

การจำแนกสายพันธุ์และการกลายพันธุ์บริเวณยีนพีเอส/เอส ของไวรัสตับอักเสบบี จากการศึกษา  
ทางระบาดวิทยาในประเทศไทย พ.ศ. 2557



นางสาวปาริฉัตร ยี่มน้อย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2557  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Determination of Genotypes and Mutations in *pre-S/S* gene of Hepatitis B Virus from  
an Epidemiological Study in Thailand, 2014

Miss Parichat Yimnoi



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การจำแนกสายพันธุ์และการกลายพันธุ์บริเวณยีนพีเอส/เอส ของไวรัสตับอักเสบ บี จากการศึกษาทางระบาดวิทยาในประเทศไทย พ.ศ. 2557
โดย	นางสาวปาริฉัตร ยิ้มน้อย
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หารรักษาเวก)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ)  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สัมชาย พยุงกร)  
.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีรพร ชินชัย)

ปาริฉัตร ยิ้มน้อย : การจำแนกสายพันธุ์และการกลายพันธุ์บริเวณยีนพีเอช/เอส ของไวรัสตับอักเสบบี จากการศึกษาทางระบาดวิทยาในประเทศไทย พ.ศ. 2557 (Determination of Genotypes and Mutations in *pre-S/S* gene of Hepatitis B Virus from an Epidemiological Study in Thailand, 2014) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นายแพทย์ พิสิฐ ตังกีจวานิชย์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ, 108 หน้า.

ปัจจุบันพบว่ามีการระบาดทั่วโลกที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังประมาณ 400 ล้านคนซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับ ต่อมาพบว่าประชากรโลกมีแนวโน้มการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ลดลงรวมทั้งประชากรไทย อันเนื่องมาจากในปีพ.ศ. 2535 กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้ทารกแรกเกิดทุกคนต้องได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยบรรจุลงในกาสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคหรือ Expanded Program on Immunization (EPI) ของประเทศ ในปี พ.ศ. 2557 หลังจากประเทศไทยได้เริ่มโครงการ EPI มาแล้วเป็นเวลา 22 ปีจึงต้องการที่จะศึกษาถึงระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างซีรัมจากประชากรชาวไทยอายุระหว่าง 6 เดือนถึง 60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐจากตัวแทนทั้ง 4 ภาค เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 5,964 ตัวอย่าง ทำการด้วยตรวจโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg จำนวน 132 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 2.2 จากนั้นนำตรวจหา HBeAg พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg 19 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 14.4 และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไวรัสจากวิธี real-time polymerase chain reaction พบ 59 ตัวอย่างที่ตรวจพบปริมาณไวรัสและมีค่าเฉลี่ย  $7.3 \pm 2.1$  log copies/mL จากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR พบตัวอย่างที่ให้บวกต่อวิธี PCR 119 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 83.8 โดยสามารถจำแนกเป็นสายพันธุ์ C 111 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 93.28 และสายพันธุ์ B 8 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 6.72 และพบ subtype adr 105 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 88.2 subtype adw 11 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 9.2 subtype ayr 3 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 2.5 จากการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant พบทั้งหมด 9 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 7.56 และพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G145R จำนวน 2 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 1.7 โดยการกลายพันธุ์ดังกล่าวพบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 22 ปีจึงอาจไม่ได้เป็นผลมาจาก การได้รับวัคซีนแต่เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ พบการกลายพันธุ์ในบริเวณยีน *pre-S* 23 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 19.3 พบการกลายพันธุ์ในบริเวณ BCP 31 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 26.1 และการกลายพันธุ์ในส่วนของยีน PC 17 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 14 ผลของการศึกษาในครั้งนี้อาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาแผนการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ต่อไป

ภาควิชา	ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต	.....
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	.....
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	.....

# # 5674046030 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORDS: HEPATITIS B VIRUS (HBV) / CHRONIC HEPATITIS B (CHB) / GENOTYPE / MUTATIONS / PRE-S/S GENE / BASIC CORE PROMOTER (BCP) AND PRECORE (PC) GENE / "A" DETERMINANT / VACCINE ESCAPE MUTANT / HBV DNA / EPI / THAILAND

PARICHAT YIMNOI: Determination of Genotypes and Mutations in *pre-S/S* gene of Hepatitis B Virus from an Epidemiological Study in Thailand, 2014. ADVISOR: PROF. PISIT TANGKIJVANICH, M.D., CO-ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., 108 pp.

More than 400 million peoples worldwide are chronically infected by hepatitis B virus (HBV) that lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Since 1992, HBV vaccination has been integrated into the expanded program on immunization (EPI) in Thailand. In 2014, 5,964 sera samples studies molecular epidemiological from 4 provinces of Northern, Northeast, Middle and Southern part of Thailand. The 132 HBsAg-positive subjects (2.2%), HBeAg was detected in 19 serum samples (14.4%). The mean of HBV viral load was detected  $7.3 \pm 2.1$  log copies/mL by real-time polymerase chain reaction. One hundred and nineteen (83.8%) of the 132 HBsAg-positive subjects were positive for HBV-DNA in the sera, detected by PCR. HBV-DNA, were found only two major genotypes in the total 119 subjects of HBV-DNA positive; 111 (93.3%) subjects were determined as genotype C: in subgenotype C1, and another genotype was belonged to genotype B in subgenotype B2, 8 (6.7%) subjects. The distribution of the HBV antigenic determinant subtypes among the total 119 of HBV-DNA positive subjects were: 105 (88.2%) of adr, 11 (9.2%) of adw and 3 (2.5%) of ayr. The prevalence and variation of the "a" determinant mutations among the HBV-DNA positive subjects was found in 9 (7.6%) consist in 2 (1.7%) subjects had amino acid mutations at G145R . The *pre-S* mutations were detected in 23 (19.3%) and The basic core promoter (BCP)/precore (PC) region were found 31 (26.1%) and 17 (14.3%) of the total of HBV-DNA positive subjects. The results of this study may be useful to plan the HB immunization program.

Department: Biochemistry

Student's Signature .....

Field of Study: Medical Biochemistry

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2014

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ที่กรุณาให้โอกาสในการศึกษาต่อระดับปริญญาโทและถ่ายทอดความรู้ที่เป็นประโยชน์สำหรับการทำงานวิจัย ให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่ดี รวมทั้งให้ความช่วยเหลือและมอบค่าครองชีพตลอดตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จการศึกษา ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขปัญหาค้นคว้าของวิทยานิพนธ์

และบุคคลที่มีความสำคัญต่อการวิจัยในครั้งนี้อีกท่านหนึ่งก็คือศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้โอกาสทำงานวิจัยในห้องปฏิบัติการที่มีอุปกรณ์เพียงพอและทันสมัย ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีการศึกษา 2557 รวมทั้งขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านจากโรงพยาบาลของรัฐทั้ง 4 ภาคที่มีส่วนร่วมในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ที่เป็นประโยชน์จนสำเร็จการศึกษา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษาและเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำ และช่วยดำเนินการเกี่ยวกับงานด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่เริ่มต้นจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือให้ความรู้เกี่ยวกับเทคนิคต่างๆในการทำวิจัย รวมถึงเอื้อเฟื้อเพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลที่สำคัญต่างๆในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณ ดร. นวรัตน์ โพธิ์สุวรรณ ที่ให้ความช่วยเหลือดูแลสอนเทคนิคในการทำงานวิจัยตั้งแต่เริ่มต้นตลอดจนช่วยแนะนำวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณกำลังใจที่ดีจากคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ดูแลเอาใจใส่ ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา รวมถึงเพื่อนๆทุกคนในภาควิชาชีวเคมีที่คอยห่วงใยและให้ความช่วยเหลือเสมอมา

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ .....	ฎ
สารบัญแผนภาพ .....	ณ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ .....	ด
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย .....	1
คำถามงานวิจัย .....	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐาน.....	3
กรอบแนวความคิดในการวิจัย.....	4
ข้อจำกัดในการวิจัย.....	5
นิยามเชิงปฏิบัติการ .....	5
คำสำคัญ.....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย .....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	7
อณูไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบ บี (Molecular virology).....	7
ระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบ บี (Molecular epidemiology).....	9
ความสำคัญของ <i>pre- S/S</i> region.....	11

ความสำคัญของ Core region.....	12
การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (Mutations of hepatitis B virus ).....	13
การกลายพันธุ์ของยีน <i>pre-S/S</i> .....	15
การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg .....	18
การตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันของไวรัสตับอักเสบบี .....	20
วัคซีนป้องกันการไวรัสตับอักเสบบี .....	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	23
รูปแบบการวิจัย (Research design) .....	23
ประชากรศึกษา (Population study).....	23
ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size) .....	24
เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	25
1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	25
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย .....	26
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	27
4. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatic.....	28
วิธีการดำเนินการวิจัย .....	29
1. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส ( DNA extraction).....	29
2. การตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี semi-nested PCR .	30
3. การตรวจหาการกลายพันธุ์ในส่วนของ Basic core promoter (BCP) และ precore (PC) gene ด้วยวิธี nested PCR .....	33
4. การสกัดแยกผลผลิตจากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์.....	36
5. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	37
6. แยกเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกัน โดยอาศัยการ cloning .....	37



7. การตรวจสอบ HBeAg.....	41
8. การตรวจปริมาณไวรัสในเลือด .....	42
9. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	45
10. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	45
11. เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	46
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	47
1. ประชากรตัวอย่าง (Sample Size).....	47
2. ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	49
3. ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อ HBV .....	53
4. การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์.....	60
5. ผลการจำแนก subtype.....	60
6. การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant .....	61
7. ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของยีน <i>Pre-S</i> .....	66
8. ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในส่วนของ Basic core promoter (BCP) และ precore (PC) gene.....	72
9. ผลการตรวจสอบ Hepatitis B e antigen (HBeAg) .....	82
10. การวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส (HBV DNA) ในซีรัม.....	82
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	87
รายการอ้างอิง .....	92
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก .....	100
ภาคผนวก ข .....	102
ภาคผนวก ค .....	107

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ..... 108



## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ความแตกต่างของลักษณะทางอนุไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบ บี สายพันธุ์ต่างๆ (33).....	10
ตารางที่ 2 การกลายพันธุ์ที่บริเวณต่างๆของไวรัสตับอักเสบ บี (44) .....	14
ตารางที่ 3 การกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant ที่ตำแหน่งต่างๆ และความสัมพันธ์กับการ .....	16
ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ของยีน <i>pre- S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant.....	30
ตารางที่ 5 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ของยีน <i>pre- S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant (1 Reaction).....	31
ตารางที่ 6 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 1 ของยีน <i>pre- S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant .....	31
ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ของยีน <i>pre- S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant.....	31
ตารางที่ 8 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ของยีน <i>pre- S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant (1 Reaction).....	32
ตารางที่ 9 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 2 ของยีน <i>pre- S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant .....	32
ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC.....	34
ตารางที่ 11 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC (1 Reaction).....	34
ตารางที่ 12 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 1 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC.....	34
ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC.....	35
ตารางที่ 14 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC (1 Reaction).....	35
ตารางที่ 15 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 2 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC.....	35

ตารางที่ 16 สารที่ใช้ในการเชื่อม (ligation) ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System I (Promega).....	37
ตารางที่ 17 สารที่ใช้ในการทำโคลนนิ่ง PCR.....	39
ตารางที่ 18 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำโคลนนิ่ง PCR.....	39
ตารางที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR.....	44
ตารางที่ 20 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR (1 Reaction).....	44
ตารางที่ 21 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ real-time PCR.....	44
ตารางที่ 22 แสดงประชากรที่ใช้ในการศึกษา.....	47
ตารางที่ 23 แสดงประชากรที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR.....	50
ตารางที่ 24 แสดงการจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างทั้ง 4 ภาค.....	53
ตารางที่ 25 แสดงการจำแนก subtype ของตัวอย่างทั้ง 4 ภาค.....	60
ตารางที่ 26 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant.....	61
ตารางที่ 27 ลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ <i>Pre-S</i> gene ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา.....	66
ตารางที่ 28 เปรียบเทียบปัจจัยต่างๆระหว่างผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ <i>Pre-S</i> gene.....	67
ตารางที่ 29 ลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP และ PC ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา.....	75
ตารางที่ 30 เปรียบเทียบปัจจัยต่างๆในผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP region.....	77
ตารางที่ 31 เปรียบเทียบปัจจัยต่างๆในผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ PC region.....	78
ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส (HBV DNA) ในซีรัมและผลการตรวจสอบ HBeAg ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg.....	84
ตารางที่ 33 การเปรียบเทียบการตรวจทางอณูไวรัสวิทยาในกลุ่มที่เกิดก่อนและหลัง EPI.....	85

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี  
[http://hepatmon.com/?page=article&article\\_id=1022](http://hepatmon.com/?page=article&article_id=1022) ..... 8

ภาพที่ 2 การกระจายตัวของสายพันธุ์ในภูมิภาคต่างๆทั่วโลก  
 (<http://www.intechopen.com/books/>) ..... 9

ภาพที่ 3 องค์ประกอบของ HBs Proteins  
 (<http://www.hepatitisbviruspage.com/hbsags.htm>) ..... 11

ภาพที่ 4 ส่วน “a” determinant ของไวรัสตับอักเสบบี  
 (<http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v28n4/bta03411.pdf>) ..... 12

ภาพที่ 5 องค์ประกอบของ HBs Proteins  
<http://www.hepatitisbviruspage.com/hbvcore.htm> ..... 13

ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี (43) ..... 14

ภาพที่ 7 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant (7) ..... 15

ภาพที่ 8 แสดงการกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S* ที่ทำให้เกิด ER stress นำไปสู่การเกิดมะเร็งตับ (8) ..... 18

ภาพที่ 9 การกลายพันธุ์ของ *precore* gene และ Basic core promoter (BCP) (9) ..... 20

ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงทางวิทยาภูมิคุ้มกันหลังการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี  
<http://www.medicalcriteria.com/> ..... 22

ภาพที่ 11 จีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ..... 30

ภาพที่ 12 จีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ..... 33

ภาพที่ 13 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของชุด ELISA kits  
 ([http://www.epitomics.com/products/product\\_info/1257](http://www.epitomics.com/products/product_info/1257)) ..... 41

ภาพที่ 14 แสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง SYBR Green I dye และ target template ..... 43

ภาพที่ 15 แสดงตัวอย่างประชากรที่ใช้ศึกษาทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย ..... 48

ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg แบ่งเป็นช่วงอายุตาม EPI ..... 48

ภาพที่ 17 แสดงผลการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี semi-nested PCR ของยีน <i>pre-S1</i> จนถึงบริเวณ “a” determinant ด้วยไพรเมอร์ HBV-PS1F+ _F และ HBV-SR4 _R ได้ผลผลิตขนาด 1,090 bp HBV-S2-1 _F และ HBV-SR5 _R ได้ผลผลิตขนาด 560 bp โดย M คือ 100 bp marker S1 คือตัวอย่างที่มี ผลผลิตขนาด 1,090 bp S2 คือตัวอย่างที่มี ผลผลิตขนาด 560 bp และ N คือ negative control.....	49
ภาพที่ 18 ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	50
ภาพที่ 19 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank).....	51
ภาพที่ 20 ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของยีน surface antigen .....	51
ภาพที่ 21 ตัวอย่างการตรวจสอบสายพันธุ์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม viral genotyping tool จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C มากที่สุด.....	52
ภาพที่ 22 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัด พิษณุโลกและอุตรดิตถ์ (CR) จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype B,C .....	55
ภาพที่ 23 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัด พระนครศรีอยุธยา (AY) และลพบุรี (LP) จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype B,C .....	56
ภาพที่ 24 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัด ขอนแก่น (KK) จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype C.....	57
ภาพที่ 25 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัดตรังและนราธิวาส (ST) จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype C .....	58
ภาพที่ 26 แสดง phylogenetic analysis ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย .....	59
ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนผู้เกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant และ อายุในผู้เกิดการกลายพันธุ์.....	62

ภาพที่ 28 แสดงการแปลงรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0 จะพบว่าลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้มีทั้งหมด 54 กรดอะมิโน .....	65
ภาพที่ 29 แสดงการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant ทั้ง 9 ตัวอย่าง .....	65
ภาพที่ 30 แสดงการ deletion ที่ตำแหน่ง <i>Pre-S1</i> .....	68
ภาพที่ 31 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ <i>Pre-S1</i> ของตัวอย่าง CR348 จากรูปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Pre-S</i> gene จากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion ไป 54 bp.....	68
ภาพที่ 32 แสดงการ deletion ที่ตำแหน่ง <i>Pre-S2</i> .....	69
ภาพที่ 33 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ <i>Pre-S2</i> ของตัวอย่าง KK1210 จากรูปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Pre-S</i> gene จากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion ไป 27 bp.....	69
ภาพที่ 34 แสดงกรดอะมิโนที่ขาดหายไป ใน <i>Pre-S1/S2</i> gene เนื่องจากมีการ deletion ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหรือการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon.....	70
ภาพที่ 35 แสดงการกลายพันธุ์ที่ start codon ที่ตำแหน่ง <i>Pre-S2</i> .....	70
ภาพที่ 36 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ start codon บริเวณ <i>Pre-S2</i> .....	71
ภาพที่ 37 LP265 มี Chromatogram ที่มีลักษณะที่มีการซ้อนทับกัน .....	71
ภาพที่ 38 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ <i>Pre-S2</i> ของตัวอย่าง LP265 จากรูปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>Pre-S</i> gene จากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion ไป 45 bp.....	71
ภาพที่ 39 แสดงผลการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี nested PCR ของบริเวณ BCP จนถึงส่วนของ PC ด้วยไพรเมอร์ HBV-Xi1_F และ HBV-CORE2_R ได้ผลผลิตขนาด 1,189 bp HBV-X101_F และ HBV-CO2_R ได้ผลผลิตขนาด 501 bp โดย M คือ 100 bp marker และ N คือ negative control.....	72
ภาพที่ 40 ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์ .....	73
ภาพที่ 41 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank).....	73

ภาพที่ 42 ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของยีน precore/core .. 74

ภาพที่ 43 แสดงการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP ทั้งหมดจำนวน 31 ตัวอย่าง ..... 79

ภาพที่ 44 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ A1762T/ G1764A บริเวณ BCP ..... 80

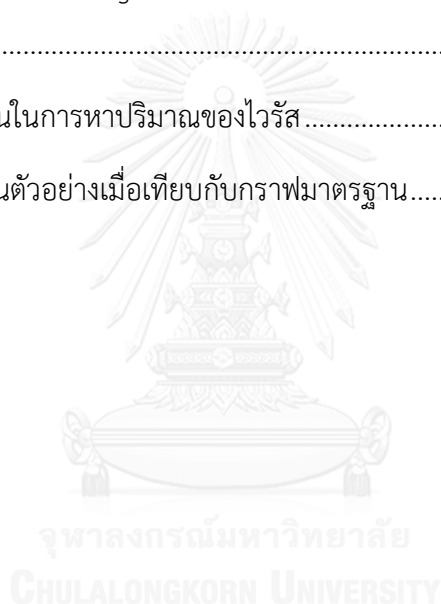
ภาพที่ 45 แสดงการกลายพันธุ์ในส่วนของ PC ทั้งหมดจำนวน 17 ตัวอย่าง..... 81

ภาพที่ 46 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ G1896A/ G1899A บริเวณ PC ..... 81

ภาพที่ 47 แสดงการตรวจหา HBeAg โดยวิธี ELISA เมื่อการตรวจให้ผลบวกของ HBeAg จะแสดงผลเป็นสีเหลืองเข้ม ..... 82

ภาพที่ 48 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณของไวรัส ..... 83

ภาพที่ 49 ปริมาณไวรัสในตัวอย่างเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน..... 83





## สารบัญแผนภาพ

แผนภาพที่ 1	กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework) .....	4
-------------	---	---



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
CHB	Chronic Hepatitis B
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EPI	Expanded Program Immunization
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular Carcinoma
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Mililiter
mM	Milimolar
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Round per minute
TBE	Tris Borate Buffer
µl	Microliter
µM	Micromolar

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (Background and rationale)

ในปัจจุบันพบว่า มีประชากรทั่วโลกที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังประมาณ 400 ล้านคน โดยภูมิภาคที่มีความชุกของการติดเชื้อสูงได้แก่ทวีปแอฟริกา ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งในภูมิภาคนี้จะมีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มากกว่าร้อยละ 8 ของประชากร (2, 3) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แบบเรื้อรังนำไปสู่การเกิดโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง (chronic hepatitis B) และโรคตับแข็งหรือ liver cirrhosis (LC) ซึ่งทำให้เกิดโรคมะเร็งตับชนิด hepatocellular carcinoma (HCC) ต่อไป(4, 5)โดยประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอัตราการชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่ค่อนข้างสูง จากการศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล (molecular epidemiological studies) จากกลุ่มประชากรตัวอย่างทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2547 พบว่าในประชากรไทยมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ประมาณร้อยละ 4 (1) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่าประชากรโลกมีแนวโน้มการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ลดลงรวมทั้งประชากรไทย อันเนื่องมาจากในปีพ.ศ. 2535 กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้ทารกแรกเกิดทุกคนต้องได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยบรรจุลงในการสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคหรือ Expanded Program on Immunization (EPI) ของประเทศ ไวรัสตับอักเสบบี มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ มีขนาดจีโนมประมาณ 3,200 นิวคลีโอไทด์ การจัดแบ่งสายพันธุ์ (genotype) ของไวรัสตับอักเสบบี มีความแตกต่างกันตามภูมิภาคต่างๆของโลกซึ่งปัจจุบันแบ่งเป็น 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ A, B, C, D, E, F, G, H, I และ J (6)โดยในประเทศไทยจะพบสายพันธุ์ที่ระบาดส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ C , B และ A โดยคิดเป็นร้อยละ 87.1 , 11.6 และ 1.3 ตามลำดับ (1) ไวรัสตับอักเสบบี เป็นเชื้อไวรัสที่มีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (rate of spontaneous mutations) สูงกว่าดีเอ็นเอไวรัสชนิดอื่นๆ เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสต้องอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase และการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อยได้แก่ ‘a’ determinant mutations เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากแรงกดดันหลังจากได้รับวัคซีนจึงมีความสัมพันธ์กับการที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์แบบนี้อาจพบได้ในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่ไม่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน ที่พบบ่อยได้แก่ การกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตำแหน่ง ที่ 145 จากไกลซีน (glycine, G) เป็นอาร์จินีน (arginine, R) หรือที่เรียกว่า G145R(7) ส่วนการกลายพันธุ์ในส่วนยีน pre-S ที่พบได้บ่อยได้แก่ pre-S1 deletion หรือ pre-S2 deletion จากการศึกษาหลายรายงานพบว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าว

อาจมีส่วนสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ(8) และนอกจากนี้การเกิดกลายพันธุ์ในบริเวณ basic core promoter (BCP) และ Precore (PC) gene จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ในส่วนนี้มีความสัมพันธ์กับการสร้าง Hepatitis B e antigen (HBeAg) โดย HBeAg เป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสในเลือดจำนวนมาก (9) โดยทำการตรวจร่วมกับการตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดหรือระดับ HBV DNA ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยการดำเนินของโรครวมทั้งการให้การรักษาแก่ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ทำเพื่อศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย โดยการศึกษาทางระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี ของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2557 เปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี พ.ศ. 2547 ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เพื่อทำการเก็บตัวอย่างซีรัมจากประชากรชาวไทยอายุระหว่าง 1-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ทั้ง 4 ภาคได้แก่ ภาคเหนือ (พิษณุโลก, อุตรดิตถ์) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น) ภาคกลาง (พระนครศรีอยุธยา, ลพบุรี) ภาคใต้(ตรัง, นราธิวาส) เก็บตัวอย่างภาคละ 1,500 ตัวอย่าง รวมประมาณ 6,000 ตัวอย่าง และทำการคัดเลือกตัวอย่างโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ Hepatitis B surface antigen (HBsAg) มาศึกษาต่อ เพื่อหาความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ ปริมาณไวรัสในเลือด (HBV DNA) ตลอดจนการกลายพันธุ์ในบริเวณยีน pre-S/S , BCP และ PC เปรียบเทียบระหว่างผู้ที่เกิดก่อน EPI และหลัง EPI

### คำถามงานวิจัย (Research questions)

1. ความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และการกระจายตัวของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสในประชากรทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยเป็นอย่างไร แตกต่างจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2547 หรือไม่
2. ลักษณะการกลายพันธุ์บริเวณ “a” determinant, *pre-S1*, *pre-S2*, BPC และ PC ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร ในผู้ที่เกิดก่อน EPI และหลัง EPI

