gastroenterology 104 (1993): 955-963
11. Robinson, W. S. Hepatitis B virus. In R. G. Webster; A. Garoff (eds.), Encyclopedia of virology, pp. 554-569. London: Academic Press, 1994.

12. Robinson, W. S. Hepatitis B virus and hepatitis D virus. In G. L. Mandell; J. E. Bennett; R. Dolin (eds.), Principles and practice of infectious diseases. 4th ed., pp. 1406-1439. New York: Churchill Livingstone, 1995.
13. Tiollais, P.; Pourcel, C.; Dejean, A. The hepatitis B virus. Nature 317 (1985): 489-495.
14. Gerlich, W. H.; Robinson, W. S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. Cell 21 (1980): 801-809
15. Will, H.; Reiser, W.; Weiner, T. et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. J Virol 61 (1987): 904-911.
16. Halliday, M. L.; Kang, L-Y.; Rankin, J. G. et al. An efficacy trial of a mammalian cell-derived recombinant hepatitis B vaccine in infants born to mothers positive to HBsAg in Shanghai, China. In J Epidemiol 21 (1992): 564-573.
17. Neurath, A. R.; Strick, N.; Sproul, P.; Ralph, H. E.; Valinsky, J. Detection of receptor for hepatitis B virus on cells of extrahepatic origin. Virology 176 (1990): 448-457.
18. Jean, O. J.; Levrero, M.; Will, H. Perricaudet, M.; Rossignol, J. M. Expression mechanism of the hepatitis B virus (HBV) C gene and biosynthesis of HBe antigen. Virology 170 (1989): 99-106.
19. Wang, G. H.; Seeger, C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. Cell 71 (1992): 663-670.
20. Lee, W. M. Hepatitis B virus infection. N Eng J Med 337 (1997): 1733-1745.
21. Ganem, D.; Schneider, R. J. Hepadnaviridae : The viruses and their replication. In D. M. Knipe et al. (eds.), Fields virology. 4th ed., pp. 2923-2969. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
22. Chisari, F. V.; Ferrari, C. Viral hepatitis. In N. Nathanson et al. (eds.), Viral pathogenesis, pp. 745-778. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
23. Ferrari, C.; Bertodetti, A.; Penna, A. et al. Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. J Clin Invest 88 (1991): 214-222.
24. Koziel, M. J. Cytokines and viral hepatitis. Sem Liver Dis 19 (1999): 157-169.

25. Okamoto, H.; Tsuda, F.; Sakugawa, H.; Sastrosoewignjo, R. I.; Imai, M.; Miyakawa, Y. and Mayumi, M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol 69 (1988): 2575-83.
26. Norder, H.; Couroucé, A. M.; Magnius, L. O. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. Virology 198 (1994): 489-503.
27. Stuyver, L.; De Gendt, S.; Van Geyt, C.; Zoulim, F.; Fried, M.; Schinazi, R. F.; Rossau, R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J Gen Virol 81 (2000): 67-74.
28. Arauz-Ruiz, P.; Norder, H.; Robertson, B. H.; Magnius, L. O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J Gen Virol 83 (2002): 2059-73.
29. Miyakawa, Y.; Mizokami, M. Classifying hepatitis B virus genotype. Intervirology 46 (2003): 329-338.
30. Kao, J. H.; Chen, P. J.; Lai, M. Y.; Chen, D. S. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology 118 (2000): 554-559.
31. Kao, J. H.; Wu, N. H.; Chen, P. J.; Lai, M. Y.; Chen, D. S. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. J Hepatol 33 (2000): 998-1001.
32. Akuta, N.; Suzuki, F.; Kobayashi, M.; Tsubota, A.; Suzuki, Y.; Hosaka, T. et al. The influence of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudines resistance during long-term treatment. J Hepatol 38 (2003): 312-315.
33. Tangkijvanich, P.; Mahachai, V.; Komolmit, P.; Fongsarun, J.; Theamboonlers, A.; Poovorawan, Y. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. World J Gastroenterol 11 (2005): 2238-2243.
34. Thakur, V.; Guptan, R. C.; Kazim, S. M. N.; Malhotra, V.; Sarin, S. K. Profile spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. J Gastroenterol Hepatol 17 (2002): 165-170.

