บทที่ 2

การสำรวจเอกสาร

ประวัติและความเป็นมาของโรคไวรัสตับอักเสบ บี

Hepatitis B virus (HBV) เป็นสาเหตุของโรคไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศที่มีการระบาดของโรคนี้สูง เช่นเดียวกันกับประเทศในกลุ่มภูมิภาคเอเชียตะวันออกอื่นๆ ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งระบาดของโรค (endemic area) ประมาณการณ์ว่าในประเทศเหล่านี้มีกลุ่มบุคคลที่เป็นพาหะของโรคไวรัสตับอักเสบ บี สูงถึง 10% ของจำนวนประชากร (1,2) ถึงแม้ว่ากลุ่มบุคคลที่เป็นพาหะเหล่านี้จะไม่แสดงอาการของโรคออกมา แต่ก็พบว่าสามารถแพร่เชื้อให้กับบุคคลอื่นได้ อาจจะโดยทางมารดาสู่ทารก หรือโดยทางบุคคลหนึ่งสู่อีกบุคคลหนึ่งจากการสัมผัสใกล้ชิด หรือการให้เลือดและผลิตภัณฑ์ของเลือด นอกจากนี้ยังพบอีกว่ากลุ่มบุคคลที่เป็นพาหะของโรคจะมีอัตราการเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับ (primary hepatocellular carcinoma , HCC) สูงกว่าคนปกติถึง 100 เท่า (18,19,20)

เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ถูกค้นพบโดย Blumberg และคณะ (21,22) ในปี ค.ศ. 1965 จัดอยู่ในกลุ่มของ Hepadna virus ไวรัสตับอักเสบชนิดอื่นซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้แก่ Woodchuck hepatitis virus (WHV), ground squirrel hepatitis virus (GSHV) และ Pekin duck hepatitis B virus ไวรัสเหล่านี้เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดตับอักเสบในสัตว์ และจากการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบเหล่านี้มีโครงสร้างทางด้านพันธุกรรมคล้ายคลึงกัน (19,23,24,25,26)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปร่างและคุณสมบัติของไวรัส

ไวรัสตับอักเสบ บี เป็น DNA ไวรัส มีขนาดประมาณ 42 nm ประกอบด้วยเปลือกหุ้มชั้นนอก (envelope) และแกนกลาง (core หรือ nucleocapsid) (19,23,24) เปลือกหุ้มชั้นนอกเรียกว่า hepatitis B surface antigen (HBs Ag) ประกอบด้วย protein, carbohydrate และ lipid โดยมี glycoprotein แทรกอยู่ในชั้นของ lipid ภายในแกนกลาง (core หรือ nucleocapsid) ประกอบไปด้วย double stranded DNA, DNA polymerase, protein kinase และ DNA - linked protein (22,27) ตัวเชื้อไวรัสที่ประกอบด้วยเปลือกหุ้มชั้นนอกและแกนกลางรวมกันเรียกว่า Dane particle ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 42 nm (28) ในซีรั่มของผู้ป่วยซึ่งติดเชื้อไวรัสนี้ บางครั้งอาจตรวจพบเฉพาะเปลือกหุ้มชั้นนอกของไวรัสอย่างเดียว โดยไม่มีส่วนประกอบของแกนกลาง ซึ่งส่วนใหญ่จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 22 nm มีหลายรูปร่าง ได้แก่ รูปทรงกลม (sphericle) หรือ รูปร่างเป็นแท่ง (filament) (1,23,28)

จากการศึกษาของ Bond และคณะ (29) พบว่าเชื้อไวรัสนี้สามารถมีชีวิตอยู่ในซีรั่มที่เก็บไว้ที่ 30°ซ. และ -20°ซ. ได้นานถึง 6 เดือน และ 15 ปี ตามลำดับ และถ้าหากทิ้งไว้ในซีรั่มที่ทำให้แห้งแล้ว เชื้อไวรัสนี้จะมีชีวิตอยู่ได้ถึง 1 สัปดาห์ ที่ 25°ซ. นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวเชื้อไวรัสสามารถทนความร้อน ที่ 60° ได้นานถึง 4 ชั่วโมง

เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี สามารถทำลายได้ด้วย 0.5 % sodium hypochlorite นาน 10 นาที ที่ 20°ซ. หรือในสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นกรด pH 2.4 นาน 6 ชั่วโมง หรือโดยการต้ม ที่ 98°ซ. นาน 20 นาที (30,31)

โครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัส

genome ของไวรัสตับอักเสบ บี ประกอบด้วย double stranded DNA สองสาย คือ long strand หรือ DNA สายลบ (-) มีความยาวประมาณ 3,200 nucleotides

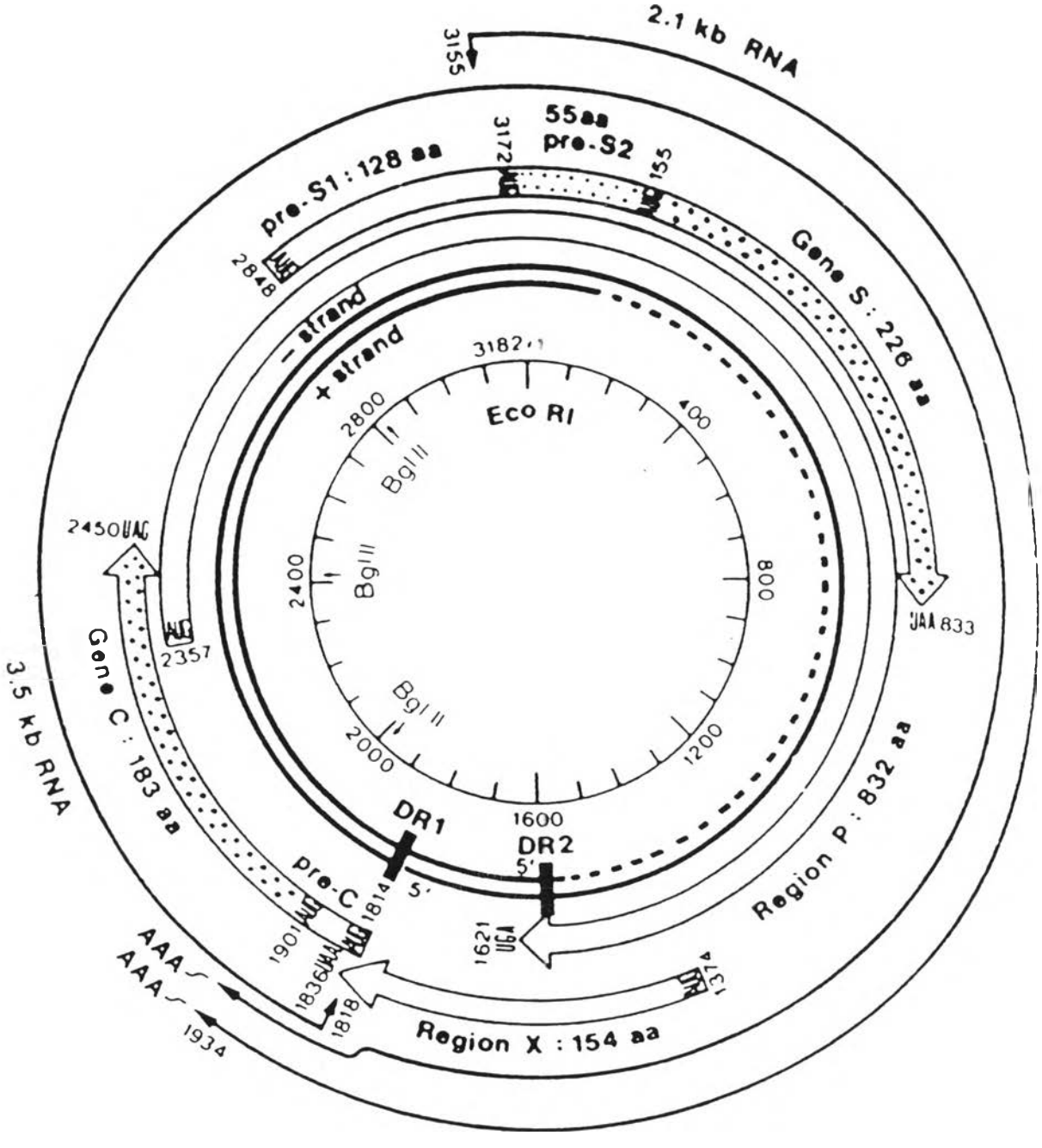
และ short strand หรือ DNA สายบวก (+) มีความยาวประมาณ 1,700-3,000 nucleotides (1,32,33)