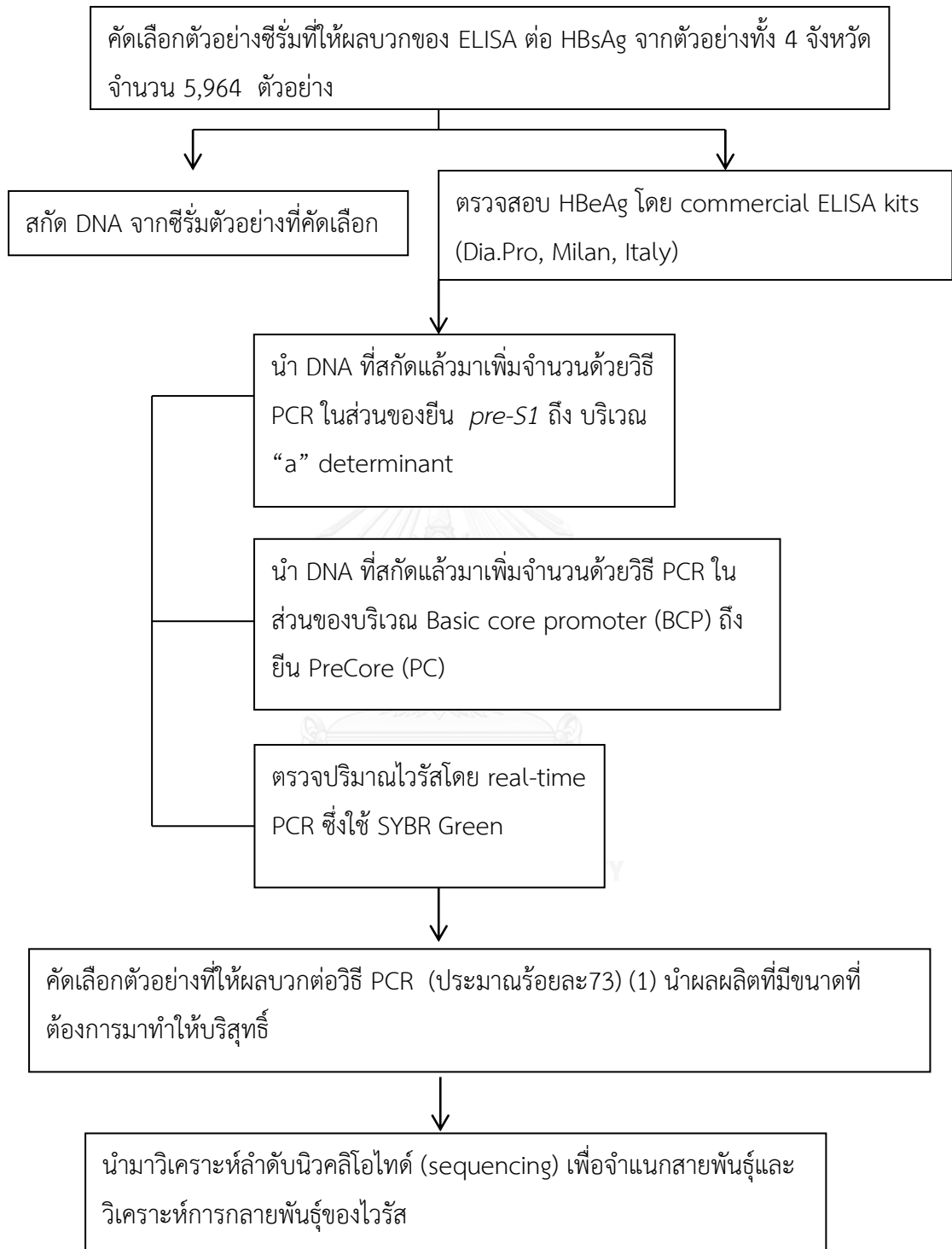
### วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. ศึกษาหาความชุกและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จากกลุ่มประชากรตัวอย่างทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย ที่ตรวจพบ HBsAg และ HBV-DNA ในเลือด
2. ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์บริเวณ “a” determinant, *pre-S1*, *pre-S2*, BPC และ PC ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในผู้ที่เกิดก่อน EPI และหลัง EPI

### สมมติฐาน (Hypothesis)

1. ความชุกของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยลดลงจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2547
2. สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่พบบ่อยในประเทศไทยได้แก่สายพันธุ์ C, B, A ตามลำดับ
3. พบการกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S1*, *pre-S2* และเกิดการกลายพันธุ์บริเวณ “a” determinant ในผู้ที่เกิดหลัง EPI หรือผู้ที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อน หรือที่เรียกว่า ‘vaccine escape’ mutant
4. พบการกลายพันธุ์บริเวณ BPC และ PC ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จากกลุ่มประชากรตัวอย่างทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย

### กรอบแนวความคิดในการวิจัย



แผนภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)

### ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

1. ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือผู้ที่ซั้ร่่มให้ผลบวกต่อ HBsAg ในตัวอย่างซั้ร่่มบางตัวอย่างมีปริมาณไม่เพียงพอตามที่กำหนดไว้ ทำให้น้ามาวิเคราะห์ซั้ร่่มไม่ได้
2. ไม่ได้รับข้อมูลวัคซีนในแบบสอบถามทำให้ขาดข้อมูลที่สำคัญในการวิเคราะห์เพื่อแปลผล

### นิยามเชิงปฏิบัติการ (Operation definition)

Genotypes คือ การจำแนกกลุ่มของไวรัสตับอักเสบบี โดย การวิเคราะห์จากรหัสทางพันธุกรรมแล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI

Mutations คือการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมที่เคยเป็น หรือ แตกต่างไปจากประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น และลักษณะนั้นสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อไป

‘vaccine escape’ mutant คือ การที่เชื้อไวรัสตับอักเสบบี สามารถหลีกเลี่ยงการทำลายจากระบบภูมิคุ้มกัน โดยเกิดจากแรงกดดันหลังจากได้รับวัคซีน

### คำสำคัญ (Keywords)

Hepatitis B virus (HBV)

Chronic Hepatitis B

Genotype

Mutations

*pre-s/s* gene

basic core promoter (BCP) and *Precore* (PC) gene

“a” determinant

‘vaccine escape’ mutant

HBV DNA

EPI

Thailand

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย (Expected Benefits of study)

1. ทำให้ทราบถึงความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ของประชากรไทยในปัจจุบัน และสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส
2. ทราบถึงความชุกและลักษณะการกลายพันธุ์ที่บริเวณยีน *pre-S1* , *pre-S2*, “a” determinant และ basic core promoter/ precore ในผู้ที่เกิดก่อน EPI และหลัง EPI
3. ฝึกกระบวนการคิด วิเคราะห์ และสามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นจากการศึกษาวิจัย มีผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ ในวารสารที่เกี่ยวข้อง





## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสตับอักเสบบี ยังเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทยโดยพบผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ประมาณร้อยละ 4 (1) ของประชากรไทยจากการศึกษาาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี (Molecular epidemiology) ในปี พ.ศ. 2547 และการติดเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดตับอักเสบบีบเรื้อรัง ตับแข็งและมะเร็งตับ ดังนั้นการศึกษาทางระบาดวิทยาในระดับอณูชีววิทยาของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากจะทำให้ทราบถึงความชุกและการกระจายตัวของสายพันธุ์ ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยแล้ว ยังเป็นประโยชน์ในทางคลินิกด้วย เพราะในปัจจุบันเชื่อว่าการติดเชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์กันจะมีการดำเนินโรคและความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน (10)

#### อณูไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี (Molecular virology)

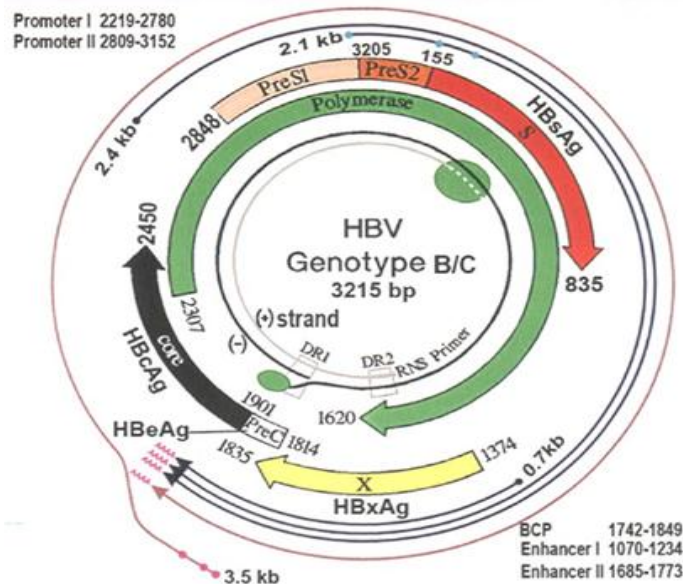
เชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นดีเอ็นเอไวรัสอยู่ใน Family *Hepadnaviridae* และอยู่ใน genus *orthohepadnavirus* เนื่องจากเชื้อไวรัสเกิดขึ้นที่ตับและมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ (hepa+DNA = hepadna) จีโนมขนาดประมาณ 3,200 นิวคลีโอไทด์ (11) และไวรัสมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 42 นาโนเมตร โครงสร้างของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะเป็นดีเอ็นเอสายคู่แบบไม่สมบูรณ์ [partially double-stranded DNA หรือ relaxed-circular DNA (rcDNA)] โดยสายลบ (L หรือ minus strand) จะมีความยาวเต็มตลอดทั้งจีโนม ส่วนสายบวก (S หรือ plus strand) จะมีความยาวไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับไวรัสแต่ละสายพันธุ์โดยมีความยาวประมาณร้อยละ 20-80 ของสายลบ (12-14) สายลบประกอบด้วย 4 open reading frames (ORFs) ซึ่งทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนของไวรัสได้แก่ S-ORFs, X-ORFs, P-ORFs และ C-ORFs เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบี เป็นดีเอ็นเอไวรัสขนาดเล็กทำให้ส่วนของ ORFs มีการซ้อนทับกันอยู่ (overlapping ORFs) โดยเฉพาะส่วนของ P-ORFs ที่ซ้อนทับกับส่วนของ S-ORFs, X-ORFs และ C-ORFs (15)

S-ORFs ทำหน้าที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสร้างโปรตีนที่ผิวหรือ surface protein ที่เรียกว่า hepatitis B surface antigen ซึ่งเป็นองค์ประกอบในส่วนของ envelope ของไวรัส สร้างจากยีน 3 ชนิดคือยีน *S*, *pre-S1* และ *pre-S2* ซึ่งยีนแต่ละชนิดมีบทบาทในการสร้างโปรตีนได้แตกต่างกัน โดยบริเวณ S-ORFs มีรหัสเริ่มต้น 3 ตำแหน่งดังนั้นจึงสามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิดคือ Major protein หรือ Small protein, Middle protein และ Large protein (16)

C-ORFs ทำหน้าที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสร้าง HBeAg จาก *precore* gene เชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้อาจมีหน้าที่เป็น immune tolerogen ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสต่ำลง และ core protein หรือ HBcAg จาก *core* gene ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันสารพันธุกรรมของไวรัส (17)

P-ORFs ทำหน้าที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสร้างเอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการ เพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication) (18, 19)

X-ORFs ทำหน้าที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสร้าง HBxAg หรือ x protein ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ที่แน่ชัด แต่เชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้มีกลไกเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับ (20, 21)

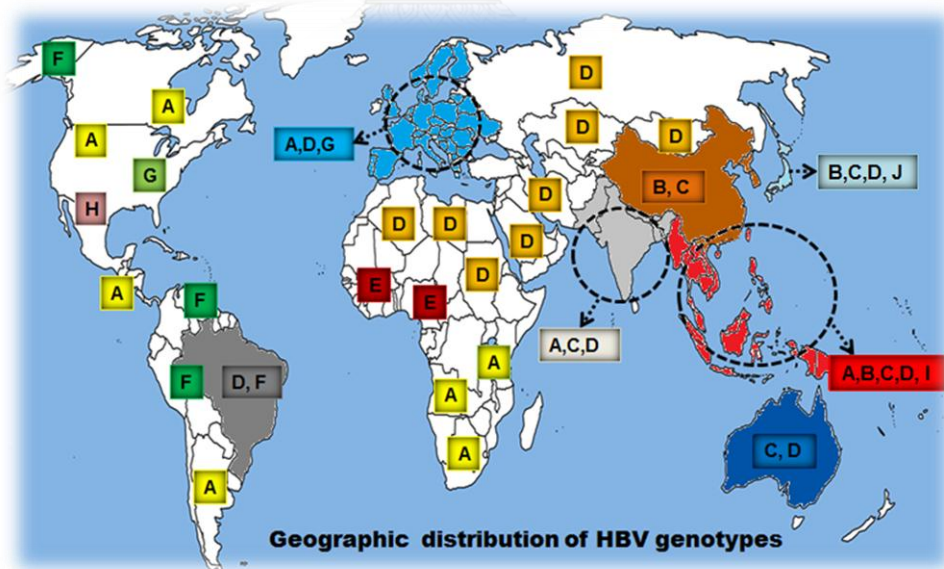


ภาพที่ 1 โครงสร้างทางพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี

[http://hepatmon.com/?page=article&article\\_id=1022](http://hepatmon.com/?page=article&article_id=1022)

## ระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบ บี (Molecular epidemiology)

การกระจายตัวของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี จะแตกต่างกันตามภูมิภาคต่างๆของโลก รวมทั้งแต่ละสายพันธุ์จะมีการดำเนินของโรคที่แตกต่างกันทำให้ความรุนแรงของโรคแตกต่างกันด้วย หลักการที่ใช้ในการจำแนกอาศัยตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ร้อยละ 8 เกิดจากความแตกต่างของจีโนมของไวรัสตับอักเสบ บี และร้อยละ 4 มาจากความแตกต่างของบริเวณ S region ในปัจจุบันจะมีการจัดแบ่งสายพันธุ์ (genotypes) ของเชื้อไวรัสโดยแบ่งเป็น 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ A-J (22) ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะมีการกระจายตัวที่แตกต่างกันตามภูมิภาคต่างๆของโลก อย่างเช่น สายพันธุ์ A จะพบทางตะวันตกเฉียงเหนือของยุโรป อินเดีย และทวีปแอฟริกา (23-25) สายพันธุ์ B พบในทวีปเอเชียโดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สายพันธุ์ C พบในทวีปเอเชีย โดยเฉพาะเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบมากในประเทศไทย (26) สายพันธุ์ D พบได้ทั่วโลก แต่มักพบโดยรอบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (27) สายพันธุ์ E พบได้ในทวีปแอฟริกา สายพันธุ์ F พบได้ในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ (28, 29) สายพันธุ์ G พบได้ในทวีปยุโรปและอเมริกา (30, 31) สายพันธุ์ H พบในอเมริกากลาง สายพันธุ์ I พบรายงานในประเทศเวียดนามและลาว สายพันธุ์ J พบรายงานในประเทศญี่ปุ่น (32)



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของสายพันธุ์ในภูมิภาคต่างๆทั่วโลก

(<http://www.intechopen.com/books/>)

ไวรัสตับอักเสบบี บางสายพันธุ์มีลักษณะทางอนุไวรัสวิทยาบางอย่างที่ช่วยในการวินิจฉัยแยกจากสายพันธุ์อื่นๆ เช่นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ A มี 6 นิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นทางด้าน 3' ของ core gene สายพันธุ์ D พบว่ามีการขาดหายของนิวคลีโอไทด์จำนวน 33 ตัวในส่วนของ *pre-S1* gene สายพันธุ์ G มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้น 36 ตัวทางด้าน 5' ของ core gene และสายพันธุ์ G ยังมีการขาดหายของนิวคลีโอไทด์จำนวน 33 ตัวในส่วนของ *pre-S1* gene และมี stop codon ที่ส่วนของ precore อีก 2 ตำแหน่งที่ codon 2 และ 28 (33)

**ตารางที่ 1** ความแตกต่างของลักษณะทางอนุไวรัสวิทยาของไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ต่างๆ (33)

Genotype	Genome length in bp	ORF-differences
A	3221	Insertion of aa 153 and 154 in HBc
B	3215	
C	3215	
D	3182	Deletion of aa 1-11 in preS1
E	3212	Deletion of aa 11 in preS1
F	3215	
G	3248	Insertion of 12 aa in HBc Deletion of aa 11 in preS1
H	3215	

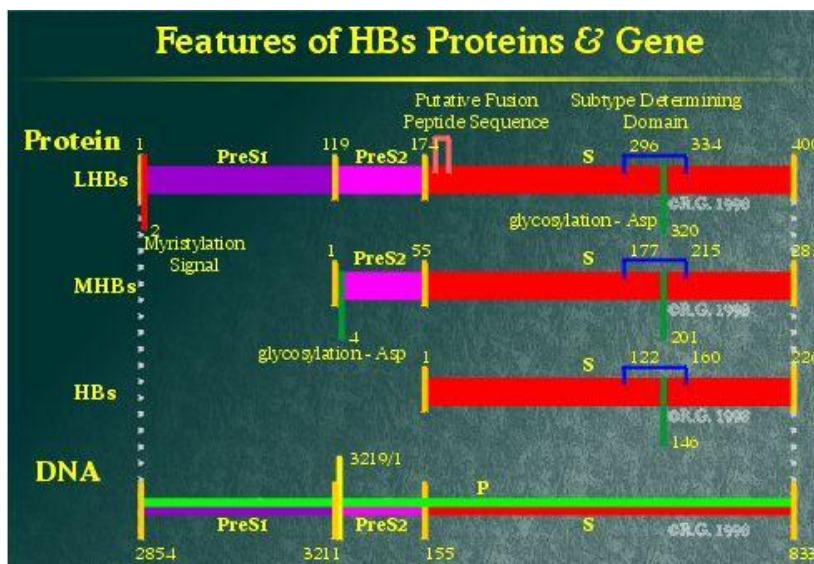
ในประเทศไทยมีการศึกษาระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลเมื่อปี พ.ศ. 2547 จากกลุ่มประชากรแต่ละจังหวัดที่เป็นตัวแทนทั้ง 4 ภาคจำนวน 6,213 คนในกลุ่มอายุต่างๆ เมื่อทำการตรวจ HBsAg ด้วยวิธี enzyme immunoassay พบว่ามีผู้ที่ติดเชื้อไวรัสหรือ HBsAg positive ร้อยละ 4 โดย genotype ส่วนใหญ่ของประชากรในประเทศไทยจะเป็น genotype C เท่ากับร้อยละ 87.1 B เท่ากับร้อยละ 11.6 และ A เท่ากับร้อยละ 1.3 (1)

แต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะอาการทางคลินิก การดำเนินโรค (10, 34) และการตอบสนองต่อยาต้านไวรัสที่แตกต่างกัน (35) ยกตัวอย่างเช่น ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C จะมีอาการที่รุนแรงและมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย interferon ต่ำกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ B และผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C มักตรวจพบ HBeAg ในเลือดที่สูงกว่าผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ B นอกจากนี้ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C ยังมีระดับของเอนไซม์ ALT รวมทั้งระดับ HBV DNA ในเลือดที่สูงกว่าที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ B (36) ข้อมูลการศึกษาในปัจจุบันเชื่อกันว่าไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C เกิดการกลายพันธุ์หลายตำแหน่งพร้อมกันโดยเฉพาะ *pre-S* deletion และ BCP mutation ร่วมกับมีระดับ HBV DNA ในเลือดที่สูง

ติดต่อกันเป็นเวลานานทำให้ผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C เสี่ยงต่อการเป็นตับแข็งและมะเร็งตับมากขึ้นในเวลาต่อมา (37)

### ความสำคัญของ *pre-S/S* region

บริเวณ S ORF เป็นรหัสเริ่มต้นในการสร้างประกอบด้วยยีน S, *pre-S1* และ *pre-S2* ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ผิวหรือ HBsAg จีโนมบริเวณนี้มีตำแหน่งของรหัสเริ่มต้น 3 ตำแหน่งดังนั้นสามารถสร้างโปรตีนได้ 3 ชนิดคือ major protein, middle protein และ large protein (13)

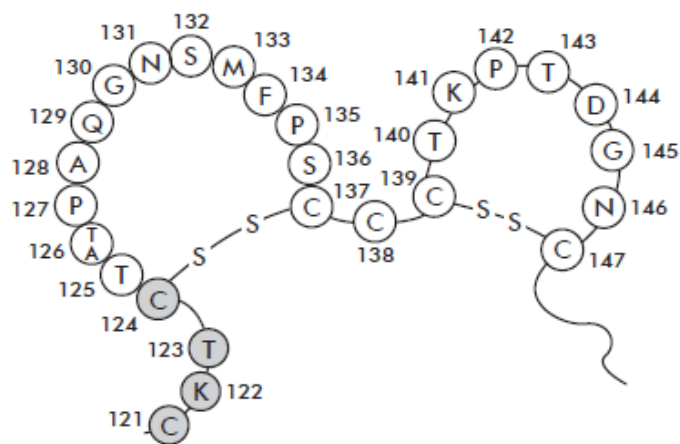


CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 3 องค์ประกอบของ HBs Proteins

(<http://www.hepatitisbviruspage.com/hbsags.htm>)

Major protein เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 90 (38) สร้างจากยีน S ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีน HBsAg ประกอบด้วยกรดอะมิโน 226 หน่วย นอกจากนี้มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 121-149 เรียกว่า Major antigenic determinant หรือ “a” determinant โครงสร้างประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) 2 ตำแหน่งเชื่อมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine, C) ตำแหน่งที่ 124 และ 137 และระหว่างตำแหน่ง 139 และ 147 โดยเชื่อมเป็นวง 2 วง (7) ซึ่งส่วนของ “a” determinant นี้เป็นส่วนที่กระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อไวรัสซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันที่สามารถเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติและได้รับมาจากการฉีดวัคซีน



ภาพที่ 4 ส่วน “a” determinant ของไวรัสตับอักเสบบี

(<http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v28n4/bta03411.pdf>)

Middle protein พบประมาณร้อยละ 10 (38) สร้างจากยีน *S* และ *pre-S2* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 281 หน่วย เชื่อกันว่าโปรตีนส่วนนี้เกี่ยวข้องกับการจับที่ผิวของเซลล์ตับซึ่งเป็นขั้นเริ่มต้นที่เชื้อไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ตับ

Large protein เป็นปริมาณน้อยที่สุดร้อยละ 1-2 (38) สร้างจากยีน *S* *pre-S1* และ *pre-S2* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 389-400 หน่วย ปัจจุบันเชื่อว่าโปรตีนส่วนนี้เป็นตำแหน่งที่เชื้อไวรัสใช้ผ่านเข้าสู่เซลล์ตับซึ่งเป็นขั้นเริ่มต้นของการติดเชื้อ

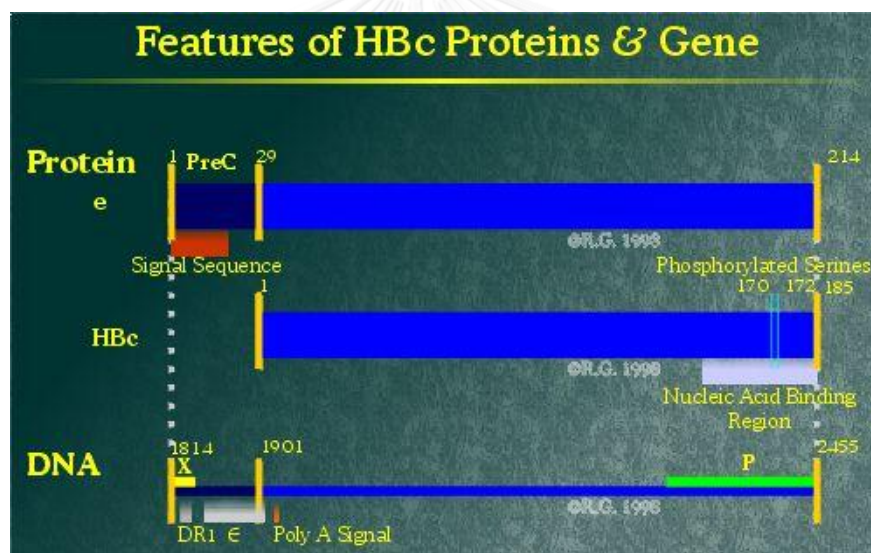
#### ความสำคัญของ Core region

C-ORFs ทำหน้าที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสร้าง core protein และ HBeAg จาก core/ precore gene โดยบริเวณปลายด้าน 5' ของ C ORF จะซ้อนทับกับปลายด้าน 3' ของ X ORF และปลายด้าน 3' ของ C ORF จะซ้อนทับกับปลายด้าน 5' ของ P ORF

Core protein หรือ HBeAg สร้างจาก core gene บน C-ORF โดยตำแหน่งเริ่มต้นของการสร้างหรือ start codon อยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1901 โปรตีนนี้เมื่อรวมกับสารพันธุกรรมของไวรัสหรือ HBV DNA เรียกว่า nucleocapsid ซึ่งการเรียงตัวของ core protein มีโครงสร้างแบบรูปทรงหลายเหลี่ยมแบบสมมาตร (icosahedral symmetric structure) core protein ทำหน้าที่ป้องกันสารพันธุกรรมของไวรัสจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ exogenous nuclease ที่ย่อยดีเอ็นเอ

นอกจากนั้น core protein ยังมีส่วน epitope ของ CD8+ T lymphocyte และ CD4+ T lymphocyte ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายและ core protein เป็นกลไกหลักของระบบ ภูมิคุ้มกันในการกำจัดเชื้อไวรัส (39)

HBeAg สร้างจาก *precore* gene บน C-ORF โดยตำแหน่งเริ่มต้นของการสร้างอยู่ที่นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1814 โดยเป็นคนละตำแหน่งกับการสร้าง Core protein ซึ่ง HBeAg เป็นโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) ความสำคัญของ HBeAg ที่มีต่อเชื้อไวรัสและพยาธิกำเนิดของโรคตับอักเสบยังไม่ทราบชัดเจน แต่ HBeAg มีโครงสร้างคล้ายกับ core protein ดังนั้นเชื่อว่าโปรตีนชนิดนี้อาจมีหน้าที่เป็น immune tolerogen ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสต่ำลง(39)นอกจากนี้การตรวจพบ HBeAg ในตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อมีประโยชน์ทางคลินิก เนื่องจากเป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสในเลือดจำนวนมาก (high levels of viral replication) (40)



