บทที่ 5

วิจารณ์ และ สรุปผลการทดลอง

การศึกษาและวิจัยในครั้งนี้ เป็นการศึกษาการนำเอาเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) มาใช้ในการตรวจหา HBV DNA จากตัวอย่างที่เป็นซีรั่ม โดยในการคัดเลือก primer เพื่อใช้ในขบวนการ PCR ได้คัดเลือกจากส่วนที่เป็น core gene ของ HBV genome ซึ่งพบว่าเป็นส่วนอนุรักษ์ (conservative region) ของไวรัสตับอักเสบ บี (69) และ จากการศึกษาพบว่า primer ที่ได้คัดเลือกมามีความจำเพาะสูงกับ HBV DNA โดยให้ผลบวกกับ DNA ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี และให้ผลลบในการทดสอบกับ DNA ของเชื้อชนิดอื่นๆ ได้แก่ Pseudomonas pseudomallei, Chlamydia trachomatis, cDNA ของ rabies virus, และ DNA ของมนุษย์

ในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากจะนำเอาเทคนิค nested PCR มาใช้ในการตรวจหา HBV DNA แล้วยังได้พัฒนาวิธีการใหม่ที่เรียกว่า One - step nested PCR ขึ้นมาใหม่โดยใช้ HBV DNA เป็น prototype ในการพัฒนาเนื่องจากวิธี Two-step nested PCR ซึ่งปัจจุบันเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจหา DNA ของเชื้อต่างๆ (7,12,13,14) โดยพบว่าปัญหาที่สำคัญของวิธี Two - step nested PCR นั้นคือผลบวกปลอม (flase positive) ที่เกิดขึ้นจากการปนเปื้อนของ PCR product จากการทำ PCR ในขั้นตอนแรก (first step PCR) เนื่องจากการทำ Two - step nested PCR มีขั้นตอนการนำเอา PCR product ที่เกิดขึ้นจาก first step PCR ออกจากหลอดทดลองเพื่อใส่ลงใน reaction mixture ในขั้นตอนของ second step PCR ดังนั้นจึงทำให้โอกาสในการปนเปื้อนของ PCR product ไปสู่ reaction mixture ในหลอดอื่นๆ เกิดขึ้นได้ง่าย ปัญหาดังกล่าวนี้สามารถหลีกเลี่ยงได้โดยการทำ One-step nested PCR ซึ่งเป็นการรวมเอา first step PCR และ second step PCR (nested PCR) ไว้ในหลอดเดียวกันโดยไม่จำเป็นต้องเปิด

ฝาหลอดของ first step PCR จึงเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของ PCR product สู่ reaction mixture อื่นๆได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ nested PCR โดยวิธี "drop in, drop out' ซึ่งคิดค้นโดย Higuchi (65) พบว่าวิธี One-step nested PCR ทำได้สะดวกกว่าโดยที่ไม่ต้องอาศัยการสร้าง primer ที่พิเศษ และสามารถใช้อุณหภูมิในการเพิ่มจำนวน DNA (thermal profile) ได้เหมือนกันทั้งขั้นตอน first step PCR และขั้นตอน nested PCR

จากคุณสมบัติของวิธี One-step nested PCR ดังที่ได้กล่าวมาแล้วจะเห็นว่าเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และทำได้ง่าย นอกจากนั้นการทำ One-step nested PCR ยังเป็นการยืนยันความจำเพาะของ DNA fragment ที่เกิดขึ้นแทนการยืนยันโดยการใช้สารกัมมันตรังสีในการทำ southern blot hybridization (5,6,10,11,65) ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังมีความปลอดภัยสูงต่อผู้ปฏิบัติอีกด้วย

ในการเปรียบเทียบผล sensitivity ของวิธี One - step nested PCR กับ วิธี Two - step nested PCR พบว่าให้ผล sensitivity เท่ากัน (รูปที่ 4.7 และ รูปที่ 4.8) นอกจากนี้วิธี One - step nested PCR ยังสามารถใช้ในการบอกปริมาณอย่างคร่าวๆ (semiquantitative) ของ HBV DNA ในตัวอย่างส่งตรวจได้อีกด้วย กล่าวคือ