HBV genome ประกอบด้วย 4 open reading frames ได้แก่ S,C,P และ X gene โดยทั้ง 4 ส่วนจะมีส่วนที่ย้อนทับกันอยู่ (รูปที่ 2.1) ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ปรากฏบนสาย DNA ของไวรัสจะถูกถอดระหัส (transcript) และถูกนำไปสร้า(translate) เป็นโปรตีนของไวรัสต่างๆ ดังนี้

S gene region ประกอบด้วย S gene, pre - S2 gene และ pre - S1 gene ซึ่งจะถูกถอดรหัส และนำไปสร้างเป็นโปรตีนส่วนเปลือกของไวรัส (viral envelope) (34,35) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ major protein, middle protein และ large protein โดยพบว่า S gene เป็น gene ที่ควบคุมการสร้าง major protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน 226 ตัว S gene และ Pre - S2 gene ควบคุมการสร้าง middle protein ประกอบด้วยกรดอะมิโน 281 ตัว โดยพบว่าโปรตีนนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส ในร่างกายผู้ป่วย (23,36) S gene, Pre - S2 gene และ Pre - S1 gene มีหน้าที่ควบคุมการสร้าง large protein ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 389 ถึง 400 ตัว ซึ่งแตกต่างกันออกไปตามชนิดของแต่ละ subtype

C gene region เป็น gene ส่วนที่ควบคุมการสร้าง nucleocapsid หรือ core protein ในส่วนของ C gene ยังประกอบด้วย pre - C gene ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hydrophobic polypeptide ซึ่งเป็นส่วนช่วยให้ nucleocapsid ยึดติดอยู่กับส่วนเปลือกหุ้มของไวรัส (36) นอกจากนี้ยังพบว่า C gene เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserved sequence)ของไวรัสตับอักเสบในแต่ละชนิด (2,23)

P gene region เป็นส่วนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน DNA polymerase ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการ reverse transcription ของไวรัส จากการศึกษาของ Tiollais และคณะ (23) พบว่า P gene region ของไวรัสตับอักเสบ บี มีส่วนเหมือน (homology)



รูปที่ 2.1 แสดง Hepatitis B virus genome

กับ *pol* gene ของ retroviruses และ cauliflower mosaic virus (CaMV) ซึ่งทำหน้าที่ reverse transcription เช่นเดียวกัน (26,37)

X gene region ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีน X ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 145-154 ตัว โดยหน้าที่ที่แน่นอนยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการรายงานต่างๆ (38,39,40,41) พบว่า x gene มีคุณสมบัติเป็น *tran* - acting propertics และจากการศึกษาของ Wu และคณะ (42) พบว่า X protein ยังสามารถทำหน้าที่เป็น protein kinase ได้อีกด้วย

วงจรชีวิต

ขบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบ บี คล้ายคลึงกับการเพิ่มจำนวน ของไวรัสตัวอื่นๆ ทั่วไป โดยประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ entry penetration, transcription, translation, assemble และ release