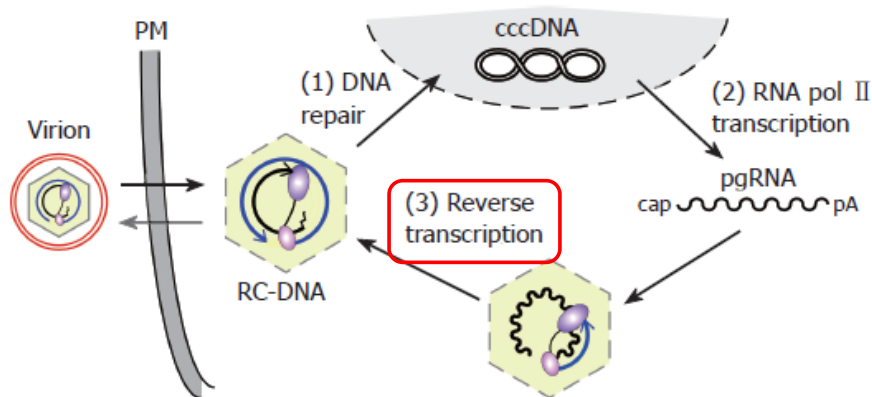
ภาพที่ 5 องค์ประกอบของ HBs Proteins

<http://www.hepatitisbviruspage.com/hbvcore.htm>

### การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบ บี (Mutations of hepatitis B virus )

การเกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี เกิดจากการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยมีกลไกคือเมื่อไวรัสเข้าสู่นิวเคลียส ของเซลล์ตับแล้วจะมีการสร้างสายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ที่เรียกว่า covalently closely circular DNA (cccDNA) ซึ่ง cccDNA จะทำหน้าที่เป็นสายดีเอ็นเอแม่แบบในการสร้าง mRNA ของไวรัสต่อไป ซึ่งการเปลี่ยนจีโนมของไวรัสจากดีเอ็นเอให้เป็นอาร์เอ็นเอที่เรียกว่า

pre-genomic RNA เพื่อนำไปสร้างสายดีเอ็นเอสายลบจากสายอาร์เอ็นเอสายนี้โดยอาศัยกลไก reverse transcription จะใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ซึ่งเอนไซม์นี้ไม่มีกระบวนการ proof-reading ของลำดับเบสในระหว่างการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยจะเป็นกลไกที่คล้ายกับในอาร์เอ็นเอไวรัส ดังนั้นไวรัสตับอักเสบบี จึงมีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติที่สูงกว่าดีเอ็นเอไวรัสชนิดอื่น (41-43)



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี (43)

การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี ที่บริเวณยีนต่างๆของไวรัสอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับในเวลาต่อมา รวมถึงการกลายพันธุ์ของ S-ORFs, X-ORFs, P-ORFs และ C-ORFs แสดงดังตารางที่ 2 (44)

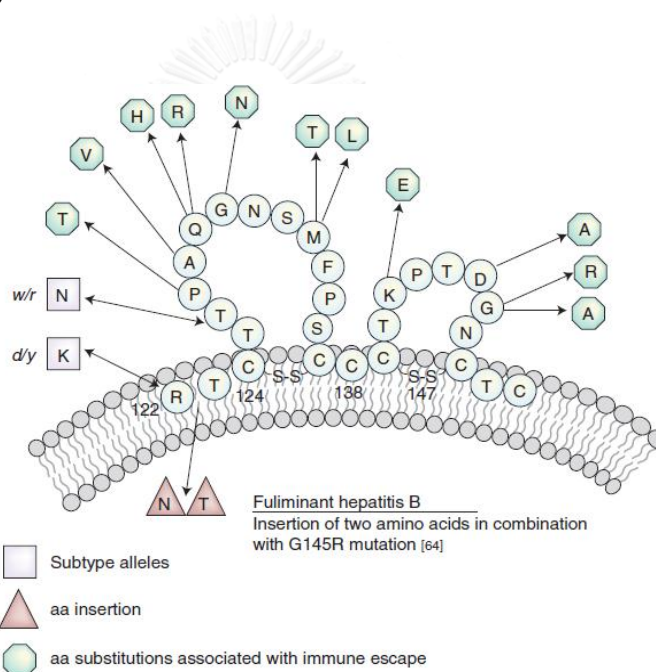
ตารางที่ 2 การกลายพันธุ์ที่บริเวณต่างๆของไวรัสตับอักเสบบี (44)

ORF	Amino acid variant	Effect
P	A181T and M204 I/V (compensatory: L80I/V, T128N, R153Q, V173L L180M, A200V <sup>1</sup> , V207I <sup>1</sup> ) N236T (compensatory: A181 T/V/S. Low sensitivity: V84M, S85A, L217R, I233V) I169T, T184S, S202C/I/G, M250I A194T <sup>1</sup>	LMV resistance  ADV resistance ETV resistance <sup>2</sup> TDF resistance
S	G145R W156Stop, W163Stop, W172Stop, W196Stop D144A, P142S, K141E, Q129H, I/T126N, T131I, M133L	Immune therapy failure HBsAg structural alterations
X	I130M, V131I, F132Y	Contribution to HCC development
C		
preCore	A1762T and G1764A	HBsAg negative forms
Core	G1896A and G1899A P5H/L/T, D32N/H, C/E43K, cP50A/H/Y, E83D, I97F/L, L100I, A131G/N/P, S181H/P and C/Q182K/stop Regions 50-69 and 74-84	Disease progression HCC development  Immune scape variants



### การกลายพันธุ์ของยีน *pre-S/S*

ยีน *S* ทำหน้าที่สร้างโปรตีน HBsAg การกลายพันธุ์ที่ยีน *S* เป็นแบบ missense mutation เป็นการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหนึ่งตำแหน่งเรียกว่า ‘vaccine escape’ mutant การกลายพันธุ์แบบนี้มีความสัมพันธ์กับการเคยได้รับวัคซีนมาก่อนอาจเกิดจากแรงกดดันหลังจากการได้รับวัคซีนหรือเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติก็เป็นได้ (14, 45) การกลายพันธุ์ที่ยีน *S* พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2533 โดยพบในผู้ที่เคยได้รับวัคซีนมาก่อนเป็นการกลายพันธุ์ที่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 145 จากไกลซีน (glycine, G) เป็นอาร์จินีน (arginine, R) [G145R] (7) ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดที่บริเวณ “a” determinant นอกจากนี้สามารถพบการกลายพันธุ์แบบอื่นอีกดังแสดงในตารางที่ 3 (46)



ภาพที่ 7 ตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant (7)

จากการศึกษาในหลายประเทศพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant อย่างเช่นในประเทศไต้หวันมีรายงานการเกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7.8 เป็นร้อยละ 23.1 ภายหลังจากการได้รับวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี อย่างทั่วถึง 15 ปี (47) และในประเทศจีนมีการรายงานถึงการเกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant ในเด็กหลังจากการได้รับวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี อย่างทั่วถึง 13 ปี มีอัตราการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 6.5 เป็นร้อยละ 14.8 (48)

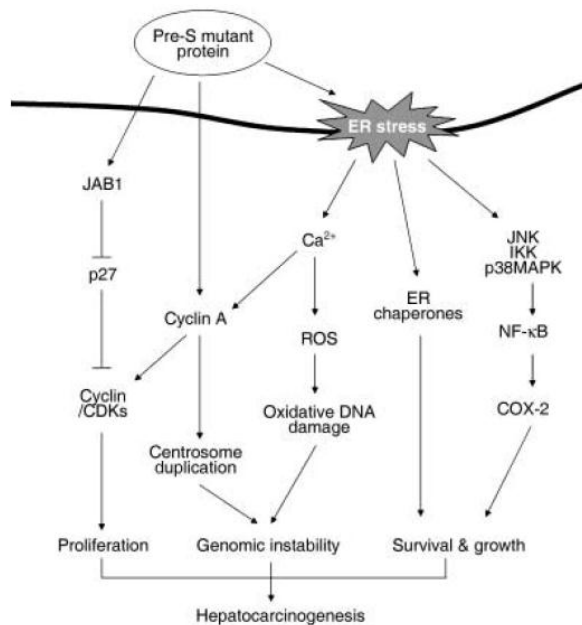
ตารางที่ 3 การกลายพันธุ์ที่บริเวณ “a” determinant ที่ตำแหน่งต่างๆ และความสัมพันธ์กับการได้รับวัคซีน (46)

Position at the MHR	Wild-type amino acid	Mutant amino acid	Affect serological diagnosis	Vaccine escape mutant	Failure in HBIg therapy	References
99	Asp	Val	YES	ND	ND	Datta et al. [2007]
100	Tyr	Phe	YES	YES	YES	Datta et al. [2007]
	Leu	Ser	ND	ND	ND	This study
101	Gln	Arg	YES	ND	ND	Hou [2001]
	Gln	His	ND	ND	ND	This study
103	Met	Cys	ND	ND	ND	This study
	Met	Ile	Yes	ND	ND	KfouryBaz [2001]
104	Leu	Val	ND	ND	ND	This study
	Leu	Phe	ND	ND	ND	This study
105	Pro	Arg	ND	ND	YES	Osiowy [2006]
106	Val	Phe	ND	ND	ND	Katsouliou [2009]
109	Leu	Arg	ND	ND	YES	Wolfram [2006]
	Leu	Pro	YES	ND	ND	Katsouliou [2009]
	Leu	Val	ND	ND	ND	This study
	Leu	Met	ND	ND	ND	This study
	Leu	Ile	YES	ND	ND	Ly et al. [2006]
	Leu	Gln	ND	ND	ND	This study
110	Ile	Leu	YES	ND	ND	Katsouliou [2009]
	Ile	Val	YES	ND	ND	Osiowy [2006]
111	Pro	Leu	Thr	ND	ND	Carman [1997]
112	Gly	Arg	YES	YES	ND	Stramer et al. [2011]
113	Ser	Thr	YES	ND	ND	Ly et al. [2006]
	Ser	Pro	YES	ND	YES	Stramer et al. [2011]
114	Ser	Thr	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
	Ser	Pro	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
	Ser	Ala	ND	ND	ND	This study
115	Thr	Aspn	YES	ND	ND	Ly et al. [2006]
116	Thr	Ser	YES	YES	ND	Carman [1997]
	Thr	Aspn	YES	YES	YES	Santantonio [1999]
117	Ser	Aspn	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
118	Thr	Arg	YES	YES	YES	Coleman [2006]
	Thr	Ala	YES	YES	ND	Carman [1997]
119	Gly	Thr	Glu	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
	Gly	Ser	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
120	Pro	Leu	ND	ND	ND	This study
	Pro	Ser	YES	YES	ND	Echevarria [2006]
	Pro	Thr	YES	YES	YES	Alavian, 2012
121	Cys	Ser	YES	ND	YES	Echevarria [2006]
122	Lys, Arg	Aspn	YES	ND	ND	Echevarria [2006]
	Lys, Arg	Ser	ND	ND	YES	Echevarria [2006]
126	Thr	Ile	YES	YES	YES	Stramer et al. [2011]
	Thr	Ala	YES	YES	YES	Echevarria [2006]
127	Pro	His	YES	ND	ND	Katsouliou [2009]
128	Ala	Val	YES	ND	ND	Katsouliou [2009]
129	Gln	Pro	YES	YES	YES	Katsouliou [2009]
	Gln	Arg	YES	YES	ND	Hou [1998]
	Gln	His	YES	YES	YES	Cooreman [2001]
130	Gly	Arg	YES	ND	YES	Carman [1997]
	Gly	Ala	ND	ND	ND	This study
	Gly	Ser	ND	ND	ND	This study
131	Thr	Aspn	YES	ND	ND	Coleman [1999]
	Thr	Ile	YES	YES	ND	Ho [1998]
132	Ser	Tyr	ND	ND	ND	This study
	Ser	Arg	ND	ND	ND	This study
133	Met	Leu	YES	YES	YES	Carman [1997]
	Met	Ser	ND	ND	ND	This study
	Met	Ile	YES	YES	YES	Carman [1997]
	Met	Thr	YES	ND	ND	Carman [1997]
134	Tyr	Asn	YES	ND	ND	Echevarria [2006]
	Tyr	Gln	ND	ND	ND	This study
	Tyr	Phe	YES	YES	YES	Katsouliou [2009]
	Tyr	His	YES	ND	ND	Ly et al. [2006]
	Tyr	Ser	YES	ND	ND	Ly et al. [2006]
135	Pro	His	ND	ND	ND	This study
	Pro	Leu	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
	Pro	Ala	YES	ND	ND	Ly et al. [2006]
136	Ser	Tyr	ND	ND	ND	This study
137	Cys	Tyr	YES	ND	YES	Echevarria [2006]
142	Pro	Leu	YES	YES	YES	Gerlich [2006]

Position at the MHR	Wild-type amino acid	Mutant amino acid	Affect serological diagnosis	Vaccine escape mutant	Failure in HBVg therapy	References
143	Ser	Thr	Yes	ND	ND	Katsouliou [2009]
	Ser	Pro	ND	ND	ND	This study
	Ser	Leu	YES	YES	ND	Avellon and Echevarria [2006]
144	Asp	Glu	YES	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
	Asp	Val	ND	ND	ND	This study
145	Gly	Arg	YES	YES	YES	Coleman [1999]
	Gly	Leu	ND	ND	ND	This study
	Gly	Ala	YES	ND	YES	Seddigh-Tonekaboni et al. [2001]
146	Asn	Lys	ND	ND	ND	In this study
147	Cys	Gly	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
157	Ala	Gly	ND	ND	ND	Avellon and Echevarria [2006]
158	Phe	Leu	ND	ND	ND	This study
161	Phe	Ser	ND	ND	ND	This study
	Phe	Tyr	ND	ND	ND	This study
162	Leu	Pro	ND	ND	ND	This study
163	Trp	Leu	ND	ND	ND	This study
	Trp	Arg	ND	ND	ND	This study
	Trp	STOP	YES	YES	YES	Kay and Zoulim [2007]
164	Glu	Val	ND	ND	ND	This study
	Glu	Arg	ND	ND	ND	This study
	Glu	Gly	YES	ND	ND	Katsouliou [2009]
165	Trp	Arg	ND	ND	ND	This study
	Trp	Leu	YES	ND	ND	Katsouliou [2009]
166	Ala	Val	ND	ND	ND	This study
	Ala	Thr	ND	ND	ND	This study
	Ala	Pro	ND	ND	ND	This study
	Ala	Gly	ND	ND	ND	This study
	Ala	Leu	ND	ND	ND	This study
167	Ser	Leu	ND	ND	ND	This study
	Ser	Thr	ND	ND	ND	This study
168	Ala	Val	ND	ND	ND	This study
169	Arg	Pro	ND	ND	ND	This study
	Arg	His	ND	ND	ND	This study
	Arg	Leu	ND	ND	ND	This study
170	Phe	Ser	ND	ND	ND	This study

The red color cells indicate the acidic amino acids, green: basic, blue: hydrophilic, and purple: hydrophobic amino acids. ND, not determined.

ยีน *pre-S* ประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญคือ *pre-S1* และ *pre-S2* มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S* ส่วนใหญ่จะเป็นแบบ deletion ซึ่งพบความชุกแตกต่างกันไปตามภูมิภาคต่างๆของโลก จากการศึกษาจากหลายรายงานพบว่ามีการกลายพันธุ์ในส่วน *pre-S* โดยเฉพาะ *pre-S1* deletion หรือ *pre-S2* deletion ทำให้การสร้าง large protein หรือ large hepatitis B surface protein (LHBs) และ medium hepatitis B surface protein (MHBs) ไม่เป็นไปตามปกติและมีการสะสมโปรตีนที่ผิดปกติในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) มากขึ้นจึงทำให้เกิดความเครียดในเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (ER stress) แล้วยังมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้นอีกด้วย ดังนั้นผลที่เกิดตามมาคือดีเอ็นเอในเซลล์ตับถูกทำลายมากขึ้นและอาจนำไปสู่สถานะขาดความเสถียรของจีโนม (genomic instability) นอกจากนี้ LHBs ยังกระตุ้นการทำงานของ cyclooxygenase-2 และ cyclin A โดยทำให้เซลล์ตับเพิ่มจำนวนมากขึ้น จากเหตุผลข้างต้นเหล่านี้เป็นกลไกนำไปสู่การเกิดมะเร็งตับในเวลาต่อมา (8)



ภาพที่ 8 แสดงการกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S* ที่ทำให้เกิด ER stress นำไปสู่การเกิดมะเร็งตับ (8)

ในประเทศไทยจะพบผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S* ประมาณร้อยละ 9.5 โดยพบผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่มีการกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S* ประมาณร้อยละ 9.5 การศึกษาความชุกของการกลายพันธุ์ที่ยีน *pre-S* พบรูปแบบการกลายพันธุ์แบบ *pre-S2* deletion มากที่สุดประมาณร้อยละ 4.1 รองลงมาคือ *pre-S2* start codon mutation ประมาณร้อยละ 2.9 *pre-S2* deletion และ start codon mutation ร่วมกันประมาณร้อยละ 2 และ *pre-S1* deletion ประมาณร้อยละ 0.7 (1) CHULALONGKORN UNIVERSITY

การกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg

ในทางคลินิกนิยมแบ่งโรคตับอักเสบบีเรื้อรังจากการตรวจ HBeAg ในเลือดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆคือกลุ่มที่ตรวจพบ HBeAg (HBeAg-positive chronic hepatitis) โดยผู้ป่วยในกลุ่มนี้มักจะตรวจพบ HBV DNA ในเลือดสูงเพราะการตรวจพบ HBeAg เป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีการแบ่งตัวของเชื้อไวรัสเป็นจำนวนมาก และอีกกลุ่มหนึ่งคือกลุ่มที่ตรวจไม่พบ HBeAg (HBeAg-negative chronic hepatitis) ซึ่งอาจมีปริมาณ HBV DNA ในเลือดสูงหรือไม่ก็ได้ โดยสาเหตุที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสแต่ตรวจไม่พบ HBeAg เนื่องจากมีการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg ทำให้ไม่สามารถสร้างแอนติเจนชนิดนี้ได้ตามปกติ การกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นสองตำแหน่งคือ 1.) เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง basic core promoter (BCP) ซึ่งควบคุมขบวนการถอดรหัส

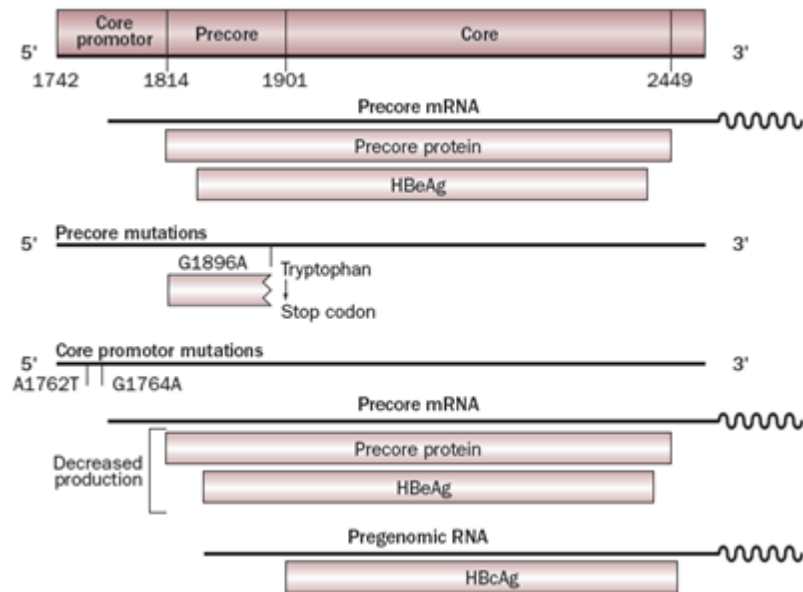
(transcription) ของดีเอ็นเอทำให้การสร้าง HBeAg ลดลงกว่าปกติ 2.) เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง precore ซึ่งควบคุมการแปลรหัส (translation) ในการสังเคราะห์โปรตีนทำให้ไม่สามารถสร้าง HBeAg ได้ (9)

#### การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง Basic core promoter (BCP)

Basic core promoter (BCP) อยู่ในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1742-1849 ซึ่งอยู่ในส่วนของ X ORF และซ้อนทับกับส่วน enhancer II โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยในส่วนนี้คือการเปลี่ยนเบสที่ 2 ตำแหน่งพร้อมกันคือตำแหน่งที่ 1762 เปลี่ยนจาก A เป็น T (A1762T) และตำแหน่งที่ 1764 เปลี่ยนจาก G เป็น A (G1764A) จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์แบบนี้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคตับอักเสบแบบเรื้อรังโดยเฉพาะการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ (12, 49, 50) กลไกการเกิดโรคตับที่รุนแรงมีหลายสมมติฐานได้แก่ 1.) การกลายพันธุ์แบบนี้อาจทำให้เชื้อไวรัสอาจมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเนื่องจากมีสัดส่วนของ pgRNA และ precore mRNA เพิ่มมากขึ้น (51) 2.) การกลายพันธุ์แบบนี้อาจทำให้การตอบสนองของ T lymphocytes ของระบบภูมิคุ้มกัน ลดลง (52) 3.) การกลายพันธุ์แบบนี้มีผลยับยั้งการทำงานของยีนต้านมะเร็งซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดมะเร็งตับ (53) เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ A1762T และ G1764A พบในเชื้อไวรัส genotype C มากกว่า genotype B ด้วยเหตุนี้การติดเชื้อไวรัส genotype C มีการดำเนินของโรคที่รุนแรงกว่า genotype B (54)

#### การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง precore

Precore gene อยู่บน C-ORF โดยตำแหน่งเริ่มต้นอยู่ที่นิวคลีโอไทด์ที่ 1814 การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยที่สุดในตำแหน่งนี้คือ การเปลี่ยนเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1896 จาก G เป็น A (G1896A) ทำให้การสร้างกรดอะมิโนเปลี่ยนจากทริปโตเฟนไปเป็น stop codon ทำให้ไม่มีการสร้าง precore protein ซึ่งเป็นโปรตีนเริ่มต้นของ HBeAg ได้ตามปกติ (55) นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งอื่นอีกได้แก่การเปลี่ยนเบสที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1898 จาก G เป็น A (G1898A) และ 1989 (G1989A) หรือการเปลี่ยนจาก C เป็น T ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1856 (C1856T) เปลี่ยนจาก A เป็น C ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 1814 (A1814C) ซึ่งเป็น start codon (7)



ภาพที่ 9 การกลายพันธุ์ของ *precore* gene และ Basic core promoter (BCP) (9)

### การตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันของไวรัสตับอักเสบ บี

การวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แบบเฉียบพลัน (acute hepatitis B infection) และแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis B infection) จำเป็นต้องอาศัยการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (serological or immunological assays) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสรวมกับการตรวจทางอณูไวรัสวิทยา (molecular virological assays) เช่น การตรวจปริมาณเชื้อไวรัสในเลือด (serum HBV DNA level) ดังนั้นความรู้ความเข้าใจทางไวรัสวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี จึงมีประโยชน์ในการแบ่งระยะของการดำเนินโรคและการพยากรณ์โรค รวมถึงการติดตามการรักษาต่อไป วิทยาภูมิคุ้มกันของไวรัสตับอักเสบ บี มีดังนี้

### Hepatitis B surface antigen (HBsAg)

HBsAg เป็นโปรตีนที่ผิวของเชื้อไวรัสสามารถตรวจพบได้ในเลือด โดยสามารถตรวจพบได้หลังมีการติดเชื้อแบบเฉียบพลันส่วนใหญ่มักตรวจพบประมาณ 6-10 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ การตรวจพบ HBsAg เป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังมีการติดเชื้อไวรัส ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อแบบเฉียบพลันถ้าตรวจพบ HBsAg น้อยกว่า 6 เดือนหรือเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรังถ้าตรวจพบ HBsAg มากกว่า 6 เดือน (56)

### Hepatitis B surface antibody (anti-HBs)

Anti-HBs เป็น neutralizing antibody ต่อ HBsAg และเป็น protective antibody ซึ่งแสดงถึงการมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัส

### Hepatitis B core antigen (HBcAg)

HBcAg หรือ core protein เป็นโปรตีนที่อยู่ส่วนกลางอนุภาคของไวรัสพบในเซลล์ตับที่มีการติดเชื้อและไม่สามารถตรวจพบได้ในเลือด

### Hepatitis B core antibody (anti-HBc)

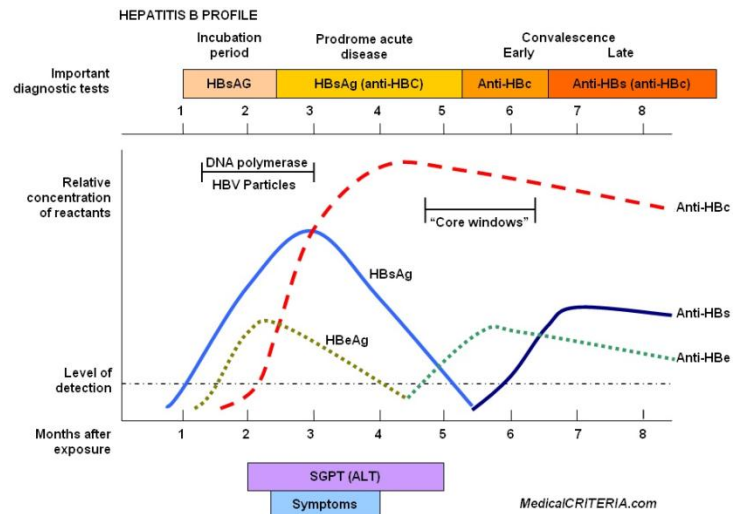
Anti-HBc เป็นแอนติบอดีที่มีประโยชน์ในการวินิจฉัยร่วมกับ HBsAg โดย anti-HBc IgM เป็นแอนติบอดีชนิดแรกที่ตรวจพบหลังมีการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (57) โดย anti-HBc IgM มีประโยชน์ในการวินิจฉัยการติดเชื้อแบบเฉียบพลันในระยะ window period ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับ HBsAg ลดต่ำลงจนตรวจไม่พบในเลือดและยังตรวจไม่พบ anti-HBs เช่นกัน และหลังจาก anti-HBc IgM ค่อยๆหายไปจะตรวจพบแอนติบอดีชนิด anti-HBc IgG ซึ่งจะคงอยู่ตลอดชีวิต (58)

