ความคงตัวของพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในตัวอย่างพลาสมาที่เก็บไว้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน

นายภัคพล รัตนชัยสิทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Stability of hepatitis B virus pregenomic RNA in plasma specimens stored for 48 hours at different times and temperatures

Mr. Pakkapon Rattanachaisit

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medicine
Department of Medicine
FACULTY OF MEDICINE
Chulalongkorn University
Academic Year 2019
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความคงตัวของพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในตัวอย่างพลาสมาที่เก็บไว้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน
โดย	นายภัคพล รัตนชัยสิทธิ์
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ชุษณา สวนกระต่าย)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ปฏิญัฐ บูรณะทรัพย์ขจร)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ทวีศักดิ์ แทนวันดี)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภัคพล รัตนชัยสิทธิ์ : ความคงตัวของพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในตัวอย่างพลาสมาที่เก็บไว้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน. (Stability of hepatitis B virus pregenomic RNA in plasma specimens stored for 48 hours at different times and temperatures) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. นพ.ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ.ยง ภู่วรวรรณ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในตัวอย่าง พลาสมา ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียสภายในเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีการศึกษา: นำตัวอย่างพลาสมาจากผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี จำนวน 40 คน โดยเจาะเลือด และปั่นแยกภายในเวลา 2 ชั่วโมง นำพลาสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาเซลเซียสที่เวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดระดับพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอพร้อมกัน โดยวิธีดิจิทัลพีซีอาร์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอ ตั้งต้นและที่อุณหภูมิและจุดเวลาต่าง ๆ

ผลการศึกษา: การเปลี่ยนแปลงของระดับพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอ เทียบกับเวลาตั้งต้น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลาการจัดเก็บตั้งแต่ 12 ชั่วโมงขึ้นไป ในอุณหภูมิจัดเก็บ 4 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิจัดเก็บ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลาการจัดเก็บตั้งแต่ 6 ชั่วโมงขึ้นไป แต่การเปลี่ยนแปลงของระดับพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอไม่มากกว่า 0.5 log จำนวนตัวต่อมิลลิลิตร จึงไม่มีนัยสำคัญทางคลินิก

สรุปผล: ระดับพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอในพลาสมามีความคงตัวที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียสในทุกช่วงเวลาระหว่าง 48 ชั่วโมง ก่อนกระบวนการวัดระดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สาขาวิชา	อายุรศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2562	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

6174065830 : MAJOR MEDICINE
KEYWORD: hepatitis B, pregenomic RNA, stability

Pakkapon Rattanachaisit : Stability of hepatitis B virus pregenomic RNA in plasma specimens stored for 48 hours at different times and temperatures. Advisor: Assoc. Prof. PIYAWAT KOMOLMIT, M.D. Co-advisor: Prof. YONG POOVORAWAN, M.D.

Objective: To demonstrate the effect of two different temperatures (4 °C and 25 °C) and storage times up to 48 hours on Hepatitis B virus (HBV) pregenomic RNA (pgRNA) stability.

Methods: Blood from forty chronic hepatitis B patients were collected and processed within 2 hours. The plasma sample of each patient was divided and stored at 4 °C and 25 °C until the six different time points (0, 2, 6, 12, 24 and 48 hours). The quantification of pgRNA from all samples was performed by the digital polymerase chain reaction (PCR) method. The differences in pgRNA level at baseline and each time point were compared.

Results: The mean change of pgRNA levels compared to the initial sample were statistically significant decreased from the initial values after 12 hours at 4 °C and after 6 hours at 25 °C. However, these changes were within 0.5 log10 copies/mL which were not considered clinical significance.

Conclusions: The plasma level of HBV pgRNA is stable at 4 °C and room temperature at least up to 48 hours before the quantification process.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study:	Medicine	Student's Signature ....
Academic Year:	2019	Advisor's Signature ....
		Co-advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยเฉพาะรองศาสตราจารย์ดอกเตอร์นายแพทย์ปิยะวัฒน์ โกมลมิศร์ และศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ ที่คอยให้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ขอขอบพระคุณคณาจารย์หน่วยโรคระบบทางเดินอาหารทุกท่านที่ได้ให้โอกาสและสนับสนุนในการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอบพระคุณพยาบาลและเจ้าหน้าที่ศูนย์โรคตับ หน่วยโรคระบบทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างเลือดและขอบพระคุณผู้ป่วย ทุกท่านที่เสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าร่วมโครงการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชาย รวมถึงคนใกล้ชิดที่คอยเป็น กำลังใจ ให้คำแนะนำ และสนับสนุนการทำงานวิจัยและการเรียนมาโดยตลอด

ภัคพล รัตนชัยสิทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ... ง

กิตติกรรมประกาศ ... จ

สารบัญ ... ฉ

สารบัญตาราง ... ฌ

สารบัญรูปภาพ ... ญ

บทที่ 1 บทนำ ... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย ... 1

1.2 คำถามของการวิจัย ... 4

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย ... 4

1.4 สมมติฐาน ... 4

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย ... 5

1.6 รูปแบบการวิจัย ... 5

1.7 ปัญหาทางจริยธรรม ... 5

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย ... 6

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรฐานการแก้ไข ... 6

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ... 8

2.1 ไวรัสวิทยา ... 8

2.2 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี ... 9

2.3 HBV RNA ... 11

2.4 HBV pregenomic RNA (HBV pgRNA) ... 12

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5 ประโยชน์ทางคลินิกของ HBV pgRNA 13
2.6 การวัดระดับ RNA ทางห้องปฏิบัติการ 15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 18
3.1 รูปแบบวิธีวิจัย 18
3.2 ระเบียบวิธีวิจัย 18
3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง 19
3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย 19
3.5. การรวบรวมข้อมูล 29
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้วิเคราะห์ 29
3.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดโครงการ 30
3.8 สถานที่ทำวิจัย 30
3.9 งบประมาณ 30
บทที่ 4 ผลการวิจัย 31
4.1 ระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน 31
4.2 เปรียบเทียบระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน 31
4.3 ค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันเทียบจากระดับตั้งต้น 35
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37
5.1 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย 37
5.2 ข้อเด่นของการศึกษา 41
5.3 ข้อด้อยของการศึกษา 41
5.4 ข้อเสนอแนะ 42
ภาคผนวก 43
ภาคผนวก ก ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย 44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข แบบบันทึกข้อมูล......48

ภาคผนวก ค ข้อมูลรายละเอียดระดับ pgRNA (log10 copies/mL) ในผู้ป่วยจำนวน 40 คน....49

บรรณานุกรม......50

ประวัติผู้เขียน......56

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 35

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย 5
รูปที่ 2 อนุภาคของไวรัสตับอักเสบบี 8
รูปที่ 3 จีโนมของไวรัสตับอักเสบบี 9
รูปที่ 4 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี 11
รูปที่ 5 Open reading frame ของไวรัสตับอักเสบบีและตำแหน่งลำดับเบสของ RNA ชนิดต่าง ๆ 11
รูปที่ 6 การเพิ่มขึ้นของ pgRNA virion หลังได้รับยา nucleot(s)ide analogues (NAs) 13
รูปที่ 7 แผนภาพวิธีการวิจัย 21
รูปที่ 8 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge, Eppendorf 5810R) 23
รูปที่ 9 ส่วนประกอบในเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) 23
รูปที่ 10 ไมโครปิเปตแบบหลายช่องดูด (Multichannel micropipette, Eppendorf) 24
รูปที่ 11 ถาดหลุมไมโครเพลท (Microplate) 24
รูปที่ 12 QIAsymphony DSP Virus/Pathogen minikit (Qiagen Gmbh, Germany) 25
รูปที่ 13 เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PCR) (Eppendorf) 25
รูปที่ 14 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) 26
รูปที่ 15 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) 26
รูปที่ 16 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) 27
รูปที่ 17 Program QuantaSoft^{TM} version 1.7 (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) 27
รูปที่ 18 ตู้เก็บรักษาพลาสมา 25 องศา 28
รูปที่ 19 ตู้เย็นเก็บรักษาพลาสมา -70 องศา 28
รูปที่ 20 ระดับ HBV pgRNA ในหน่วย log10 copies/mL ของผู้ป่วยแต่ละรายที่อุณหภูมิ จัดเก็บ 4 องศาเซลเซียส 32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 21 ระดับ HBV pgRNA ในหน่วย log10 copies/mL ของผู้ป่วยแต่ละรายที่อุณหภูมิ จัดเก็บ 25 องศาเซลเซียส 33

รูปที่ 22 ค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดมาตรฐาน (standard error) ของระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน 34

รูปที่ 23 มัธยฐาน (median), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25 (25th percentile, P25), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75 (75th percentile, P75) ของระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน 34

รูปที่ 24 ค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันเทียบจากระดับตั้งต้น 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (Chronic hepatitis B infection) เป็นสาเหตุที่สำคัญเหตุหนึ่งของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากโรคตับทั่วโลก องค์การอนามัยโลกได้ประมาณการว่าทั่วโลกมีผู้ติดเชื้อไวรัส ตับอักเสบบีเรื้อรัง ร้อยละ 3.5 ของ ประชากรโลก หรือประมาณ 257 ล้านคน ในปี ค.ศ.2015(1) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถนำไปสู่ ภาวะตับแข็งและมะเร็งตับได้ แม้ว่าในปัจจุบันจะไม่สามารถ กำจัดไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังได้อย่างถาวร แต่การจำกัดปริมาณไวรัสและป้องกันโรคได้รับการพัฒนาขึ้น อย่างมาก องค์การอนามัยโลกตั้งเป้าหมายว่า จะสามารถกำจัดไวรัสตับอักเสบให้ได้ภายในปี ค.ศ.2030 (2)

การรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในปัจจุบัน มีการใช้ยาใน 2 กลุ่มหลักได้แก่ interferon และ nucleos(t)ide analogues (NUC) ยา Pegylated interferon-alpha (PegIFN-α) ซึ่งให้โดยการฉีดใต้ผิวหนัง 48 สัปดาห์สามารถกดระดับไวรัสลงได้ ร้อยละ 25 ของผู้ป่วยที่ได้รับยานี้ แต่มีผลข้างเคียงมาก (3, 4) ยาในกลุ่ม nucleos(t)ide analogues สามารถกดระดับไวรัสลงได้ดีกว่า เมื่อใช้ยาที่มีประสิทธิภาพสูง และโอกาสดื้อยาต่ำ เช่นยา tenofovir หรือ entecavir (3, 4) อย่างไรก็ตามต้องให้ยาในระยะยาวและอาจเกิดผลข้างเคียงจากยา ในระยะยาวได้ ประโยชน์สำคัญของการรักษาด้วยยาทั้งสองกลุ่มนอกจากจะลดระดับไวรัสแล้วยังลดโอกาส การเกิดมะเร็งตับด้วย โดยเป้าหมายของการรักษา ซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับผลลัพธ์ที่ดีทั้งในแง่การหยุดยาได้ และลดการเกิดมะเร็งตับ คือการที่ไม่สามารถตรวจพบ small envelope

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

antigen (HBsAg) แต่โอกาสที่จะเกิดการสูญเสีย HBsAg พบว่าไม่ถึงร้อยละ 10 ของผู้ป่วยที่ได้รับการรักษา (3, 4)

ในปัจจุบันเป้าหมายการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ไม่ได้มุ่งเน้นไปเพียงแค่การลดระดับไวรัสได้ หากแต่มีเป้าหมายเพื่อกำจัดสารพันธุกรรมของเชื้อออกจากเซลล์ตับ โดยแบ่งเป้าหมายได้ดังนี้ (5, 6)

1. Functional cure คือการที่สูญเสีย HBsAg โดยอาจจะเกิด anti-HBs หรือไม่ก็ได้ร่วมกับไม่พบ DNA ของเชื้อในเลือด แต่ยังมี cccDNA ในเซลล์ตับ ภาวะดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อถูกจำกัดโดย ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยและสามารถหยุดยาได้

2. Complete sterilizing cure คือ การเกิด functional cure ร่วมกับการกำจัด cccDNA ออกจากเซลล์ตับได้ รวมทั้งกำจัด integrated HBV DNA

3. Partial cure คือ การที่ยังตรวจพบ HBsAg แต่ไม่พบ DNA ของเชื้อในเลือดหลังหยุดการรักษาด้วยยาต้านไวรัส

ในการรักษาด้วยยาในปัจจุบันโอกาสที่จะบรรลุเป้าหมายดังกล่าวยังน้อย จึงเป็นที่มาของความพยายาม ในการวิจัยและพัฒนายาใหม่ ๆ ในการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังตามกลไกของเชื้อในการแบ่งตัว เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพในการลดระดับไวรัสและบรรลุเป้าหมาย Functional cure หรือ Complete sterilizing cure อย่างไรก็ตามผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ไม่สามารถบรรลุเป้าหมายดังกล่าวได้ ยังต้องได้รับการรักษาด้วยยา ในระยะยาว จึงเป็นที่มาของการใช้ตัวชี้วัดเพื่อติดตามการรักษา ประเมินระยะโรค ทำนายโอกาส ในการเกิดมะเร็งตับ รวมทั้งโอกาสในการหยุดยา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตัวชี้วัดที่มีใช้ในปัจจุบันเช่น การวัดปริมาณไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA quantitation) และการวัดระดับ quantitative HBsAg สามารถให้ข้อมูลที่สำคัญในการประเมินระยะโรค ทำนายโอกาสในการเกิดมะเร็งตับ และติดตามผลการรักษาโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังในปัจจุบัน (7, 8) สำหรับตัวชี้วัดใหม่ที่เริ่มมีการศึกษาและวิจัยมากขึ้น ได้แก่ ระดับ HBV RNA, ระดับ Hepatitis B Core-Related Antigen (HBcrAg), ระดับ Hepatitis B e Antigen (HbeAg) และระดับ Hepatitis B core Antibody (Anti-HBc) พบว่าสามารถใช้ติดตามการรักษา ประเมินระยะโรค ทำนายโอกาสในการเกิดมะเร็งตับ รวมทั้งโอกาสในการหยุดยา และที่สำคัญคือการใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาใหม่ เช่นยาที่มีเป้าหมายยับยั้งการทำงานของ cccDNA โดยใช้ระดับ HBV RNA หรือระดับ HBcrAg หรือ ระดับ Anti-HBc ในยาที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune-modulatory therapies)(8)

การศึกษาพบ pregenomic RNA (HBV pgRNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ถูกสร้างจาก cccDNA ของเชื้อไวรัส ตับอักเสบบีโดยตรง และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางคลินิกดังที่ได้กล่าวข้างต้น(9) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลพื้นฐาน ในด้านความคงตัวของสารพันธุกรรมนี้ที่เวลาและอุณหภูมิในการจัดเก็บที่ต่างกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

โดยทั่วไป RNA เป็นโมเลกุลที่ไม่คงตัว สามารถถูกย่อยสลายได้ในสภาวะแวดล้อม และระหว่างกระบวนการวัดปริมาณ ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดความไม่คงตัวของ RNA คือ การปนเปื้อนของ เอนไซม์ไรโบนิวคลิเอส (ribonuclease หรือ RNase) การปนเปื้อนของตัวยับยั้ง (inhibitor) รวมทั้งปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ หรือปัจจัยจากเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณ(10)

สำหรับแนวทางปฏิบัติในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กระบวนการวิเคราะห์ปริมาณไวรัส ของ ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ให้นำส่งตัวอย่างเลือดภายใน 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส หากไม่ทันใน 4 ชั่วโมง สามารถปั่นแยกพลาสมาที่อุณภูมิห้อง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ได้นาน 3 วัน หรือแช่แข็งได้นาน 1 เดือน (11) ในระดับประเทศคาดว่าการส่งตัวอย่างเลือด สามารถนำส่งห้องปฏิบัติการ หรือระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เนื่องจากยังขาดข้อมูลในด้านความคงตัวของสารพันธุกรรมนี้ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อ เปรียบเทียบผลของการเก็บตัวอย่างพลาสมา ไว้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส ว่ามีผลต่อระดับ HBV pgRNA หรือไม่

1.2 คำถามของการวิจัย

คำถามหลัก ระดับHBV pgRNA ใน plasma ไม่เปลี่ยนแปลงในการเก็บที่ อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียสที่เวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหรือไม่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

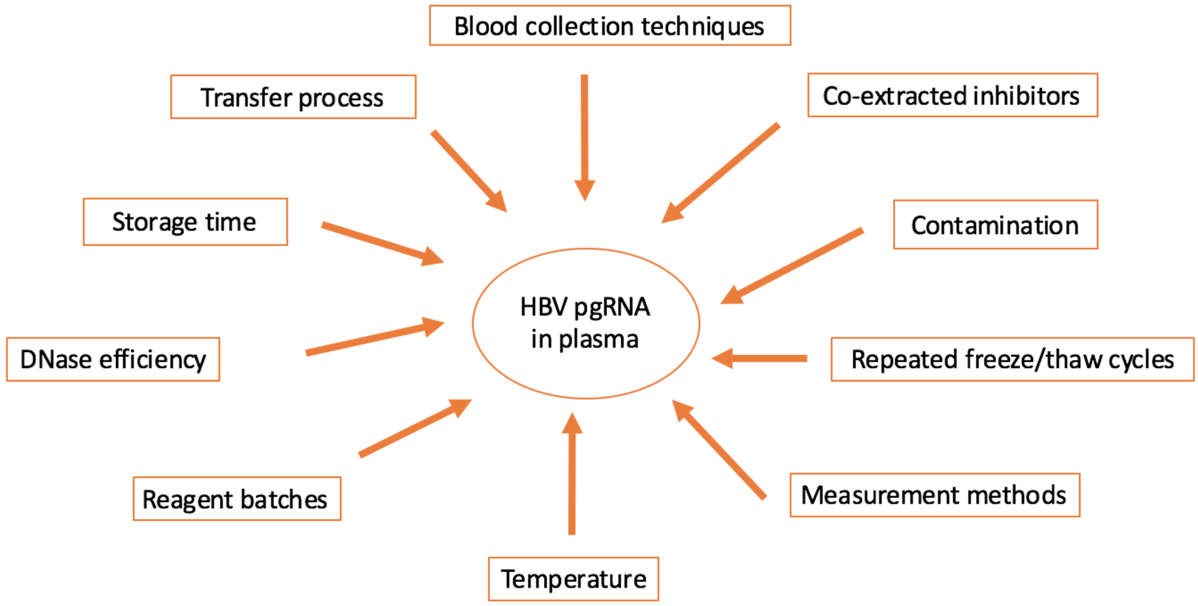
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลัก เปรียบเทียบระดับHBV pgRNA ในตัวอย่างพลาสมา ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียสที่เวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

1.4 สมมติฐาน

ระดับ HBV pgRNA ใน plasma ไม่เปลี่ยนแปลงในการเก็บที่ อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียสที่เวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย



รูปที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

1.6 รูปแบบการวิจัย

Descriptive study, repeated measurement

1.7 ปัญหาทางจริยธรรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

<u>หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person)</u>

ผู้วิจัยจะเก็บความลับของอาสาสมัครโดยไม่มี identifier ในแบบบันทึกข้อมูลที่จะระบุถึงตัว อาสาสมัคร ผู้ที่จะสามารถเข้าถึงข้อมูลผู้ป่วยมีเฉพาะผู้วิจัยหลักเท่านั้นและอาสาสมัครทุกรายจะ ได้รับข้อมูลเกี่ยวกับรายละเอียดงานวิจัย วัตถุประสงค์ ประโยชน์และผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นได้อย่าง ครบถ้วนและได้รับความยินยอมจากผู้ป่วย

<u>หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non–maleficence)</u>

ผู้ป่วยจะได้รับประโยชน์จากงานวิจัยนี้ เนื่องจากทราบปริมาณ HBV pgRNA ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามการรักษาต่อไปในอนาคต

ความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นต่อตัวผู้ป่วย ได้แก่ การเจาะเลือดทำให้เกิดการช้ำและติดเชื้อบริเวณที่เจาะ เลือดได้ ทำให้ผู้ป่วยเสียเวลาในการเดินทางและเจาะเลือด ทั้งนี้ผู้เจาะเลือดเป็นเจ้าหน้าที่วิจัยที่มี ประสบการณ์สูงเพื่อให้ความมั่นใจต่อผู้ป่วย

<u>หลักความยุติธรรม (Justice)</u>

มีเกณฑ์การคัดเข้าและออกชัดเจน ผู้ป่วยทุกคนจะได้รับการเจาะเลือดและปฏิบัติอย่างเท่าเทียมกัน

1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

นำข้อมูลเป็นพื้นฐานในการจัดเก็บ HBV pgRNA เพื่อสร้างแนวทางปฏิบัติการตรวจ วัดระดับ HBV pgRNA และใช้เป็นข้อมูลในการทำงานวิจัยเปรียบเทียบระดับ HBV pgRNA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรฐานการแก้ไข

เนื่องจากเป็นตัวชี้วัดใหม่ที่ยังไม่มีการศึกษามากนัก และยังไม่ได้ใช้ในงานบริการทางคลินิก ทำให้ต้องมีการประชาสัมพันธ์ที่ดี และเชิญชวนผู้ป่วย ให้ทราบถึงประโยชน์ของการศึกษานี้ รวมทั้งในขั้นตอนการจัดเก็บและวัดระดับ อาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อการวัดระดับ HBV pgRNA เช่น ความแปรปรวนของเครื่องมือที่ใช้วัด, การปนเปื้อนของ RNase และ

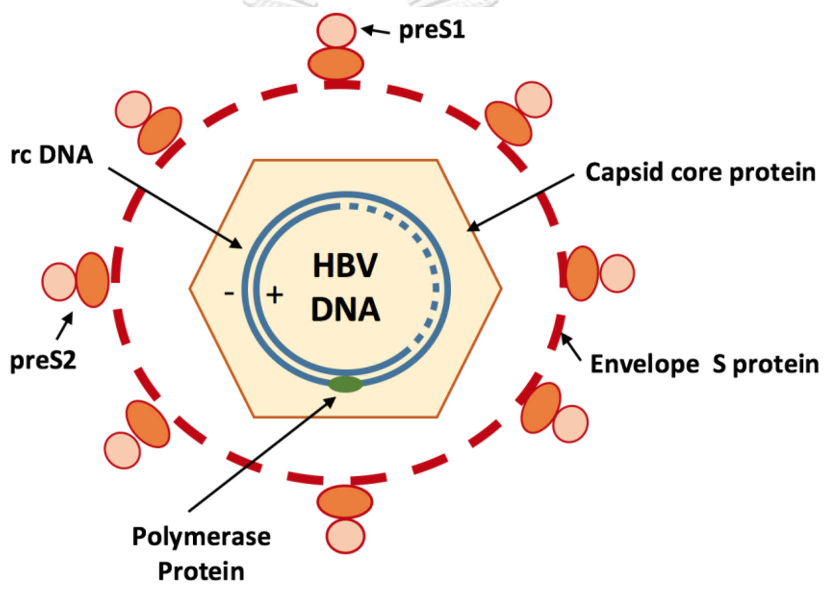
inhibitor เป็นต้น จึงต้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน มีการใช้น้ำยามาตรฐาน และเครื่องมือมาตรฐานในเวลาเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไวรัสวิทยา

ไวรัสตับอักเสบบี จัดอยู่ในกลุ่มดีเอ็นเอไวรัส สกุล *Hepadnaviridae* อนุภาคของไวรัสที่สามาถ ติดต่อได้ (Dane particle) ประกอบด้วยสารพันธุกรรมของไวรัส เอนไซม์โพลีเมอเรส (polymerase) และโปรตีนของไวรัส ดังแสดงในรูปที่ 2 (12)

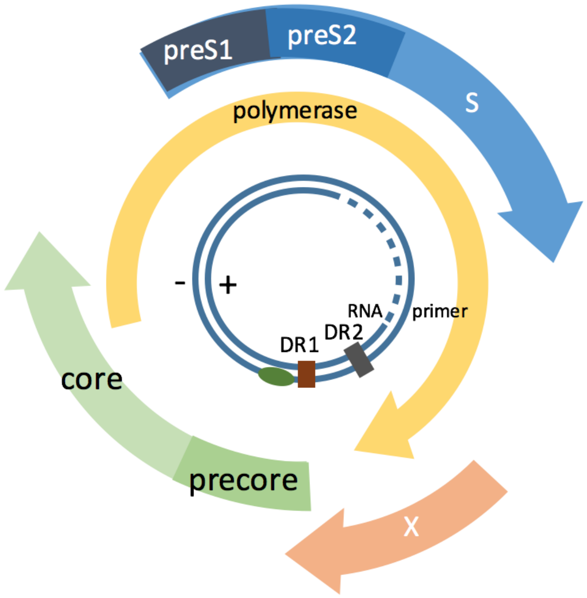


CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2 อนุภาคของไวรัสตับอักเสบบี

สารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี เป็นโครงสร้างดีเอ็นเอที่มีมีลักษณะวงกลมสายคู่แบบไม่สมบูรณ์ (relaxed, circular, partial double strand) ขนาด 3.2 กิโลเบส โดยสายลบครบวงกลม และสายบวกไม่ครบวงกลม จีโนมของไวรัส ประกอบด้วย open reading frames ที่ทับซ้อนกันจำนวน 4 กลุ่มได้แก่ 1. Polymerase region ถอดรหัสเป็น เอนไซม์ polymerase ซึ่งทำงานเป็นทั้ง DNA polymerase, reverse transcriptase และ RNase 2. Core region ถอดรหัสเป็น

โปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรม (nucleocapsids) และ e antigen (HBeAg) 3. Surface (S) region ถอดรหัสเป็น s antigen (HBsAg) สำหรับ สร้างเปลือกหุ้มไวรัส (glycoprotein envelope) และ 4. X region ถอดรหัสเป็นโปรตีน X (12, 13) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 จีโนมของไวรัสตับอักเสบบี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี

อนุภาคไวรัสตับอักเสบบีที่ประกอบด้วย DNA และเอนไซม์ polymerase จะจับกับผิวของเซลล์ตับ และเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ endocytosis โดยภายใน cytoplasm ส่วนของเปลือกหุ้มจะถูกแยกออก (uncoating) สารพันธุกรรมในรูปแบบ relaxed circular DNA (rcDNA) จะเข้าสู่นิวเคลียส และผ่านการซ่อมแซมเพื่อสร้างเป็น DNA สายคู่ครบวงกลมในรูปแบบ covalently closed circular DNA (cccDNA) การสร้าง cccDNA นี้เป็นจุดสำคัญ ของวงจรชีวิตไวรัสเพื่อเป็นแม่แบบในการถอดรหัส ทางพันธุกรรมต่อไป (13, 14)

RNA ที่เกิดจากการถอดรหัสของ cccDNA แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่สร้างเป็นจีโนม

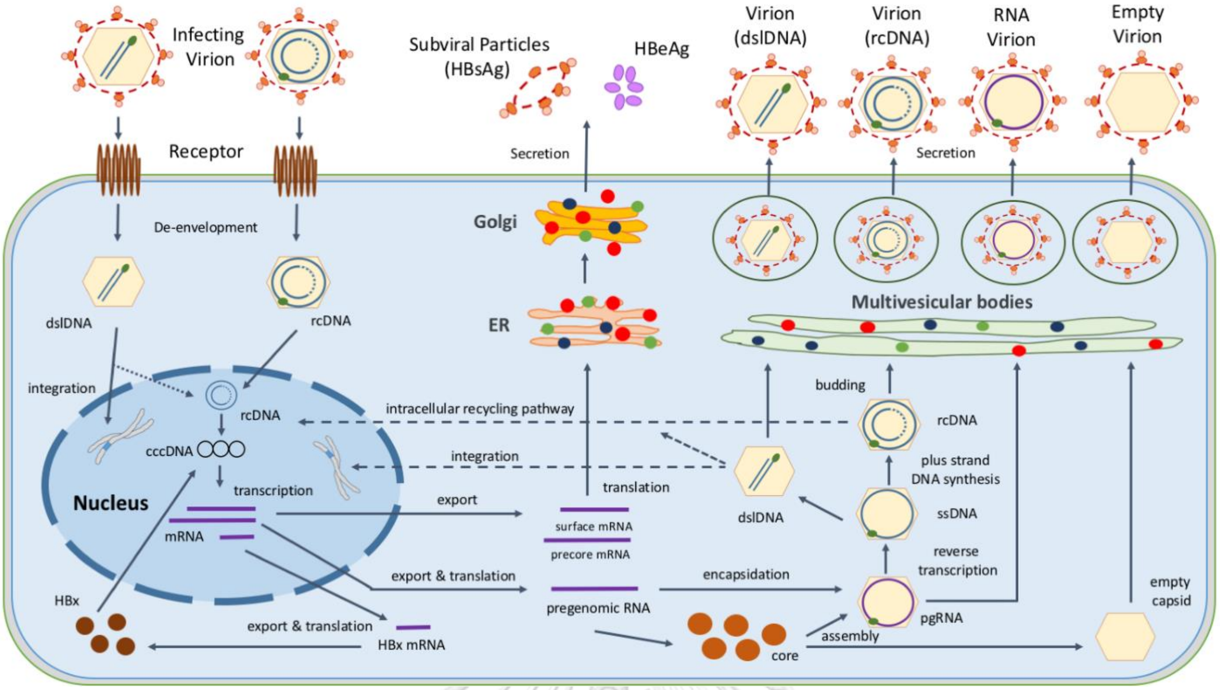
(genomic RNA หรือ pregenomic RNA) ซึ่งถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน precore, core และ polymerase และกลุ่มที่ไม่สร้างเป็นจีโนม (subgenomic RNA) ซึ่งถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน preS, preS2, HBsAg และ X (12)