Summer และคณะ (43,44) ได้ศึกษาวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบ บี เป็นครั้งแรกในปี 1982 โดยใช้ Peking duck virus เป็นต้นแบบในการศึกษาโดยพบว่าเมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่เซลล์ตับ ส่วนเปลือกจะถูกถอดทิ้ง (uncoated) จากนั้น DNA ของไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ตับ และมีการสร้างสาย DNA สาย (+) ให้ครบวงโดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ของไวรัส ขั้นตอนต่อไปจะมีการสร้าง RNA หรือ pre genome โดยขบวนการ transcription ซึ่งใช้เอนไซม์ RNA polymerase ของเซลล์ตับเป็นตัวสร้างโดยอาศัย DNA สาย (-)ของไวรัสเป็นแม่แบบ จากนั้นจึงมีการสร้าง DNA สาย (-) ของไวรัสขึ้นมาใหม่ด้วยขบวนการ reverse transcription โดยเอนไซม์ reverse transcriptase หลังจากนั้น pre genome หรือ RNA จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ RNase-H ของตัวไวรัสเอง ขั้นตอนต่อไปจะมีการสร้าง DNA สาย (+) ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase โดยใช้ DNA สาย (-)เป็นแม่แบบขณะเดียวกัน DNA ที่สร้างขึ้นมาใหม่นี้จะถูกบรรจุเข้าในเปลือกหุ้มไวรัส (envelope) ได้เป็นไวรัสตัวใหม่ และจะถูกปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ โดยขบวนการ

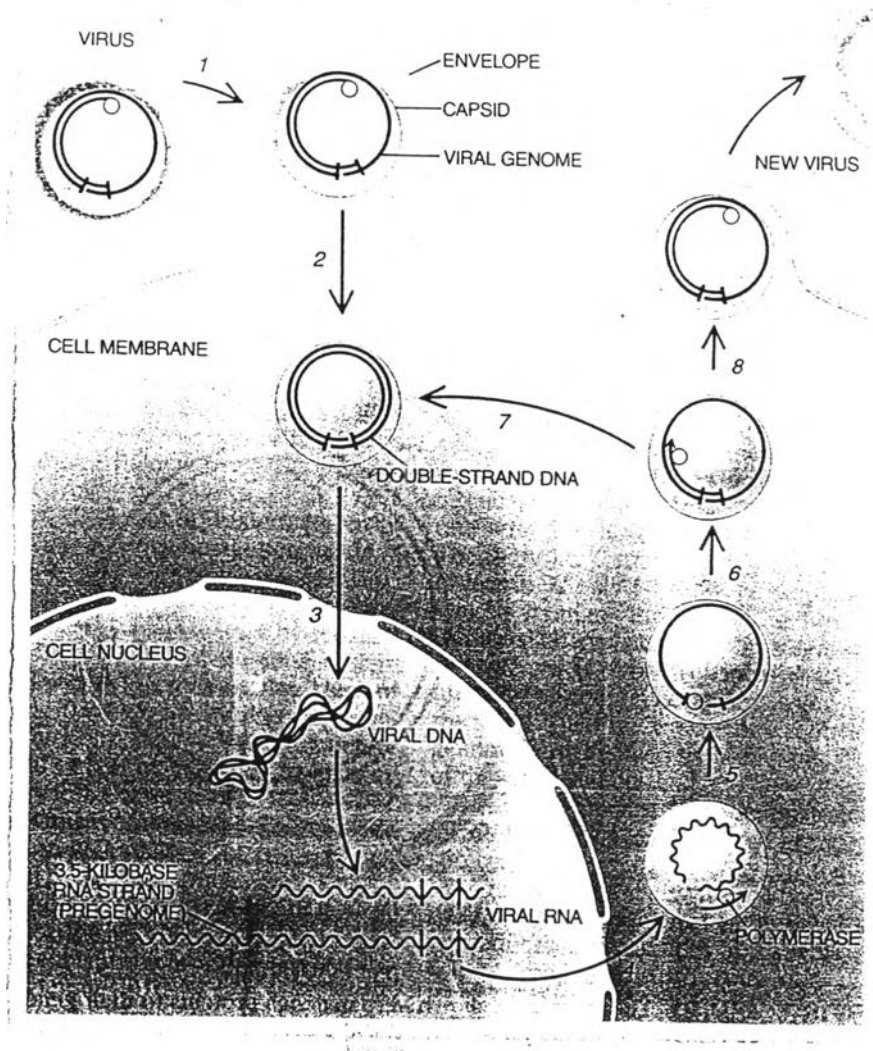
budding (รูปที่2.2) และจากการศึกษาพบว่าไวรัสตัวใหม่จะออกสู่นอกเซลล์ก่อนที่ DNA สาย (+) จะสร้างเสร็จสมบูรณ์ ดังนั้นจึงเป็นเหตุให้ DNA สาย (+) ของไวรัสตับอักเสบ บี มีความยาวไม่เท่ากันกับ DNA สาย (-)(45,46)