35. Hou, J.; Schilling, R.; Jansen, H. L. A. et al. Molecular characteristics of hepatitis B virus genotype A confer a higher response rate to interferon treatment. J Hepatol 34 (2001): 15.
36. Kao, J. H. Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. J Gastroenterol Hepatol 17 (2002): 643-650.
37. Carman, W.; Thomas, H.; Domingo, E. Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example. Lancet 314 (1993): 349-353.
38. Norder, H.; Courouch, A. M.; Magnius, L. O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. J Gen Virol 73 (1992): 3141-3145.
39. Weber, B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. J Clin Virol 32 (2005): 102-112.
40. Hilleman, M. R.; McAleer, W. J.; Buynak, E. B. et al. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. J Infect 7 (1983): 3-9.
41. McAller, W. J.; Buynak, E. B.; Maigetter, R. Z.; Wampler, D. E.; Miller, W. J.; Hilleman, M. R. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 307 (1984): 178-80.
42. Hilleman, M. R. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. Infection 15 (1987): 3.
43. Chang, M. H.; Chen, C. J.; Lai, M. S. et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. N Eng J Med 336 (1997): 1855-1859.
44. Waters, J. A.; Kennedy, M.; Voet, P. et al. Loss of the common "a" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. J Clin Invest 90 (1992): 2543-2547.
45. Carman, W. F.; Zanetti, A. R.; Karayiannis, P. et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. Lancet 336 (1990): 325-329.
46. Terrault, N. A. The emerging importance of hepatitis B virus surface gene mutants. Viral Hepatitis Rev 3 (1997): 1-3.

47. Norder, H. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. Intervirology 47 (2004): 289-309.
48. ยง ภาววรรณ และ วรนุช จงศรีสวัสดิ์. วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบ: เรื่องความรู้สำหรับเวชปฏิบัติ. กรุงเทพฯ : เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, 2544.
49. Kaneko, S. et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. Proc. Natl. Acad. Sci USA 86 (1989): 312-316.
50. Theamboonlers, A.; Tangkijvanich, P.; Pramoolsinsap, C.; Poovorawan, Y. Genotype and subtype of hepatitis B virus in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 29 (1998): 786-791.
51. Huy, T. T. T.; Abe, K. Molecular epidemiology of hepatitis B and C virus infections in Asia. Pediatrics Inter 46 (2004): 223-230.
52. Gitlin, N. Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. Clin Chem 43 (1997): 1500-1506.
53. Huy, T. T. T. et al. High prevalence of hepatitis B virus Pre-S mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. J Clin Microbiol 41 (2003): 5449-5455.
54. Melegari, M.; Scaglioni, P. P.; Wands, J. R. The small envelope protein is required for secretion of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted. J Virol. 71 (1997): 5449-5454.
55. Kondo, J. et al. Mutations in the hepatitis B virus PreS2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. Acta Med Okayama 56 (2002): 193-198.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 5X Tris borate buffer (5X TBE)

Tris-base	54	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH8.0)	20	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ละลาย และ ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1X Tris borate buffer (1X TBE)

5X TBE	200	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

3. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel	4	กรัม
1XTBE	200	มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

4. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide	30	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

5. loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 °C

6. Proteinase K (20 mg/ml)

Proteinase K	100	มิลลิกรัม
Distilled water	5	มิลลิลิตร

7. Lysis buffer

Tris – HCl	0.105	กรัม
EDTA	0.1245	กรัม
SDS	0.335	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

8. LB/ampicilin/IPTG/X-Gal plate

Agar	3.75	กรัม
Peptone	2.5	กรัม
Yeast	1.25	กรัม
NaCl	1.25	กรัม
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch² ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น จากนั้นเติม ampicilin 100 mg/ml 250 µl จากนั้นเทลงบน plate ทิ้งไว้ให้เย็นจนแข็ง เติม IPTG 250 mg/ml 4 µl และ X-Gal 50 mg/ml 15 µl spread ให้ทั่ว plate จนแห้ง

9. LB broth/ampicilin

Peptone	0.5	กรัม
Yeast	0.25	กรัม
NaCl	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch² ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุ่น จากนั้นเติม ampicilin 100 mg/ml 50 µl

10. Soc medium

Tryptone	2.0	กรัม
Yeast	0.5	กรัม
1M NaCl	1	มิลลิลิตร
1 M KCl	0.55	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

