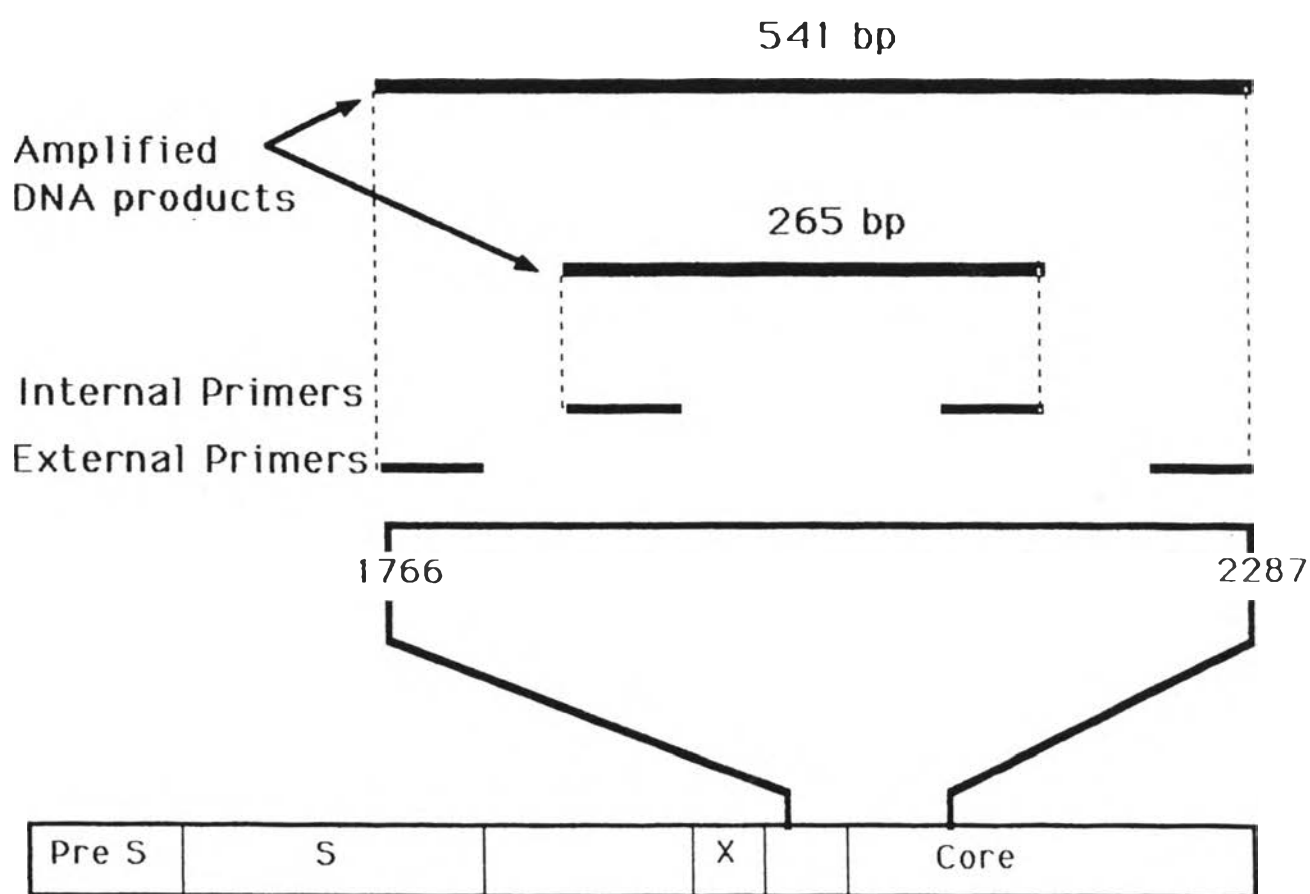


ผลการทดลอง

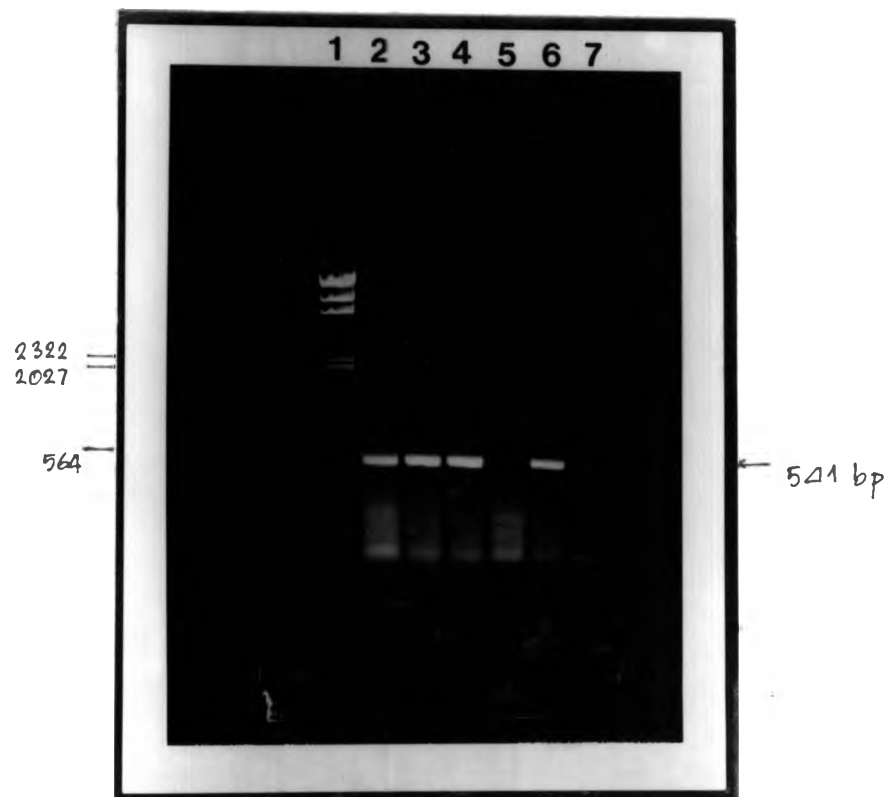
การตรวจหา HBV DNA ด้วยขบวนการ PCR โดยใช้ Outer primer

การตรวจหา HBV DNA ด้วยขบวนการ PCR เมื่อใช้ outer primer ที่สร้างขึ้น พบว่า DNA fragment ที่ได้จะมีขนาด 541 bp. (รูป 4.1) และจากผลการตรวจหา HBV DNA ที่ได้จากการสกัดซีรัม ในรายที่ HBS Ag⁺ (อยู่ในกลุ่ม 2) พบว่าได้ DNA fragment ขนาด 541 bp (รูป 4.2, lane 2-4) ส่วนการตรวจหา HBV DNA ในรายที่จัดเป็น HBS Ag-negative ex-chronic carrier (อยู่ในกลุ่ม 3.1) ไม่พบ DNA fragment ขนาด 541 