### Hepatitis B e antigen (HBeAg) และ Hepatitis B e antibody (anti-HBe)

HBeAg เป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสในเลือดจำนวนมากและสามารถแพร่ไปสู่ผู้อื่นได้ (high infectivity) เมื่อมีการติดเชื้อแบบเฉียบพลันสามารถตรวจพบ HBeAg ได้ในระยะเวลาสั้นๆหลังจากนั้น HBeAg จะค่อยๆลดลงจนหายไปและตรวจพบ anti-HBe แทนที่ซึ่งเรียกว่า HBeAg seroconversion (59, 60)

### Serum HBV DNA หรือ viral load

การตรวจระดับ HBV DNA เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเลือด (active viral replication หรือ viremia) การตรวจ HBV DNA ในเลือดแบ่งเป็นการตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative assay) ให้ผลเป็นบวกหรือลบและการตรวจเชิงปริมาณ (quantitative assay) โดยเป็นการตรวจปริมาณไวรัสหรือตรวจระดับ HBV DNA ในเลือดซึ่งการตรวจด้วยวิธีนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยโรคและการติดตามการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (61)



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงทางวิทยาภูมิคุ้มกันหลังการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

<http://www.medicalcriteria.com/>

### วัคซีนป้องกันการไวรัสตับอักเสบบี

องค์การอนามัยโลก WHO เริ่มให้มีวัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1974 และในประเทศไทยเริ่มให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 โดยเริ่มใน 12 จังหวัดนำร่องได้แก่ อุดรธานี สระบุรี ราชบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ยโสธร นครสวรรค์ พิษณุโลก สุราษฎร์ธานี และสงขลา ต่อมาเดือนเมษายน พ.ศ. 2535 กระทรวงสาธารณสุขได้เริ่มให้วัคซีนป้องกันการไวรัสตับอักเสบบี กับทารกทุกคนโดยให้รวมเข้าไปใน EPI



### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Descriptive cross-sectional study) โครงการวิจัยจะได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

#### ประชากรศึกษา (Population study)

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา ใช้ซีรัมที่เหลือจากแผนงานวิจัย เรื่อง “ผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบ บี ในงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ หลังจากดำเนินการมา 20 ปี และความชุกของโรคตับอักเสบ เอ บี และซีในประเทศไทย” ซึ่งแผนงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว (หมายเลขโครงการ 419/56)

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพิ่มเติมจากซีรัมที่เหลือของแผนงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ซึ่งเก็บแบบนิรนาม โดยจะใช้ตัวอย่างที่อาสาสมัครได้ยินยอมและอนุญาตให้นำตัวอย่างมาศึกษาในการศึกษาใหม่ ซึ่งแผนงานวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นที่เรียบร้อยแล้ว (หมายเลขโครงการ 443/57) ผู้ที่เข้าร่วมโครงการเจาะเลือดในครั้งนั้นมีความยินยอมให้เก็บตัวอย่างซีรัมที่เหลือไว้เพื่อการวิจัยในอนาคตต่อไป ซึ่งผู้เข้าร่วมโครงการยินยอมเข้าโครงการศึกษาโดยสมัครใจและลงนามเป็นลายลักษณ์อักษร

### ขนาดของประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

#### ตัวอย่างเลือกรวมทั้ง 4 ภาคมีประมาณ 6,000 ตัวอย่าง

ขนาดตัวอย่าง คำนวณโดยใช้อัตราการเป็นพาหะของโรคตับอักเสบ บี ในกลุ่มอายุต่างๆเป็นเกณฑ์การคำนวณเพราะจะได้จำนวนตัวอย่างสูงสุด ดังแสดงในสูตรข้างล่างนี้ จำนวนตัวอย่างที่คำนวณได้เป็นจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาทั้งประเทศ แล้วนำมาคำนวณตัวอย่างในแต่ละจังหวัด แต่ละโรงพยาบาลต่อไป

จำนวนตัวอย่างคำนวณจากสมการ Cochran's samples size formula

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

โดยที่ n คือ จำนวนตัวอย่าง

Z คือ ระดับความเชื่อถือที่ 95 เปอร์เซนต์ ดังนั้นเท่ากับ 1.96

p คือ อัตราการเป็นพาหะของโรคตับอักเสบ บี ในแต่ละช่วงอายุ

q คือ 1-p

d คือ ค่าความคลาดเคลื่อน เท่ากับ 30%-60% ของอัตราการเป็นพาหะของโรคตับอักเสบ บี

ในแต่ละ กลุ่มอายุ

ตารางแสดงอัตราการเป็นพาหะตับอักเสบบี ค่าความคลาดเคลื่อนและจำนวนตัวอย่างจำแนกตามกลุ่มอายุ

กลุ่มอายุ (ปี)	อัตราการเป็นพาหะตับอักเสบบี (p:%)	ค่าความคลาดเคลื่อน (d:%)	จำนวนตัวอย่าง
1-10	0.5	0.3 (60% of p)	2124
11-20	1	0.6 (60% of p)	1057
21-30	3	1.35 (45% of p)	614
31-40	6.0	1.8 (30% of p)	669
41-50	6.0	1.8 (30% of p)	669
51-60	6.0	1.8 (30% of p)	669
รวม	-	-	5802

ขนาดตัวอย่างรายจังหวัด คำนวณโดยการนำจำนวนตัวอย่างรวมในแต่ละกลุ่มอายุมาแบ่งเป็น 4 ภาค โดยทำการแบ่งโดยไม่มีการถ่วงน้ำหนักด้วยจำนวนประชากรรวมในแต่ละภาค ใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\text{ขนาดตัวอย่างรายจังหวัด} = \frac{\text{ตัวอย่างรวมในแต่ละกลุ่มอายุ}}{4}$$

$$= 5,802/4 = 1,450.5 \text{ หรือประมาณ } 1,500 \text{ รายต่อภาค}$$

$$\text{ดังนั้นจำนวนประชากรรวมทั้ง 4 ภาค} = 1,500 \times 4 = 6,000 \text{ ตัวอย่าง}$$

ขณะนี้ได้ทำการตรวจสอบตัวอย่างเลือดบางส่วนด้วยวิธี ELISA ไปแล้วประมาณ 5,500 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างเลือดที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg เท่ากับ 147 ตัวอย่าง ดังนั้นถ้าตัวอย่างเลือดทั้งหมดมีประมาณ 6,000 ตัวอย่าง จะให้ผลบวกต่อ HBsAg ประมาณ 160 ตัวอย่างหรือประมาณร้อยละ 2.7

แต่ในการศึกษาครั้งนี้ต้องใช้ตัวอย่างเลือดที่ HBV-DNA ให้ผลบวก หรือ PCR positive ด้วยการศึกษาก่อนหน้านี้ในปี พ.ศ. 2547 HBV-DNA ให้ผลบวกเท่ากับร้อยละ 73 (1) เพราะฉะนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างเลือดที่ HBV-DNA ให้ผลบวกประมาณ 110 ตัวอย่าง (ร้อยละ 73 ของ 160 ตัวอย่าง)

ในงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างในการทำการวิจัยทั้งหมด 5,964 ตัวอย่างมาทำการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Enzyme link-immunosorbent assay (ELISA)

### เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

#### 1. เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

- 1.1 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.2 Flask: 250 ml (Pyrex, USA)
- 1.3 Cylinder: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.4 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, USA)
- 1.5 Cuvett: 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l (MiralBio, Japan)
- 1.6 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml (Axygen, USA)

- 1.7 Pipette tip: 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1,000  $\mu$ l (Axygen, USA)
- 1.8 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- 1.9 Parafilm (American Nation Can, USA)
- 1.10 Stirring-magnetic bar
- 1.11 foil film
- 1.12 Pipette rack (Eppendorf, Germany)

## 2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

- 2.1 Water Purification equipment (Water pro PS, USA)
- 2.2 Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2  $\mu$ l), P10 (0.5-10  $\mu$ l), P20 (5-20  $\mu$ l), P100 (20-100  $\mu$ l) และ P1000 (100-1,000  $\mu$ l) (Eppendorf, Germany)
- 2.3 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- 2.5 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 2.6 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)
- 2.7 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.8 Freezer -20 °C (Sanyo, Japan)
- 2.9 Freezer -70 °C (Forma Scientific, USA)
- 2.10 Refrigerator 4 °C (Mitsubishi, Japan)
- 2.12 Microcentrifuge 0.2 ml (Sprout, USA)
- 2.13 Microcentrifuge 1.5 ml (Eppendorf, Germany)
- 2.14 Incubator (Mettler, Germany)
- 2.15 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.16 PCR Mastercycle personal (Eppendorf, Germany)

- 2.17 Microwave oven (Sharp, Japan)
- 2.18 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.19 Refrigerate microcentrifuge (Eppendorf, Germany)
- 2.20 pH meter (Mettler Toledo, Switzerland)
- 2.21 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.22 UV transilluminator (Fotodyne, USA)
- 2.23 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.24 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)
- 2.25 Thermal paper (Bio-RAD, USA)

### 3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1 สารเคมีสำหรับการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในบริเวณยีนที่จำเพาะด้วยวิธี PCR
  - 3.1.1 5 Prime Perfect TaqPlus Master Mix kit (5 prime GmbH, Germany)
- 3.2 สารเคมีสำหรับการตรวจสอบผลการทำ PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis
  - 3.2.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)
  - 3.2.2 Tris base Biotechnology Grade (USB, Hongkong)
  - 3.2.3 EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
  - 3.2.4 Boric acid (USB, Hongkong)
  - 3.2.5 GeneRuler 100 base pair DNA ladder (Fermentas, MD, USA)
  - 3.2.6 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
- 3.3 วัสดุและสารเคมีสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์
  - 3.3.1 Agarose Gel Extract mini kit (5 prime GmbH, Germany)
- 3.4 สารเคมีการทำ DNA cloning และ Transformation ใน E.Coli
  - 3.4.1 Agar Bacteriological (GIBCO, NY, USA)

- 3.4.2 pGEM®-T Easy Vector System (Promega, CA, USA)
- 3.4.3 IPTG (isopropylthio- $\beta$ -galactoside) (Eppendorf, Germany)
- 3.4.4 One Shot TOP10 Chemically Competent E.Coli (Invitrogen, NY,USA)
- 3.4.5 X-Gal (Promega, CA, USA)
- 3.4.6 Tryptone powder (BIO BASIC INC., NY, USA)
- 3.4.7 Yeast Extract (GIBCO, NY, USA)
- 3.4.8 FastPlasmid Mini (Eppendorf, Germany)

#### 4. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทาง Bioinformatic

- 4.1 BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9.1)
- 4.2 Chromas Lite (version 2.0.0)
- 4.3 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 6.05)
- 4.4 SeqMan TM II (version 6.0)
- 4.5 Sequin (version 13.7)

## วิธีการดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้นำ ตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg มาสกัด DNA จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) ต่อไป

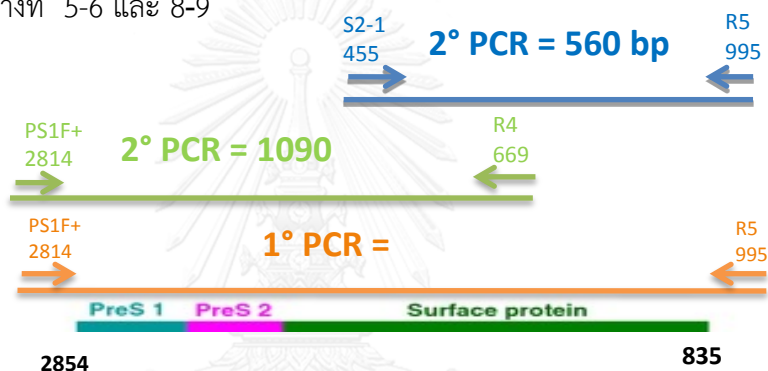
### 1. การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัส ( DNA extraction)

การสกัด DNA จากซีรัม โดยใช้เทคนิค phenol-chloroform-isoamyl alcohol extraction มีขั้นตอนดังนี้

- 1.1. ใช้ซีรัมปริมาตร 100  $\mu$ l เติม lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS) ปริมาตร 400  $\mu$ l และเติม proteinase K (20 mg/ml) ปริมาตร 10  $\mu$ l นำไป vortex 15 วินาที จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 1.2. เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 250  $\mu$ l และ chloroform :isoamyl alcohol (49:1) ปริมาตร 250  $\mu$ l จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 40 นาที
- 1.3. จากนั้นเตรียม microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่โดยเติม glycogen ปริมาตร 4  $\mu$ l absolute ethanol ปริมาตร 800  $\mu$ l และ 2 M NaOAc ปริมาณ
- 1.4 40  $\mu$ l จากนั้นดูดสารละลายส่วนที่ได้จากขั้นที่ 2 ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อันใหม่ แล้วผสมให้เข้ากันโดยการ inverse ด้วยมือเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 1.5 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำส่วนตะกอนที่เหลือมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 นาที
- 1.6 ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนสีขาวก้น microcentrifuge tube เท่านั้น จากนั้นนำไปอบแห้งโดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที
- 1.7 นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (sterile distilled water) ปริมาตร 30  $\mu$ l จากนั้นเก็บสารละลาย DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 °C

## 2. การตรวจหาและจำแนกกลุ่มของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี semi-nested PCR

นำ DNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี semi-nested Polymerase Chain Reaction (semi-nested PCR) ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ครอบคลุมในส่วนของยีน *pre-S1* *pre-S2* และ *S* ขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 1 คือ 1416 bp และขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 2 คือ 1090 bp และ 560 bp โดยจะใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 4 ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 และใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 7 ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 (62) จากนั้นนำผลผลิตจากการทำ PCR มาเข้ากระบวนการหาลำดับเบส (sequencing) เพื่อจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ต่อไป สำหรับรายละเอียดของปริมาณสารต่างๆ และสถานะสำหรับการทำ PCR มีรายละเอียดดังตารางที่ 5-6 และ 8-9



ภาพที่ 11 จีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR

การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี semi-nested PCR ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp)
HBV-PS1F+_F	Forward	GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA C	1416
HBV-SR5 _R	Reverse	GAA TTG TGG GTC TTT TGG GCT	



ตารางที่ 5 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant (1 Reaction)

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.75
Eppendorf MasterMix (5PRIME)	6.25
PS1F+ Forward primer (10 μM)	0.25
R5 Reverse primer (10 μM)	0.25
DNA template	0.5
Total volume	13

ตารางที่ 6 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 1 ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา รอบ	จำนวน
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40
Annealing	50	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Extension	72	5 นาที	1
Final extension	25	10 นาที	1

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp)
HBV-PS1F+_F	Forward	GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA C	1090
HBV-SR4_R	Reverse	GGC TCA GTT TAC TAG TGC CAT	
HBV-S2-1_F	Forward	CAA GGT ATG TTG CCC GTT TG	560
HBV-SR5_R	Reverse	GAA TTG TGG GTC TTT TGG GCT	

**ตารางที่ 8** สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ของยีน *pre- S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant (1 Reaction)

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5.75
Eppendorf MasterMix (5PRIME)	6.25
PS1F+ Forward primer (10 μM)	0.25
R4 Reverse primer (10 μM)	0.25
DNA template	0.5
Total volume	13

**หมายเหตุ** สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ของผลผลิตขนาด 1,090 bp และ 560 bp

**ตารางที่ 9** สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 2 ของยีน *pre- S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา รอบ	จำนวน
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40
Annealing	55	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Extension	72	5 นาที	1
Final extension	25	10 นาที	1

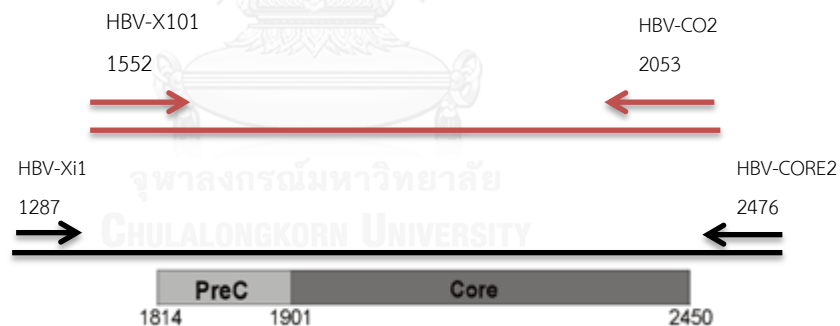
**หมายเหตุ** สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 2 ของผลผลิตขนาด 1,090 bp และ 560 bp

ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR โดยการนำผลผลิตผสมกับ loading dry แล้วใส่ลงในหลุมของ 2% agarose gel electrophoresis จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที และใช้ marker 100 bp เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ นำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลาย ethidium

bromide ประมาณ 30 นาที และนำมาฉายรังสีที่ เครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transilluminator) ขนาดของผลผลิตคือ 1,090 bp และ 560 bp

### 3. การตรวจหาการกลายพันธุ์ในส่วนของ Basic core promoter (BCP) และ precore (PC) gene ด้วยวิธี nested PCR

นำ DNA ที่ได้ไปเพิ่มจำนวนด้วยวิธี nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) ซึ่งเป็นการทำ PCR 2 รอบ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณ Basic core promoter (BCP) ถึงบริเวณยีน precore (PC) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ครอบคลุมบริเวณ Basic core promoter (BCP) และยีน precore (PC) ขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 1 คือ 1189 bp และขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 2 คือ 501 bp โดยจะใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 10 ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 และใช้ไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 13 ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 (62) จากนั้นนำผลผลิตจากการทำ PCR มาเข้ากระบวนการหาลำดับเบส (sequencing) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่บริเวณ BCP และ PC ของไวรัสตับอักเสบบี ต่อไป สำหรับรายละเอียดของปริมาณสารต่างๆ และสภาวะสำหรับการทำ PCR มีรายละเอียดดังตารางที่ 11-12 และ 14-15



ภาพที่ 12 จีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่แสดงบริเวณของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR

การเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี nested PCR ที่บริเวณ Basic core promoter (BCP) ถึงยีน precore (PC)

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp)
HBV-Xi1	Forward	AGC TTG TTT TGC TCG CAG C	1189
HBV-CORE2	Reverse	CCC ACC TTA TGA GTC CAA GG	

ตารางที่ 11 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 1 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC (1 Reaction)

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3
Eppendorf MasterMix (5PRIME)	6.25
HBV-Xi1 Forward primer (10 μM)	0.25
HBV-CORE2 Reverse primer (10 μM)	0.25
MgCl <sub>2</sub>	0.25
DNA template	3
Total volume	13

ตารางที่ 12 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 1 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา รอบ	จำนวน
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40
Annealing	50	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Extension	72	5 นาที	1
Final extension	25	10 นาที	1

ตารางที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC

ชื่อไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด ผลิตภัณฑ์ (bp)
HBV-X101	Forward	TCT GTG CCT TCT CAT CTG	501
HBV- CO2	Reverse	GTG AGG TGA ACA ATG TTC CG	

ตารางที่ 14 สารที่ใช้ในการทำ PCR ครั้งที่ 2 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC (1 Reaction)

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	3
Eppendorf MasterMix (5PRIME)	6.25
HBV-Xi1 Forward primer (10 μM)	0.25
HBV-CORE2 Reverse primer (10 μM)	0.25
MgCl <sub>2</sub>	0.25
DNA template	2
Total volume	12

ตารางที่ 15 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ PCR ครั้งที่ 2 ที่บริเวณ BCP ถึงยีน PC

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา รอบ	จำนวน
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40
Annealing	55	45 วินาที	
Extension	72	1 นาที 30 วินาที	
Extension	72	5 นาที	1
Final extension	25	10 นาที	1

ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR โดยการนำผลผลิตผสมกับ loading dry แล้วใส่ลงในหลุมของ 2% agarose gel electrophoresis จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที และใช้ marker 100 bp เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ นำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 30 นาที และนำมาฉายรังสีที่ เครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV-Transilluminator) ขนาดของผลผลิตคือ 501 bp

#### 4. การสกัดแยกผลผลิตจากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์

หลังจากทำการตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR ที่ได้โดยส่องผ่านแสง UV และตัดแถบ เจลในบริเวณที่มีดีเอ็นเอที่เราสนใจอยู่จากแผ่น gel electrophoresis โดยที่ยีน *preS/S* คือบริเวณที่มีลำดับ 1,090 และ 560 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตของ PCR ครั้งที่ 2 และที่ยีน BCP/PC ที่มีลำดับ 501 นิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นขนาดผลผลิตของ PCR ครั้งที่ 2 จากนั้นทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดยชุด GeneAll Gel/PCR DNA fragment extraction kit โดยมีขั้นตอนดังนี้

- 1.1. เติมสารละลาย GB buffer 500 ul ลงใน microcentrifuge tube ที่มี gel อยู่ จากนั้น incubate ที่ 50°C จนกว่า gel จะละลาย
- 1.2. เมื่อ gel ละลายจึงดูดสารละลายทั้งหมดลงใน column filter แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 1.3. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม NW buffer (wash buffer) 700 ul แล้ว centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที
- 1.4. เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้น centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- 1.5. เปลี่ยน column filter ใส่ microcentrifuge tube จากนั้นเติม EB buffer (elution buffer) ประมาณ 40 ul แล้วทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
- 1.6. centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์แล้วตกลงไปใน microcentrifuge tube จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์

## 5. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยส่งไปที่บริษัท First Base laboratories ประเทศมาเลเซีย ที่ยีน *preS/S* โดยใช้ไพรเมอร์ HBV-PS1F+\_F และ HBV-SR4 \_R กับ PCR product ขนาด 1,090 bp ใช้ไพรเมอร์ HBV-S2-1 \_F กับ PCR product ขนาด 560 bp เป็น sequencing primer และที่ยีน BCP/PC ใช้ไพรเมอร์ HBV-X101\_F กับ PCR product ขนาด 501 bp เป็น sequencing primer แล้วจึงอ่านผลที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อทำการตรวจสอบและแก้ไขผลที่ได้ต่อไป

## 6. แยกเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกัน โดยอาศัยการ cloning

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าการซ้อนทับกันของ chromatogram ซึ่งอาจเกิดจากการมีเชื้อสองชนิดอยู่ในตัวอย่างเดียวกัน จึงต้องทำการแยกเชื้อทั้งสองชนิดออกจากกัน โดยการ clone ทำโดยนำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์โดยตัดเฉพาะส่วนที่มี DNA ที่ต้องการที่มาจาก gel electrophoresis และทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดยชุด GeneAll Gel/PCR DNA fragment extraction kit แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิต 5  $\mu$ l ตรวจสอบด้วย gel electrophoresis อีกครั้งเพื่อยืนยันว่าเป็นชิ้น DNA ที่เราต้องการและไม่มี DNA ชนิดอื่นๆเจือปน นำผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับ vector โดยใช้ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega)

**ตารางที่ 16** สารที่ใช้ในการเชื่อม (ligation) ผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I (Promega)

สารที่ใช้	ปริมาตร ( $\mu$ l)
2x buffer	5
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector	1
Insert (ผลิตภัณฑ์จากการสกัดเจลของยีน <i>pre-s/s</i> )	3
T4 DNA ligase	1
<b>Total volume</b>	<b>10</b>

จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 22°C เป็นเวลา 30 นาที และบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน

### การเพิ่มจำนวนพลาสมิดโดยอาศัยเทคนิค Transformation

1. เตรียม competent cells (*E.coli* strain DH5- $\alpha$ ) ปริมาตร 50  $\mu$ l และสารละลาย ligation ปริมาตร 5  $\mu$ l
2. แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที
3. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 50 วินาที
4. แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที
5. เติม SOC medium ที่มี 2M Mg<sup>2+</sup> และ 2M Glucose ปริมาตร 950  $\mu$ l
6. หลังจากนั้นนำมาเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ด้วยความเร็ว 200 rpm ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที
7. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
8. เทส่วนใสทิ้งให้เหลือปริมาตรประมาณ 50  $\mu$ l
9. จากนั้นเติม 5  $\mu$ l IPTG และ 15  $\mu$ l X-gal แล้ว Spread ลงใน LB agar plate ที่มี Ampicillin
10. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
11. นำโคโลนี *E. coli* ที่มีสีขาวที่ตรวจสอบด้วยการทำโคโลนี PCR แล้วมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2  $\mu$ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

### การเลือก Colony

สังเกตดูโคโลนีที่ขึ้นมาบน Agar plate โดยจะเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR ซึ่งมีรายละเอียดของไพรเมอร์ ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ดังแสดงในตารางที่ 17 เพื่อจำแนกโคโลนีที่มี vector ตามเงื่อนไขต่างๆ ดังนี้