ระบาดวิทยา

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี พบได้ทุกภูมิภาคของโลกแต่มีอุบัติการสูงในเขตร้อน ในประเทศไทยพบว่าประมาณร้อยละ 10 ของประชากรเป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบ บี จากการศึกษาส่วนประกอบของเปลือกหุ้มไวรัส โดยเฉพาะส่วนที่เรียกว่า hepatitis B surface antigen (HBs Ag) พบว่ามีลักษณะแอนติเจนย่อยแยกออกไปอีกคือ "a" เป็นแอนติเจนร่วมที่พบได้ในทุกๆ subtype ของไวรัสตับอักเสบ บี นอกจากนี้ยังแยกลักษณะแอนติเจนย่อยได้เป็น 2 ระบบคือ d หรือ y และ w หรือ r จากลักษณะแอนติเจนดังกล่าวนี้ทำให้สามารถแบ่งไวรัสตับอักเสบ บี ออกได้เป็น 4 subtype คือ adw, ayw, adr และ ayr ซึ่งแต่ละ subtype จะพบแตกต่างกันออกไปตามแต่ละภูมิภาคของโลก โดยประเทศในกลุ่ม อเมริกา, ยุโรป และ อาฟริกา พบ subtype adw และ ayw มาก สำหรับในประเทศไทย และกลุ่มประเทศในแถบทวีปเอเชีย จะพบ subtype adr เป็นส่วนใหญ่ (48,49,50,51)

การป้องกัน และการรักษา

ปัจจุบันยังไม่มียารักษาที่ใช้เฉพาะกับโรคไวรัสตับอักเสบ บี ดังนั้นการรักษาจึงเป็นการรักษาตามอาการ ด้วยเหตุนี้การป้องกันการติดเชื้อจึงเป็นวิธีการรักษาที่ดีที่สุด สำหรับการติดเชื้อโดยการให้เลือด และผลิตภัณฑ์ของเลือดสามารถป้องกันได้โดยทำการตรวจหา HBs Ag ในเลือดก่อนนำไปใช้ ส่วนการป้องกันการติดเชื้อจากการสัมผัสใกล้ชิดกับบุคคลที่เป็นพาหะซึ่งไม่แสดงอาการ (carriers) ในทางปฏิบัติมักทำได้ยากแต่ควรหลีกเลี่ยงพฤติกรรมที่ทำให้เสี่ยงต่อโรคสูง กล่าวคือไม่ควรใช้ของใช้ส่วนตัวร่วมกันกับผู้อื่น เช่น มีดโกน ที่ตัดเล็บ ผ้าเช็ดตัว เป็นต้น



รูปที่ 2.2 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบ บี

ปัจจุบันพบว่าการฉีดวัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบ บี เป็นวิธีการป้องกันโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ วัคซีนป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบ บี แบ่งได้เป็นหลายชนิดตามวิธีการผลิต คือ