bp (รูป 4.2, lane 7) ที่เป็นดังนี้เนื่องจากในซีรัมของบุคคลรายนี้มี HBV DNA ในระดับต่ำจนไม่สามารถตรวจพบได้โดยการทำ PCR ครั้งเดียว



Region of HBV genome amplified by PCR.

รูปที่ 4.1 ภาพแสดง HBV genome และ ตำแหน่งของ external primer และ internal primer



รูปที่ 4.2 แสดง DNA fragment ขนาด 541 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน HBV DNA โดยใช้ outer primer

Lane 1 : molecular weight marker; \nearrow DNA/Hind III

Lane 2-4 : HBs Ag⁺

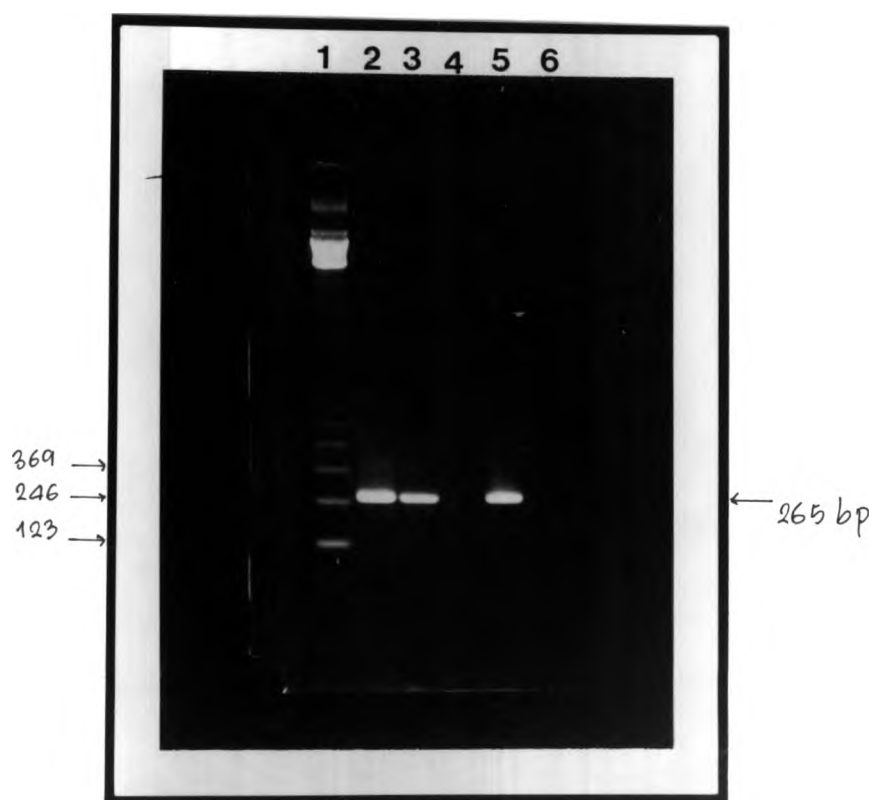
Lane 5 : negative control (H₂O)