นำไป autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch² ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้จนเย็น เติม 2M Mg²⁺ 1 มิลลิลิตร และ 2M glucose 1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

CODE	Age	Sex	PCR	Genotype	Subtype	Vaccine	HBsAg(S/N)	antiHBs	antiHBc(S/CO)	antiHAv	antiHCv
CR021	48	M	-			-	218.80	-	0.171	+	-
CR039	17	F	-			-	2.40	-	0.098	-	-
CR074	23	M	-			+	278.84	-	0.094	-	-
CR075	62	F	-			-	2.91	-	0.114	+	-
CR081	55	M	+	c	adr	-	250.97	-	0.101	+	-
CR082	40	M	+	c	adr	-	287.97	-	0.087	+	-
CR104	36	F	-			-	306.65	-	0.103	-	-
CR119	20	F	-			+	329.88	-	0.101	-	-
CR122	39	M	-			-	159.72	-	0.091	+	-
CR174	26	F	+	c	adr	-	298.84	-	0.168	+	-
CR194	13	F	+	c	adr	-	185.36	-	0.175	+	-
CR197	17	M	+	b	adw	+	379.32	-	0.147	+	-
CR198	17	M	-			+	269.97	-	0.224	+	-
CR219	47	F	+	c	adr	-	260.19	-	0.171	+	-
CR239	28	F	+	c	adr	+	324.54	-	0.122	-	-
CR244	42	F	+	c	adr	-	236.32	-	0.272	+	-
CR260	28	M	+	c	adr	-	205.16	-	0.172	+	-
CR264	54	M	+	c	adr	+	184.65	-	0.220	+	-
CR277	25	M	-			-	11.66	-	0.195	+	-
CR285	36	M	+	c	adr	-	179.20	-	0.174	+	-
CR307	13	M	+	c	adr	-	172.74	-	0.105	+	-
CR328	43	F	-			-	259.98	-	0.120	+	-
CR350	27	M	-			-	256.24	-	0.098	-	-
CR353	40	M	+	c	adr	-	210.37	-	0.088	+	-
CR354	43	M	+	c	adr	-	173.29	-	0.052	+	-
CR380	2	M	+	c	adr	-	132.40	-	0.142	-	-
CR393	25	M	+	c	adr	-	200.21	-	0.141	-	+
CR408	48	F	+	c	adr	-	247.54	-	0.167	+	-
CR429	17	M	+	b	adw	+	170.56	-	0.084	+	-
CR441	30	M	+	c	adr	-	239.39	-	0.113	+	-
CR450	29	M	-			-	238.87	-	0.165	+	-
CR451	29	F	-			-	247.40	-	0.178	-	-
CR455	31	F	-			-	237.58	-	0.127	+	-
CR470	36	M	+	c	adr	-	259.18	-	0.144	+	-
CR472	38	F	-			-	308.72	-	0.109	-	-
CR476	42	M	+	c	adr	-	195.43	-	0.090	+	-
CR485	48	M	+	c	adr	+	302.92	-	0.079	+	-
CR519	39	F	-			-	265.80	-	0.124	+	-
CR520	38	M	-			+	247.21	-	0.117	+	-
CR538	31	F	+			+	349.53	-	0.167	-	-
CR542	35	M	-			+	281.20	-	0.186	+	-
CR548	41	M	-			-	414.33	-	0.123	-	-