- Blue colony มี empty vector ซึ่งไม่มี inserted DNA จะได้ PCR product ขนาด 250 bp
- White colony มี Recombinant vector ซึ่งมี inserted DNA จะได้ PCR product ขนาด 1,140 bp

โดยจะเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin , 200 mg/ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง



### การทำโคลน PCR

การทำโคลน PCR เพื่อตรวจสอบว่าโคลนสีขาวที่เราเลือกมีชิ้นยีน *pre-s/s* อยู่หรือไม่ โดยสารที่ใช้ในการทำ PCR และสภาวะที่ใช้แสดงดังตารางที่ 18 และ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เท่ากับขนาดของ primer คือ 250 bp บวกกับขนาดยีนของเราคือ 1090 bp ขนาดของยีน ทั้งหมดจึงเท่ากับ 1140 bp

ตารางที่ 17 สารที่ใช้ในการทำโคลน PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร ( $\mu$ l)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	6
Eppendorf MasterMix (5PRIME)	5
M13F Forward primer (10 $\mu$ M)	0.5
M13R Reverse primer (10 $\mu$ M)	0.5
โคลนที่เราเลือก	
<b>Total volume</b>	<b>~13</b>

ตารางที่ 18 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำโคลน PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ( $^{\circ}$ C)	เวลา รอบ	จำนวน
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	} 40
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	2 นาที	
Extension	72	10 นาที	1

### การสกัดพลาสมิด

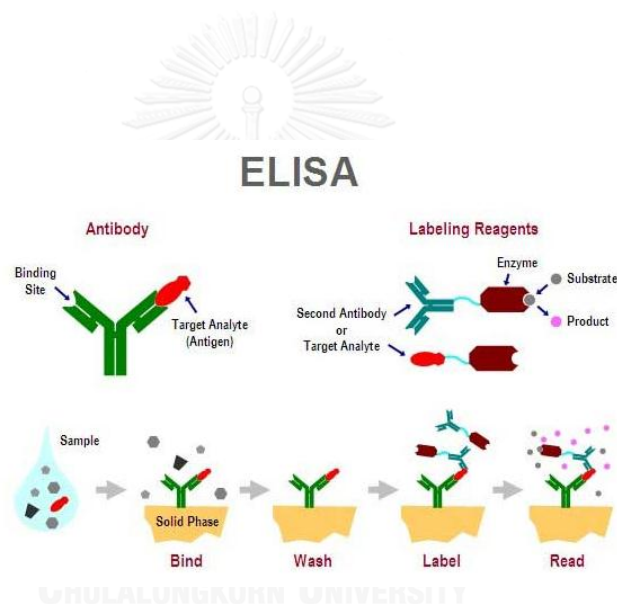
1. ชุดสกัดพลาสมิดที่ใช้คือ FastPlasmid Mini Kit
2. นำโคลิ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 2 ml ที่มี Ampicillin ปริมาตร 2  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงมาถ่ายลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
3. นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งสารละลายส่วนใสออก
4. เติม ICE-COLD Complete Lysis Solution ปริมาตร 400  $\mu$ l และนำมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex 30 วินาที
5. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที
6. จากนั้นถ่ายสารทั้งหมดใส่ spin column
7. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 30 วินาที
8. เติม Diluted Wash buffer ปริมาตร 400  $\mu$ l
9. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 30 วินาที
10. ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน Collection tube แล้วใส่ spin column กลับเข้าไปใน Collection tube อีกครั้ง
11. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 60 วินาที
12. จากนั้นใส่ spin column ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
13. เติม Elution buffer ปริมาตร 50  $\mu$ l
14. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 60 วินาทีและเก็บพลาสมิดที่อุณหภูมิ -20°C

จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยส่งไปที่บริษัท First Base laboratories ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter มี PCR product ขนาด 1100 bp

## 7. การตรวจสอบ HBeAg

ในการตรวจสอบ HBeAg โดยเป็นการตรวจหาเชิงคุณภาพใช้วิธี commercial enzyme immunoassay kits (Dia. Pro Diagnostic BioProbes, Milan, Italy) โดยมีวิธีการดังนี้

1. HBeAg ที่มีอยู่ใน sample จะจับกับ specific monoclonal antibody จากนั้นป่มปฏิกิริยา
2. แล้วล้าง antibody ที่ไม่จับด้วย wash buffer จากนั้นเติม specific anti HBeAg monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วย enzyme peroxidase (HRP) ด้วย แล้วป่มปฏิกิริยา
3. จากนั้นเติม chromogen/substrate แล้วป่มปฏิกิริยา
4. ตัวอย่างที่มี HBeAg จะปรากฏสีที่เปลี่ยนไปจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง enzyme และ substrate



ภาพที่ 13 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาของชุด ELISA kits

([http://www.epitomics.com/products/product\\_info/1257](http://www.epitomics.com/products/product_info/1257))

โดยมีค่า cut off ของ HBeAg:

$$\text{Negative control} + 0.100 = \text{Cut-off (Co)}$$

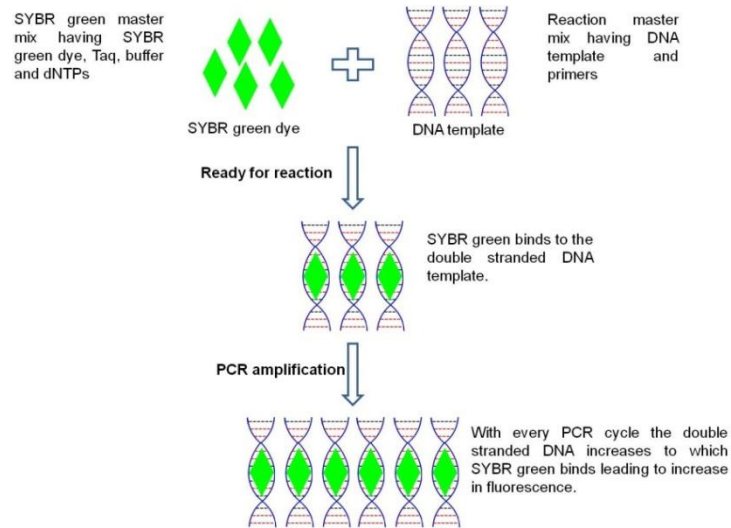
การ interpret ผล

S/Co	Interpretation
<0.9	Negative
0.9-1.1	Equivocal
>1.1	Positive

#### 8. การตรวจปริมาณไวรัสในเลือด (quantification of serum HBV DNA หรือ viral load)

การตรวจวัดปริมาณไวรัสในเลือดโดยวิธี real-time PCR ซึ่งเป็นการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ทุกช่วงของปฏิกิริยา PCR โดยปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มเป็นสัดส่วนสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ปล่อยออกมาจากสารเรืองแสงเช่น SYBR Green I

SYBR Green เป็นสารเรืองแสงที่สามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่ได้ โดยในขั้นตอนของการคลายเกลียวของดีเอ็นเอสาย คู่ให้เปนสายเดี่ยวนั้น SYBR Green I จะยังไม่สามารถ จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นได้ เมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ SYBR Green I จะแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ และเมื่อถูกกระตุ้น ด้วยแสง UV แล้ว SYBR Green I จะคายพลังงานออกมาในรูปของแสง fluorescence โดยการเรืองแสงที่เพิ่มขึ้นนี้จะบ่งบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆทำโดยใช้คอมพิวเตอร์ทั้งหมด ปริมาณแสงที่เปล่งออกมาจะสัมพันธ์กับปริมาณตั้งต้นของ target template แต่ปัญหาของการใช้ SYBR Green I คือสามารถจับกับดีเอ็นเอสายคู่อื่น ๆ ที่ไม่ใช่เป้าหมายที่ต้องการได้



ภาพที่ 14 แสดงการทำปฏิกิริยาระหว่าง SYBR Green I dye และ target template

(<http://galleryhip.com/qrt-pcr-sybr-green.html>)

### 8.1 การคำนวณ stock ความเข้มข้น plasmid

นำ stock plasmid มาวัดความเข้มข้น (ng/ $\mu$ L) ด้วย spectrometer แล้วคำนวณ copy number ตามสูตรคำนวณดังนี้

$$N = \frac{g \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{M.W.}$$

$$M.W. = (\text{plasmid length (3,015bp)} + \text{pcr product size (6,676bp)}) \times 660$$

### 8.2 เจือจางความเข้มข้น plasmid ให้มีความเข้มข้นเป็น $10^{10}$ copies/ $\mu$ L ปริมาตร 20 $\mu$ L

โดยใช้สูตรดังนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$C_1$  คือ ความเข้มข้นของ plasmid ที่ยังไม่ได้เจือจาง

$V_1$  คือ ปริมาตรของของ plasmid ที่ยังไม่ได้เจือจาง

$C_2$  คือ ความเข้มข้นของ plasmid ภายหลังจากการเจือจาง

$V_2$  คือ ปริมาตรของของ plasmid ภายหลังจากการเจือจาง

เมื่อได้จำนวน copy number แล้วจะทำ 10-fold serial dilution เพื่อให้ได้ copy number ต่างๆ ได้แก่  $10^9$ ,  $10^8$ , .....,  $10^2$  จากนั้นนำมาเป็น template ในการหา standard curve โดยรายละเอียดของโปรแกรมแสดงในตารางที่ 19 ปริมาณสาร รวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการทำ PCR ได้แสดงในตารางที่ 20-21 (63)

ตารางที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ real-time PCR

	ชนิด	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
HBV_S_F350	Forward	TCC TCC AAY TTG TCC TGG TYA TC
HBV_S_R432	Reverse	AGA TGA GGC ATA GCA GCA GGA T

ตารางที่ 20 สารที่ใช้ในการทำ real-time PCR (1 Reaction)

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	5
Eppendorf MasterMix (5PRIME)	5
F350 Forward primer (25 μM)	0.5
R432 Reverse primer (25 μM)	0.5
10X SYBR Green	0.2
DNA template	1
Total volume	12.7

ตารางที่ 21 สภาวะของปฏิกิริยาที่ใช้ทำ real-time PCR

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ(°C)	เวลา	จำนวนรอบ
1	95	180 วินาที	} 50 รอบ
2	95	15 วินาที	
	55	20 วินาที	
	72	30 วินาที	
	74	30 วินาที	
3	67	45 วินาที	
	95	20 วินาที	

## 9. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยใช้โปรแกรม

- Chromas Lite (version 2.0.0) เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์ (chromatogram)
- BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9.1) ใช้สำหรับการจัดเรียง (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิจัยนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม (GenBank database) ใช้เพื่อ edited ลำดับนิวคลีโอไทด์
- Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) (version 5.05) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาทางวิวัฒนาการ
- SeqMan เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากหลาย segment เข้าด้วยกัน

## 10. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของยีน *pre-S/S* และ BCP/PC มาเปรียบเทียบเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree analysis) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป อาทิเช่น Clustal X, BioEdit และ BLAST เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนมีดังนี้

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- ทำการจำแนก สายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี แต่ละสายพันธุ์ที่อยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST
- ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธี Clustal analysis ด้วยโปรแกรม Clustal X และ BioEdit เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ศึกษามากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี แต่ละสายพันธุ์ที่อยู่ใน GenBank

- ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA5 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบีแต่ละสายพันธุ์ที่อยู่ใน GenBank
- $p$ -value <0.05 แสดงข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### 11. เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ program Sequin version 13.7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin>) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>





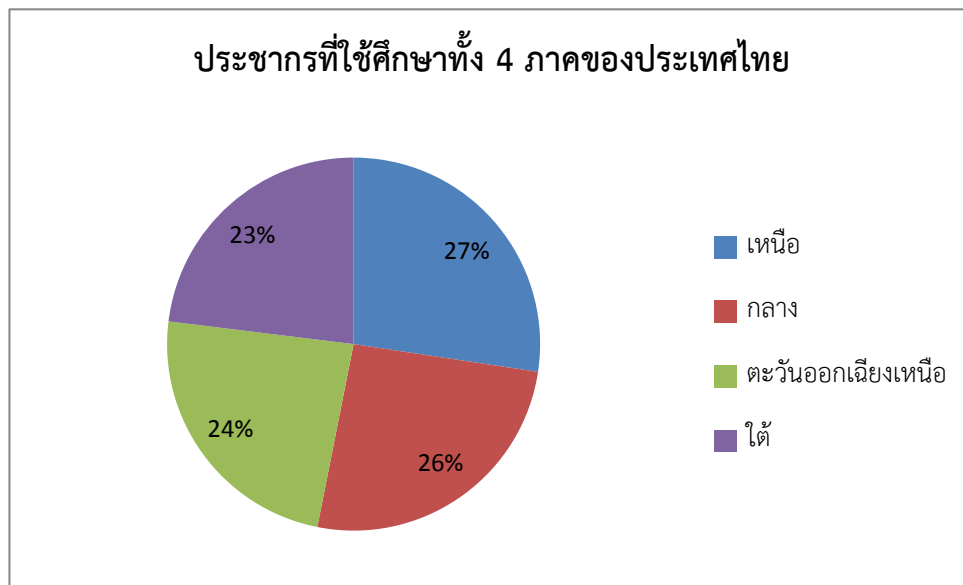
## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 1. ประชากรตัวอย่าง (Sample Size)

ประชากรที่ใช้ในการศึกษา ใช้ซีรัมที่เหลือแล้วจากแผนงานวิจัย เรื่อง “ผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบ บี ในงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ หลังจากดำเนินการมา 20 ปี และความชุกของโรคตับอักเสบ เอ บี และซีในประเทศไทย” โดยเก็บตัวอย่างจากประชากรชาวไทย อายุระหว่าง 1-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ตัวอย่างซีรัมที่ใช้เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดต่างดังนี้ ภาคเหนือเก็บจากจังหวัด พิจิตร โลกและอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บจากจังหวัด ขอนแก่น ภาคกลางเก็บจากจังหวัด พระนครศรีอยุธยาและลพบุรี และภาคใต้เก็บจากจังหวัด ตรังและนราธิวาส ได้ตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 5,964 ตัวอย่าง และนำตัวอย่างซีรัมทั้งหมดมาตรวจหา Hepatitis B surface antigen (HBsAg) ด้วยวิธี ELISA และนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg มาทำการศึกษาต่อ ตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 22 และแสดงตัวอย่างประชากรที่ใช้ศึกษาทั้ง 4 ภาคของประเทศไทยโดยทุกภาคมีจำนวนตัวอย่างใกล้เคียงกันประมาณ 1,500 ตัวอย่าง ดังรูปที่ 15

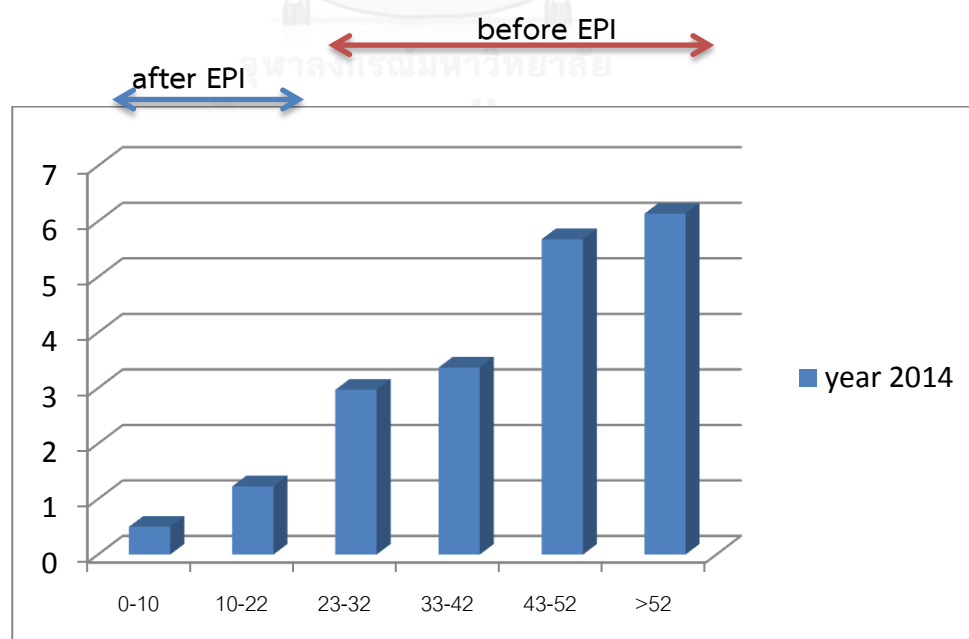
ตารางที่ 22 แสดงประชากรที่ใช้ในการศึกษา

ภาค	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg
เหนือ	1,633 (27.4%)	36 (27.3%)
กลาง	1,535 (25.7%)	38 (28.8%)
ตะวันออกเฉียงเหนือ	1,421 (23.8%)	39 (29.5%)
ใต้	1,375 (23.1%)	19 (14.4%)
รวม	5,964	132 (2.2%)



ภาพที่ 15 แสดงตัวอย่างประชากรที่ใช้ศึกษาทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย

จากตาราง จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้มีจำนวน 132 ตัวอย่างโดยเมื่อแบ่งเป็นช่วงอายุ 0-10 ปี, อายุ 10-22 ปี, อายุ 23-32 ปี, อายุ 33-42 ปี, อายุ 43-52 ปี, อายุมากกว่า 52 ปีแสดงดังรูปที่ 16 แต่ละตัวอย่างแสดง Code โดยทำการระบุ รหัสจังหวัด ตามด้วย รหัสตัวอย่าง ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก

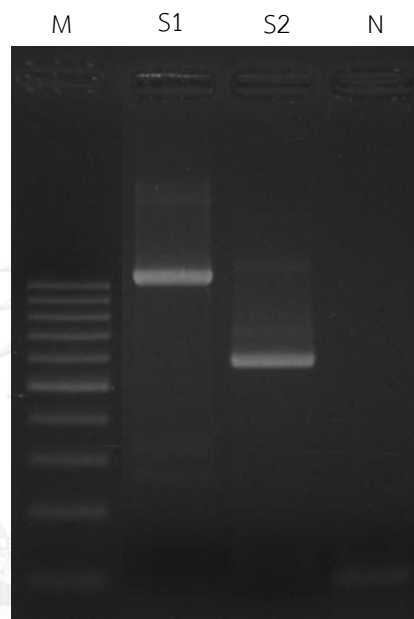


ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg แบ่งเป็นช่วงอายุตาม EPI

## 2. ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

### 2.1 ผลการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant

จากการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี semi-nested PCR ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่จะครอบคลุมในส่วนของยีน *pre-S1* *pre-S2* และ *S* ขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 1 คือ 1,416 bp และขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 2 คือ 1,090 bp และ 560 bp ตามรูปที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงผลการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี semi-nested PCR ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant ด้วยไพรเมอร์ HBV-PS1F+ \_F และ HBV-SR4 \_R ได้ผลผลิตขนาด 1,090 bp HBV-S2-1 \_F และ HBV-SR5 \_R ได้ผลผลิตขนาด 560 bp โดย M คือ 100 bp marker S1 คือ ตัวอย่างที่มี ผลผลิตขนาด 1,090 bp S2 คือตัวอย่างที่มี ผลผลิตขนาด 560 bp และ N คือ negative control

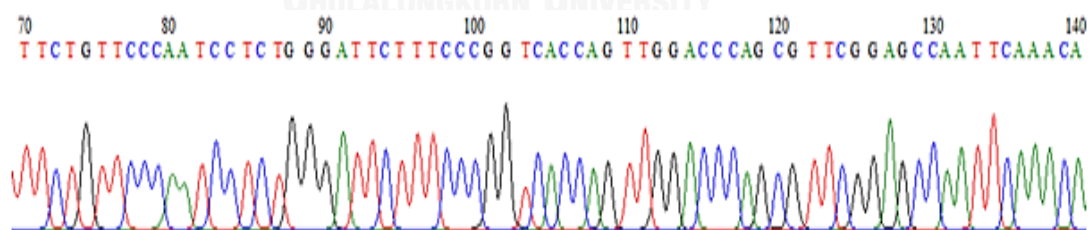
จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในซีรัมทั้งหมดด้วยวิธี PCR พบซีรัมที่ให้บวกต่อวิธี PCR 119 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 90.1

ตารางที่ 23 แสดงประชากรที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างที่ใช้	ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ	คิดเป็นร้อยละ
	ศึกษา	PCR	
พิษณุโลก	19	16	84.21
อุตรดิตถ์	17	14	82.35
ขอนแก่น	39	39	100
พระนครศรีอยุธยา	18	14	77.78
ลพบุรี	20	20	100
ตรัง	10	7	70.00
นราธิวาส	9	9	100
<b>รวม</b>	<b>132</b>	<b>119</b>	<b>90.15</b>

## 2.2 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของ *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> พบว่ามีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ทุกตัวอย่างและมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของ surface antigen gene



ภาพที่ 18 ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์

Hepatitis B virus isolate migrant 746 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete cds  
 Sequence ID: [gb|GQ855464.1](#) Length: 1203 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1057 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1875 bits(1015)	0.0	1044/1058(99%)	1/1058(0%)	Plus/Plus
Query 27	ATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAACCTTTCTGTTCCCAAT			86
Sbjct 1	ATGGGAGGTTGGTCTTCCAAACCTCGACAAGGCATGGGGACGAACCTTTCTGTTCCCAAT			60
Query 87	CCTCTGGGATCTTTCCCGGTCAACAGTTGGACCCGGCATTGGAGCCAATTCAAACAAT			146
Sbjct 61	CCTCTGGGATCTTTCCCGGTCAACAGTTGGACCCAGCATTGGAGCCAATTCAAACAAT			120
Query 147	CCAGATTGGGACTTCAACCCCAACAAGGATCAATGGCCAGCAGCAAAACAGGTAGGGAGTG			206
Sbjct 121	CCAGATTGGGACTTCAACCCCAACAAGGATCAATGGCCAGCAGCAAAACAGGTAGGGAGTG			180
Query 207	GGGTCATTTGGACCCGGGATCACTCCACACACAGCGGCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAG			266
Sbjct 181	GGATCATTGGGGCAGGGTCACTCCACACACAGCGGCTTTTGGGGTGGAGCCCTCAG			240
Query 267	GCTCAGGGCATATTGACAACAGTCCAGCAGCGCTCTCTCTGCTCCACCAATCGGCAG			326
Sbjct 241	GCTCAGGGCATATTGACAACAGTCCAGCAGCGCTCTCTCTGCTCCACCAATCGGCAG			300
Query 327	ACAGGAAGACAGCCTACTCCCATCTCTCCACTTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATG			386
Sbjct 301	TCAGGAAGACAGCCTACTCCCATCTCTCCACTTAAGAGACAGTCATCCTCAGGCCATG			360
Query 387	CAGTGGAACTCCAGCACATTCACCAAGCTCTGTAGATCCAGAGTGAGGGGCTATAC			446
Sbjct 361	CAGTGGAACTCCAGCACATTCACCAAGCTCTGTAGATCCAGAGTGAGGGGCTATAC			420
Query 447	TTTCCTGCTGGTGGCTCAAGTTCAAGAACAGTAAACCTGTTCCGACTACTGCCTCTCCC			506
Sbjct 421	TTTCCTGCTGGTGGCTCAAGTTCCGGAACAGTAAACCTGTTCCGACTACTGCCTCTCCC			480
Query 507	ATATCGTCAATCTTCTCGAGACTGGGGACCTGCACCGAAATGGAGAGCACCATCA			566
Sbjct 481	ATATCGTCAATCTTCTCGAGACTGGGGACCTGCACCGAAATGGAGAGCACCATCA			540
Query 567	GGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTTTTTCTGTTGACAAGAATCCTC			626
Sbjct 541	GGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGCGGGGTTTTTCTGTTGACAAGAATCCTC			600
Query 627	ACAATACCAAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGAGCACCC			686
Sbjct 601	ACAATACCAAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGAGCACCC			660