1. Plasma - derived vaccine
2. Recombinant DNA vaccine
3. Synthetic vaccine

Plasma derived vaccine เป็นวัคซีนที่ผลิตจากพลาสมาของผู้ที่เป็นพาหะของโรคไวรัสตับอักเสบ บี โดยปั่นแยกเฉพาะส่วน HBs Ag ออกมาให้บริสุทธิ์ แล้วผ่านขบวนการทำลายเชื้อด้วยฟอร์มาลีน หรือ ความร้อน ประสิทธิภาพของวัคซีนชนิดนี้พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันโรคได้ดีในระยะ 4 ปีแรก และพบว่าภูมิต้านทานจะค่อย ๆ ลดต่ำลง ข้อเสียของวัคซีนที่ผลิตโดยวิธีนี้ คือ มีต้นทุนในการผลิตสูง และอาจมีเชื้อโรคที่สามารถติดต่อได้โดยทางเลือดหรือ น้ำเหลือง เช่น เชื้อ HIV ปนเปื้อนมาด้วย (28,52,53,54)

Recombinant DNA vaccine เป็นวัคซีนที่ผลิตขึ้นโดยอาศัยความรู้ทางด้านวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (genetic engineering) ที่ทำให้ทราบถึงรายละเอียดเกี่ยวกับยีนของไวรัส และสามารถตัดส่วนของยีนที่กำหนดการสร้าง HBs Ag ของไวรัสแล้วนำเข้าไปใส่ในสิ่งมีชีวิตอันใหม่ (expression vector) เพื่อให้สิ่งมีชีวิตอันใหม่นั้นสร้างโปรตีน HBs Ag ปัจจุบัน expression vector ที่นิยมใช้กันได้แก่ vaccinia virus และ buculovirus โดยใช้ yeast, insect cells และ mammalian cells เป็น host การผลิตวัคซีนโดยวิธีนี้สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก, ต้นทุนการผลิตต่ำ และมีความปลอดภัยจากการติดเชื้อจากไวรัสตับอักเสบ บี หรือเชื้อโรคชนิดอื่นๆแต่อาจมีข้อเสียคืออาการแทรกซ้อนของ vaccinia ซึ่งใช้เป็น expression vector (52,54,55)

Synthetic peptide vaccine เป็นวัคซีนที่ผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมีเพื่อให้ได้โปรตีน (polypeptide) ที่มีคุณสมบัติเหมือน HBs Ag ปัจจุบันยังอยู่ในขั้นตอนของการศึกษา

การติดต่อ

ไวรัสตับอักเสบ บี สามารถติดต่อได้ทั้งแบบ parenteral transmission และ vertical transmission

Parenteral transmission เป็นการติดเชื้อโดยการได้รับเชื้อโดยตรงจากการให้เลือดหรือได้รับจากเครื่องมือต่างๆที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อนอยู่ เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี สามารถตรวจพบได้ทั้งในเลือดและสารคัดหลั่งต่าง เช่น น้ำตา, น้ำอสุจิ, และเยื่อเมือกต่างๆ ดังนั้นไวรัสตับอักเสบ บี จึงสามารถติดต่อได้ทางเพศสัมพันธ์ และการสัมผัสใกล้ชิด

Vertical transmission เป็นการติดต่อจากมารดาที่ตรวจพบ HBs Ag สู่ทารก จากการศึกษาพบว่า ถ้าในเลือดของมารดาตรวจพบ HBs Ag ร่วมกับ HBe Ag แล้วทารกที่คลอดมาจะมีโอกาสติดเชื้อสูงขึ้นถึง 90 % แต่หากมารดาตรวจไม่พบ HBe Ag ทารกจะมีโอกาสติดเชื้อลดลงคือ 20 % และถ้าหากมารดาตรวจพบเฉพาะ HBs Ag และมี anti-HBe ทารกจะมีโอกาสติดเชื้อเพียง 12% (56,57,58)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เนื่องจากไวรัสตับอักเสบ บี ไม่สามารถเพาะเลี้ยงใน tissue culture ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัย เพื่อบ่งบอกถึงการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี จึงอาศัยวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (serological test) ซึ่งอาจเป็นการตรวจหา virus antigen หรือตรวจหาภูมิคุ้มกันที่ร่างกายสร้างขึ้นหลังจากการได้รับเชื้อแล้ว วิธีการตรวจหาทางน้ำเหลืองได้มีการพัฒนาให้มีความไวขึ้นมาตามลำดับ ได้แก่ counterimmunoelectrophoresis (CIEP), red cell agglutination, enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) และ radioimmuno assay (RIA) อย่างไรก็ตามในกรณีที่ในร่างกายมีไวรัสในระดับต่ำ วิธีการเหล่านี้อาจตรวจไม่พบเนื่องจากมีความไวไม่เพียงพอ (3,4,16,59)