Lane 6 : positive control (HBV DNA)

Lane 7 : HBs Ag - negative ex - chronic carrier

การตรวจหา HBV DNA ด้วยขบวนการ PCR โดยใช้ inner primer

การตรวจหา HBV DNA ด้วยขบวนการ PCR เมื่อใช้ inner primer ที่สร้างขึ้น พบว่า DNA fragment ที่ได้จะมีขนาด 265 bp (รูป 4.1) และจากผลการตรวจหา HBV DNA ที่ได้จากการสกัดซีรัม ในรายที่ HBs Ag⁺ (อยู่ในกลุ่ม 2) พบว่าได้ DNA fragment ขนาด 265 bp (รูป 4.3, lane 2-3) ส่วนการตรวจหา HBV DNA ในรายที่จัดเป็น HBs Ag - negative ex - chronic carrier (อยู่ในกลุ่ม 3.1) ไม่พบ DNA fragment ขนาด 265 bp (รูป 4.3, lane 6) ที่เป็นดังนี้เนื่องจากในซีรัมของบุคคลกลุ่มนี้มี HBV DNA ในระดับต่ำจนไม่สามารถตรวจพบได้โดยการทำ PCR ครั้งเดียว



รูปที่ 4.3 แสดง DNA fragment ขนาด 265 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน

HBV DNA โดยใช้ inner primer

Lane 1 : molecular weight marker; 123 bp DNA ladder

Lane 2-3 : HBS Ag⁺

Lane 4 : negative control (H₂O)

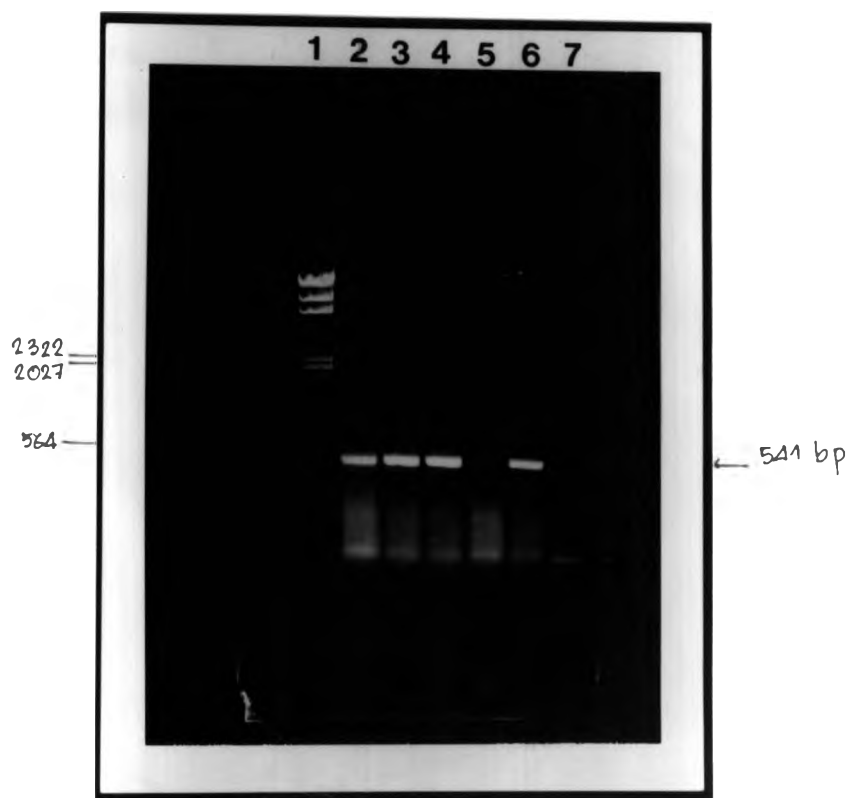
Lane 5 : positive control (HBV DNA)