ภาพที่ 19 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

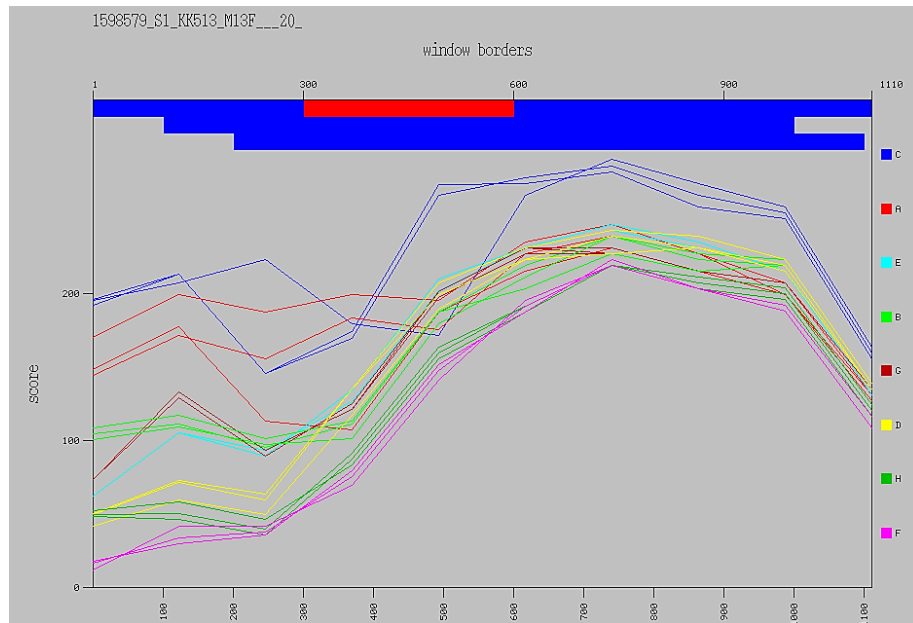
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> HBV genotype CP_Large S genes for P protein, Large S protein, partial cds, strain: C0901193(NT19)	1533	1533	94%	0.0	98%	<a href="#">AB540598.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate MY836508 polymerase (P) gene, complete cds	1531	1531	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ717812.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate MY2031333 polymerase (P) gene, complete cds	1531	1531	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ717811.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate 479-9129-6 polymerase (P) gene, partial cds; and large S protein (S), middle S protein (S), and S protein (S) genes, complete cds	1531	1531	96%	0.0	97%	<a href="#">JN604153.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate MY677465 polymerase (P) gene, complete cds	1526	1526	96%	0.0	97%	<a href="#">KJ717810.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate 479-6033-2 polymerase (P) gene, partial cds; and large S protein (S), middle S protein (S), and S protein (S) genes, complete cds	1526	1526	96%	0.0	97%	<a href="#">JN604151.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate 04029 polymerase (P) gene, partial cds; and large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete cds	1517	1517	95%	0.0	97%	<a href="#">KC315303.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate MY71639 polymerase (P) gene, complete cds	1515	1515	96%	0.0	97%	<a href="#">KF053176.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate 476-8046-9 polymerase (P) gene, partial cds; large S protein (S) gene, complete cds; middle S protein-like (S) gene, complete sequence;	1515	1515	96%	0.0	97%	<a href="#">JN604121.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 1737 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete cds	1511	1511	95%	0.0	97%	<a href="#">GQ855511.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 746 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete cds	1511	1511	95%	0.0	97%	<a href="#">GQ855464.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 547 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, complete cds	1511	1511	95%	0.0	97%	<a href="#">GQ855442.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 3774 large S protein (S), middle S protein (S), and small S protein (S) genes, partial cds	1511	1511	95%	0.0	97%	<a href="#">GQ855347.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate CH-854 S protein gene, partial cds	1511	1511	95%	0.0	97%	<a href="#">DQ361438.1</a>

ภาพที่ 20 ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของยีน surface antigen

### ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

การตรวจสอบสายพันธุ์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม viral

genotyping tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/help.html>) พบว่าสามารถแยก สายพันธุ์ ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างได้ สายพันธุ์ B และ C



**ภาพที่ 21** ตัวอย่างการตรวจสอบสายพันธุ์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม viral genotyping tool จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี สายพันธุ์ C มากที่สุด

ผลการจำแนกสายพันธุ์จากผลการตรวจสอบสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม viral genotyping tool และจากการวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic analysis ทั้งสิ้น 4 ภาครวมทั้งหมด 7 จังหวัดพบสายพันธุ์ C subgenotype C1 111 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 93.3 และสายพันธุ์ B subgenotype B2 8 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 6.7 ให้ผลสรุปดังตารางที่ 24 และพบว่ากระจายตัวของสายพันธุ์ ไวรัสตับอักเสบบี ในแต่ละภาคของประเทศไทยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.175

ตารางที่ 24 แสดงการจำแนกสายพันธุ์ของตัวอย่างทั้ง 4 ภาค

ภาค	สายพันธุ์ (%)		รวม	p-value
	B	C		
ภาคเหนือ	5 (16.67)	25 (83.33)	30(25.21)	0.175
ภาคใต้	-	16 (100)	16(13.45)	
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	-	39 (100)	39(32.77)	
ภาคกลาง	3 (8.82)	31 (91.18)	34(28.57)	
รวม	8 (6.72)	111 (93.28)	119	

### 3. ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อ HBV

ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้วิธี Phylogenetic analysis เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี แต่ละสายพันธุ์ที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบสายพันธุ์ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่

**genotype A:** M57663 subgenotype A1, Z35717 subgenotype A2

**genotype B:** D23678 ,D50521 subgenotype B1, AF479684 ,AF121244 ,U87747 subgenotype B2, AB033554 ,AB219428 subgenotype B3, AY033072 subgenotype B4

**genotype C:** D23684 ,AF458664 ,AF286594 ,AB03355, AY057947 ,AB112472 ,KF798221 ,KC315303 ,KC315317 ,GQ855327 ,GQ855496, GQ855504 ,EF384202 ,JN604151 ,DQ361526 ,AB112066 subgenotype C1, AB014376 subgenotype C2, AY161157 subgenotype D1

**genotype D:** GU456635 subgenotype D2, X85254 subgenotype D3, AB033559 subgenotype D4;

**genotype E:** AB091255

**genotype F:** AY090458 subgenotype F1, AF223965 subgenotype F2

**genotype G:** AF160501 , AF405706

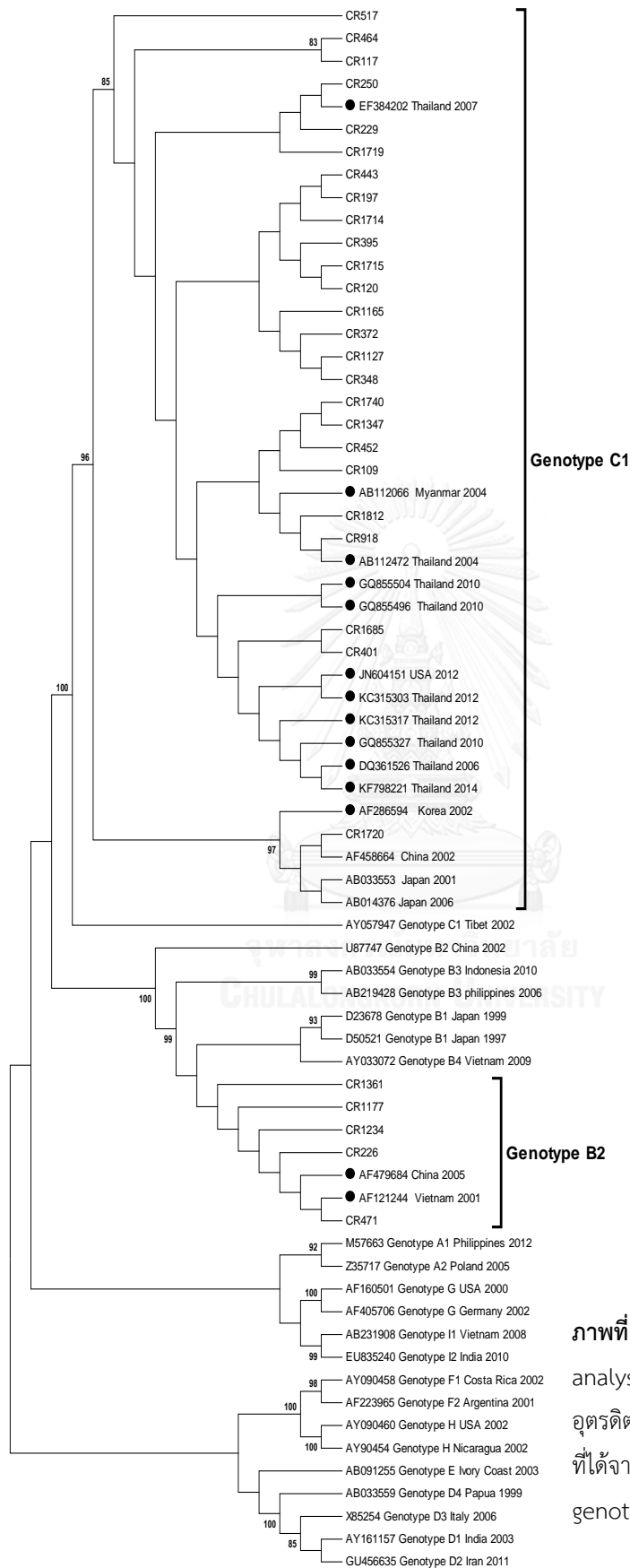
**genotype H:** AY090460, AY90454

**genotype I:** AB231908 subgenotype I1, EU835240 subgenotype I2

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบ genotype ซึ่งมีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ด้วยวิธี Alingment โดยโปรแกรม BioEdit version 7.0 จากนั้นนำผลที่ได้มาทำ phylogenetic analysis โดยโปรแกรม MEGA version 5.05 จากการศึกษาได้ทำ phylogenetic analysis ทั้ง 4 ภาค พบการกระจายตัวของสายพันธุ์ในแต่ละภาคแตกต่างกัน โดยภาคเหนือได้แก่ จังหวัดพิษณุโลกและอุตรดิตถ์ (CR) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสามารถจัดอยู่ใน genotype B,C ภาคกลางได้แก่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY) และลพบุรี (LP) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสามารถจัดอยู่ใน genotype B,C ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดขอนแก่น (KK) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา สามารถจัดอยู่ใน genotype C ภาคใต้ได้แก่จังหวัดตรังและนราธิวาส (ST) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาสามารถจัดอยู่ใน genotype C และ phylogenetic tree รวมทั้งหมดดังรูปที่ 22-26



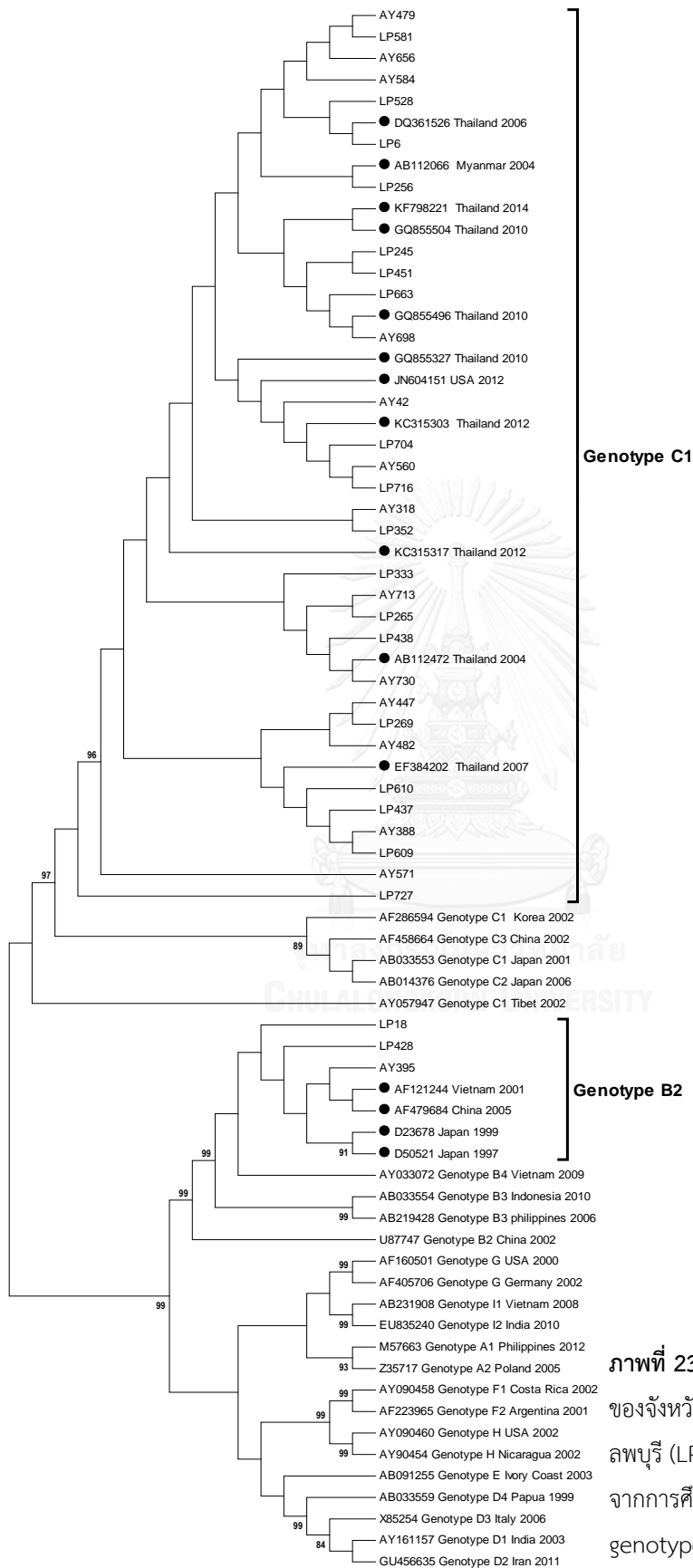




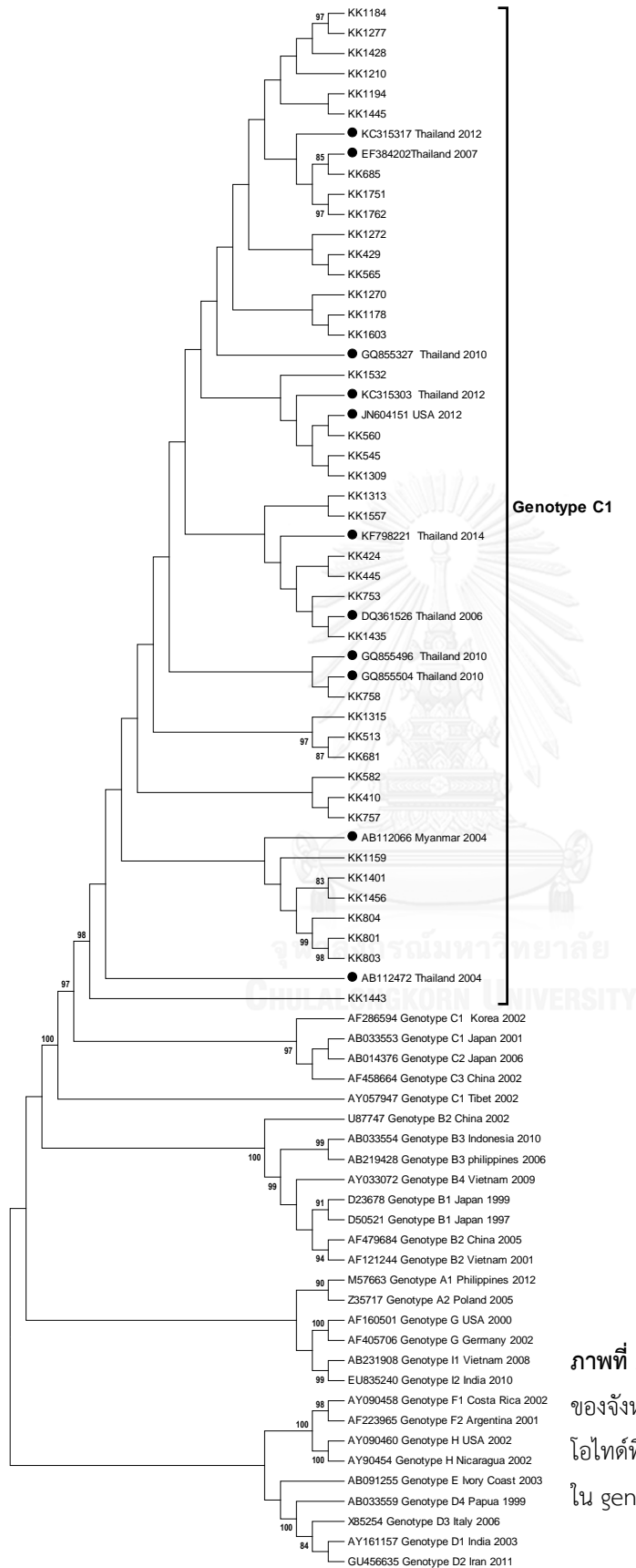
Genotype C1

Genotype B2

ภาพที่ 22 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัด พิษณุโลกและอุตรดิตถ์ (CR) จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype B,C

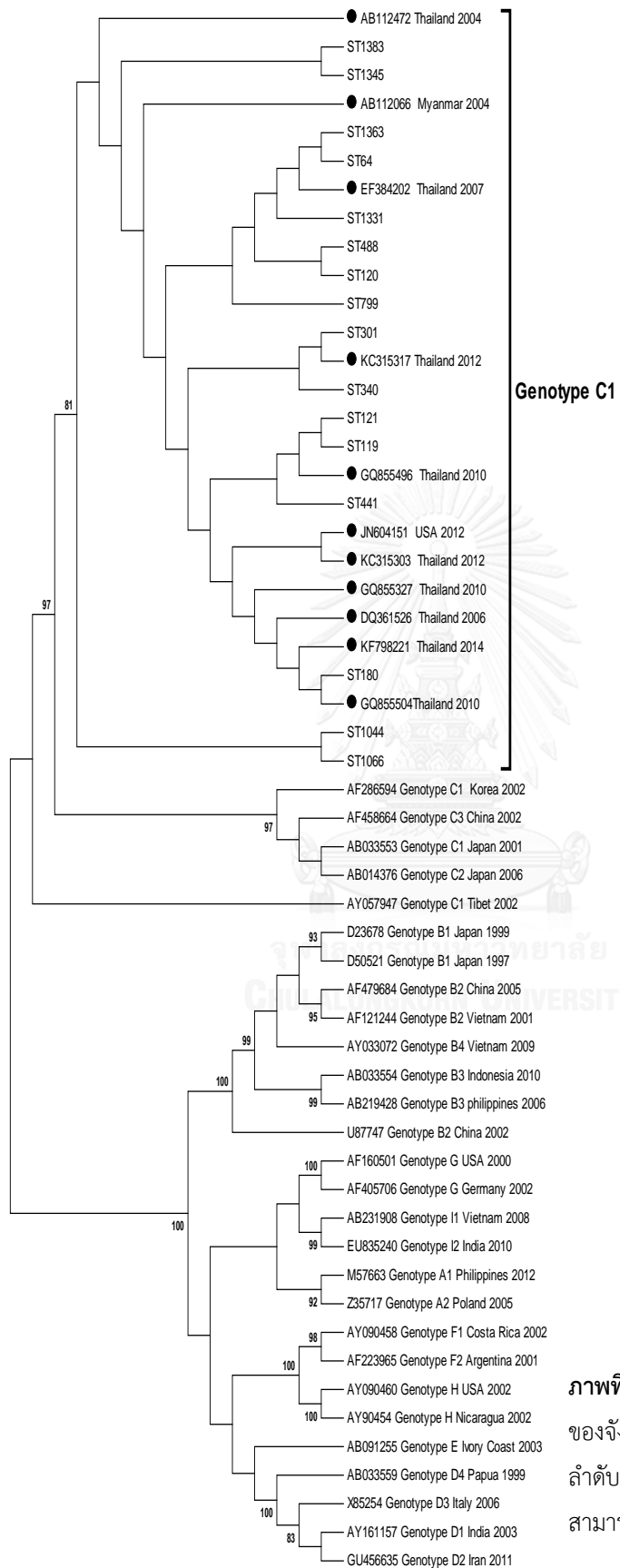


ภาพที่ 23 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัด พระนครศรีอยุธยา (AY) และ ลพบุรี (LP) จากgrup ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype B,C

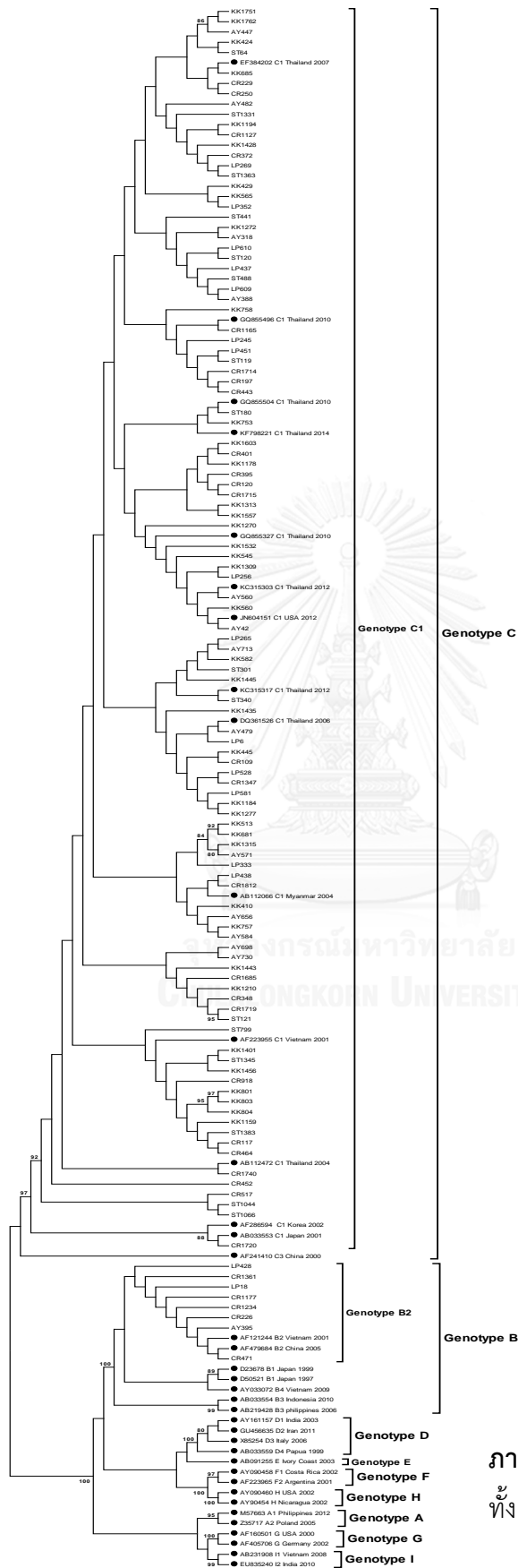


Genotype C1

ภาพที่ 24 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัด ขอนแก่น (KK) จากรูป ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype C



ภาพที่ 25 แสดง phylogenetic analysis ของจังหวัดตรังและนราธิวาส (ST) จากรูปลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา จะสามารถจัดได้อยู่ใน genotype C



ภาพที่ 26 แสดง phylogenetic analysis  
ทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย

#### 4. การเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

มีการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปยังฐานข้อมูลธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาไวรัสตับอักเสบ บี ต่อไป โดยฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถค้นหาได้ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ซึ่งหมายเลขประจำลำดับนิวคลีโอไทด์ (GenBank accession number) ได้แก่หมายเลข KR077062 - KR077180

#### 5. ผลการจำแนก subtype

จากการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant ให้กลายเป็นกรดอะมิโนแล้วจำแนก subtype โดยดูจากกรดอะมิโนตำแหน่ง 122 และ 160 จะสามารถแยก subtype ได้เป็น adr, adw และ ayr ดังตารางที่ 25 และพบว่ากระจายตัวของ subtype ของไวรัสตับอักเสบ บี ในแต่ละภาคของประเทศไทยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่า  $p$ -value เท่ากับ 0.174

ตารางที่ 25 แสดงการจำแนก subtype ของตัวอย่างทั้ง 4 ภาค

ภาค	subtypes (%)			รวม	$p$ -value
	adr	adw	ayr		
ภาคเหนือ	22 (73.33)	7 (23.33)	1 (3.33)	30(25.21)	0.174
ภาคใต้	16 (100)	-	-	16(13.45)	
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	37 (94.88)	1 (2.56)	1 (2.56)	39(32.77)	
ภาคกลาง	30 (88.24)	3 (8.82)	1 (2.94)	34(28.57)	
รวม	105 (88.24)	11 (9.24)	3 (2.52)	119	

โดยทั่วไป ไวรัสตับอักเสบ บี ที่พบในประเทศไทย และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ genotype C จะมี subtype เป็น adr และ ayr genotype B จะมี subtype เป็น adw (64) และเมื่อทำการศึกษาพบว่า genotype C ส่วนใหญ่จะมี subtype เป็น adr แต่มี genotype C บางตัวที่มี subtype เป็น ayr ส่วน genotype B ทั้งหมดจะมี subtype เป็น adw

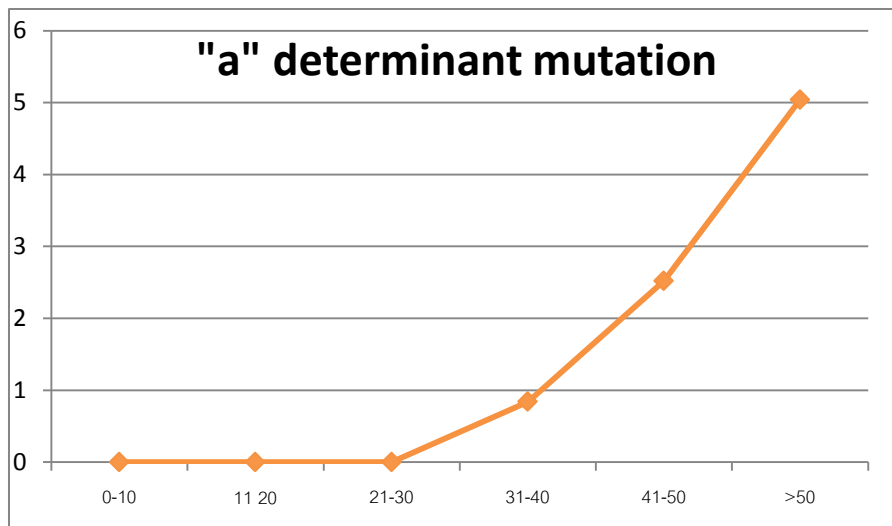
## 6. การตรวจสอบการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant

การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant ในตำแหน่ง 126, 129, 144, 145 พบว่าตำแหน่งดังกล่าวทำให้เกิด vaccine escape mutant (45) จากการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant พบทั้งหมด 9 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 7.56 โดยแบ่งเป็นการกลายพันธุ์ในตำแหน่งที่ 145 จาก Glycine (G) เป็น Arginine (R) จำนวน 2 ตัวอย่าง และจาก Glycine(G) เป็น Lysine (K) จำนวน 1 ตัวอย่าง ตำแหน่งที่ 144 จาก Aspartic acid (D) เป็น Alanine (A) จำนวน 1 ตัวอย่าง ตำแหน่งที่ 129 จาก Glutamine (Q) เป็น Histidine (H) จำนวน 1 ตัวอย่าง ตำแหน่งที่ 126 จาก Threonine (T) เป็น Serine (S) จำนวน 2 ตัวอย่าง และจาก Threonine (T) เป็น Asparagine (N) จำนวน 2 ตัวอย่าง เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant กับสายพันธุ์ของไวรัส พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า *p*-value เท่ากับ 0.054 และเมื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์กับอายุพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า *p*-value เท่ากับ 0.263 ข้อมูลการกลายพันธุ์แสดงดังตารางที่ 26

**ตารางที่ 26** การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant

Code	อายุ	เพศ	สายพันธุ์	Subtype	HBsAg (S/CO)	การกลายพันธุ์ “a” determinant
KK 757	52	M	C	ayr	3597.58	G145R
ST799	57	M	C	adr	3766.83	G145R
CR443	53	F	C	adr	3976.47	G145K
CR1361	37	F	B	adw	1375.12	D144A
CR1177	52	M	B	adw	3.90	Q129H
KK445	51	F	C	adr	2722.77	T126S
ST1331	42	M	C	adr	786.37	T126S
KK1445	42	M	C	adr	3814.29	T126N
AY656	52	F	C	adr	4176.96	T126N

เมื่อทำการเปรียบเทียบอายุของผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณ "a" determinant พบมากในผู้สูงอายุแสดงดังรูปที่ 27



ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์ที่บริเวณ "a" determinant และ อายุในผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์



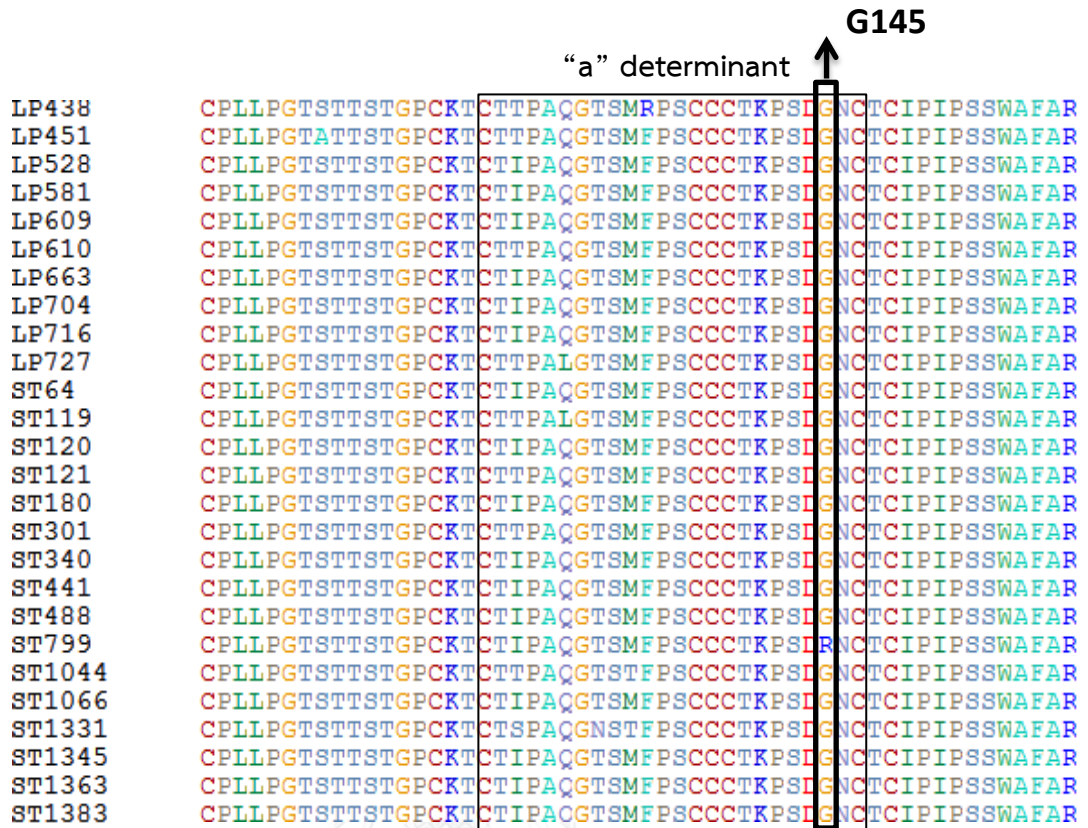
### 6.1 ผลการแปลรหัสพันธุกรรมในส่วน “a” determinant

ทำการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน “a” determinant ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วย

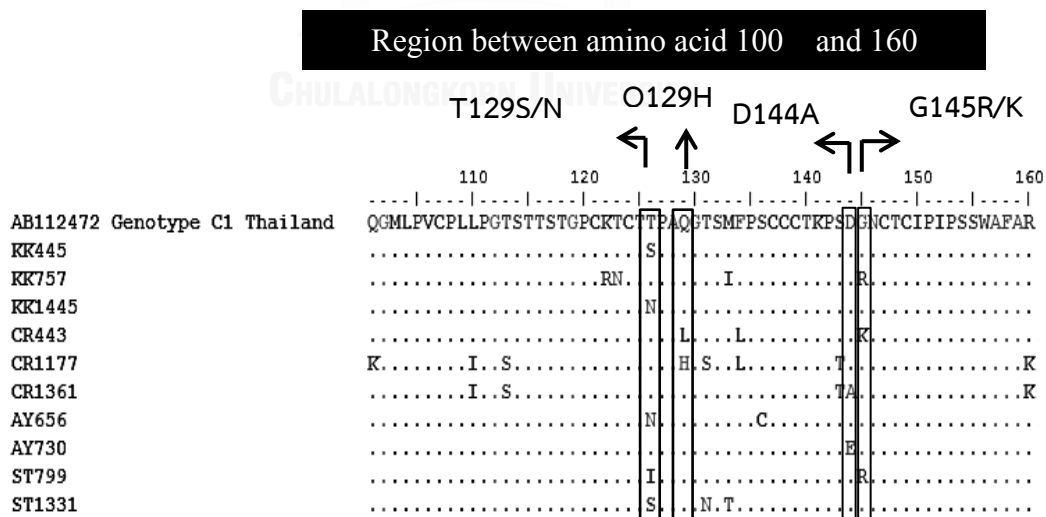
โปรแกรม Bioedit version 7.0 เริ่มต้นที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 107 ถึง 160 จำนวน 54 กรดอะมิโน

S gene	“a” determinant	G145R
	CPLIPGSTTTSTGPCKTCTTPAQQNSMFPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK41U	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK424	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK429	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK445	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTSPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK513	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK545	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK560	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK565	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK582	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK681	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK685	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK753	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK757	CPLLPGTSTTTSTGPCRNCTTPAQQGTSIFPSCCCTKPSI	IRNCTCIPIPSSWAFAR
KK758	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK801	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK803	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK804	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1159	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1178	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1184	CPLLPETSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1194	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1210	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1270	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1272	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1277	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMIPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1309	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1313	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1315	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1401	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1428	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTTPAQQGSMIPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR
KK1435	CPLLPGTSTTTSTGPCKTCTIPAQQGSMFSPSCCCTKPSI	IGNCTCIPIPSSWAFAR

		“a” determinant	G145R
KK1443	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1445	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTNPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1456	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1532	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1557	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1603	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1751	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
KK1762	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR109	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR117	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR120	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR197	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPANGT	SMFSPCCCTKPSI
CR226	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPTI
CR229	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR250	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR348	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR372	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR395	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR401	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR443	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPALG	TSMFSPCCCTKPSI
CR452	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR464	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR471	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSLFSPCCCTKPTI
CR517	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR918	CPLLPGTSTTSTGPCRT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1127	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1165	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1177	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPAHG	SSMLPSCCCTKPTI
CR1234	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPTI
CR1347	CPLLPGTATTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1361	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPTA
CR1685	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1714	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1715	CPLLQGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1719	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1720	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1740	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
CR1812	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY42	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY318	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY388	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY395	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPTI
AY447	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY479	CPLLPGTSTASTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY482	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY560	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY571	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY584	CPLLPGTSTTNTGPCRT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY656	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTNPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY698	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY713	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
AY730	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP6	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP18	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPTI
LP245	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP256	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP265	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP269	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP333	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP352	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI
LP428	CPLIPGSSTTSTGPCKT	CTTPA	QGTSMFSPCCCTKPTI
LP437	CPLLPGTSTTSTGPCKT	CTIPA	QGTSMFSPCCCTKPSI



ภาพที่ 28 แสดงการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Bioedit version 7.0 จะพบว่าลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้มีทั้งหมด 54 กรดอะมิโน



ภาพที่ 29 แสดงการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant ทั้ง 9 ตัวอย่าง

## 7. ผลการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของยีน *Pre-S*

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา นำมาวิเคราะห์ โดยโปรแกรม BioEdit version 7.0 ด้วยวิธี alignment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด 119 ตัวอย่าง บางตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ ส่วนของยีน *Pre-S* โดยการกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 4 แบบ ดังนี้ 1.) *pre-S2* deletion พบมากที่สุด 15.13% 2.) *pre-S2* start codon mutation พบ 4.20% 3.) *pre-S1* deletion พบ 2.52% 4.) *pre-S2* deletion and start codon mutation พบน้อยที่สุด 0.84% ดังตารางที่ 27 และเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆระหว่างผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ *pre-S* gene ดังตารางที่ 28

**ตารางที่ 27** ลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ *Pre-S* gene ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา

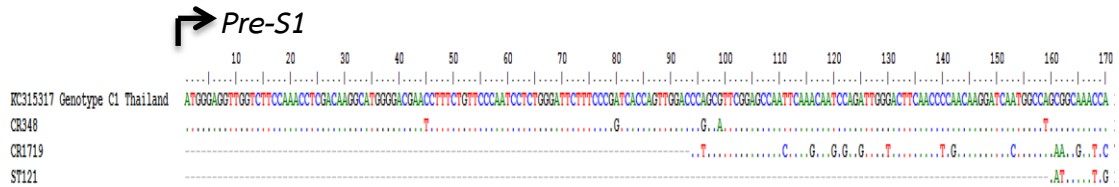
Coad	อายุ	เพศ	สายพันธุ์	HBsAg (S/CO)	การกลายพันธุ์ <i>Pre-S</i>
KK757	52	M	C	3597.58	<i>Pre-S2</i> start codon mutation
KK1194	59	F	C	2.05	<i>Pre-S2</i> deletion
KK1210	59	F	C	6249.29	<i>Pre-S2</i> deletion
KK1277	28	F	C	2919.6	<i>Pre-S2</i> deletion
KK1428	52	M	C	216.31	<i>Pre-S2</i> deletion
KK1443	55	F	C	5185.42	<i>Pre-S2</i> deletion
KK1445	42	M	C	3814.29	<i>Pre-S2</i> deletion
LP18	25	M	B	6219.41	<i>Pre-S2</i> deletion
LP265	32	M	C	3352.02	<i>Pre-S2</i> deletion
LP269	54	M	C	5563.76	<i>Pre-S2</i> deletion
LP438	52	M	C	3289.3	<i>Pre-S2</i> deletion
AY571	15	M	C	2903.67	<i>Pre-S2</i> deletion
AY730	44	M	C	3525.45	<i>Pre-S2</i> deletion
CR229	55	M	C	5103.94	<i>Pre-S2</i> start codon mutation
CR250	59	M	C	4896.63	<i>Pre-S2</i> start codon mutation
CR348	34	F	C	3014.52	<i>Pre-S1/S2</i> deletion
CR372	55	M	C	2742.86	<i>Pre-S2</i> deletion, <i>Pre-S2</i> start codon mutation

Code	อายุ	เพศ	สายพันธุ์	HBsAg (S/CO)	การกลายพันธุ์ Pre-S
CR1127	46	F	C	6497.8	Pre-S2 deletion
CR1165	34	F	C	6408.83	Pre-S2 deletion
CR1719	52	F	C	5525.86	Pre-S1 deletion Pre-S2 start codon mutation
ST121	59	F	C	2574.82	Pre-S1 deletion
ST1331	42	M	C	786.37	Pre-S2 deletion
ST1363	51	F	C	5497.6	Pre-S2 deletion

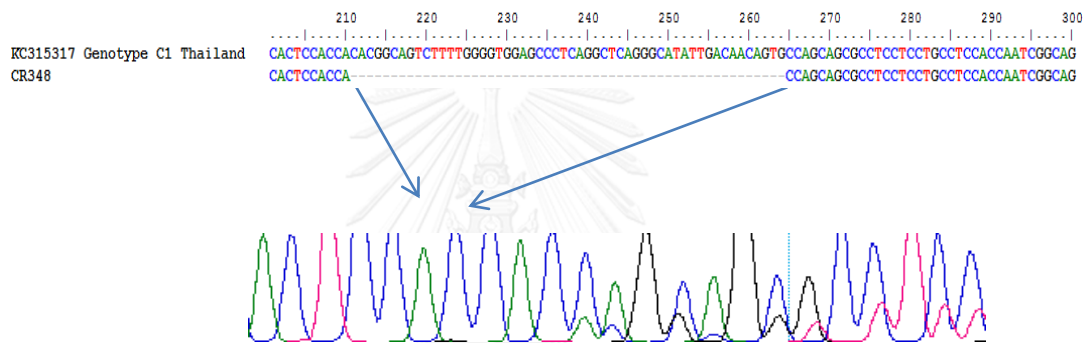
ตารางที่ 28 เปรียบเทียบปัจจัยต่างๆระหว่างผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วน  
ของ Pre-S gene

	เกิดการกลายพันธุ์ที่ pre-s จำนวน 23 ราย	ไม่เกิดการกลายพันธุ์ที่ pre-s จำนวน 96 ราย	p-value
อายุ (เฉลี่ย)	45.9±12.4	39.9±13.3	0.062
เพศ (ชาย/หญิง)	13 /10	47 /49	0.494
สายพันธุ์			0.076
สายพันธุ์ C (ร้อยละ)	22 (95.7)	89 (92.7)	
สายพันธุ์ B (ร้อยละ)	1 (4.3)	7 (7.3)	
การตรวจหา HBeAg			0.025
ให้ผลลบต่อ HBeAg (ร้อยละ)	0	19 (19.8)	
ให้ผลลบต่อ HBsAg (ร้อยละ)	23 (100)	77 (80.2)	
การตรวจพบปริมาณไวรัส			
ปริมาณไวรัส (> 10 <sup>2</sup> copies/mL)	7 (30.4)	49 (51)	0.434
mean±SD (log copies/mL)	6.6±0.6	7.4±2.1	0.155
ปริมาณไวรัส (< 10 <sup>2</sup> copies/mL)	16 (69.6)	47 (49)	

7.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างที่เกิดการ Deletion ที่ *pre-S1* / *pre-S2* gene จากการวิเคราะห์พบการ Deletion ที่ *Pre-S1* gene ได้แก่ตัวอย่าง CR348 CR1719 ST121

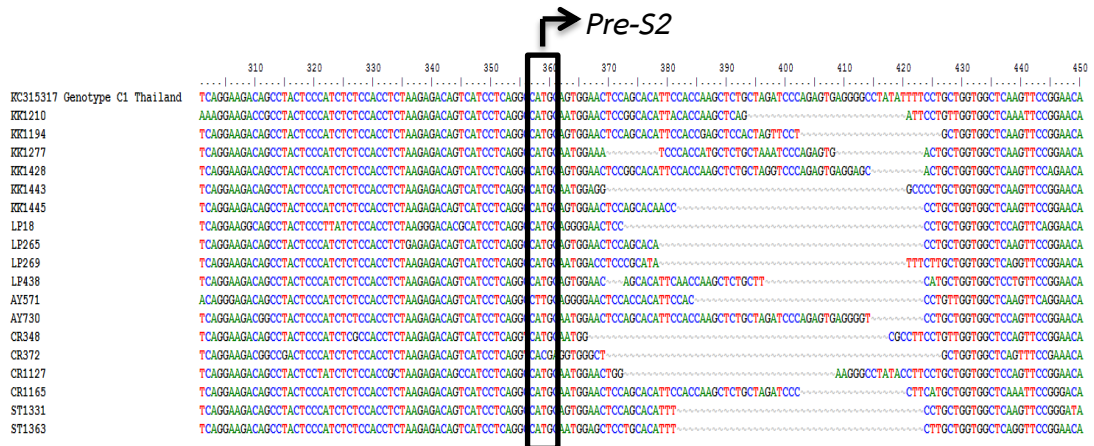


ภาพที่ 30 แสดงการ deletion ที่ตำแหน่ง *Pre-S1*

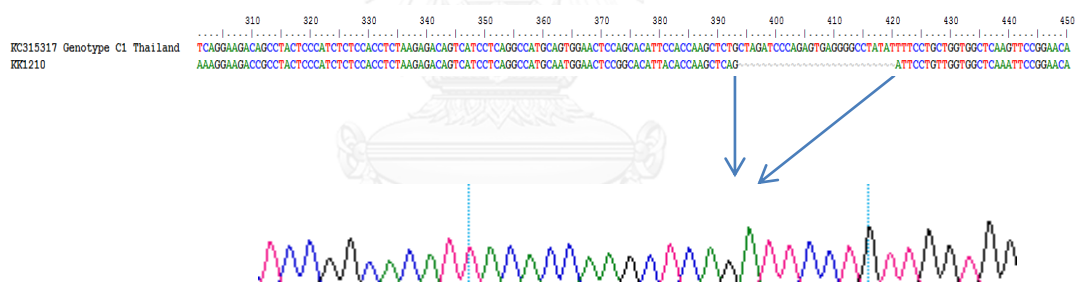


ภาพที่ 31 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ *Pre-S1* ของตัวอย่าง CR348 จากรูปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pre-S* gene จากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion ไป 54 bp

จากการวิเคราะห์พบการ Deletion ที่ *Pre-S2* gene ได้แก่ตัวอย่าง KK1210 KK1194 KK1277 KK1428 KK1443 KK1445 LP18 LP265 LP269 LP438 AY571 AY730 CR348 CR372 CR1127 CR1165 ST1331 ST1363



ภาพที่ 32 แสดงการ deletion ที่ตำแหน่ง *Pre-S2*



ภาพที่ 33 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ *Pre-S2* ของตัวอย่าง KK1210 จากรูปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pre-S* gene จากข้อมูล Chromatogram พบว่าการ deletion ไป 27 bp

เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าลักษณะของกรดอะมิโนที่ขาดหายไป ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหรือการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือ เกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon



ภาพที่ 34 แสดงกรดอะมิโนที่ขาดหายไปใน Pre-S1/S2 gene เนื่องจากมีการ deletion ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหรือการกลายพันธุ์แบบ frame shift หรือเกิดการกลายพันธุ์เป็น stop codon

7.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2

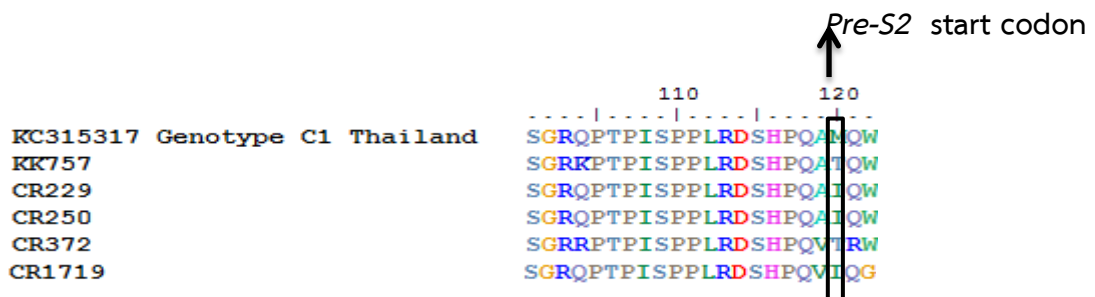
จากการวิเคราะห์พบมีการกลายพันธุ์ที่ start codon ของ Pre-S2 เท่านั้น ซึ่งได้แก่ตัวอย่าง KK757 CR229 CR250 CR372 CR1719



ภาพที่ 35 แสดงการกลายพันธุ์ที่ start codon ที่ตำแหน่ง Pre-S2

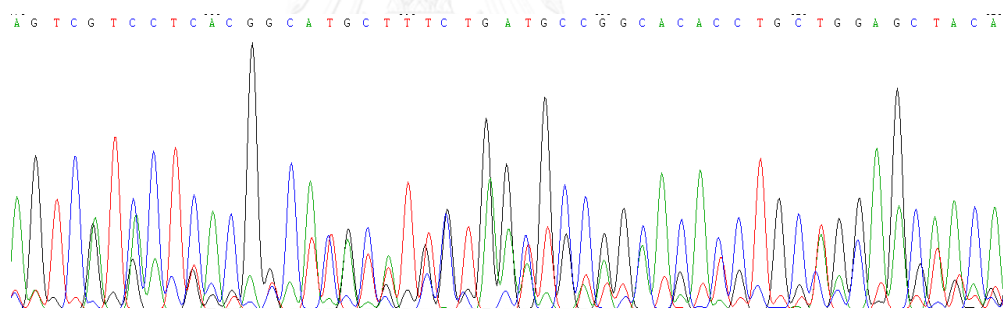


เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก M เป็น T และ I โดยไม่เกิดเป็น stop codon แต่อย่างไรก็ตามแสดงในรูปที่ 35

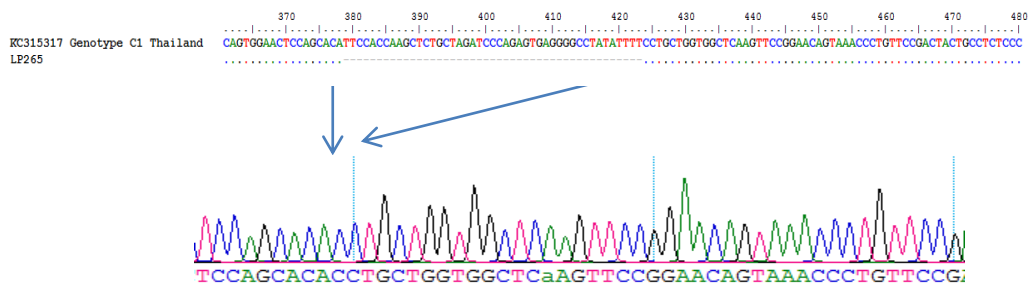


ภาพที่ 36 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ start codon บริเวณ *Pre-S2*

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง LP265 พบว่าข้อมูล Chromatogram มีลักษณะที่มีการซ้อนทับกันโดยในตำแหน่ง *Pre-S2* gene เมื่อทำการ clone เพื่อแยกเชื้อสองชนิดออกจากกันซึ่งต่อมาพบว่าเชื้อมีการ deletion ที่ *Pre-S2* gene



ภาพที่ 37 LP265 มี Chromatogram ที่มีลักษณะที่มีการซ้อนทับกัน

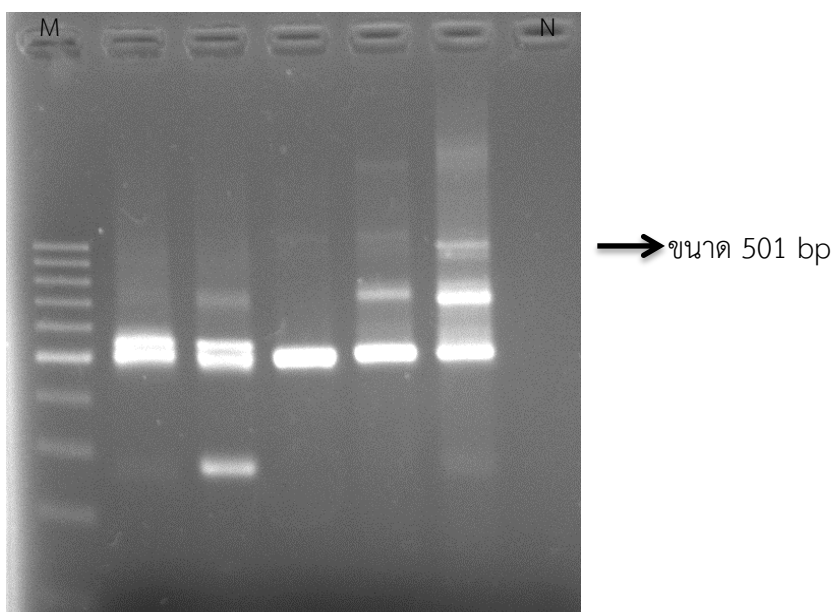


ภาพที่ 38 แสดงข้อมูลการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ *Pre-S2* ของตัวอย่าง LP265 จากรูปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pre-S* gene จากข้อมูล Chromatogram พบว่ามีการ deletion ไป 45 bp

## 8. ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในส่วนของ Basic core promoter (BCP) และ precore (PC) gene

### 8.1 ผลการเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ BCP จนถึงส่วนของ PC

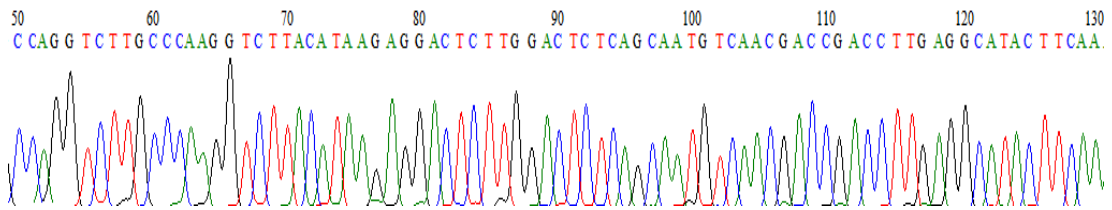
จากการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี nested PCR ของบริเวณ BCP จนถึงส่วนของ PC โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณ BCP จนถึงส่วนของ PC ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ครอบคลุมทั้ง 2 ส่วน ขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 1 คือ 1,189 bp และขนาดผลผลิตจากการทำ PCR ครั้งที่ 2 คือ 501 bp ตามรูปที่ 39