นอกจากไวรัสที่มีสารพันธุกรรมแบบ rcDNA แล้ว ยังมีอนุภาคไวรัสบางส่วนที่มีสารพันธุกรรมที่เป็น double stranded linear DNA (dslDNA) เมื่อเข้าสู่นิวเคลียสแล้ว สามารถแทรกตัว เข้าไปในพันธุกรรมของมนุษย์ (integrated HBV genome) หรืออาจสร้างเป็น cccDNA ได้ (15) การที่ DNA ของไวรัสแทรกเข้ามาในพันธุกรรมของมนุษย์ พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ (16) อย่างไรก็ตามพบว่า integrated HBV genome ไม่สามารถสร้าง HBV pgRNA ที่ทำงานแต่สร้าง HBsAg ได้ (17)

HBV pgRNA และ โปรตีน polymerase จะประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่โดยการห่อหุ้มด้วย ส่วนแคบสิด (encapsidation) ภายใน cytoplasm และต่อมา polymerase จะใช้คุณสมบัติ reverse transcription เปลี่ยน pgRNA สู่ relaxed circular DNA และใช้เอ็นไซม์ RNase เพื่อสลาย pgRNA ต้นแบบ อนุภาคที่เกิดขึ้นนี้จะหมุนเวียนกลับเข้าสู่นิวเคลียส เพื่อสร้างเป็น cccDNA (recycling pathway) หรือปล่อยออกนอกเซลล์โดยผ่าน endoplasmic reticulum ซึ่งจะสร้างเปลือกหุ้มชั้นนอก (glycoprotein envelope) ให้กับอนุภาคไวรัส (12, 18, 19) นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการสร้างสารพันธุกรรมที่เป็น double stranded linear DNA (dslDNA) จาก pgRNA ซึ่งสามารถสร้างเป็น cccDNA และ แทรกเข้ามาในยีนของเซลล์ตับได้ (20) (รูปที่ 4)

อนุภาคที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ตับที่ติดเชื้อ นอกจากจะประกอบไปด้วยอนุภาคของ relaxed circular DNA แล้ว ยังพบว่ามีอนุภาคที่มี dslDNA, pgRNA หรืออนุภาคเปล่า(19, 21) (รูปที่ 4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

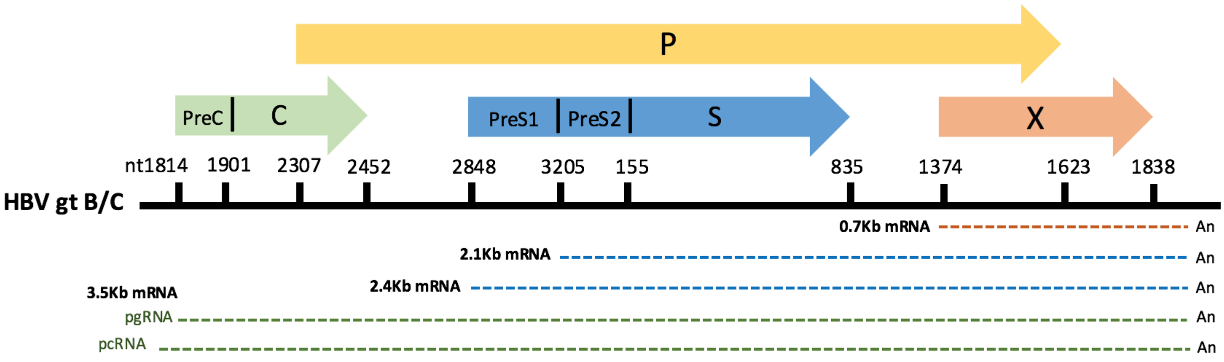


รูปที่ 4 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี

2.3 HBV RNA

RNA ของไวรัสตับอักเสบบีถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วย precore RNA (pcRNA) ขนาด 3.5 kb, pgRNA ขนาด 3.5 kb, surface messenger RNA (mRNA) ขนาด 2.1 และ 2.4 kb ส่วนสุดท้ายคือ X mRNA ขนาด 0.7 kb โดยทุกสายของ mRNA มีลำดับเบสทับซ้อน กับ X mRNA เริ่มจากปลาย 3’ ดังรูปที่ 5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 5 Open reading frame ของไวรัสตับอักเสบบีและตำแหน่งลำดับเบสของ RNA ชนิดต่าง ๆ

RNA ของไวรัสตับอักเสบบีได้ถูกค้นพบว่ามีในเลือด มากกว่า 20 ปี (22) การศึกษาในระยะหลังพบว่า RNA ส่วนใหญ่ในเลือดเป็น pgRNA ซึ่งถูกถอดรหัสโดยตรงจาก covalently closed circular DNA และอยู่ในรูป อนุภาคที่มี capsid และ envelope ห่อหุ้ม (HBV RNA virion–like particles) (21, 23) อนุภาคดังกล่าว สามารถส่งออกจากเซลล์ตับและออกสู่ระบบเลือดได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษา ถึงความสามารถ ในการติดต่อของอนุภาคนี้ และกระบวนการสร้างสารพันธุกรรมที่ เริ่มจาก HBV pgRNA สู่ covalently closed circular DNA (24)

การตรวจพบและวัดปริมาณ HBV RNA ในเลือดแตกต่างกันไปตามวิธีที่ใช้ในการทำ Polymerase chain reaction (PCR) และ primers ที่ใช้ อย่างไรก็ตาม RNA ที่พบในเลือดก็มีหลายรูปแบบทั้งขนาดปกติ (genome length) หรือมีการปรับแต่ง เช่น ผ่านกระบวนการ splicing หรือ polyadenylation (19) ระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี รวมถึงการได้รับยาต่าง ๆ ตลอดจนวิธีการวัดระดับ RNA ในเลือด ส่งผลให้ชนิด ของ RNA ที่วัดได้แตกต่างกัน ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการวิเคราะห์ระดับ HBV RNA ที่เป็นมาตรฐาน(19, 25)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

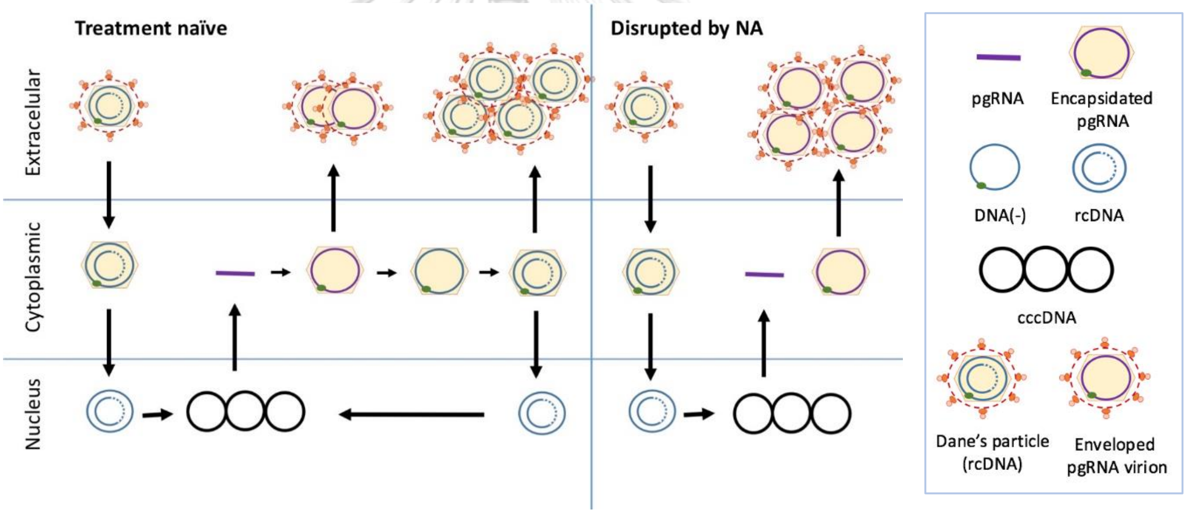
2.4 HBV pregenomic RNA (HBV pgRNA)

ด้วยวิธีการวัดระดับ HBV RNA ที่แตกต่างกัน ทั้ง primers ที่เลือกใช้ วิธีการ และเครื่องมือ ทำให้มีความแตกต่างของชนิด RNA ที่พบในเลือด (HBV RNA species) อย่างไรก็ตาม HBV RNA ที่พบส่วนใหญ่เป็น HBV pgRNA ซึ่งสามารถพบได้ทั้งที่มีขนาดปกติ 3.5 kb หรือมีการปรับแต่งได้ (19)

ประโยชน์ของการนำ HBV pgRNA มาใช้ในทางคลินิกที่สำคัญคือการบอกการทำงานของ covalently closed circular DNA ในเซลล์ตับ โดยการตรวจเลือด และเชื่อว่าจะมีประโยชน์มากกว่าการใช้ quantitative HBsAg เนื่องจาก HBsAg สามารถสร้างได้จากทั้ง covalently closed

circular DNA และ integrated DNA รวมทั้งระดับที่เปลี่ยนไปใน genotype ต่างกัน และ mutation (26)

มีการศึกษาพบว่าระดับของ HBV pgRNA จะเพิ่มขึ้นในผู้ที่ได้รับยา nucleot(s)ide analogues (NAs) การศึกษาทดลองในสัตว์ทดลอง ที่ได้รับการรักษาด้วยยา entecavir พบว่า ระดับ HBV pgRNA สูงขึ้นหลังได้รับการรักษาด้วยยา แม้ว่าระดับ HBV DNA จะลดลง เช่นเดียวกับผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย telbivudine พบว่าระดับ HBV pgRNA จะลดลงในสัดส่วนที่น้อยกว่า HBV DNA (21) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การเพิ่มขึ้นของ pgRNA virion หลังได้รับยา nucleot(s)ide analogues (NAs)

2.5 ประโยชน์ทางคลินิกของ HBV pgRNA

มีการศึกษาถึงประโยชน์ของ HBV RNA ในทางคลิกนิกหลายด้าน เช่น ใช้ตรวจติดตามการรักษาด้วย nucleot(s)ide analogues (NAs), ใช้ตรวจติดตามการรักษาด้วย interferon และใช้ช่วยในการตัดสินใจหยุดยา

การศึกษาในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยา lamivudine และ entecavir จำนวน 52 คน

พบว่าระดับ HBV RNA ที่ 12 สัปดาห์ สามารถทำนายโอกาสที่จะไม่สามารถวัดระดับ HBV DNA หลังการรักษาได้ดี (adjusted hazard ratio = 0.9, p = 0.035) (27) เช่นเดียวกับการรักษาด้วย interferon มีการศึกษาพบว่าในผู้ป่วยที่ได้รับ pegylated interferon alfa (Peg-IFN) และ adefovir จำนวน 86 คน ระดับการลดลงของ HBV RNA จะมากกว่าในกลุ่มที่ตอบสนองต่อยา และในผู้ป่วยที่เป็น HBV eAg negative ระดับ HBV RNA ที่น้อยก่อนเริ่มยามีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อยา Peg-IFNและ adefovir (OR 0.44, p = 0.019) (23) อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลการทำนายผลของการรักษาในระยะยาวโดยใช้การตรวจ HBV RNA (19)

การศึกษาของ van Bömmel และคณะ(28) ในผู้ป่วย HBeAg positive ที่ได้รับการรักษาด้วยยา จำนวน 50 รายพบว่า การลดลงของ HBV RNA ที่ 3 และ 6 เดือนหลังการรักษา เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเกิด HBeAg seroconversion เทียบกับระดับ HBV DNA HBsAg และ alanine aminotransferase นอกจากนี้ระดับตั้งต้นของ full length HBV RNA (baseline HBV flRNA) สามารถทำนายการเกิด HBeAg seroconversion ได้ดีกว่าระดับ HBV DNA โดยมีค่า area under the receiver operating characteristic curve เท่ากับ 0.73 และ 0.67 ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ในด้านการพิจารณาหยุดยาหลังการรักษา การใช้ระดับ HBV RNA ซึ่งสามารถบอก cccDNA activity ได้ จะเป็น ประโยชน์ในการตัดสินใจหยุดยาอย่างปลอดภัย(29) การศึกษาในผู้ป่วยที่หยุดยา 24 สัปดาห์ หลังได้รับการรักษาด้วยยา nucleot(s)ide analogue พบว่า มีผู้ป่วยที่มี HBV DNA rebound จำนวน 19 คนจาก 36 คน การวิเคราะห์หลายตัวแปรพบว่าระดับ HBV DNA และ RNA หลังเริ่มการรักษาที่ 3 เดือน เป็นปัจจัยสัมพันธ์กับการเกิด HBV DNA rebound (OR 9.747, p = 0.043) โดยเมื่อใช้ระดับ HBV DNA และ RNA หลังเริ่มการรักษาที่ 3 เดือน ที่ 4.8 log copies/mL จะมีความไว 0.733 และความจำเพาะ 0.619 ต่อการเกิด HBV DNA rebound

(30) การศึกษาของ Wang และคณะ (21) พบว่าในผู้ป่วยที่หยุดการรักษาด้วยยา จำนวน 33 คน หากมีการตรวจพบว่ายังมี HBV RNA หลังการรักษา จะมี viral rebound ทุกคนแต่หากตรวจไม่พบ จะมี viral rebound เพียง 25 % ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า HBV RNA น่าจะมีประโยชน์ในการบอกโอกาสการเกิด relapse หลังการหยุดยา

สำหรับยารักษาไวรัสตับอักเสบบีกลุ่มใหม่ ซึ่งมีเป้าหมายในการยับยั้งวงจรชีวิตของไวรัสในจุดต่าง ๆ pgRNA ก็เป็น เป้าหมายหนึ่งในการเมินประสิทธิภาพของยา เช่น ยากลุ่ม Capsid assembly modulators (CAMs) ซึ่งสามารถยับยั้ง cccDNA formation, capsid assembly และ pgRNA packaging(31) การศึกษายา NVR 3-788 ร่วมกับ PEG-IFN ในหนูพบว่าสามารถยับยั้ง HBV DNA replication และการสร้าง HBV RNA ได้ (32) การศึกษาในเซลล์ตับของมนุษย์พบว่ายา BAY41-4109 สามารถยับยั้งการสร้าง cccDNA และลดระดับ intracellular HBV RNA ได้ (33) ในส่วนของ pgRNA encapsidation ก็มีการศึกษา ถึงยาที่สามารถยับยั้งกระบวนการดังกล่าวได้เช่น ยา (Z)-2-(allylamino)-4-amino-N'-cyanothiazole-5-carboximidamide (AACC) การศึกษาในระดับเซลล์พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของ pgRNA และ polymerase ทำให้ ลดระดับ encapsidated pgRNA และยับยั้ง capsid assembly (34)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

มะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma สามารถพบ pgRNA ภายในเซลล์มะเร็งได้ แสดงให้เห็นว่าไวรัสสามารถแบ่งตัวได้ภายในเซลล์มะเร็ง (35) มีการศึกษาพบว่าการตรวจพบ pgRNA และ cccDNA ในเนื้อมะเร็ง สัมพันธ์กับมะเร็งที่ไม่มี microvascular invasion และ survival ที่ดี โดยเป็นมะเร็งที่มีลักษณะ well-differentiated ซึ่งมี cell cycle, DNA repair marker และ expression ของ HBV receptor ที่ต่ำ (36)

2.6 การวัดระดับ RNA ทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจาก RNA เป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรเมื่อเทียบกับ DNA ปัจจัยต่าง ๆ ล้วนมีผลต่อการ

วัดระดับ RNA เช่น อุณหภูมิ เวลาในการจัดเก็บ เครื่องมือที่ใช้วัด การปนเปื้อนของ RNase และ inhibitor เป็นต้น (37) จึงเป็นที่มาของการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับความคงตัวของไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA เช่น ไวรัสเอชไอวี และไวรัสตับอักเสบซี การศึกษาในไวรัสเอชไอวี พบว่า HIV RNA ในเลือดสามารถเก็บ ไว้ได้ที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 3 วัน(38) การศึกษาในไวรัสตับอักเสบซี พบว่า HCV RNA ในเลือด สามารถเก็บ ไว้ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 4 วัน แต่ระดับจะลดลงหากเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 23 หรือ 37 องศาเซลเซียส (39, 40)

การวัดระดับ RNA ของไวรัสในปัจจุบัน มีหลายวิธี เช่น quantitative PCR (qPCR), digital PCR (dPCR), QuantiGene assays และ indirect quantification โดยแต่ละวิธีจะมีการใช้ HBV specific primer ซึ่งมีเป้าหมายในการจับที่ต่างกันบนสาย RNA ได้แก่ X, C, S, preC region (รูปที่ 5) การวัดระดับ RNA ด้วย qPCR จะต้องมีกระบวนการกำจัด DNA ที่ปนเปื้อนมาหลังการสกัดด้วยเอนไซม์ deoxyribonuclease วิธี dPCR เป็นวิธีใหม่ในการวัดระดับไวรัสเป็นจำนวน copies (absolute quantification) ไม่ต้องใช้การเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานอย่างวิธี qPCR และมีความแม่นยำ เหมาะสำหรับการวัดระดับ RNA ที่มีจำนวนน้อยได้ดี (41) QuantiGene assays เป็นวิธีการวัดระดับ RNA โดย ใช้ HBV-specific probes เกิดการ hydridization กับ X region บน open reading frame เพื่อวัดระดับ RNA โดยตรง โดยไม่เกิดการสร้าง cDNA หรือ PCR amplification (42) สำหรับการวัดระดับ RNA ด้วยวิธี indirect quantification คือการวัดระดับ HBV nucleic acid ทั้งหมด แล้วหักลบด้วยระดับ HBV DNA ที่วัดได้ด้วย qPCR (19)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐาน ในการวัดระดับ pgRNA อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Tang และคณะ ได้เปรียบเทียบการวัดระดับ HBV DNA ด้วย qPCR และ dPCR พบว่าการวัดด้วยวิธี

dPCR สามารถวัดระดับ HBV DNA ที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่า เพิ่มความไว (sensitivity) มากกว่าวิธี qPCR (43)

ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเรื่องความคงตัวของระดับ HBV pgRNA ในเลือดที่เวลาและอุณหภูมิ ที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการที่ RNA นี้อยู่ในรูป HBV RNA virion-like particles ทำให้ยากที่จะประเมิน ความคงตัว เมื่อเลือดต้องผ่านกระบวนการต่าง ๆ ในการวัดระดับ RNA ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อ การศึกษา วิจัยและประยุกต์ใช้ในทางคลินิกต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบวิธีวิจัย

Descriptive study, repeated measurement

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรเป้าหมาย (Target population)

ผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังที่มี ปริมาณ HBV DNA มากกว่า 2,000 IU/ml หรือ quantitative HBsAg มากกว่า 2,000 IU/ml

วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร

ผู้ป่วยในคลินิกโรคตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)

1. อายุมากกว่า 18 ปี
2. เป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง
3. วัดปริมาณ HBV DNA ได้ มากกว่า 2,000 IU/ml และ/หรือ quantitative HBsAg มากกว่า 2,000 IU/ml

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)

1. ติดเชื้อร่วมไวรัสเอชไอวี หรือไวรัสตับอักเสบซี
2. ไม่ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากไม่มีการศึกษาใน HBV pgRNA เปรียบเทียบ จึงอ้างอิงการศึกษาใน ไวรัสเอชไอวี และไวรัสตับอักเสบซี ซึ่งมี 10-30 ตัวอย่าง และค่า intra-assay standard deviation ของการศึกษา ระดับโมเลกุลอยู่ที่ +/-0.5 log10(44) จึงคาดการณ์ว่าระดับ HBV pgRNA ที่เปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด อย่างมีความสำคัญทางสถิติ คือ 0.5 log

จากสูตร(45)

$$n = \frac{(z_{\frac{\alpha}{2}} + z_{\beta})^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

แทนค่า SD (σ) = 1

Difference data between groups (Δ) = 0.5

Alpha (α) = 0.05

Beta(β) = 0.2

โดยการคาดการณ์นี้ จะได้ขนาดตัวอย่าง 32 ตัวอย่าง ที่ 80% power และ 2-sided significance level ที่ 5% ดังนั้นเมื่อพิจารณา intra assay variability ด้วยแล้วจึงปรับเพิ่มขนาดตัวอย่างเป็น 40 ตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

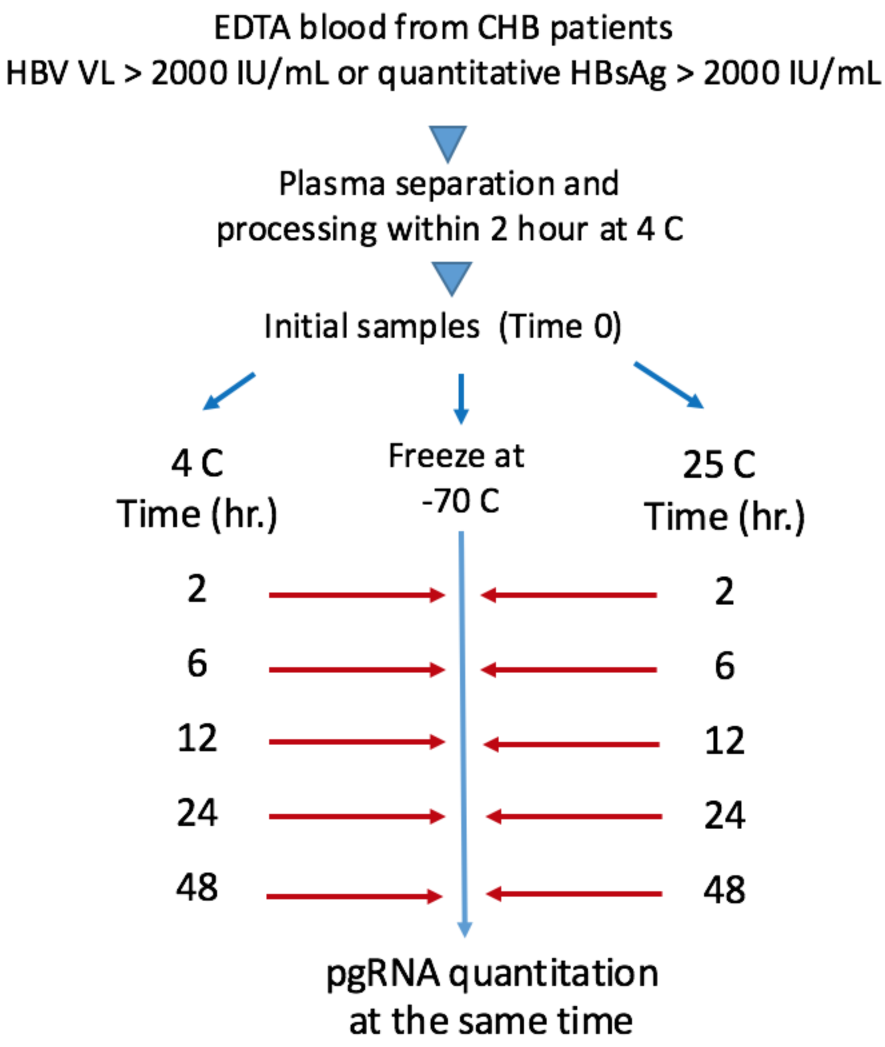
3.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. แพทย์ผู้ทำวิจัยรวบรวมกลุ่มประชากรตัวอย่างโดยคัดกรองฐานข้อมูลผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี เรื้อรังที่ตรงตามเกณฑ์คัดเลือกเข้าและคัดเลือกออกในคลินิกโรคตับ ภปร 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ออกตรวจทุกวันพฤหัสบดี เวลา 8.00-16.00 น.)

2. แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายข้อมูลให้กับอาสาสมัครและแจกเอกสารข้อมูลและแบบขอความยินยอมให้ อาสาสมัครนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจ โดยใช้สถานที่คลินิกโรคตับ ภปร 3 โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ (ออกตรวจทุกวันพฤหัสบดี เวลา 8.00-16.00 น.)
3. ผู้ป่วยให้ความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย
4. เก็บเลือดตัวอย่างจากผู้ป่วย (EDTA tube) ซีซี (4 20ช้อนชา)
5. ปั่นแยกพลาสมาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใน 2 ชั่วโมงหลังเจาะเลือด
6. แยกพลาสมาเป็น 11 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำเก็บที่ อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
7. แบ่งพลาสมา 5 ส่วน เก็บที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอีก 5 ส่วน เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)
8. ในทั้ง 5 ส่วน เมื่อครบเวลา 2, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ละส่วนจะนำเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
9. สกัดแยก RNA ด้วยเครื่อง QIAsymphony DSP Virus/Pathogen minikit (QIAgen Gmbh, Germany)
10. วิเคราะห์ปริมาณโดยใช้ Digital PCR

* ทั้งนี้กระบวนการวิจัยระดับโมเลกุล กระทำโดยนักวิทยาศาสตร์ที่มีประสบการณ์ *

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 7 แผนภาพวิธีการวิจัย

การตรวจวัดระดับ HBV pgRNA

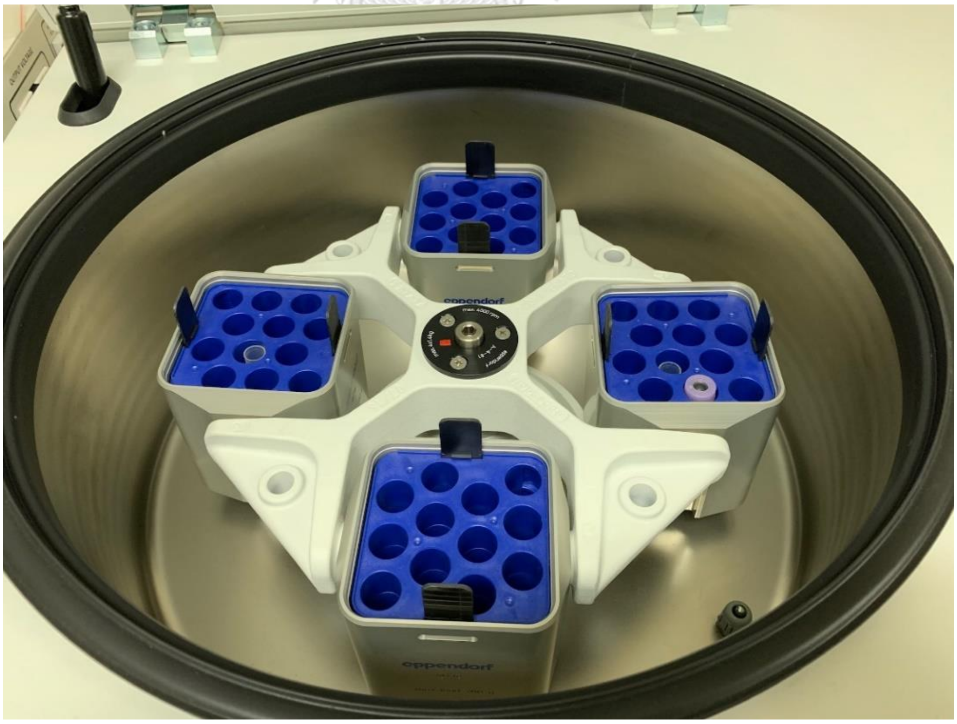
1. สกัดสารพันธุกรรมจากพลาสมา 200 µl โดยใช้ QIAsymphony DSP Virus/Pathogen minikit (Qiagen Gmbh, Germany)
2. แยก RNA ออกจาก DNA โดยสลาย DNA ด้วย DNase (Qiagen Gmbh, Germany)
3. แบ่งสารสกัด RNA บางส่วนโดยไม่ผ่านกระบวนการ reverse transcription และทดสอบเทียบว่าไม่มี HBV DNA ปนเปื้อนมา ด้วยวิธี PCR
4. นำสารสกัด RNA ที่ได้ผ่านกระบวนการ reverse transcription ด้วย ImProm–II

Reverse Transcriptase (Promega) โดยใช้ HBV-specific RT primers และวัดปริมาณด้วยวิธี digital PCR