CODE	Age	Sex	PCR	Genotype	Subtype	Vaccine	HBsAg(S/N)	antiHBs	antiHBc(S/CO)	antiHAv	antiHCv
CR550	42	F	+	c	adr	-	287.77	-	0.111	-	-
CR551	42	M	+	c	adr	+	234.94	-	0.113	-	-
CR559	45	M	+	c	adw	+	396.16	-	0.131	-	-
CR589	37	F	+	c	adr	-	413.99	-	0.109	-	-
CR654	46	F	-			-	285.88	-	0.218	-	-
CR655	48	F	-			-	406.72	-	0.182	-	-
CR724	20	M	-			+	299.20	-	0.181	-	-
CR725	39	M	-			-	312.94	-	0.171	-	-
CR753	16	F	+	c	adr	-	340.69	-	0.175	-	-
CR777	13	M	+	c	adr	+	389.18	-	0.180	-	-
CR816	7	M	+	b	adw	+	400.40	-	0.077	+	-
CR819	17	M	+	b	adw	-	384.12	-	0.229	-	-
CR837	26	F	+	c	adr	-	438.21	-	0.216	+	-
CR857	20	F	+	c	adr	-	411.66	-	0.138	+	-
CR870	14	M	+	c	adr	-	41.47	-	0.073	-	-
CR871	9	F	+	c	adr	-	368.69	-	0.072	+	-
CR908	7	M	+	b	ayw	-	415.78	-	0.066	+	-
CRM003	32	1	+	c	adr	-	399.94	-	0.249	-	-
CRM014	47	2	+	c	adr	-	186.33	-	0.097	-	-
CRM040	39	2	-			-	467.54	-	0.117	-	-
CRM047	20	1	-			-	509.77	-	0.122	-	-
CRM062	35	2	-			-	422.20	-	0.129	-	-
CRM068	56	1	+	c	adr	-	362.64	-	0.238	-	-
CRM097	23	2	+	c	adr	+	431.60	-	0.158	-	-
CRM105	36	2	+	c	adr	+	262.91	-	0.194	-	-
CRM123	22	2	+	c	adr	+	359.18	-	0.258	-	-
CRM129	30	2	+			+	404.46	-	0.223	-	-
CRM133	24	1	+	b	adw	+	477.71	-	0.228	-	-
CRM148	48	1	+	c	adr	-	370.97	-	0.271	-	-
CRM165	55	1	-			-	370.14	-	0.124	-	-
CRM172	35	1	+	c	adr	-	481.68	-	0.218	-	-
CRM175	31	2	-			-	416.59	-	0.219	-	-
CRM182	38	2	-			-	128.30	-	0.168	-	-
CRM194	26	2	+	a	adw	-	348.33	-	0.226	-	-
CRM205	41	2	+	c	adr	-	444.99	-	0.176	-	-
CRM211	35	2	+	b	adw	-	527.81	-	0.192	-	-
CRM236	10	1	+	c	adr	+	290.88	-	0.178	-	-
CRP010	19	2	+	c	adr	-	188.33	-	0.112	-	-
CRP019	53	1	+	c	adr	-	262.24	-	0.135	-	-
CRP020	67	1	+	c	adr	-	258.50	-	0.165	-	-
CRP042	22	1	+	c	adr	+	132.19	-	0.148	-	-
CRP063	23	2	+	c	adr	-	189.78	-	0.403	-	-
CRP110	47	2	+	c	adr	-	228.10	-	0.060	+	-
CRP159	54	2	+	b	adw	-	517.08	-	0.148	-	-
CRP177	50	1	+	b	adw	-	538.91	-	0.079	-	-
CRP194	36	2	+	c	adr	-	511.04	-	0.236	-	-
CRP200	31	2	+	c	adw	-	438.15	-	0.222	-	-