Lane 6 : HBS Ag - negative ex - chronic carrier



การตรวจหา HBV DNA โดยวิธี Two - step nested PCR

ผลการตรวจหา HBV DNA ที่ได้จากการสกัดซีรัมในรายที่ HBs Ag⁺ (กลุ่ม 2) และจากซีรัมในรายที่จัดเป็น HBs Ag - negative ex - chronic carrier โดยวิธี Two - step nested PCR (รูปที่ 4.4 แสดง First step PCR และรูปที่ 4.5 แสดง nested PCR) พบว่าในรายที่เป็น HBs Ag-negative ex-chronic carrier ไม่สามารถตรวจพบ HBV DNA (DNA fragment ขนาด 541 bp) ในขั้นตอนของ first step PCR (รูป 4.4, lane 7) แต่สามารถตรวจพบ HBV DNA (DNA fragment ขนาด 265 bp) ได้ในขั้นตอนของ nested PCR (รูป 4.5, lane 7) เนื่องจากว่าในซีรัมของบุคคลรายนี้มีระดับ HBV DNA ต่ำมาก



รูปที่ 4.4 First step PCR แสดง DNA fragment ขนาด 541 bp

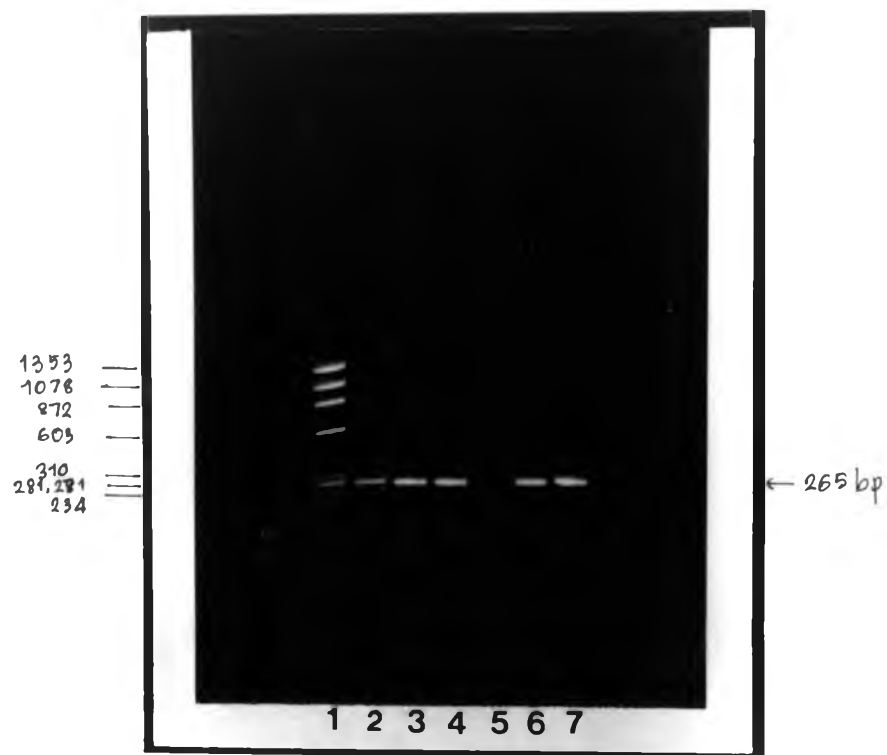
Lane 1 : molecular weight marker: λ DNA/Hind III

Lane 2-4 : HBS Ag⁺

Lane 5 : negative control (H₂O)

Lane 6 : positive control (HBV DNA)

Lane 7 : HBS Ag - negative ex - chronic carrier



รูปที่ 4.5 Nested PCR แสดง DNA fragment ขนาด 265 bp

Lane 1 : molecular weight marker; ϕ 174/Hae III

Lane 2-4 : HBS Ag⁺

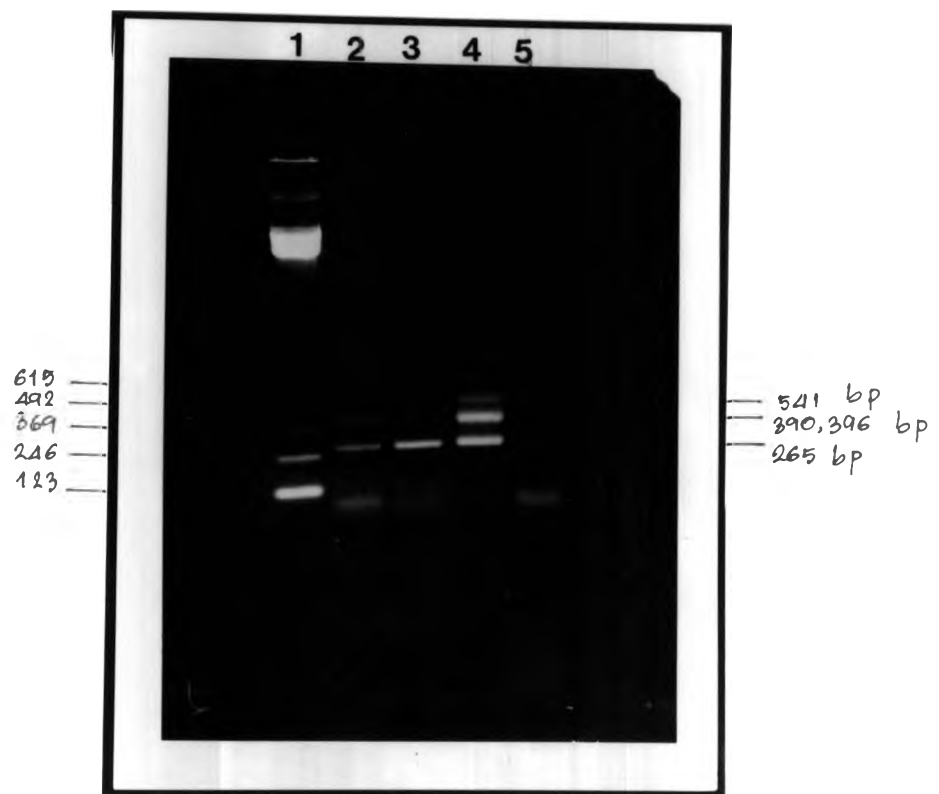
Lane 5 : negative control (H₂O)