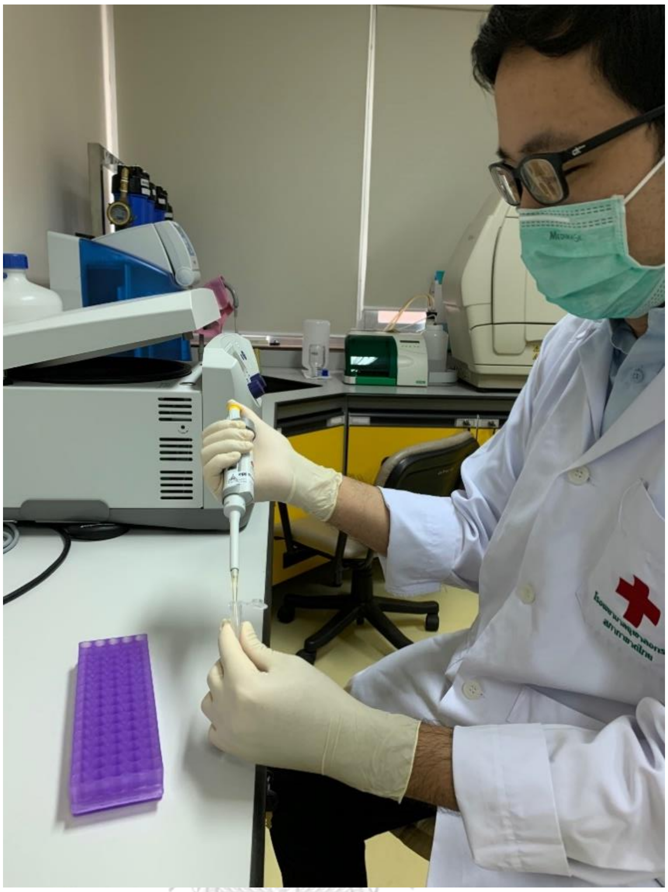
5. วัดระดับ HBV pgRNA โดยใช้ AutoDG Droplet Digital PCR System (46) (Bio-Rad Laboratories, Inc., California) ใช้ส่วนผสม 20 µl ซึ่งประกอบไปด้วย 2x supermix for probes (Bio-rad Laboratories, Inc., California) จำนวน 10 µl, primers (10 nM) จำนวน 1.8 µl, TaqMan probe (5 nM) จำนวน 1 µl, cDNA template จำนวน 2 µl และน้ำจำนวน 3.4 µl
6. การวิเคราะห์ใช้เวลาและอุณหภูมิเป็นรอบดังนี้ รอบที่หนึ่งที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที รอบต่อมาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โดยวนรอบทั้งหมดจำนวน 40 ครั้ง และรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
7. Primers และ probes ที่ใช้ได้แก่ (21)
    - HBV specific RT primer (บริเวณลำดับเบสที่ 2436-2415): 5’ATTCTCAGACCGTAGCACACGACACCGAGATTGAGATCTTCTGCGAC-3’
    - forward primer: 5’-AYAGACCATCAAATGCCC-3’
    - reverse primer: 5’-ATTCTCAGACCGTAGCACACGACAC-3’
    - probe: 5’ FAM-CTTATCAACACTTCCGGARACTACTGTTGTTAGAC-BHQ1-3’
8. คำนวณปริมาณ HBV pgRNA จาก QuantaSoft™ version 1.7 (Bio-rad Laboratories, Inc., California) โดยมีระดับต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (lower limit of detection) เท่ากับ 100 copies/ml

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 8 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge, Eppendorf 5810R)

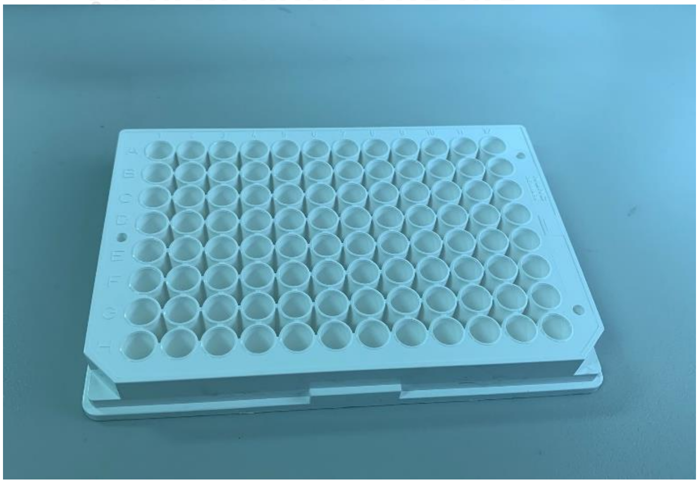


รูปที่ 9 ส่วนประกอบในเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge)



รูปที่ 10 ไมโครปิเปตแบบหลายช่องดูด (Multichannel micropipette, Eppendorf)

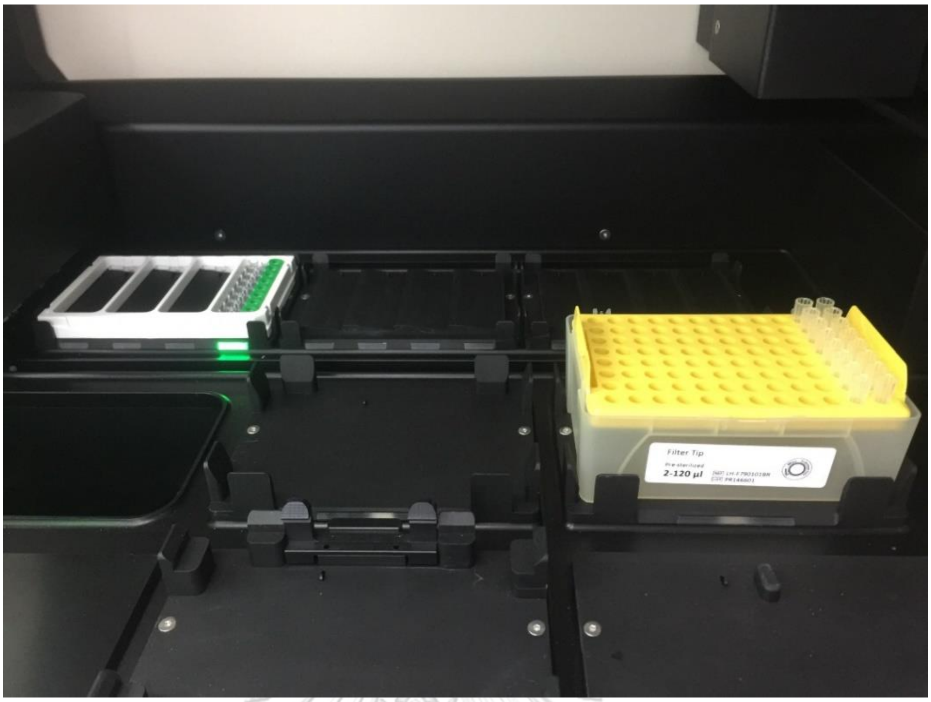
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 ถาดหลุมไมโครเพลท (Microplate)

รูปที่ 12 QIAsymphony DSP Virus/Pathogen minikit (Qiagen Gmbh, Germany)

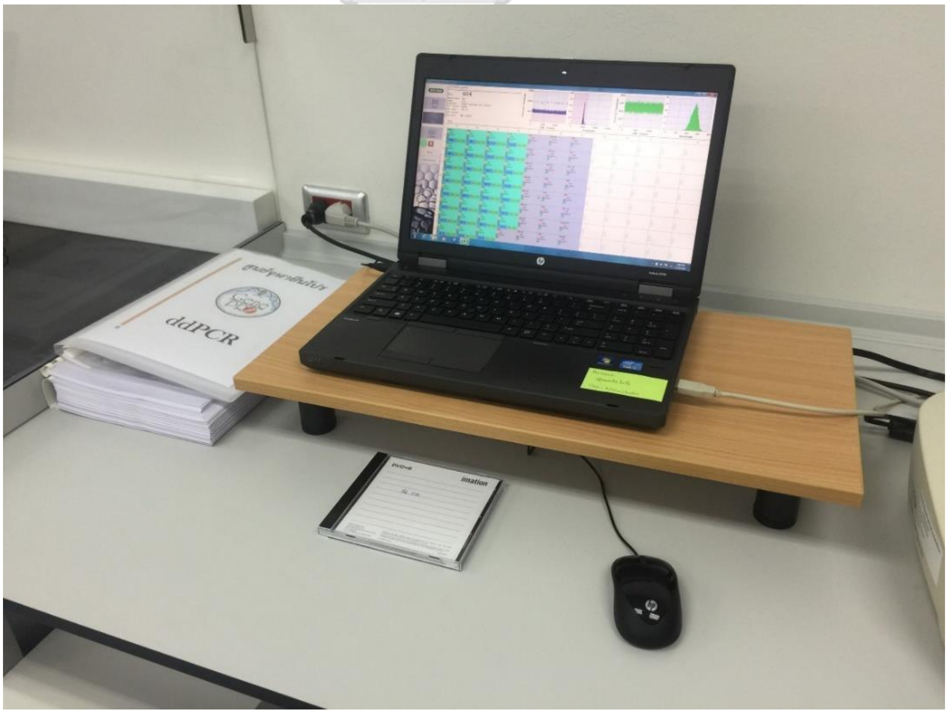
รูปที่ 13 เครื่องเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (PCR) (Eppendorf)



รูปที่ 14 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California)

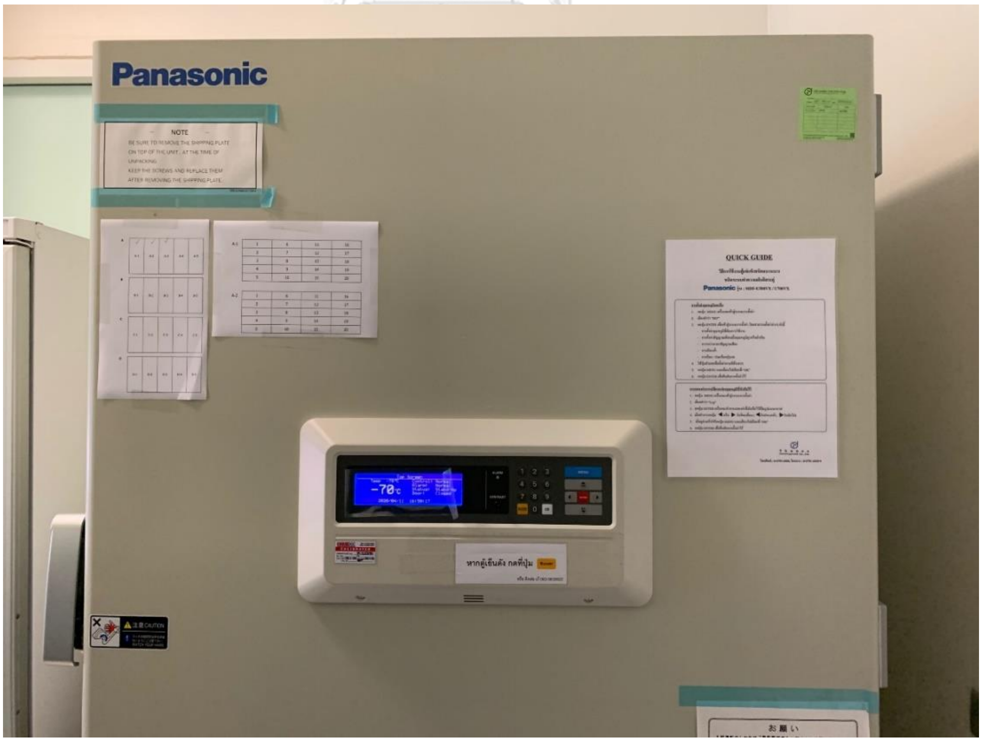
รูปที่ 15 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc., California)

รูปที่ 16 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., California)



รูปที่ 17 Program QuantaSoft^{TM} version 1.7 (Bio-Rad Laboratories, Inc., California)

รูปที่ 18 ตู้เก็บรักษาพลาสมา 25 องศา



รูปที่ 19 ตู้เย็นเก็บรักษาพลาสมา -70 องศา

3.5. การรวบรวมข้อมูล

เก็บข้อมูลจากหน่วยโรคทางเดินอาหารและตับ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ผู้เก็บข้อมูล คือ ผู้ดำนินการวิจัย และผู้บันทึกข้อมูลคือ ผู้ดำเนินการวิจัย

1. เริ่มจากการเก็บข้อมูลพื้นฐานตามเกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมการวิจัย
2. บันทึกข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย ได้แก่ เพศ อายุ ระดับ HBV DNA และ ระดับ quantitative HBsAg
3. บันทึกระดับ HBV pgRNA ในพลาสมาแต่ละเวลาและอุณหภูมิ

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล และสถิติที่ใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณ HBV pgRNA ใช้รูปแบบ log10 นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และค่าผิดพลาดมาตรฐาน (standard error, SE)

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน และค่าเฉลี่ยของ การเปลี่ยนแปลงระดับเทียบจากระดับตั้งต้น (mean change from baseline) ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

ในการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับเทียบจากระดับตั้งต้น ใช้การคำนวณ โดยวิธี paired T-test โดยถือว่ามีนัยสำคัญ ทางสถิติเมื่อ p-value < 0.05

การเปลี่ยนแปลงของระดับ HBV pgRNA ที่มากกว่า 0.5 log copies/mL จึงจะแสดงว่ามีความสำคัญทางคลินิก (clinical significance) (44)

การวิเคราะห์ทางสถิติใช้การคำนวณด้วยโปรแกรม Stata 16.0 (Statacorp, College Station, TX, USA)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.7 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดโครงการ

ระยะเวลา 1 ปี

3.8 สถานที่ทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการของสาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ และ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 1873 ถนน พระรามที่ 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

3.9 งบประมาณ

ผู้เข้าร่วมวิจัย 40 คน เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อแยกวัดระดับ HBV pgRNA คนละ 11 ตัวอย่าง รวม 440 ตัวอย่าง

Plasma separation	440 x 50 บาท	22,000 บาท
RNA extraction	440 x 500 บาท	220,000 บาท
Digital PCR	440 x 800 บาท	352,000 บาท
Refrigerator		30,000 บาท
Total		624,000 บาท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

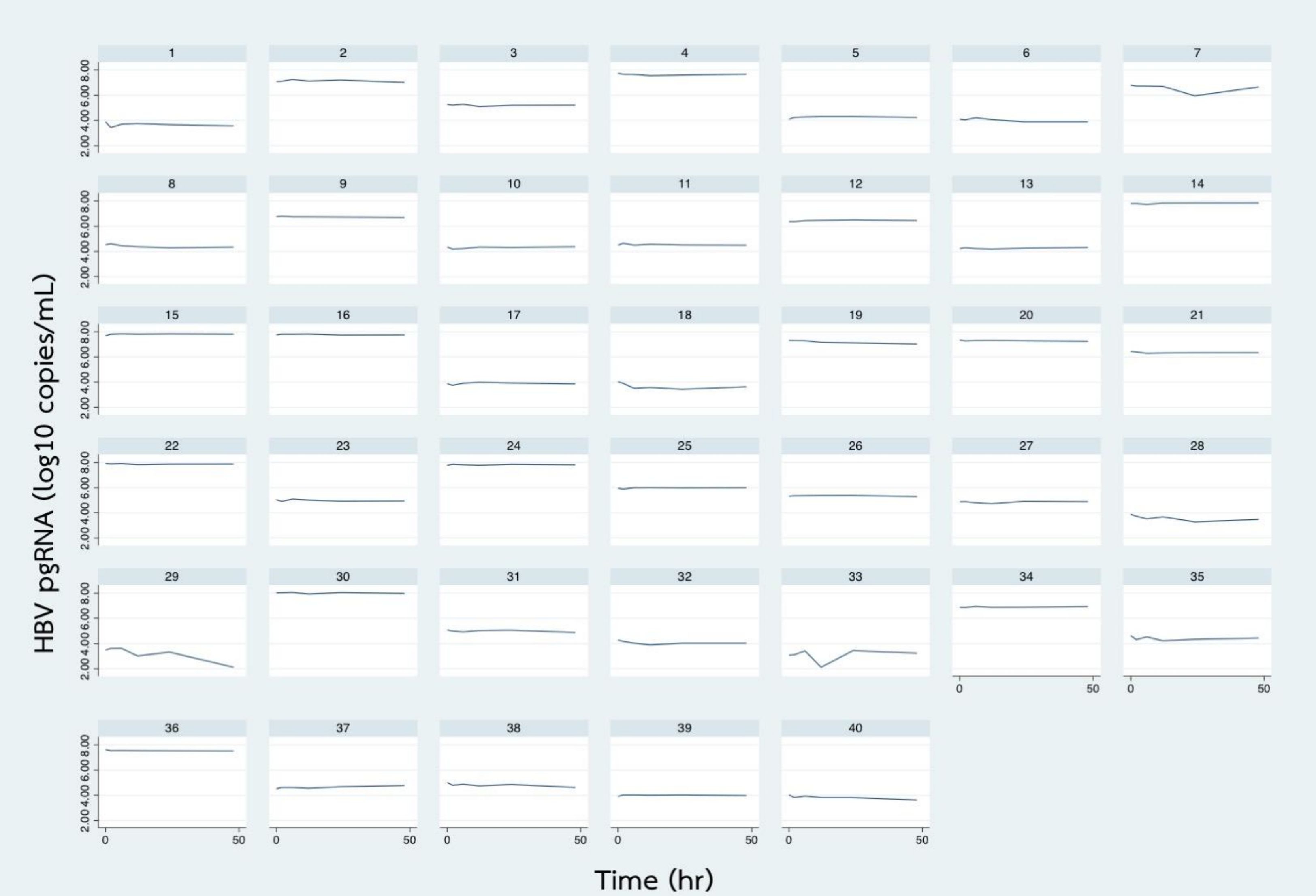
จากตัวอย่างพลาสมาจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าระดับ HBV pgRNA ตั้งต้นอยู่ระหว่าง 3.08 ถึง 8.04 log10 copies/mL และมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 5.58 log10 copies/mL