CODE	Age	Sex	PCR	Genotype	Subtype	Vaccine	HBsAg(S/N)	antiHBs	antiHBc(S/CO)	antiHAv	antiHCv
CRP228	55	1	+	b	adw	-	440.64	-	0.191	-	-
CRP236	47	2	-			-	391.56	-	0.215	-	-
CRP296	32	2	-			-	438.92	-	0.188	-	-
CRP316	46	2	+	c	adr	-	367.58	-	0.066	-	-
NK153	45	2	+	c	adr	+	253.93	-	0.098	+	-
NK212	20	2	+	a	adw	-	478.50	-	0.191	-	-
NK310	33	2	+	c	adr	-	406.24	-	0.189	-	-
NK313	26	2	-			-	486.40	-	0.109	-	-
NK316	56	2	+	c	adr	-	383.36	-	0.303	-	-
NK347	52	1	+	c	adr	-	420.42	-	0.162	+	-
NK377	32	2	-			-	463.33	-	0.211	+	-
NK394	35	2	+	c	adr	+	487.88	-	0.114	-	-
NK417	42	1	+	c	adr	-	346.04	-	0.253	+	-
NK431	56	2	+	c	adr	-	429.71	-	0.164	-	-
NK435	25	2	-			-	494.29	-	0.148	-	-
NK518	21	2	+	c	adr	+	352.99	-	0.107	+	-
NK586	41	2	+	c	adr	-	428.23	-	0.248	-	-
NK652	33	1	+	c	adr	-	453.17	-	0.146	-	-
NK698	27	2	+	c	adr	-	315.89	-	0.092	-	-
NKS015	26	2				-	408.57	-	0.077	+	-
NKS124	59	2	+	c	adr	-	336.65	-	0.157	+	-
NKT009	20	2	+	c	adr	-	266.75	-	0.123	-	-
NKT052	58	2	+	c	adr	-	374.06	-	0.183	-	-
NKT095	37	2	+	c	adr	-	441.26	-	0.136	-	-
NKT110	13	2	+	c	adr	+	229.79	-	0.072	-	-
NKT265	33	1	+	c	adr	+	366.19	-	0.141	+	-
NKT357	17	1	+	c	adr	-	370.09	-	0.072	-	-
NKT359	40	2	+	c	adr	-	409.28	-	0.053	-	-
NKT363	6	1	-			-	243.30	-	0.114	-	-
UD008	33	1	+	c	adr	-	304.92	-	0.095	-	-
UD021	51	1	+	c	adr	-	323.38	-	0.105	+	-
UD045	32	2	+	b	ayw	-	442.64	-	0.136	+	-
UD049	11	1	+	c	adr	+	338.19	-	0.127	-	-
UD054	17	1	+	c	adr	-	246.10	-	0.160	+	-
UD068	18	1	+	c	adr	+	145.94	-	0.227	-	-
UD100	44	1	+	c	adr	-	248.46	-	0.177	+	-
UD136	26	1	-			-	153.63	-	0.180	-	-
UD156	51	2	+	c	adr	-	206.62	-	0.151	+	-
UD157	45	2	+	c	adr	-	280.53	-	0.160	+	-
UD176	30	1	+	c	adr	-	75.08	-	0.109	+	-
UD182	47	2	+		adr	-	231.77	-	0.164	+	-
UD210	34	2	+	c	adr	-	126.33	-	0.152	+	-
UD213	29	1	+	c	adr	-	117.87	-	0.129	+	-
UD265	30	2	+	c	adr	-	342.96	-	0.118	-	-
UD296	34	2	+	c	adr	-	417.97	-	0.121	-	-
UD299	59	1	+	c	adr	-	271.78	-	0.118	-	-
UD402	41	1	+	c	adr	-	375.98	-	0.124	-	-

CODE	Age	Sex	PCR	Genotype	Subtype	Vaccine	HBsAg(S/N)	antiHBs	antiHBc(S/CO)	antiHAV	antiHCv
UD482	56	1	+	c	adr	-	302.62	-	0.144	+	-
UD515	21	1	-			+	6.86	-	0.148	-	-
UD572	51	2	+	c	adr	-	180.21	-	0.137	-	-
UD585	16	2	+	c	adr	-	293.88	-	0.302	-	-
UD589	59	2	+	c	adr	-	374.83	+	0.202	-	-
UD636	18	1	+	c	adr	+	217.76	-	0.127	-	-
UD672	19	1	+	c	adr	-	280.02	-	0.131	-	-
UD767	8	1	+	c	adr	+	268.64	-	0.138	-	-
UDH199	17	1	-			-	373.04	-	0.168	-	-
UDH226	22	1	+	c	adr	+	216.26	-	0.136	-	-
UDH241	27	1	+	c	adr	+	363.89	-	0.176	-	-
UDH268	22	2	+	c	adr	-	369.73	-	0.155	-	-
UDH276	32	1	+	c	adr	-	292.95	-	0.116	+	-
UDH308	34	2	-			+	258.49	-	0.139	-	-
UDH359	42	1	+	c	adr	-	416.75	-	0.071	-	-
UDH398	60	2	+	c	adr	-	326.29	-	0.076	-	-
UDH419	53	1	-			-	359.48	-	0.073	-	-
UDV028	56	2				-	3.03	-	0.156	+	-
UDV035	51	1	+	c	adr	-	309.69	-	0.077	-	-
UDV039	25	2	+	c	adr	+	290.18	-	0.080	-	-
UDV044	22	2	+	c	adr	-	272.09	-	0.184	-	-
UDV045	26	2				-	324.75	-	0.139	-	-
UDV050	31	2	+	c	adr	+	283.18	-	0.097	+	-
UDV058	34	2	+	c	adr	+	248.41	-	0.089	-	-
UDV071	22	1				-	179.32	-	0.103	-	-
UDV116	22	2	+	c	adr	-	263.37	-	0.204	-	-
UDV120	48	1	+	c	adr	-	368.00	-	0.142	-	-
UDV133	50	2	+	c	adr	-	303.01	-	0.172	-	-
UDV150	24	1				+	539.59	-	0.164	-	-
UDV153	48	2	+	c	adr	+	257.86	-	0.221	-	+
UDV229	29	2				-	222.29	-	0.188	-	-
UDV329	15	1				-	397.98	-	0.087	-	-
UDV353	16	2				+	382.22	-	0.089	-	-
UDV387	18	1	+	c	adr	-	316.66	-	0.139	-	-
UDV395	20	1	+	c	adr	-	379.36	-	0.073	-	-
UDV396	20	1	+	c	adr	-	46.61	-	0.937	-	-
UDV399	22	1	+	c	adr	-	267.24	-	0.108	-	-
UDV400	26	2	+	c	adr	+	402.54	-	0.080	-	-
UDV408	20	1	+	c	adr	-	354.66	-	0.078	-	-
UDV410	24	1	+	c	adr	-	386.85	-	0.078	-	-
UDV441	37	1				-	4.22	-	0.076	-	-
CH095	4		+	c	adr	+	345.47	-	0.069	-	-
CH207	8	2	+	c	adr	+	2.70	-	1.529	-	-
CH341	15	1	+	c	adr	+	380.14	-	0.061	+	-
CH391	38	1	+	c	adr	-	258.27	-	0.157	+	-
CH425	54	1	+	b	adw	-	10.04	-	0.065	+	-
CH496	39	1	-			-	413.02	-	0.141	-	-