Lane 6 : positive control (HBV DNA)

Lane 7 : HBS Ag - negative ex - chronic carrier

การตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One - step nested PCR

ผลการตรวจหา HBV DNA ที่ได้จากการสกัดซีรัมในรายที่ HBS Ag⁺ (กลุ่ม 2) และจากซีรัมในรายที่จัดเป็น HBS Ag - negative ex - chronic carrier โดยวิธี One-step nested PCR พบว่าได้ผลการตรวจเหมือนกันกับวิธี Two-step nested PCR



รูปที่ 4.6 แสดง DNA fragment ที่ได้จากขบวนการ One-step nested PCR

Lane 1 : molecular weight marker; 123 bp DNA ladder

Lane 2 : HBS Ag⁺

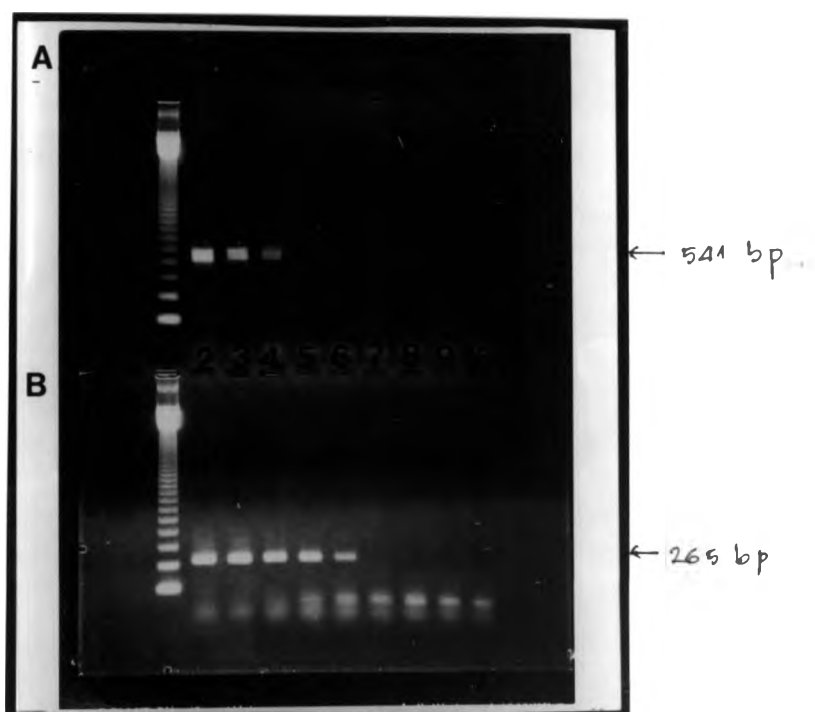
Lane 3 : HBS Ag - negative ex - chronic carrier

Lane 4 : positive control (HBV DNA)

Lane 5 : negative control (H₂O)

เปรียบเทียบ sensitivity ระหว่าง วิธี One-step nested PCR และ วิธี Two - step nested PCR

ผลแสดงการเปรียบเทียบ sensitivity ระหว่างวิธี One-step nested PCR และ วิธี Two-step nested PCR โดยทำการทดสอบกับ HBV DNA ในรายเดียวกันโดยทำการตรวจหาตั้งแต่ undiluted HBV DNA จนถึง 10^{-7} HBV DNA จากการเปรียบเทียบพบว่า ทั้งวิธี One-step nested PCR และ Two-step nested PCR ให้ผล sensitivity เท่ากัน คือสามารถตรวจพบ HBV DNA ที่เจือจางเท่ากันคือ 10^{-4} (รูปที่ 4.7 และ รูปที่ 4.8)



รูปที่ 4.7 แสดงการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี Two-step nested PCR

Panel A : First PCR

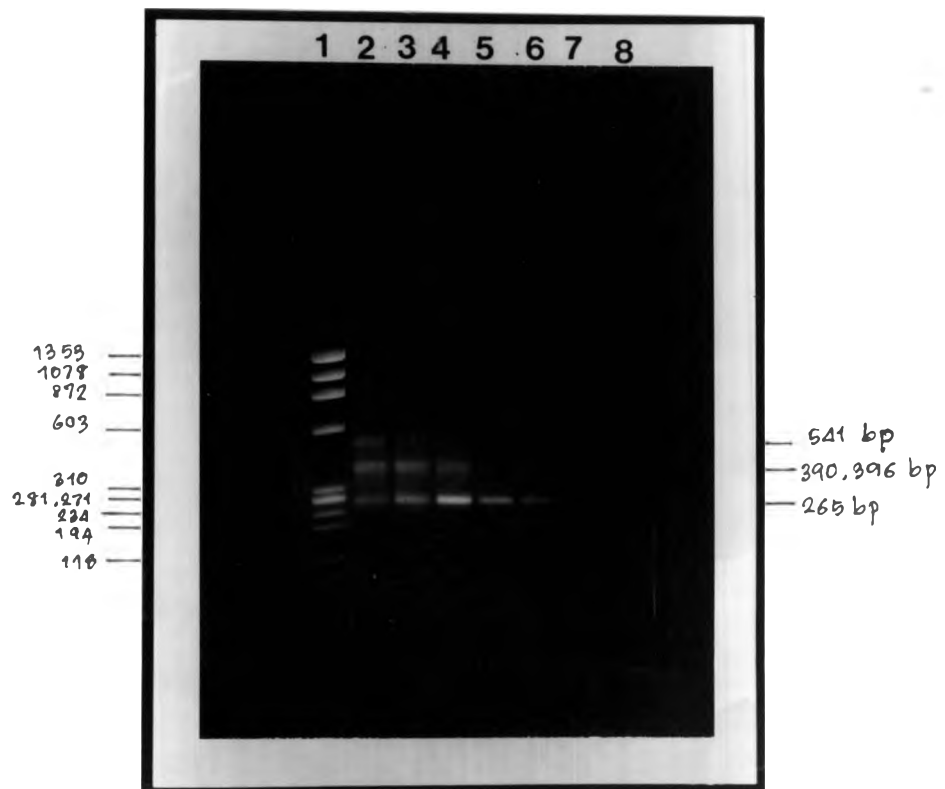
Panel B : Nested PCR

Lane 1 : molecular weight marker; 123 bp DNA ladder

Lane 2 : undiluted HBV DNA

Lane 3-9 : 10^{-1} - 10^{-7} HBV DNA

Lane 10 : negative control (H_2O)



รูปที่ 4.8 แสดงการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One - step nested PCR

Lane 1 : molecular weight marker ; Φ 174/Hae III

Lane 2 : undiluted HBV DNA

Lane 3-7 : 10^{-1} - 10^{-5} HBV DNA

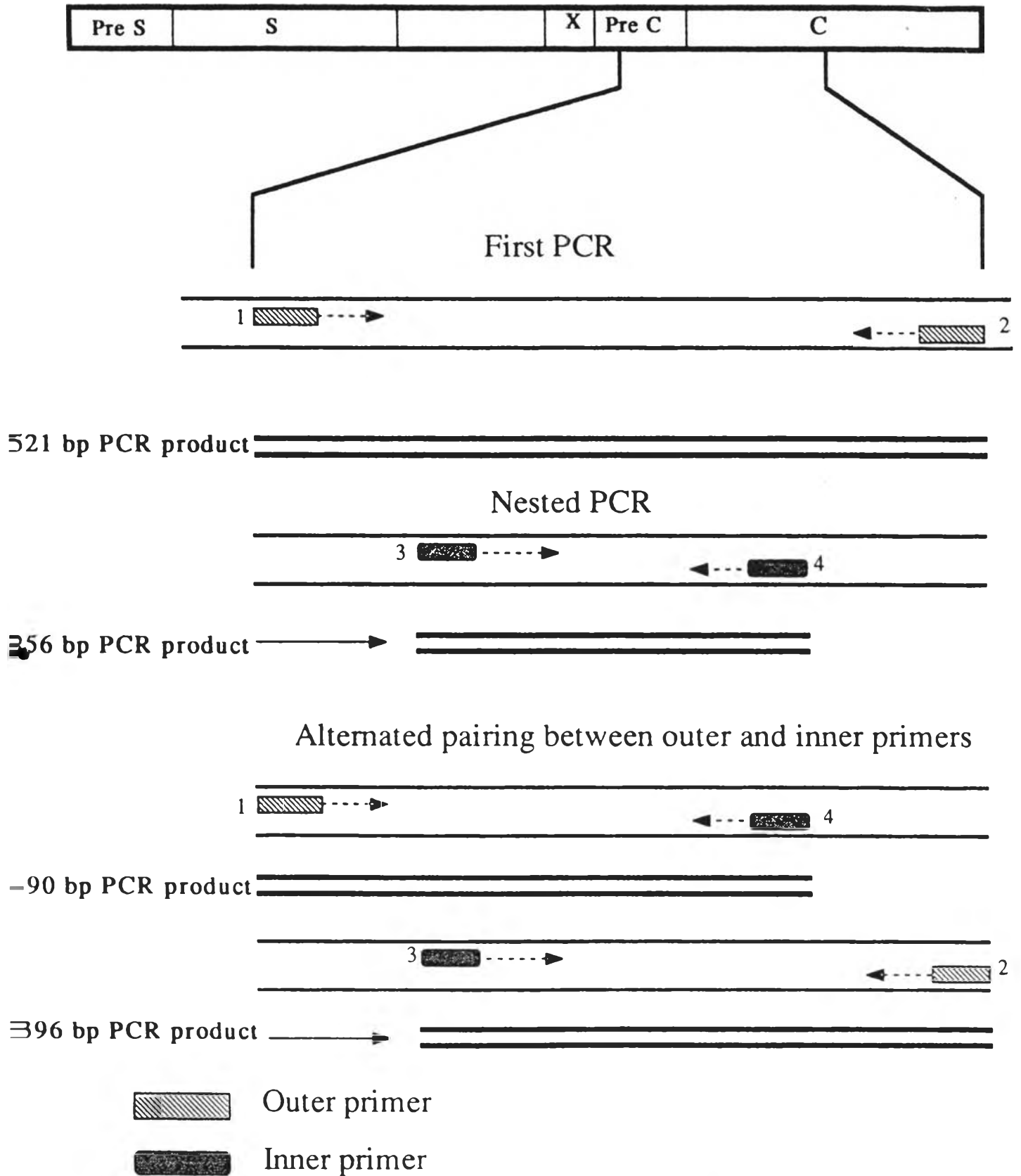
Lane 8 : negative control (H₂O)

ผลของ DNA fragment ขนาดต่าง ๆ ที่เกิดจากขบวนการ PCR โดยการสลับคู่ของ primer
(alternate pairs of primer)

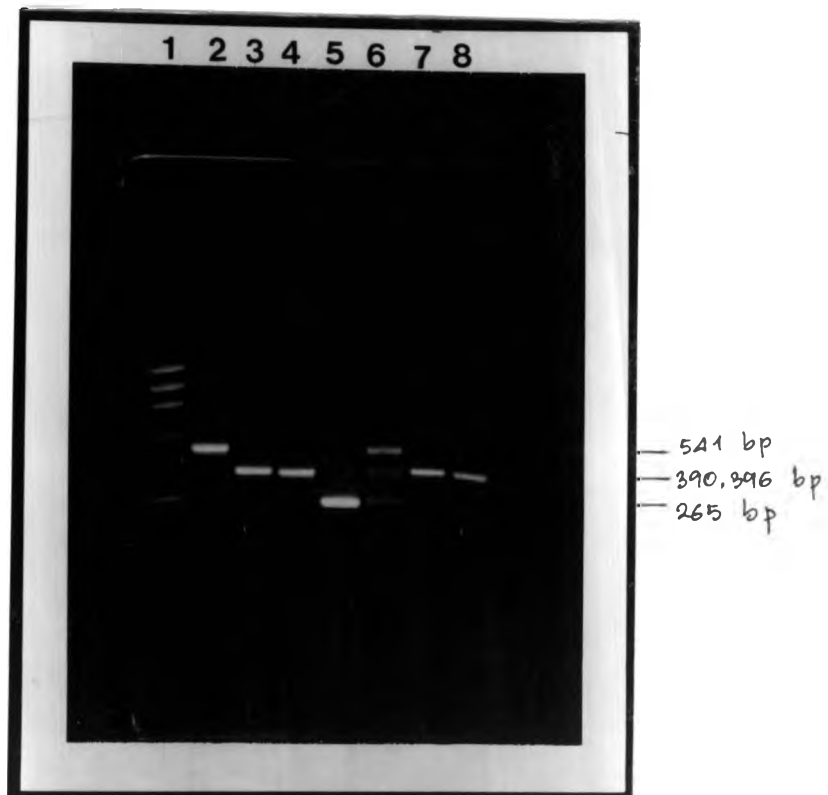
DNA fragment ขนาดต่าง ๆ ที่เกิดจากขบวนการ One - step nested PCR อันเนื่องจากการสลับคู่การเพิ่มจำนวน DNA ของ primer ทั้ง 4 primers (รูปที่ 4.9 และ รูปที่ 4.10)

โดยเมื่อเพิ่มจำนวน DNA ด้วย primer 1 และ 2 จะได้ DNA fragment ขนาด 521 bp
primer 3 และ 4 จะได้ DNA fragment ขนาด 265 bp
primer 1 และ 4 จะได้ DNA fragment ขนาด 390 bp
primer 2 และ 3 จะได้ DNA fragment ขนาด 396 bp

HBV Genome



รูปที่ 4.9 ภาพแสดง DNA fragment ขนาดต่าง ๆ ที่เกิดจาก ขบวนการ PCR โดยการสลับคู่ ของ primer



รูปที่ 4.10 แสดง DNA fragment ขนาดต่างๆ ที่เกิดจากขบวนการ PCR

โดยการสลับคู่ของ primer

Lane 1 : molecular weight marker; ϕ 174/Hae III

Lane 2 : 521 bp PCR product

Lane 3,7 : 396 bp PCR product

Lane 4,8 : 390 bp PCR product

Lane 5 : 265 bp PCR product

Lane 6 : One - step nested PCR

ผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่มบุคคล HBsAg negative control และ HBs Ag positive control โดยวิธี One - step nested PCR

จากการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One - step nested PCR ในกลุ่ม HBs Ag negative control จำนวน 50 ราย (group I, II, III) และกลุ่ม HBs Ag positive control จำนวน 50 ราย (group IV) ให้ผลการตรวจดังตาราง 4.1

ตาราง 4.1

Group	No.of sample	HBs Ag	Anti-HBs	Anti-HBc	HBV DNA
I	18	-	-	-	3
II	9	-	+	+	-
III	23	-	+	-	-
IV	50	+	ND	ND	+(49)

ND : Not determined

จากผลการตรวจหา HBV DNA ใน group I สามารถพบ HBV DNA ได้จำนวน 3 ราย จากทั้งหมด 18 ราย (ในการศึกษาได้ทำการตรวจซ้ำ 3 ครั้ง โดยเจาะเลือดใหม่ทุกครั้ง) ซึ่งทั้งหมดให้ผลการตรวจ HBs Ag , anti-HBs และ anti-HBc เป็นลบที่เป็นดังนี้อาจเนื่องจากในซีรัมของบุคคลเหล่านี้มีระดับ HBV DNA อยู่ในระดับต่ำมาก ๆ (low-level carrier) ซึ่งตรงกันกับรายงานของ Sumazaki และคณะ (5), Wang และคณะ (8) ดังได้กล่าวไว้แล้วในบทที่ 2.7 หรืออาจเกิดจากบุคคลทั้ง 3 รายนี้ ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มาตั้งแต่แรกเกิด (neonatal tolerance)

สำหรับกลุ่ม IV ซึ่งเป็นกลุ่มที่ตรวจพบ HES Ag ได้โดยวิธี ELISA จากการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One-step nested PCR พบว่า 1 รายไม่สามารถตรวจเจอ HBV DNA ได้ที่เป็นดังนี้ เนื่องจากเป็นระยะที่ไม่มีการสร้างเชื้อไวรัสตัวใหม่ออกมา (nonreplicative state) คงมีการสร้างเฉพาะส่วนเปลือกของไวรัส (free HBs Ag) ออกมา ซึ่งตรงกันกับรายงานของ Baginski และคณะ (87) ที่พบว่าในผู้ป่วยที่ตรวจพบ HBs Ag ในเลือดเป็นบวก ไม่สามารถตรวจพบ HBV DNA ได้จากซีรัม แต่สามารถตรวจพบ HBV DNA ได้ใน peripheral blood mononuclear cell (PBMC) เนื่องจากว่าเชื้อไวรัสอยู่ในระยะ nonreplicative state

ผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม HBs Ag-negative ex-chronic carrier (กลุ่ม 3.1)

โดยวิธี One-step nested PCR

จากการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม HBs Ag-negative ex-chronic carrier จำนวน 12 ราย พบว่าสามารถตรวจพบ HBV DNA จำนวน 6 ราย โดยวิธี One - step nested PCR คิดเป็นร้อยละ 50

ผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม hepatitis B vaccine non-responder (กลุ่ม 3.2)

โดยวิธี One-step nested PCR

จากการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม hepatitis B vaccine non-responder จำนวน 9 ราย พบว่า สามารถตรวจพบ HBV DNA จำนวน 3 ราย โดยวิธี One - step nested PCR คิดเป็นร้อยละ 33.3