ปัจจุบันความก้าวหน้าทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลได้รุดหน้าเป็นอย่างมากจึงได้มีผู้คิดค้นวิธีการตรวจหา DNA ของเชื้อต่าง ๆ โดยวิธี DNA hybridization มาใช้ในการตรวจหา HBV DNA ซึ่งมีความไวสูงกว่าวิธีการตรวจทางน้ำเหลือง (serology test) (4)

อย่างไรก็ตามในกรณีที่สิ่งส่งตรวจนั้นมีปริมาณไวรัสตับอักเสบ บี ต่ำมากๆ วิธีการตรวจโดยใช้ DNA probe hybridization ก็จะใช้ไม่ได้ผลเนื่องจากมีความไวไม่เพียงพอ (5,6,10,14) อีกทั้งมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและต้องใช้สารกัมมันตรังสี ปัจจุบันได้มีผู้คิดค้นวิธีการตรวจหา ปริมาณ DNA ที่มีจำนวนน้อยๆได้ โดยเทคนิคที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction เป็นวิธีเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ในหลอดทดลองโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzymatic reaction) Kary Mullis นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกาเป็นผู้คิดค้นเทคนิค PCR ขึ้นในปี 1985 (14,60,61) ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอน

1. Denaturation เป็นขั้นตอนแยกสาย DNA template ที่ต้องการเพิ่มจำนวนออกจากกันโดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90 -94 ° ซ.

2. Primer annealing เป็นขั้นตอนที่ให้ specific primer ที่มีขนาดประมาณ 15 - 30 nucleotides โดยมีลำดับเบสที่ complementary กับลำดับเบสส่วนหัวและท้ายของ DNA template ที่ต้องการเพิ่มจำนวนโดยอาศัยอุณหภูมิที่พอเหมาะประมาณ 40-50°ซ. อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนเบสของ specific primer ที่ใช้

3. Primer extension ขั้นตอนนี้เป็นจุดเริ่มต้นของการการสังเคราะห์ DNA สายใหม่โดยอาศัย เอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 72 °ซ. ซึ่ง DNA สายใหม่ที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่เป็น DNA template ของการเพิ่มจำนวน DNA ในรอบต่อๆไปของขบวนการ PCR

จากขบวนการ PCR ทั้ง 3 ขั้นตอนที่กล่าวมาจะเห็นว่าเมื่อเริ่มต้นจาก DNA ที่ต้องการ (target DNA) เพียง 1 โมเลกุล จะทำให้ได้ DNA เพิ่มขึ้นเป็น 2 โมเลกุล เมื่อสิ้นสุดการสังเคราะห์ DNA ในรอบที่หนึ่ง จะเห็นว่า DNA ที่ถูกเพิ่มจำนวนจะเพิ่มขึ้นในอัตราเท่าทวีคูณ (exponential accummulation) ดังนั้นเมื่อผ่านขบวนการสังเคราะห์ DNA ในรอบที่ n จะทำให้ได้โมเลกุล DNA ที่ต้องการเป็น 2^n โดยทั่วไปการเพิ่มจำนวน DNA โดยขบวนการ PCR จะทำประมาณ 20 - 30 รอบ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดขบวนการ PCR ในรอบสุดท้ายแล้วจะทำให้ได้ จำนวน DNA เพิ่มขึ้นเป็นหลายพันล้านโมเลกุล ภายในระยะเวลาเพียง 2 - 3 ชั่วโมงเท่านั้น (62,63) จากขบวนการดังกลาวนี้ PCR จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำมาประกอบการวินิจฉัยและวิเคราะห์โรคต่างๆได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ (12,13,14)

จากการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าขบวนการ PCR สามารถที่จะเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการซึ่งมีอยู่เพียงจำนวนเล็กน้อยในสิ่งตัวอย่างให้มีปริมาณมากๆ ถึงล้านเท่าได้ ดังนั้นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งของการนำเทคนิค PCR มาใช้ก็คือเรื่องของผลบวกปลอม (flase positive) ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนของ DNA ที่ถูกเพิ่มจำนวนไว้ก่อน (PCR product carry over contamination) หรือเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ในแต่ละขั้นตอนของการทำ PCR วิธีการป้องกันการปนเปื้อนดังกล่าวสามารถทำได้โดยการระมัดระวังในการปฏิบัติการต่างๆ (attention to careful laboratory procedure) (64,65) ได้แก่

- แบ่งย่อยสารละลายต่าง ๆ ไว้ใช้ (pre-aliquoting reagent)
- ใช้ pipette tip ที่มีแผ่นกรอง (tips with barrier) หรือ positive displacement pipette
- แยกห้องที่ใช้ในการเตรียม DNA ตัวอย่าง, ห้องเตรียม PCR reagent และห้องที่ใช้เพิ่มจำนวน DNA และห้องที่ใช้ในการวิเคราะห์ PCR product (physical separation of the reaction preparation from the reaction product analysis)
- พยายามไม่ให้เกิดการกระฉอก หรือหกของ PCR product (avoid splashes)

- ทำ positive และ negative control ควบคู่ไปด้วย (choose positive and negative control)
- ลดขั้นตอนการจับถือ (minimize handling)

นอกจากวิธีการดังกล่าว การป้องกันการปนเปื้อนยังสามารถทำได้โดยทำลาย PCR product ก่อนการนำไปเพิ่มจำนวนโดยการใช้แสง ultraviolet หรืออาจจะใช้เอนไซม์ Uracil-N-glycosylase (65,66,67)

ปัจจุบันได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้นำเอาเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหา HBV DNA ในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบ บี เพื่อนำมาช่วยประกอบการพยากรณ์การดำเนินไปของโรค เช่นจากรายงานของ Shih และคณะ (83) พบว่าในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบ บี ซึ่งให้ผลการตรวจ HBe Ag เป็นลบยังสามารถตรวจพบ HBV DNA ได้ถึง 80.2% แสดงให้เห็นว่าแท้ที่จริงแล้วในร่างกายบุคคลกลุ่มนี้ยังมีการสร้างไวรัสตัวใหม่ (viral replication) ดังนั้นการใช้เทคนิค PCR มาช่วยในการตรวจหา HBV DNA จึงมีประโยชน์มากกว่าการตรวจทางน้ำเหลือง (serology) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบ HBV DNA กลุ่มบุคคลที่มีสุขภาพสมบูรณ์ (healthy person) หลายๆ กลุ่ม เช่นรายงานของ Sumazaki และคณะ (5) พบว่าในซีรั่มของบุคคลที่ตรวจพบเฉพาะ anti-HBc อย่างเดียว จำนวน 5 ราย สามารถตรวจพบ HBV DNA ในซีรั่มได้ 3 ราย โดยวิธี PCR และจากรายงานของ Wang และคณะ (8) พบว่าในเลือดซึ่งได้รับจากการบริจาคทั้งหมด 206 ราย ซึ่งให้ผลการตรวจ HBs Ag เป็นลบโดยวิธี radioimmunoassay สามารถตรวจพบ HBV DNA ได้ 9 ราย และพบว่าผู้ป่วยหนึ่งรายหลังการได้รับเลือดใน 9 unit นี้ มีระดับของเอนไซม์ ALT สูงขึ้น