ถ้าปริมาณ HBV DNA ในตัวอย่างส่งตรวจมีปริมาณมาก จากการตรวจหา โดยวิธี One - step nested PCR แล้วจะพบว่า DNA fragment ที่เกิดขึ้นจะมี 4 ขนาด คือ 521 bp, 396 bp, 390 bp และ 265 bp โดย DNA fragment ขนาด 521 bp เกิดขึ้นจากขั้นตอนของ first step PCR โดยการเพิ่มจำนวนของ primer คู่นอก DNA fragment ขนาด 396 bp และ ขนาด 390 bp เกิดจากการสลับคู่การเพิ่มจำนวนของ primer คู่นอก และ primer คู่ใน ในขั้นตอนของ second step PCR เนื่องจากในขั้นตอนนี้ reaction mixture จะมีทั้ง primer คู่นอก และ primer คู่ใน ผสมกันซึ่งจากการแยกใน gel electrophoresis จะเห็นเพียงขนาดเดียวเนื่องจาก DNA fragment ทั้งสองมีขนาด

ใกล้เคียงกันมาก ส่วน DNA fragment ขนาด 265 bp เกิดขึ้นจาก primer คู่ใน ในขั้นตอนของ second step PCR (รูปที่ 4.8)

ถ้าหากปริมาณ HBV DNA ในสิ่งส่งตรวจมีปริมาณน้อยลง ขนาดของ DNA fragment ที่เกิดขึ้นจากการทำ One - step nested PCR จะพบว่ามีเพียง 3 ขนาด คือ 396 bp , 390 bp และ 265 bp แต่จะเห็นเพียง 2 ขนาด จากการแยกใน gel electrophoresis

ถ้าหากปริมาณ HBV DNA ในสิ่งส่งตรวจมีปริมาณน้อยมาก จากการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี One-step nested PCR นั้จะพบเฉพาะ DNA fragment ขนาด 265 bp ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนของ nested PCR

จากที่กล่าวมาแล้วในการบอกปริมาณ HBV DNA อย่างคร่าว ๆ สามารถบอกได้เป็น 3^+ , 2^+ , และ 1^+ โดย

3^+ หมายถึง การพบ DNA fragment ทั้ง 4 ขนาด คือ 520 bp, 396 bp, 390 bp และ 265 bp (รูปที่ 4.8 , lane 2-3)

2^+ หมายถึง การพบ DNA fragment 3 ขนาด คือ 396 bp, 390 bp และ 265 bp (รูปที่ 4.8 , lane 4)

1^+ หมายถึง การพบ DNA fragment เพียงขนาดเดียว คือ 265 bp (รูปที่ 4.8 , lane 5-6)

สำหรับการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่มบุคคลที่มีสุขภาพสมบูรณ์ (healthy person) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากลุ่มบุคคลที่ให้ผลการตรวจ HBs Ag negative สามารถตรวจพบ HBV DNA โดยวิธี One - step nested PCR จำนวน 3 ราย ในจำนวนทั้งหมด 50 ราย (ตารางที่ 4.1) ที่เป็นดังนี้อาจเนื่องมาจากบุคคลกลุ่มนี้มีระดับไวรัสตับอักเสบ บี ในร่างกาย

อยู่ระดับต่ำๆ (low - level carriers) ซึ่งอาจต่ำกว่าระดับ infectivity dose(7,8)

สำหรับการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม non-responder หรือกลุ่มบุคคลที่ไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี โดยพบว่าร่างกายไม่สามารถสร้าง anti-HBs หรือสร้างได้ในระดับต่ำ คือน้อยกว่า 10 mIU/ml (18,71) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในจำนวน non-responder มีสุขภาพสมบูรณ์ (healthy person) จำนวน 9 ราย สามารถตรวจพบ HBV DNA จำนวน 3 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 33.3 (รูปที่ 4.11) และในจำนวน non-responder ที่เคยเป็นโรคไวรัสตับอักเสบ บี มาก่อน (ex-chronic carrier) จำนวน 12 ราย สามารถตรวจพบ HBV DNA ได้จำนวน 6 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 50 จากผลการวิจัยในครั้งนี้ อาจอธิบายได้ว่าสาเหตุที่ non-responder ดังกล่าวไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี อาจเนื่องมาจากความบกพร่องทางด้านภูมิคุ้มกันของบุคคลเหล่านี้ที่เรียกว่า low dose immunotolerance ซึ่งตรงกันกับสมมุติฐานของ Luo และคณะ (70) ซึ่งได้รายงานว่าจากการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่มประชากรชาวจีน โดยวิธี PCR พบว่าในจำนวน non-responder ทั้งหมด 19 ราย สามารถตรวจพบ HBV DNA 7 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 36.8 จะเห็นได้ว่าจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้และจากรายงานของ Luo และคณะให้ผลใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าการไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี เกิดขึ้นได้อย่างไรซึ่งได้มีผู้รายงานว่า อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับยีนในระบบ HLA ของร่างกายโดยจากการตรวจหา HLA (HLA typing) ในกลุ่ม non-responder พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับยีน HLA-B8, HLA-DR3 และ HLA-B35 (71, 72,73,74,75,76) ซึ่งยีนเหล่านี้มีผลในการควบคุมการสร้าง Anti-HBs ของร่างกาย นอกจากนี้ยังมีผู้ตั้งสมมุติฐานว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ suppressor T cell ของร่างกาย โดยพบว่าจำนวน suppressor T cell ในกลุ่ม non-responder มีสูงกว่าในกลุ่ม responders (77,78)

จากที่ได้กล่าวมาแล้วถึงประโยชน์ของการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One-step nested PCR การตรวจหาโดยวิธีนี้ยังมีข้อดีกว่าการตรวจทาง serology หลายประการ ซึ่งในบางกรณีการตรวจทาง serology ไม่สามารถนำมาอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ เช่น

1. ในกลุ่มผู้ป่วยที่ตรวจพบเฉพาะ anti-HBc อย่างเดียวโดยให้ผลการตรวจ anti-HBs และ HBs Ag เป็นลบ โดยวิธีทาง serology การตรวจพบ HBV DNA ได้โดยวิธี PCR สามารถอธิบายได้ว่าผู้ป่วยมี HBs Ag ในเลือดในระดับต่ำๆ จนไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีทาง serology ซึ่งผู้ป่วยกลุ่มนี้จัดอยู่ในกลุ่ม chronic HBV carrier (79,80) ซึ่งอาจสามารถแพร่เชื้อไปยังบุคคลอื่นได้

2. ในกลุ่มผู้ป่วยที่พบว่า HBV gene เกิดการกลายพันธ์ (mutation) ในส่วนของ pre-core region ซึ่งทำให้ไวรัสไม่สามารถสร้าง HBe Ag ออกมาได้ (81) จึงทำให้ผลการตรวจ HBe Ag โดยวิธีทาง serology ให้ผลเป็นลบโดยที่ผู้ป่วยยังมีอาการของ hepatitis และ viraemia ซึ่งสามารถตรวจพบ HBV DNA ได้โดยวิธี PCR (7,82,83,84)

3. ในการติดตามผู้ป่วยซึ่งติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ที่ได้รับการรักษาด้วย alpha -interferon การตรวจหา HBV DNA โดยวิธี PCR สามารถบอกถึงผลการรักษาได้ดีกว่าวิธีการตรวจทาง serology (85)

4. ในอนาคตเมื่อมีการนำเทคนิค PCR มาใช้กันอย่างแพร่หลายการผลิต PCR kit สำหรับตรวจหา HBV DNA อาจมีต้นทุนในการผลิตต่ำลงซึ่งสามารถนำมาใช้ในงานธนาคารเลือดในการตรวจหา HBV DNA ในผู้บริจาคโลหิต ซึ่งปัจจุบันพบว่ายังมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี หลังการให้เลือดที่ได้รับการตรวจ HBs Ag เป็นลบ ด้วยวิธีทาง serology (5,8,86)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นพบว่าการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี PCR นั้นสามารถนำมาอธิบายกลไกต่างๆได้ดีกว่าการตรวจหา hepatitis B virus maker โดยวิธีทาง serology ซึ่งในบางกรณีไม่สามารถนำมาอธิบายได้ อย่างไรก็ตามข้อควรระวังในการนำเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ คือ เรื่องผลบวกปลอม (flase positive) ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนต่างๆ ของการทำ PCR