รูปที่ 20 และ 21 แสดงระดับ HBV pgRNA ในหน่วย log10 copies/mL ของผู้ป่วยแต่ละรายที่อุณหภูมิ จัดเก็บ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4.2 เปรียบเทียบระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

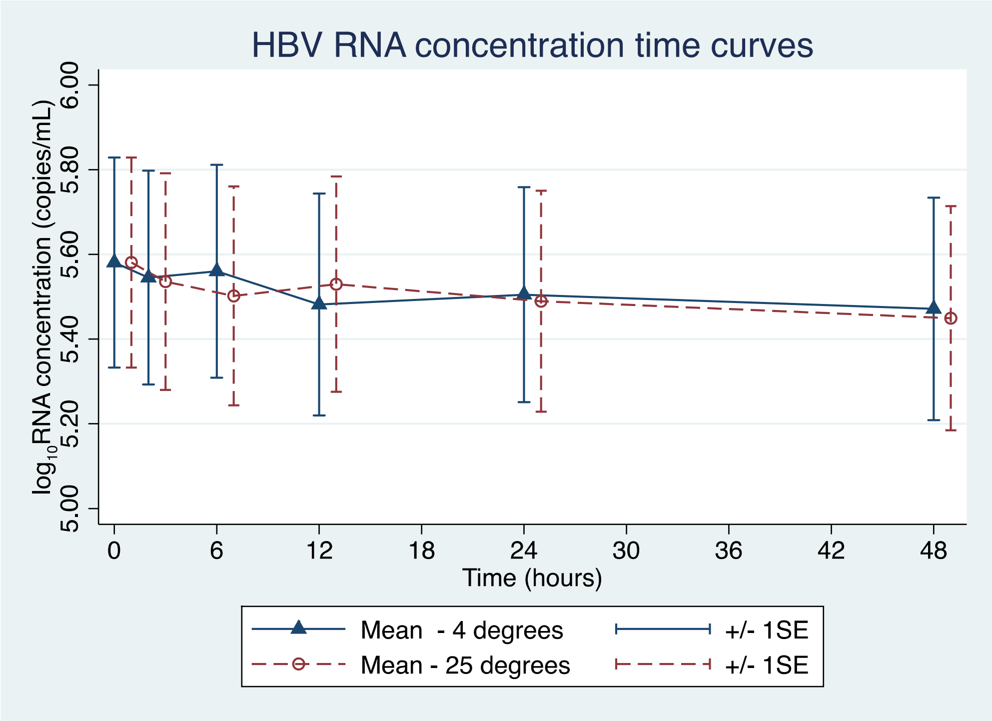
เมื่อเปรียบเทียบระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน จะได้ ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าผิดพลาดมาตรฐาน (standard error) ดังแสดงในรูปที่ 22 และค่ามัธยฐาน (median), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25 (25th percentile, P25), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75 (75th percentile, P75) ดังแสดงในรูปที่ 23

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

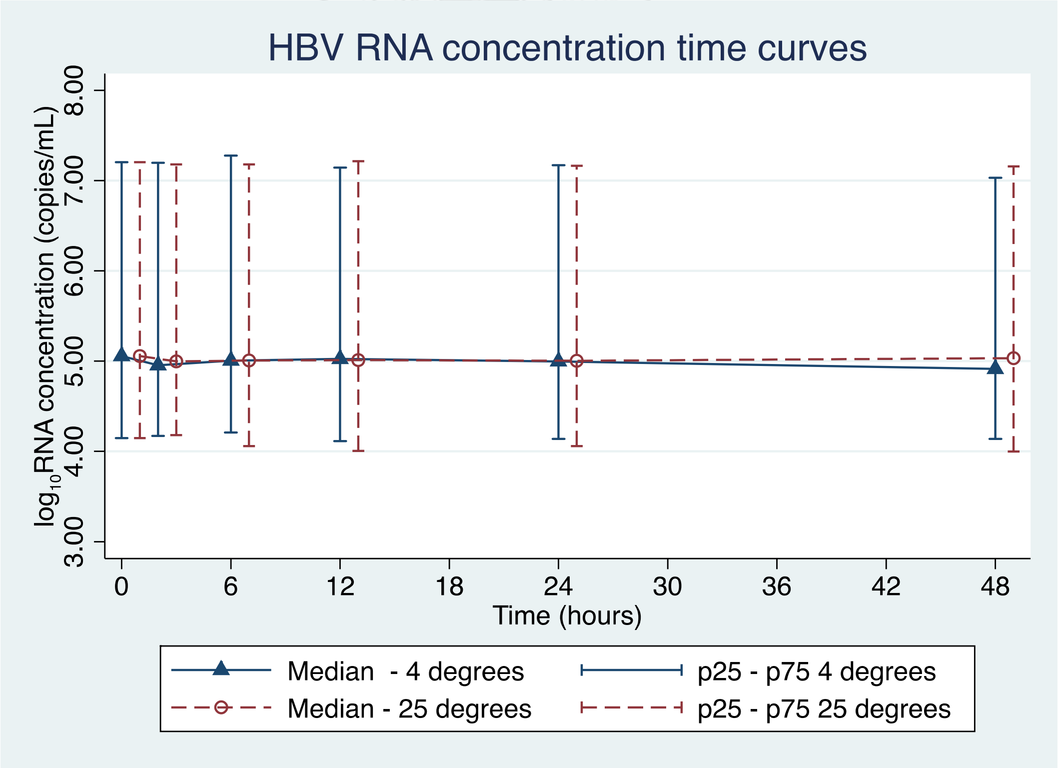


รูปที่ 20 ระดับ HBV pgRNA ในหน่วย log10 copies/mL ของผู้ป่วยแต่ละรายที่อุณหภูมิ จัดเก็บ 4 องศาเซลเซียส

รูปที่ 21 ระดับ HBV pgRNA ในหน่วย log10 copies/mL ของผู้ป่วยแต่ละรายที่อุณหภูมิ จัดเก็บ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 22 ค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดมาตรฐาน (standard error) ของระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน



รูปที่ 23 มัธยฐาน (median), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25 (25th percentile, P25), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75 (75th percentile, P75) ของระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน

4.3 ค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันเทียบจากระดับตั้งต้น

การเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันเทียบจากระดับตั้งต้น แสดงในตารางที่ 1 และ 2 โดยประกอบไปด้วยค่าเฉลี่ย (mean), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD), ค่าต่ำสุด (minimum, min), มัธยฐาน (median, P50), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 25 (25th percentile, P25), เปอร์เซ็นไทล์ที่ 75 (75th percentile, P75) และค่าสูงสุด (maximum, max)

นอกจากนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงของระดับ HBV pgRNA ไม่มากกว่า 0.5 log copies/mL แสดงให้เห็นว่าไม่มีความสำคัญทางคลินิก (clinical significance) (รูปที่ 24)

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (หน่วย log10 copies/mL)

Time (hr)	mean	SD	min	P25	P50	P75	max	p*
0	0	0	0	0	0	0	0	-
2	-0.04	0.13	-0.45	-0.1	-0.02	0.05	0.16	0.29
6	-0.02	0.15	-0.52	-0.09	0.00	0.06	0.35	0.54
12	-0.1	0.21	-0.95	-0.17	-0.04	0.03	0.22	0.004
24	-0.08	0.22	-0.83	-0.18	-0.03	0.05	0.37	0.03
48	-0.11	0.26	-1.38	-0.2	-0.06	0.04	0.25	0.001

*เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละช่วงเวลาเทียบกับค่าตั้งต้น

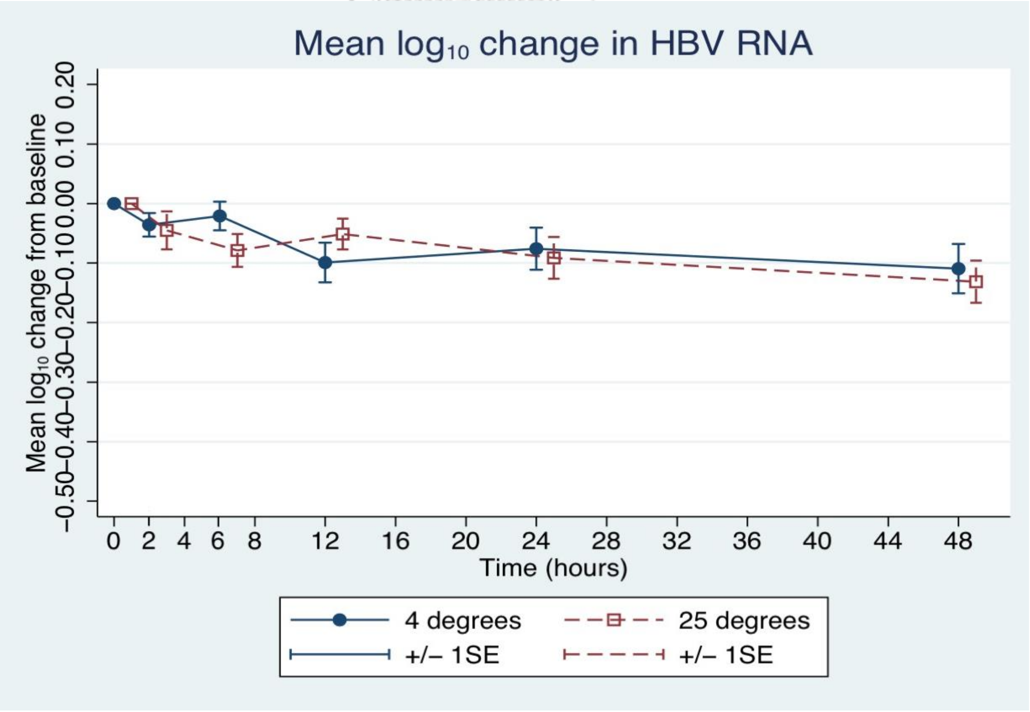
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

(หน่วย log10 copies/mL)

Time (hr)	mean	SD	min	P25	P50	P75	max	p*
0	0	0	0	0	0	0	0	–
2	–0.05	0.2	–0.71	–0.12	–0.01	0.08	0.32	0.13
6	–0.08	0.17	–0.51	–0.13	–0.07	0.04	0.18	0.009
12	–0.05	0.16	–0.37	–0.16	–0.04	0.07	0.39	0.09
24	–0.09	0.22	–1.08	–0.13	–0.07	0.05	0.22	0.002
48	–0.13	0.22	–0.95	–0.18	–0.08	0.00	0.16	<0.001

*เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละช่วงเวลาเทียบกับค่าตั้งต้น



รูปที่ 24 ค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันเทียบจากระดับตั้งต้น

บทที่ 5
อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การวัดระดับ pgRNA ของไวรัสตับอักเสบบี เป็นตัวชี้วัดใหม่ที่สามารถแสดงการทำงานของ cccDNA ภายในเซลล์ตับที่ติดเชื้อได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการดูแลผู้ป่วยทั้งในแง่การวินิจฉัยโรคและ การรักษาผู้ป่วย อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีวิธีการมาตรฐานสำหรับการเก็บเลือด การจัดเก็บ และการวัดค่า ทางห้องปฏิบัติการ เพื่อความแม่นยำและสามารถนำไปใช้ในระดับสากล (19)

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี เมื่อผ่านการจัดเก็บด้วยหลอด EDTA และผ่านกระบวนการปั่นแยกพลาสมาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใน 2 ชั่วโมงหลังการเจาะเลือด พลาสมาที่ได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยไม่มีผลต่อการวัดระดับ HBV pgRNA

ด้วยมาตรฐานการจัดเก็บดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสถานการณ์ปัจจุบัน ซึ่งสามารถขนส่ง เลือดจากการเจาะเลือดจนถึงห้องปฏิบัติการกลาง ภายใน 48 ชั่วโมง โดยที่อุณหภูมิที่ศึกษาทั้งสองอุณหภูมิ เป็นอุณหภูมิมาตรฐานหลักที่ใช้ในการเก็บและขนส่งตัวอย่างเลือดทางห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษานี้ พบว่าค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงระดับ HBV pgRNA ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ เทียบ จากระดับตั้งต้น ในบางช่วงเวลามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ที่อุณหภูมิจัดเก็บ 4 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่

เวลาการจัดเก็บตั้งแต่ 12 ชั่วโมงขึ้นไป และ ที่อุณหภูมิจัดเก็บ 25 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลาการจัดเก็บตั้งแต่ 6 ชั่วโมงขึ้นไป (ตารางที่ 1 และ 2)

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาดังกล่าวเป็นเพียงผลทางสถิติ ในแง่การประยุกต์ ใช้ทางคลินิกถือว่า ไม่มีความแตกต่าง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของระดับ HBV pgRNA ไม่มากกว่า 0.5 log copies/mL (44, 47)