CODE	Age	Sex	PCR	Genotype	Subtype	Vaccine	HBsAg(S/N)	antiHBs	antiHBc(S/CO)	antiHAV	antiHCv
CH514	49		+	b	adw	-	257.48	-	0.156	-	-
CH601	38	2	+	c	adr	-	111.71	-	0.122	-	-
CH619	48	2	+	b	adw	-	495.87	-	0.077	+	-
CH703	21		+	b	adw	+	430.80	-	0.070	-	-
CH854	7		+	c	adr	-		-		-	-
CHA163	19	1	+	c	adr	+	335.33	-	0.07	-	-
CHA243	39	1				-	2.22	-	0.069	+	+
CHA254	40	2				-	3.41	+	0.081	+	-
CHA255	46	1				-	444.01	-	0.068	+	-
CHB165	29	1				-	434.00	-	0.071	-	-
CHB212	39	1	+	c	adr	+	213.89	-	0.073	+	-
CHB215	47	2	+	c	adr	-	452.04	-	0.072	+	-
CHB226	49	1	+	c	adw	-	393.63	-	0.140	-	-
CHP038	28	2	+	c	adw	+	392.39	-	0.060	-	-
CHP107	36	2	+	b	adw	-	406.54	-	0.086	-	-
CHP126	20	2	+	b	adw	-	437.84	-	0.044	-	-
CHP151	56	2	+	c	adr	-	308.97	-	0.081	-	-
CHP181	33	2	+	c	adr	-	349.95	-	0.055	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล กมล สุวรรณการ เพศ ชาย
 อายุ 24 ปี เกิด 19 กรกฎาคม 2524
 สถานที่เกิด โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพฯ
 ที่อยู่ 1909 ถ.สุขุมวิท ต.สำโรงเหนือ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
 ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)
 จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2546
ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร
 การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.
 2547

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

- Suwannakarn, K.; Tangkijvanich, P.; Theamboonlers, A.; Abe, K.; Poovorawan, Y.
 A novel recombinant of hepatitis B virus genotype G and C isolated from a Thai
 patient with hepatocellular carcinoma. J Gen Virol 86 (2005); 3027-3030.

การนำเสนอผลงาน

- นำเสนอผลงานในหัวข้อเรื่อง ไวรัสตับอักเสบ บี ลูกผสมสายพันธุ์ genotype G และ C ใน
 การประชุมกลุ่มเมธีวิจัยอาวุโส สกว.ศ.นพ.ยง ภู่วรรณ วันที่ 27 มกราคม 2549 ณ ห้อง
 ประชุมมณคลนาวิน ตึก ส.ก. ชั้น 10

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย