บทที่ 1

บทนำ

Hepatitis B virus (HBV)เป็น DNA virus จัดอยู่ในกลุ่มของ hepadnavirus ซึ่งก่อให้เกิดโรคไวรัสตับอักเสบ บี อันเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของประเทศไทย โดยพบว่า ร้อยละ 10 ของประชากรเป็นพาหะของโรคนี้ (1,2) เนื่องจากปัจจุปันยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ดังนั้น วิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจหาไวรัสตับอักเสบ บี จึงเป็นวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (serology) แต่วิธีการดังกล่าวมีความไวไม่เพียงพอในการที่จะตรวจหาเชื้อไวรัส ในกรณีที่ผู้ติดเชื้อมีปริมาณของไวรัสในเลือดอยู่ในระดับต่ำ ๆ เช่น กลุ่มที่เป็น HBs Ag seronegative (3,4,5,6,7,8,) ดังนั้นปัจจุบันได้มีการนำวิธีการทางด้าน molecular biology มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรม (DNA) ของไวรัสโดยตรง วิธีการดังกล่าวคือ การใช้ DNA probe hybridization การใช้เทคนิคทาง molecular biology วิธีนี้ ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากวิธีการดังกล่าว ให้ผลการตรวจที่แม่นยำ และมีความไวสูงกว่าวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (serology) (4,9) อย่างไรก็ตามในกรณีที่สิ่งส่งตรวจนั้นมีปริมาณไวรัสตับอักเสบ บี ต่ำมาก ๆ วิธีการตรวจโดยใช้ DNA probe hybridization ก็จะใช้ไม่ได้ผล (5,6,10,11) อีกทั้งยังมีขั้นตอนยุ่งยาก และต้องใช้สารกัมมันตรังสี ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า polymerase chain reaction เพื่อใช้ในการตรวจหาสารพันธุกรรม (DNA) ของไวรัสหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นขบวนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA (specific DNA segment) ที่ต้องการศึกษาในหลอดทดลองโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzymatic reaction) (12,13,14) แต่เนื่องจากการตรวจด้วยวิธี PCR เพียงขั้นตอนเดียวนั้นจำเป็นต้องยืนยันผลการตรวจด้วย วิธี southern blot hybridization

ซึ่งต้องใช้สารกัมมันตรังสี ปัญหาดังกล่าวสามารถหลีกเลี่ยงได้โดยการทำ PCR สองครั้ง หรือ nested PCR โดยนอกจากจะเป็นการเพิ่ม sensitivity และ specificity ของการตรวจแล้ว nested PCR ยังเป็นการตรวจสอบยืนยันความถูกต้องว่า DNA fragment ที่เกิดขึ้นเป็น DNA ที่ต้องการจริงๆแทนการยืนยันด้วยการทำ southern blot hybridization (12, 15,16,17) อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการลดขั้นตอนการทำ two - step nested PCR ให้น้อยลง และยังเป็นการป้องกันผลบวกปลอมที่อาจจะเกิดจากการปนเปื้อนของ PCR product เนื่องจากขั้นตอนของ nested PCR ต้องมีการนำ product ของ PCR จากรอบแรกมาเพิ่มจำนวนต่อด้วย primer คู่ใน จึงได้พัฒนาวิธีการทำ One - step nested PCR ซึ่งเป็นการรวมเอาการทำ first step PCR และ second step PCR (nested PCR) ไว้ในหลอดเดียวกัน

ปัจจุบันพบว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี มีอยู่ประมาณ 5-10 % ไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน โดยร่างกายไม่สามารถสร้าง anti-HBs Ag antibodies หรือสร้างได้ในระดับต่ำ คือ น้อยกว่า 10 mIU/ml (18,70,77) โดยสาเหตุยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการใช้เทคนิค PCR มาช่วยในการตรวจหา HBV DNA อาจนำไปสู่คำอธิบายกลไกของการไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี เพราะกลุ่มบุคคลเหล่านี้อาจมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี อยู่แล้วก็ได้ แต่เป็น " sub-threshold infection " คือ ไม่สามารถจะตรวจหา HBs Ag ในซีรั่มได้โดยชุดตรวจสอบ HBs Ag ที่มีอยู่ในท้องตลาดปัจจุบัน เนื่องจากมีปริมาณ HBV DNA น้อยมาก ซึ่งอาจตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองแบบ one-step nested polymerase chain reaction ให้ได้ผลรวดเร็ว , ประหยัด, มีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยาก, มีความแม่นยำความไวสูง และ สามารถป้องกันการ carry over อันเนื่องจากการเปิดฝาหลอด เพื่อนำ PCR product มาทำ nested PCR โดยใช้ HBV DNA เป็น prototype ในการพัฒนา

2. เพื่อหาความสัมพันธ์ของ HBV DNA จากน้ำเหลืองในกลุ่มบุคคลที่ได้รับการฉีดวัคซีนไวรัสตับอักเสบ บี แต่ร่างกายไม่สามารถสร้างภูมิคุ้มกัน (non-responder) และในกลุ่มผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบ บี ชนิดเรื้อรัง ซึ่งต่อมา HBs Ag ให้ผลการตรวจเป็นลบโดยไม่ปรากฏว่ามีการสร้าง anti-HBs (HBs Ag-negative ex-chronic carrier)