เมื่อพิจารณาในรายบุคคลที่ทำการจัดเก็บเลือดพบว่า ในผู้ป่วยบางราย เช่น ผู้ป่วยรายที่ 29 และ 33 มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ pgRNA ที่อุณหภูมิ 4 และ 25 องศาแตกต่างกันไปตามระยะเวลา มากกว่าผู้ป่วยรายอื่น (รูปที่ 20, 21 และภาคผนวก ค) สาเหตุที่ทำให้มีระดับที่เปลี่ยนแปลงมากกว่าผู้ป่วยรายอื่นนั้นอาจเป็นได้จาก กระบวนการเก็บเลือดและกระบวนการปั่นแยกเลือด ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของ RNase หรือการเกิด oxidation เมื่อเลือดตั้งทิ้งไว้ที่เวลานานหรืออุณหภูมิที่สูง (48) ดังนั้นการจัดเก็บเลือดและกระบวนการปั่นแยกพลาสมาในอนาคต อาจทำในเวลาที่น้อยลงกว่า 2 ชั่วโมงในงานวิจัยนี้ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิต่ำเสมอ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวิธีการมาตรฐานสำหรับการวัดปริมาณ HBV pgRNA ทางห้องปฏิบัติการ(19) ทางผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธีวัดปริมาณ RNA ด้วยวิธี digital PCR (dPCR) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวัดปริมาณสัมบูรณ์ ของระดับ RNA และ DNA ได้ โดยต่างจากวิธี quantitative PCR (qPCR) ซึ่งต้องวัดปริมาณโดย เทียบกับกราฟมาตรฐาน (calibration curve) นอกจากนี้การวัดปริมาณ RNA ด้วยวิธี digital PCR (dPCR) ยังมีข้อดีในเรื่องความไวในการตรวจวัดสารพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยมากในเลือดได้(41) เมื่อเปรียบเทียบ การวัดระดับ HBV DNA โดยใช้วิธี digital PCR (dPCR) และ quantitative PCR (qPCR) มีการศึกษาพบว่าวิธี digital PCR (dPCR) สามารถตรวจ DNA ที่มีปริมาณน้อยได้ดีกว่า quantitative PCR (qPCR) รวมทั้งสามารถทำซ้ำ

(reproducibility) ได้ดีกว่า จึงเป็นการเพิ่มความไวและความจำเพาะของการวัดระดับ HBV DNA ได้ (43) ในการศึกษานี้จึงใช้วิธีการวัดระดับ HBV pgRNA โดย digital PCR (dPCR) เพื่อให้มั่นใจว่าสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงแม้เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างที่เก็บไว้ในต่างเวลาและต่างอุณหภูมิ

เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม ในงานวิจัยนี้ ใช้เครื่องมืออัตโนมัติ คือ QIAsymphony DSP virus/pathogen minikit เพื่อลดความผิดพลาดจากมนุษย์ในขั้นตอนการสกัด RNA รวมทั้งป้องการปนเปื้อนของ ribonuclease (RNase) โดยมี Buffer และ RNA carrier มาตรฐานในชุดการสกัด RNA สำหรับการปนเปื้อนของ DNA ที่อาจมารบกวนการวัดระดับ pgRNA ทางผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบขั้นตอนการวัดระดับ pgRNA โดย หลังจากที่สลาย DNA ใน nucleic acid ที่สกัดได้จากพลาสมา โดย DNase แล้ว นำสารที่ได้ไปทดสอบว่ามี DNA หลงเหลืออยู่หรือไม่ โดยการใช้ primer ที่จำเพาะกับ HBV DNA และ housekeeping DNA มาทดสอบ พบว่าจากการตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าว จำนวน 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ 20) ไม่พบ DNA ปนเปื้อนหลังการย่อยด้วย DNase

ปัจจุบันยังไม่สามารถระบุชนิดของ RNA ที่พบในเลือดได้ชัดเจน Wang และคณะ พบว่า RNA ที่แยกได้จาก supernatant เป็นชนิด pgRNA ซึ่งบรรจุอยู่ในเปลือกหุ้ม (encapsidated form) (21) อย่างไรก็ตามยังต้องการข้อมูลจากงานวิจัย เพื่อสนับสนุนการค้นพบดังกล่าว (19) นอกจากชนิดของ RNA ที่พบต่างกันแล้ว RNA ที่พบในเลือดยังมีลักษณะผสมระหว่างสาย RNA ที่สมบูรณ์ (genome length) เช่น pgRNA มีขนาด 3.5 กิโลเบส หรืออยู่ในรูปที่มีการปรับแต่งให้สั้นลง (spliced) หรือ polyA-free ความหลากหลายดังกล่าวขึ้นกับระยะการดำเนินโรค ยาที่ผู้ป่วยได้รับ รวมถึงวิธีในการวัดระดับ RNA (19, 21, 49)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้เลือก ไพรเมอร์เฉพาะ (HBV–specific primer) เพียงชนิดเดียว (21) ซึ่งมีความจำเพาะกับ HBV pgRNA บางรูปแบบเท่านั้น จึงไม่สามารถวัดระดับ RNA ทั้งหมดในเลือดผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบก่อนและหลัง ด้วยเครื่องมือและวิธีการเดียวกัน ปัจจัยดังกล่าว จึงไม่มีผลกระทบในประเด็นเรื่องความคงตัวของสารพันธุกรรม เมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างกัน ความคงตัวของ HBV pgRNA ที่พบในงานวิจัยนี้อาจอธิบายได้จาก การบรรจุอยู่ในเปลือกหุ้ม (encapsidated form)

การนำไปใช้ประโยชน์ของระดับ HBV pgRNA สำหรับยารักษาไวรัสตับอักเสบบีกลุ่มใหม่ ซึ่งมีเป้าหมายในการยับยั้งวงจรชีวิตของไวรัสในจุดต่าง ๆ เช่นยาที่มีกลไกยับยั้ง pgRNA encapsidation เช่นยา (Z)–2–(allylamino)–4–amino–N’–cyanothiazole–5–carboximidamide (AACC) ออกฤทธิ์ยับยั้งการ ทำงานของ pgRNA และ polymerase ทำให้ ลดระดับ encapsidated pgRNA และยับยั้ง capsid assembly (34) ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาผลของยากลุ่มนี้ต่อระดับ HBV pgRNA ในเลือด หากนำระดับ HBV pgRNA มาใช้ในการตรวจติดตามการรักษาแล้ว ความคงตัวของระดับ RNA ในเลือดอาจต่างกับผู้ป่วยที่ได้รับยา ในกลุ่มอื่น ๆ เช่น nucleot(s)ide analogue หรือ interferon เนื่องจากยาในกลุ่มนี้ไม่รบกวน การสร้างเปลือกหุ้มของ RNA ที่ปล่อยออกมาในเลือด จึงเป็นข้อจำกัดของผลการศึกษาในงานวิจัยนี้ หากใช้ในผู้ป่วยที่ได้รับยา รักษาไวรัสตับอักเสบบีกลุ่มใหม่

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการจัดเก็บเลือดจากผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบี เพื่อวัดระดับ HBV pgRNA ด้วยกระบวนการจัดเก็บและวัดระดับด้วยวิธีข้างต้น ไม่มีผลต่อระดับ HBV pgRNA ความรู้นี้สามารถนำไป ประยุกต์ทั้งในแง่การทำวิจัยใหม่และสามารถใช้เป็นแนวทางในการส่งตรวจ HBV pgRNA เพื่อการดูแล ผู้ป่วยในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 ข้อเด่นของการศึกษา

การศึกษานี้มีข้อเด่น คือ เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาเรื่องความคงตัวของ HBV pgRNA เมื่อเก็บรักษาในสภาวะต่างกัน ทั้งด้านอุณหภูมิและระยะเวลา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการต่อยอดงานวิจัย ในอนาคต ทั้งยังช่วยสนับสนุนแนวคิดเรื่องของรูปแบบ RNA ในเลือดที่อยู่ในรูปแบบมีเปลือกหุ้ม ไม่ใช่สารพันธุกรรมอิสระ จึงมีความคงตัวในสภาวะต่าง ๆ มาก นอกจากนี้วิธีการในการวัดระดับ HBV pgRNA ยังใช้วิธี digital PCR (dPCR) ซึ่งมีความละเอียดและความไวในการตรวจหาสารพันธุกรรม และสามารถบอกค่าเป็นปริมาณสัมบูรณ์ได้

5.3 ข้อด้อยของการศึกษา

การศึกษานี้มีข้อด้อยของการศึกษาบางประการ ได้แก่

1. ปัจจัยหลายอย่างอาจส่งผลกระทบต่อระดับ HBV pgRNA ในเลือดของผู้ป่วย เช่น การปนเปื้อนของ RNase และ inhibitor เครื่องมือที่ใช้วัด สารต่าง ๆ ที่ใช้ในกระบวนการวัดปริมาณ RNA เช่น reagent และ DNase เป็นต้น เพื่อเป็นการลดผลกระทบดังกล่าว ผู้วิจัยจึงใช้การเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างที่เก็บไว้มาวัดระดับที่เวลาเดียวกัน ใช้สารชุดเดียวกัน และเครื่องมือครั้งเดียวกัน นอกจากนี้ยังใช้เครื่องมือที่เป็นอัตโนมัติมากที่สุด เพื่อลดความผิดพลาดจากขั้นตอนที่ต้องใช้มนุษย์

2. วิธีการเก็บรักษาตัวอย่างเลือดในการศึกษานี้ ซึ่งมีขั้นตอนจำเพาะ เช่นการปั่นแยกพลาสมาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ภายใน 2 ชั่วโมงหลังเจาะเลือด และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ทำให้การนำข้อมูลจากงานวิจัยนี้ที่แสดงว่าความคงตัวของ HBV pgRNA อยู่ได้นานถึง 48 ชั่วโมง จำกัดเฉพาะการวิเคราะห์ปริมาณด้วยขั้นตอนจำเพาะนี้เท่านั้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3. การเลือกใช้ไพรเมอร์เฉพาะ (HBV-specific primer) เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีความจำเพาะกับ HBV pgRNA บางรูปแบบเท่านั้น จึงไม่สามารถวัดระดับ RNA ทั้งหมดในเลือดผู้ป่วยได้ ทำให้หากมีการนำไปใช้ต่อยอดในอนาคต ต้องคำนึงว่าวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างเพื่อให้มีความคงตัวถึง 48 ชั่วโมงดังกล่าวมีหลักฐานสนับสนุนกรณีวัดระดับ HBV pgRNA ด้วยวิธีในงานวิจัยนี้เท่านั้น อย่างไรก็ตามเนื่องจาก HBV pgRNA เป็น RNA ที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ในเลือดของผู้ป่วย รวมทั้งยังไม่มีแนวทางมาตรฐานสำหรับการวัดระดับ RNA ในเลือด วิธีการนี้จึงสามารถนำไปอ้างอิงในอนาคตได้

4. ผู้ป่วยที่เข้ามาในการศึกษาวิจัยนี้ประกอบไปด้วยทั้งผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาและยังไม่ได้รับ การรักษาด้วยยา nucleot(s)ide analogue ดังนั้นข้อมูลความคงตัวนี้อาจสามารถใช้ได้เฉพาะกับผู้ป่วย กลุ่มดังกล่าวเท่านั้น หากมีการนำยารักษาไวรัสตับอักเสบบีใหม่ ๆ มาใช้ในผู้ป่วย โดยที่ยานั้นมีผลต่อ HBV pgRNA หรือการสร้างเปลือกของ HBV pgRNA (pregenomic RNA encapsidation) ความคงตัวดังกล่าวอาจไม่สามารถสรุปได้จากงานวิจัยนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.4 ข้อเสนอแนะ

โดยสรุปงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ระดับ HBV pgRNA ในพลาสมาเมื่อจัดเก็บด้วยกระบวนการ จัดเก็บที่ 48 ชั่วโมง และวัดระดับด้วยวิธีที่ดังกล่าว ไม่มีผลต่อระดับ HBV pgRNA อย่างไรก็ตาม ดังที่กล่าวใน ข้อด้อยของการศึกษา ปัจจัยต่าง ๆ อาจมีผลรบกวนการวัดผลได้ หากมีการศึกษาในอนาคต ที่สามารถควบคุมปัจจัย หรือเพิ่มแนวทางการจัดเก็บ เช่นอุณหภูมิหรือเวลาที่หลากหลายขึ้น รวมทั้งศึกษา ในผู้ป่วย ที่มาจากหลายกลุ่ม จะมีประโยชน์ต่อการใช้ระดับ HBV pgRNA ในการวิจัยและรักษาผู้ป่วยต่อไป

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
ใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

การวิจัยเรื่อง ความคงตัวของพรีจีโนมิกอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในตัวอย่างพลาสมาที่เก็บไว้ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน

วันให้คำยินยอม วันที่.............เดือน............................พ.ศ....................................

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว..

ที่อยู่..

ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยวิจัยที่แนบมาฉบับวันที่ .... และข้าพเจ้ายินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารแสดงความยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนามและวันที่ พร้อมด้วย เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบาย จากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด

ข้าพเจ้ามีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ด้วยความ เต็มใจไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้ารับทราบจากผู้วิจัยว่าหากเกิดอันตรายใด ๆ จากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษา พยาบาล โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย แต่จะไม่ได้รับการชดเชยจากผู้สนับสนุนการวิจัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้าพเจ้ามีสิทธิที่จะบอกเลิกเข้าร่วมในโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอกเลิก การเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่น ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อได้รับการยินยอมจาก ข้าพเจ้าเท่านั้น คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรม การวิจัยในคนอาจได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจและประมวลข้อมูลของข้าพเจ้า ทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทางการแพทย์ของข้าพเจ้าได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ เพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัย และต้องการ ให้ทำลายเอกสารและ/หรือ ตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวข้าพเจ้าได้

ข้าพเจ้าเข้าใจว่าข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้า และสามารถยกเลิก การให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของข้าพเจ้าได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้าที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่าน กระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในแบบบันทึกและในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการ รวมทั้งการใช้ข้อมูลทางการแพทย์ ในอนาคตหรือการวิจัยเท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นและมีความเข้าใจดีทุกประการแล้ว ยินดีเข้าร่วมในการวิจัยด้วยความเต็มใจ จึงได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้

....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

(...) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

วันที่ ....เดือน.................................พ.ศ........................

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพ

☐ ไม่มีตัวอย่างชีวภาพ

☐ มีแต่ไม่มีการขอเก็บ

☑ มีและขอเก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

ข้าพเจ้า ☐ ยินยอม

☐ ไม่ยินยอม

ให้เก็บตัวอย่างชีวภาพที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคต

....ลงนามผู้ให้ความยินยอม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(...) ชื่อผู้ยินยอมตัวบรรจง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

วันที่ ....เดือน...................................พ.ศ.............................

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการไม่พึงประสงค์หรือ ความเสี่ยง ที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ตามนามข้างต้นได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

....ลงนามผู้ทำวิจัย

(..) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง

วันที่ ....เดือน...................................พ.ศ.............................

....ลงนามพยาน

(...) ชื่อพยาน ตัวบรรจง

วันที่ ....เดือน...................................พ.ศ.............................

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข
แบบบันทึกข้อมูล

Code ผู้ป่วย ....

ยาที่ได้รับปัจจุบัน ☐tenofovir ☐ lamivudine ☐ entecavir ☐ อื่น ๆ ....

☐ ไม่ได้รับยา

<u>HBV status</u>

HBV viral load .... Date ....

HbeAg ☐ positive ☐ negative Date ....

Anti Hbe ☐ positive ☐ negative Date ....

HbsAg quantitative .... Date ....

Anti HCV ☐ positive ☐ negative Date ....

Anti HIV ☐ positive ☐ negative Date ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

<u>HBV pgRNA</u>

Collection date .... Time ....

Initial load: .... copies/ml

Storage: ☐ 4°c ☐ 25 °c

Time: ☐ 2 hr ☐4 hr ☐6 hr ☐12 hr ☐ 24 hr

Final load: .... copies/ml

ภาคผนวก ค

ข้อมูลรายละเอียดระดับ pgRNA (log10 copies/mL) ในผู้ป่วยจำนวน 40 คน

No.	0 hr.	HBV-RNA Temp 4 °C					HBV-RNA Temp 25 °C				
		2 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.	48 hr.	2 hr.	6 hr.	12 hr.	24 hr.	48 hr.
1	3.88	3.43	3.70	3.75	3.66	3.56	3.41	3.72	3.65	3.88	3.59
2	7.09	7.11	7.26	7.12	7.21	7.02	7.21	7.18	7.22	7.19	7.18
3	5.26	5.21	5.28	5.09	5.19	5.20	5.21	5.21	5.15	5.18	5.20
4	7.74	7.66	7.65	7.56	7.60	7.67	7.66	7.62	7.56	7.63	7.60
5	4.08	4.24	4.28	4.31	4.31	4.24	4.28	4.24	4.31	4.31	4.17
6	4.08	4.03	4.21	4.05	3.89	3.89	3.94	4.00	4.01	3.98	4.02
7	6.79	6.73	6.73	6.71	6.61	6.66	6.74	6.73	6.69	6.71	6.69
8	4.53	4.61	4.45	4.36	4.28	4.33	4.45	4.43	4.43	4.28	4.45
9	6.75	6.79	6.74	6.74	6.72	6.69	6.73	6.74	6.74	6.76	6.72
10	4.33	4.17	4.21	4.33	4.31	4.36	4.49	4.03	4.31	4.24	4.39
11	4.49	4.65	4.49	4.56	4.51	4.49	4.56	4.62	4.58	4.55	4.55
12	6.37	6.36	6.43	6.45	6.48	6.44	6.41	6.47	6.45	6.46	6.43
13	4.21	4.28	4.21	4.17	4.24	4.31	4.28	4.13	3.98	4.08	3.98
14	7.79	7.79	7.72	7.83	7.84	7.84	7.89	7.84	7.89	7.85	7.79
15	7.69	7.81	7.84	7.82	7.83	7.82	7.81	7.84	7.83	7.88	7.84
16	7.76	7.82	7.81	7.83	7.75	7.75	7.91	7.85	7.81	7.77	7.72
17	3.87	3.75	3.92	3.99	3.93	3.86	3.85	3.89	3.89	3.88	3.87
18	4.03	3.90	3.51	3.58	3.43	3.64	3.81	3.53	3.77	3.71	3.51
19	7.32	7.30	7.30	7.17	7.13	7.04	7.15	7.18	7.21	7.13	7.14
20	7.35	7.28	7.31	7.32	7.30	7.25	7.31	7.27	7.28	7.26	7.24
21	6.45	6.41	6.29	6.32	6.33	6.34	6.38	6.33	6.34	6.38	6.36
22	7.91	7.89	7.91	7.83	7.87	7.88	7.91	7.90	7.92	7.91	7.87
23	5.03	4.92	5.09	5.01	4.93	4.95	5.08	5.06	4.89	5.03	5.13
24	7.78	7.86	7.82	7.79	7.86	7.82	7.80	7.82	7.74	7.82	7.70
25	5.96	5.89	6.00	6.01	5.99	6.00	5.96	5.96	5.98	5.93	5.93
26	5.33	5.36	5.37	5.38	5.38	5.30	5.35	5.35	5.35	5.42	5.29
27	4.87	4.89	4.79	4.71	4.92	4.88	4.77	4.75	4.98	4.80	4.70
28	3.88	3.73	3.51	3.67	3.28	3.47	3.61	3.59	3.51	3.49	3.47
29	3.51	3.62	3.64	3.03	3.33	2.13	3.69	3.28	3.31	2.43	2.98
30	8.04	8.04	8.07	7.94	8.06	7.99	8.04	7.95	8.04	7.98	7.96
31	5.08	4.99	4.92	5.04	5.06	4.88	4.92	4.96	5.05	4.98	4.94
32	4.28	4.17	4.03	3.91	4.03	4.03	3.56	3.77	3.91	3.94	3.65
33	3.08	3.13	3.43	2.13	3.45	3.24	3.41	3.03	3.47	3.17	2.13
34	6.89	6.87	6.95	6.89	6.90	6.94	6.96	6.95	6.91	6.64	6.71
35	4.62	4.31	4.53	4.21	4.33	4.43	4.41	4.13	4.36	4.31	4.41
36	7.62	7.54	7.54	7.53	7.52	7.51	7.57	7.51	7.53	7.54	7.55
37	4.53	4.62	4.62	4.56	4.67	4.77	4.61	4.66	4.66	4.61	4.69
38	5.01	4.79	4.87	4.74	4.85	4.62	4.70	4.69	4.81	4.87	4.90
39	3.91	4.03	4.03	4.01	4.03	3.98	4.08	4.08	4.00	4.03	3.96
40	4.03	3.81	3.94	3.81	3.81	3.62	3.53	3.79	3.67	3.58	3.67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บรรณานุกรม

1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.

2. Razavi-Shearer D, Gamkrelidze I, Nguyen MH, Chen D-S, Van Damme P, Abbas Z, et al. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. The Lancet Gastroenterology & Hepatology. 2018;3(6):383-403.

3. Gish RG, Given BD, Lai CL, Locarnini SA, Lau JY, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. Antiviral Res. 2015;121:47-58.

4. Zoulim F, Durantel D. Antiviral therapies and prospects for a cure of chronic hepatitis B. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2015;5(4).

5. Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Journal of hepatology. 2016;64(1, Supplement):S117-S31.

6. Lok AS, Zoulim F, Dusheiko G, Ghany MG. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. Hepatology (Baltimore, Md). 2017;66(4):1296-313.

7. Terrault NA, Lok ASF, McMahon BJ, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. Hepatology (Baltimore, Md). 2018;67(4):1560-99.

8. Coffin CS, Zhou K, Terrault NA. New and Old Biomarkers for Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B Virus Infection. Gastroenterology. 2019;156(2):355-68.e3.

9. Rokuhara A, Matsumoto A, Tanaka E, Umemura T, Yoshizawa K, Kimura T, et al. Hepatitis B virus RNA is measurable in serum and can be a new marker for monitoring lamivudine therapy. Journal of gastroenterology. 2006;41(8):785-90.

10. Sanders R, Bustin S, Huggett J, Mason D. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. Biomolecular detection and quantification. 2018;15:13-7.

11. Manual of Specimen Collection and Handling in Microbiology. Bangkok: Department of micobiology, Faculty of medicine, Chulalongkorn university; 2018.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

12. Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular Biology of the Hepatitis B Virus for Clinicians. Journal of Clinical and Experimental Hepatology. 2012;2(4):353-65.

13. Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. 2000;64(1):51-68.

14. Ganem D, Schneider R. Hepadnaviridae:the viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2923–69.

15. Hu J, Liu K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. Viruses. 2017;9(3).

16. Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. Journal of hepatology. 2016;64(1 Suppl):S84-s101.

17. Wooddell CI, Yuen MF, Chan HL, Gish RG, Locarnini SA, Chavez D, et al. RNAi-based treatment of chronically infected patients and chimpanzees reveals that integrated hepatitis B virus DNA is a source of HBsAg. Science translational medicine. 2017;9(409).

18. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nature reviews Immunology. 2005;5(3):215-29.

19. Liu S, Zhou B, Valdes JD, Sun J, Guo H. Serum Hepatitis B Virus RNA: A New Potential Biomarker for Chronic Hepatitis B Virus Infection. Hepatology (Baltimore, Md). 2019;69(4):1816-27.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

20. Yang W, Summers J. Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. Journal of virology. 1999;73(12):9710-7.

21. Wang J, Shen T, Huang X, Kumar GR, Chen X, Zeng Z, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. Journal of hepatology. 2016;65(4):700-10.

22. Kock J, Theilmann L, Galle P, Schlicht HJ. Hepatitis B virus nucleic acids associated with human peripheral blood mononuclear cells do not originate from replicating virus. Hepatology (Baltimore, Md). 1996;23(3):405-13.

23. Jansen L, Kootstra NA, van Dort KA, Takkenberg RB, Reesink HW, Zaaijer HL. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Is Present in Virions in Plasma and Is Associated With

a Response to Pegylated Interferon Alfa-2a and Nucleos(t)ide Analogues. The Journal of infectious diseases. 2016;213(2):224-32.

24. Lu F, Wang J, Chen X, Xu D, Xia N. Potential use of serum HBV RNA in antiviral therapy for chronic hepatitis B in the era of nucleos(t)ide analogs. Frontiers of medicine. 2017;11(4):502-8.

25. Wang J, Sheng Q, Ding Y, Chen R, Sun X, Chen X, et al. HBV RNA virion-like particles produced under nucleos(t)ide analogues treatment are mainly replication-deficient. Journal of hepatology. 2018;68(4):847-9.

26. Cornberg M, Wong VW, Locarnini S, Brunetto M, Janssen HLA, Chan HL. The role of quantitative hepatitis B surface antigen revisited. Journal of hepatology. 2017;66(2):398-411.

27. Huang YW, Takahashi S, Tsuge M, Chen CL, Wang TC, Abe H, et al. On-treatment low serum HBV RNA level predicts initial virological response in chronic hepatitis B patients receiving nucleoside analogue therapy. Antiviral therapy. 2015;20(4):369-75.

28. van Bommel F, Bartens A, Mysickova A, Hofmann J, Kruger DH, Berg T, et al. Serum hepatitis B virus RNA levels as an early predictor of hepatitis B envelope antigen seroconversion during treatment with polymerase inhibitors. Hepatology (Baltimore, Md). 2015;61(1):66-76.

29. Wang J, Du M, Huang H, Chen R, Niu J, Jiang J, et al. Reply to: "Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity": Consistent loss of serum HBV RNA might predict the "para-functional cure" of chronic hepatitis B. Journal of hepatology. 2017;66(2):462-3.

30. Tsuge M, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, et al. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. Journal of gastroenterology. 2013;48(10):1188-204.

31. Wu Y, Wen J, Xiao W, Zhang B. Pregenomic RNA: How to assist the management of chronic hepatitis B? Reviews in Medical Virology. 2019;29(4):e2051.

32. Klumpp K, Shimada T, Allweiss L, Volz T, Lutgehetmann M, Hartman G, et al. Efficacy of NVR 3-778, Alone and In Combination With Pegylated Interferon, vs Entecavir

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

In uPA/SCID Mice With Humanized Livers and HBV Infection. Gastroenterology. 2018;154(3):652-62.e8.

33. Berke JM, Dehertogh P, Vergauwen K, Van Damme E, Mostmans W, Vandyck K, et al. Capsid Assembly Modulators Have a Dual Mechanism of Action in Primary Human Hepatocytes Infected with Hepatitis B Virus. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017;61(8).

34. Jo E, Ryu D-K, König A, Park S, Cho Y, Park S-H, et al. Identification and characterization of a novel hepatitis B virus pregenomic RNA encapsidation inhibitor. Antiviral Research. 2020;175:104709.

35. Bai F, Yano Y, Fukumoto T, Takebe A, Tanaka M, Kuramitsu K, et al. Quantification of pregenomic RNA and covalently closed circular DNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. International journal of hepatology. 2013;2013:849290.

36. Halgand B, Desterke C, Riviere L, Fallot G, Sebagh M, Calderaro J, et al. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA in Hepatocellular Carcinoma: A Nosological and Prognostic Determinant. Hepatology (Baltimore, Md). 2018;67(1):86-96.

37. Sanders R, Bustin S, Huggett J, Mason D. Improving the standardization of mRNA measurement by RT-qPCR. Biomolecular detection and quantification. 2018;15:13-7.

38. Sebire K, McGavin K, Land S, Middleton T, Birch C. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. Journal of clinical microbiology. 1998;36(2):493-8.

39. de Moreau de Gerbehaye AI, Bodeus M, Robert A, Horsmans Y, Goubau P. Stable hepatitis C virus RNA detection by RT-PCR during four days storage. BMC infectious diseases. 2002;2:22.

40. Krajden M, Minor JM, Zhao J, Rifkin O, Comanor L. Assessment of hepatitis C virus RNA stability in serum by the Quantiplex branched DNA assay. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 1999;14(2):137-43.

41. Kuypers J, Jerome KR. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. Journal of clinical microbiology. 2017;55(6):1621-8.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

42. Lam AM, Ren S, Espiritu C, Kelly M, Lau V, Zheng L, et al. Hepatitis B Virus Capsid Assembly Modulators, but Not Nucleoside Analogs, Inhibit the Production of Extracellular Pregenomic RNA and Spliced RNA Variants. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017;61(8).
43. Tang H, Cai Q, Li H, Hu P. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantification of hepatitis B virus DNA. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2016:1-6.
44. Pawlotsky JM. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays? Hepatology (Baltimore, Md). 1997;26(1):1-4.
45. Chow S, Shao J, Wang H. Sample Size Calculation in Clinical Research. 2nd ed: Chapman&Hall/CRC; 2003.
46. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, Meng Z, Zheng J, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. Journal of hepatology. 2018;68(1):16-24.
47. Baleriola C, Johal H, Jacka B, Chaverot S, Bowden S, Lacey S, et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20°C and -70°C. Journal of clinical microbiology. 2011;49(9):3163-7.
48. Relova D, Rios L, Acevedo AM, Coronado L, Perera CL, Pérez LJ. Impact of RNA Degradation on Viral Diagnosis: An Understated but Essential Step for the Successful Establishment of a Diagnosis Network. Vet Sci. 2018;5(1).
49. Hacker HJ, Zhang W, Tokus M, Bock T, Schroder CH. Patterns of circulating hepatitis B virus serum nucleic acids during lamivudine therapy. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004;1022:271-81.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ภัคพล รัตนชัยสิทธิ์
วัน เดือน ปี เกิด	26 เมษายน 2533
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2551 มัธยมศึกษาตอนปลาย เตรียมอุดมศึกษา พ.ศ.2557 แพทยศาสตร์บัณฑิต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2561 แพทย์ประจำบ้าน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2563 แพทย์ประจำบ้านต่อยอด ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	73/2 หมู่ 13 ต.ในคลองบางปลากด อ.พระสมุทรเจดีย์ จ.สมุทรปราการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University