ภาพที่ 39 แสดงผลการเพิ่มจำนวน DNA โดยวิธี nested PCR ของบริเวณ BCP จนถึงส่วนของ PC ด้วยไพรเมอร์ HBV-Xi1\_F และ HBV-CORE2\_R ได้ผลผลิตขนาด 1,189 bp HBV-X101\_F และ HBV-CO2\_R ได้ผลผลิตขนาด 501 bp โดย M คือ 100 bp marker และ N คือ negative control

### 8.2 ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ BCP จนถึงส่วนของ PC

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในส่วนของ BCP จนถึงบริเวณ PC มาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> พบว่ามีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ทุกตัวอย่างและมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของ precore/core gene



ภาพที่ 40 ตัวอย่างของกราฟ chromatogram และลำดับนิวคลีโอไทด์

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 721 X protein (X), precore/core protein (C), and core protein (C) genes, partial cds	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">GQ855567.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 643 X protein (X), precore/core protein (C), and core protein (C) genes, partial cds	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">GQ855563.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 352 X protein (X), precore/core protein (C), and core protein (C) genes, partial cds	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">GQ855540.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 37 X protein (X), precore/core protein (C), and core protein (C) genes, complete cds	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">GQ855523.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate M86, complete genome	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">GQ924649.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate M30b, complete genome	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">GQ924613.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate C2_M04-1116 S protein (S) and core protein (C) genes, complete cds	824	824	96%	0.0	99%	<a href="#">FJ023658.1</a>
<input type="checkbox"/> Hepatitis B virus isolate migrant 1253 X protein (X), precore/core protein (C), and core protein (C) genes, partial cds	822	822	94%	0.0	99%	<a href="#">GQ855602.1</a>

ภาพที่ 41 ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

Hepatitis B virus isolate 3 X protein (X), precore/core protein (C), and core protein (C) genes, partial cds  
Sequence ID: [gb|EU841396.1](#) Length: 505 Number of Matches: 1

Range 1: 44 to 502		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
821 bits(444)	0.0	454/459(99%)	0/459(0%)	Plus/Plus	
Query 14	CTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCATGAACGCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGCTTACA			73	
Sbjct 44	CTCTGCACGTCGCATGGAGACCACCGTGAACGCCGCCAGGTCTTGCCCAAGGCTTACA			103	
Query 74	TAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACTTGAGGCATACCTCAAAGA			133	
Sbjct 104	TAAGAGGACTCTTGGACTCTCAGCAATGTCAACGACCGACTTGAGGCATACCTCAAAGA			163	
Query 134	CTGTGATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGACT			193	
Sbjct 164	CTGTGATTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGGAGGAGACTCGGTTAATGATCTTTGACT			223	
Query 194	GGGAGGCTGTAGGCATAAATTTGGTCTGTTCAACGACCATGCAACTTTTTCACCTCTGC			253	
Sbjct 224	GGGAGGCTGTAGGCATAAATTTGGTCTGTTCAACGACCATGCAACTTTTTCACCTCTGC			283	
Query 254	CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCAAGCTGTGCTTGGGTGGCTT			313	
Sbjct 284	CTAATCATCTCATGTTTCATGTCCTACTGTTCAAGCCTCAAGCTGTGCTTGGGTGGCTT			343	
Query 314	TGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTCTTT			373	
Sbjct 344	TGGGGCATGGACATTGACCCGTATAAAGAATTTGGAGCTTCTGTGGAGTTACTCTCTTT			403	
Query 374	TTGCCTTCTGACTTCTTCTCTTCTATTCGTGATCTCTCGACACCGCCGCTTTGTAT			433	
Sbjct 404	TTGCCTTCTGACTTCTTCTCTTCTATTCGTGATCTCTCGACACCGCCGCTTTGTAT			463	
Query 434	CGAGAGGCTTAGAGTCTCCGGAACATTGTTACCTCAC			472	
Sbjct 464	CGAGAGGCTTAGAGTCTCCGGAACATTGTTACCTCAC			502	

ภาพที่ 42 ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม(GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จากรูปพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในส่วนของยีน precore/core

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา นำมาวิเคราะห์ โดยโปรแกรม BioEdit version 7.0 ด้วยวิธี alignment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด 56 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 42.4 บางตัวอย่างมีการกลายพันธุ์ ส่วนของ Basic core promoter (BCP) และ precore (PC) gene โดยการกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 แบบดังนี้

- 1.) ที่บริเวณ Basic core promoter (BCP) พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 31 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 55.4 และพบการกลายพันธุ์ทั้งสองตำแหน่งที่ A1762T และ G1764A 28 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 50
- 2.) ที่บริเวณ precore (PC) พบการกลายพันธุ์ทั้งหมด 17 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 30.6 และพบการกลายพันธุ์ทั้งสองตำแหน่ง G1896A และ G1899A จำนวน 4 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 7.1 โดยตารางที่ 29 แสดงลักษณะการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP และ PC ตารางที่ 30 และเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆในผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์ไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP และ PC region ตามลำดับ

**ตารางที่ 29** ลักษณะกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP และ PC ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา

Code	Age	Sex	Genotype	HBe status	HBV DNA Log(copies/ml)	BCP mutant	PC mutant
KK410	33	F	C	+	6.01	G1764A	-
KK513	56	F	C	-	6.77	A1762T/ G1764A	-
KK582	43	M	C	-	7.15	A1762T/ G1764A	-
KK685	41	F	C	+	8.5	A1762T/ G1764A	-
KK1159	55	F	C	-	5.75	A1762T/ G1764A	G1896A
KK1178	57	F	C	-	4.48	A1762T/ G1764A	G1896A
KK1270	32	M	C	+	9.49	A1762T/ G1764A	-
KK1313	55	F	C	-	4.48	-	G1896A/ G1899A
KK1315	55	F	C	-	6.09	A1762T/ G1764A	G1896A
KK1443	55	F	C	-	4.48	A1762T/ G1764A	-
KK1456	26	F	C	-	9.5	A1762T/ G1764A	-
LP6	51	M	C	-	6.13	A1762T/ G1764A	G1899A
LP18	25	M	B	-	6.45	A1762T/ G1764A	G1896A
LP256	44	F	C	-	5.69	A1762T/ G1764A	G1896A
LP265	32	M	C	-	6.65	A1762T/ G1764A	-
LP269	54	M	C	-	7.68	A1762T/ G1764A	-
LP352	24	M	C	-	5.18	A1762T/ G1764A	-
LP428	50	M	B	-	5.99	-	G1896A
AY318	44	M	C	-	5.97	-	G1899A
AY388	37	F	C	-	4.48	A1762T/ G1764A	-

Code	Age	Sex	Genotype	HBe status	HBV DNA Log (copies/ml)	BCP mutant	PC mutant
AY479	59	F	C	-	4.48	-	G1896A
AY482	54	M	C	-	10.2	A1762T/ G1764A	-
AY571	15	M	C	-	6.08	A1762T/ G1764A	-
AY698	44	M	C	-	6.21	A1762T/ G1764A	-
AY713	31	F	C	-	4.48	A1762T/ G1764A	G1896A
CR120	59	M	C	-	4.48	A1762T/ G1764A	G1896A/ G1899A
CR229	55	M	C	-	7.18	A1762T, G1764A	-
CR250	59	M	C	-	6	A1762T/ G1764A	G1899A
CR348	34	F	C	-	6.2	A1762T/ G1764A	G1896A
CR452	46	F	C	-	6.57	A1762T	-
CR517	46	F	C	+	6.44	A1762T/ G1764A	-
CR1177	52	M	B	-	4.48	-	G1896A/G1899A
CR1685	30	M	C	-	6.19	A1762T/ G1764A	G1899A
ST121	59	F	C	-	4.48	G1764A	G1896A/G1899A
ST799	57	M	C	-	8.22	A1762T/ G1764A	-
ST1345	60	F	C	-	5.11	A1762T/ G1764A	-

ตารางที่ 30 เปรียบเทียบปัจจัยต่างๆในผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP region

	เกิดการกลายพันธุ์ที่	ไม่เกิดการกลายพันธุ์ที่	p-value
	BCP	BCP	
	จำนวน 31 ราย	จำนวน 25 ราย	
อายุ (เฉลี่ย)	44.2±12.9	30±16.7	0.019
เพศ (ชาย/หญิง)	15 16	15 10	0.572
สายพันธุ์			0.059
สายพันธุ์ C (ร้อยละ)	30 (96.8)	20 (80)	
สายพันธุ์ B (ร้อยละ)	1 (3.2)	5 (20)	
การตรวจหา HBeAg			0.477
ให้ผลบวกต่อ HBeAg (ร้อยละ)	4 (12.9)	15 (60)	
ให้ผลลบต่อ HBsAg (ร้อยละ)	27 (87.1)	10 (40)	
การตรวจพบปริมาณไวรัส			
ปริมาณไวรัส (> 10 <sup>2</sup> copies/mL)	26 (83.9)	21 (84)	<0.001
mean±SD (log copies/mL)	6.8±1.3	8.3±2.2	0.014
ปริมาณไวรัส (< 10 <sup>2</sup> copies/mL)	5 (16.1)	4 (16)	

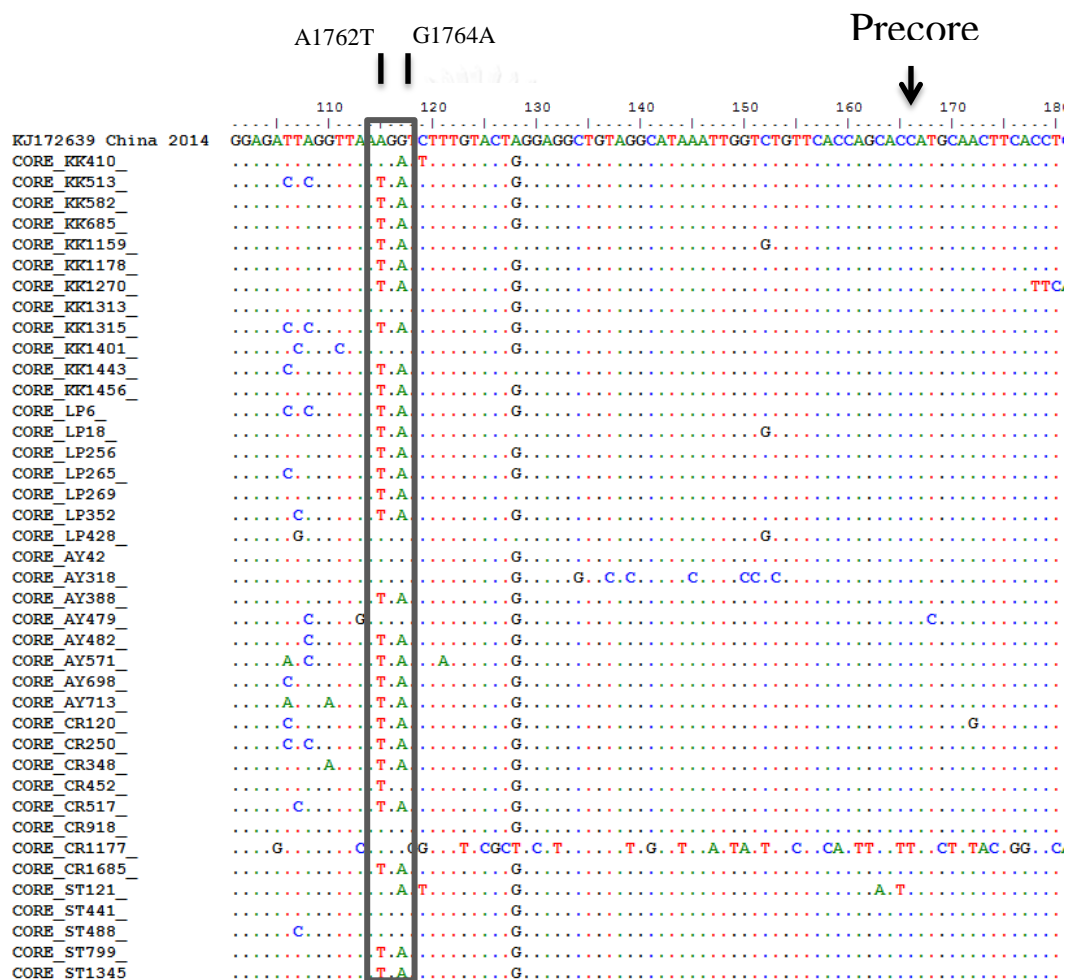
ตารางที่ 31 เปรียบเทียบปัจจัยต่างๆในผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์และไม่เกิดการกลายพันธุ์ในส่วนของ PC region

	เกิดการกลายพันธุ์ที่ PC จำนวน 17 ราย	ไม่เกิดการกลายพันธุ์ที่ PC จำนวน 39 ราย	<i>p</i> -value
อายุ (เฉลี่ย)	48.2±11.5	33.3±16.1	0.021
เพศ (ชาย/หญิง)	8/9	22/17	0.796
สายพันธุ์			0.021
สายพันธุ์ C (ร้อยละ)	14 (82.4)	36 (92.3)	
สายพันธุ์ B (ร้อยละ)	3 (17.6)	3 (7.7)	
การตรวจหา HBeAg			0.289
ให้ผลบวกต่อ HBeAg (ร้อยละ)	1 (5.9)	18 (46.2)	
ให้ผลลบต่อ HBeAg (ร้อยละ)	16 (94.1)	21 (53.8)	
การตรวจพบปริมาณไวรัส			
ปริมาณไวรัส (> 10 <sup>2</sup> copies/mL)	11 (64.7)	36 (92.3)	0.011
mean±SD (log copies/mL)	6.0±0.2	8.1±2.0	0.748
ปริมาณไวรัส (< 10 <sup>2</sup> copies/mL)	6 (35.3)	3 (7.7)	



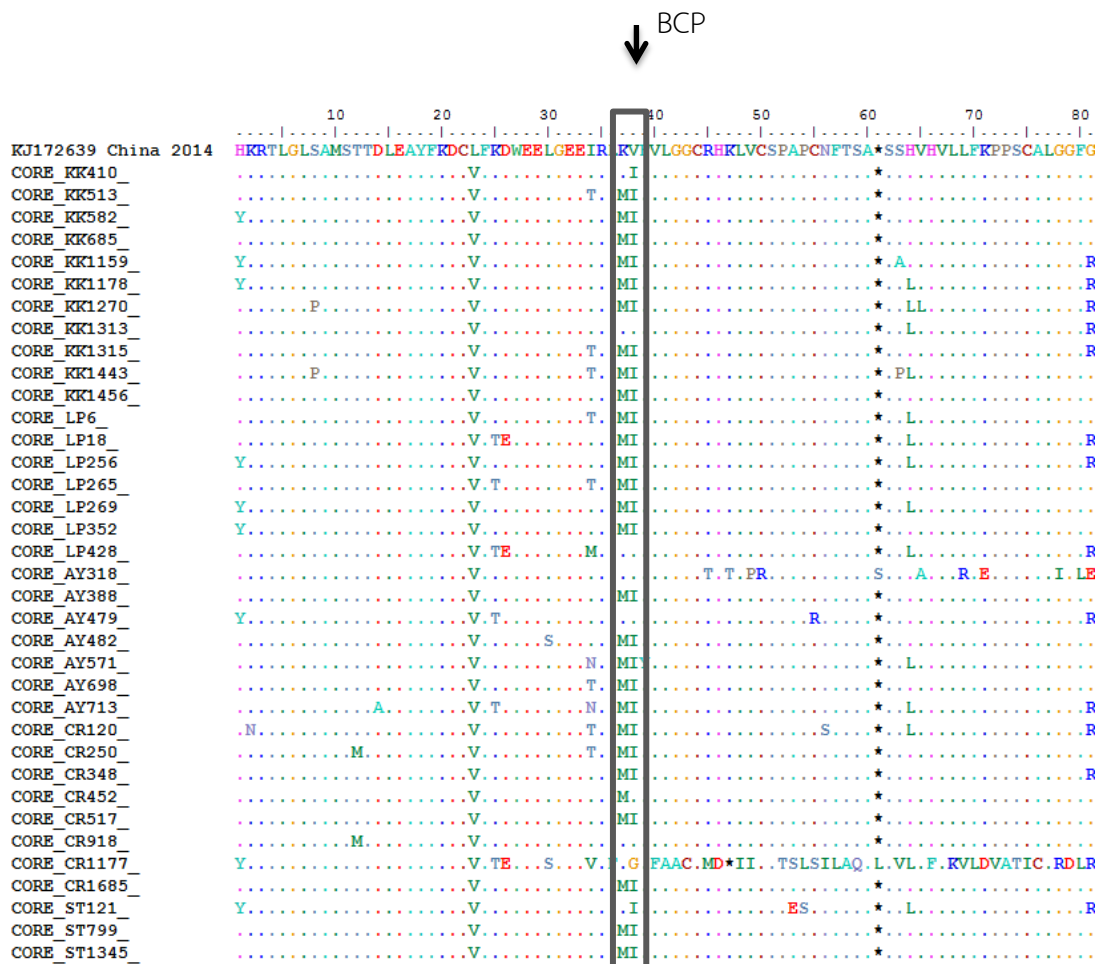
### 8.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างที่เกิดกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP

จากการวิเคราะห์พบการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP ที่ตำแหน่ง A1762T/ G1764A ทั้งหมดจำนวน 31 ตัวอย่างได้แก่ตัวอย่าง KK410 KK513 KK582 KK685 KK1159 KK1178 KK1270 KK1313 KK1315 KK1443 KK1456 LP6 LP18 LP256 LP265 LP269 LP352 AY388 AY482 AY571 AY698 AY713 CR120 CR229 CR250 CR348 CR452 CR517 CR1685 ST121 ST799 ST1345 โดยที่ตำแหน่ง 1762 เปลี่ยนกรดอะมิโนจากอะลานีนเป็นทรีโอนีนและตำแหน่งที่ 1764 เปลี่ยนกรดอะมิโนจากไกลซีนเป็นอะลานีน



ภาพที่ 43 แสดงการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP ทั้งหมดจำนวน 31 ตัวอย่าง

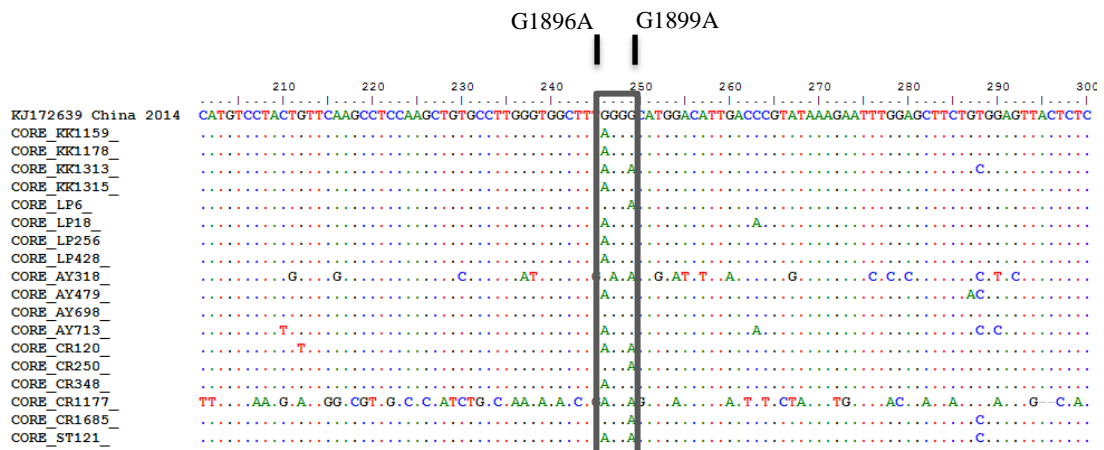
เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนในตำแหน่ง 1762 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก F (Phenylalanine) เกิดเป็น C (Cysteine) และในตำแหน่ง 1764 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก V (Valine) เกิดเป็น I (Isoleucine) แต่ทำให้การสร้าง HBeAg ลดลงดังแสดงในรูปที่ 44



ภาพที่ 44 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ A1762T/ G1764A บริเวณ BCP

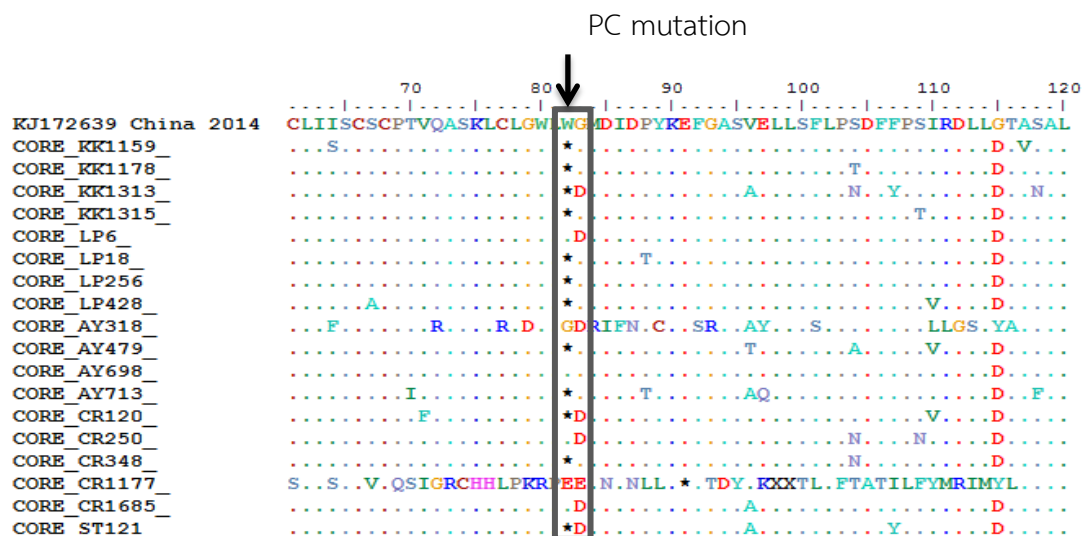
#### 8.4 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตัวอย่างที่เกิดกลายพันธุ์ในส่วนของ PC

จากการวิเคราะห์พบการกลายพันธุ์ในส่วนของ PC ที่ตำแหน่ง G1896A/ G1899A ทั้งหมดจำนวน 17 ตัวอย่างได้แก่ตัวอย่าง KK1159 KK1178 KK1313 KK1315 LP6 LP18 LP256 LP256 LP428 AY318 AY479 AY698 AY713 CR120 CR250 CR348 CR1177 CR1685 ST121 โดยที่ตำแหน่ง 1896 และ 1899 เปลี่ยนกรดอะมิโนจากไกลซีนเป็นอะลานีน



ภาพที่ 45 แสดงการกลายพันธุ์ในส่วนของ PC ทั้งหมดจำนวน 17 ตัวอย่าง

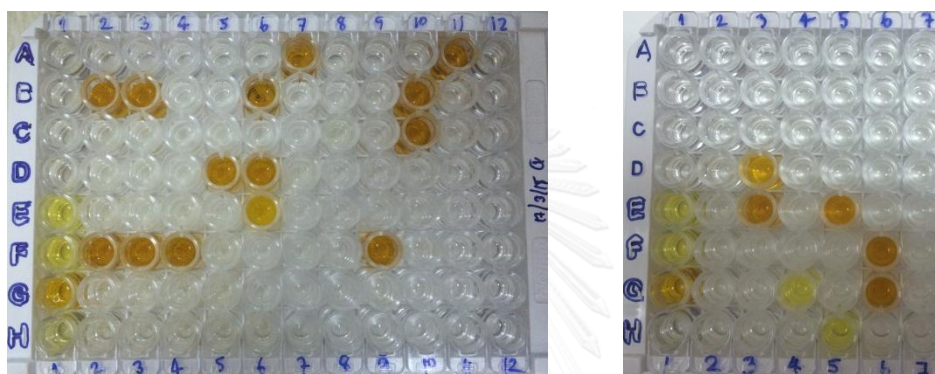
เมื่อทำการแปลเป็นกรดอะมิโนพบว่าในตำแหน่งที่ 1896 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก M (Methionine) เกิดเป็น stop codon และในตำแหน่งที่ 1899 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจาก G (Glycine) เกิดเป็น D (Aspartic acid) ทำให้ไม่มีการสร้าง HBeAg ดังแสดงในรูปที่ 46



ภาพที่ 46 แสดงการแปลเป็นกรดอะมิโนที่ G1896A/ G1899A บริเวณ PC

### 9. ผลการตรวจสอบ Hepatitis B e antigen (HBeAg)

จากการตรวจหา HBeAg จากซีรัมที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg ทั้งหมด 132 ตัวอย่าง พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg นั้นคือในตัวอย่างมี antigen ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ antibody ในชุด kits ได้โดยแสดงผลเป็นสีเหลืองเข้ม แสดงดังรูปที่ 47 จากการตรวจสอบพบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg จำนวน 19 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 14.4 ได้แก่ตัวอย่างดังนี้ KK429 KK560 KK685 KK801 KK1270 KK1401 KK1456 KK1532 KK1557 KK1751 LP704 AY42 AY318 AY560 CR517 CR918 CR1812 ST441 ST488

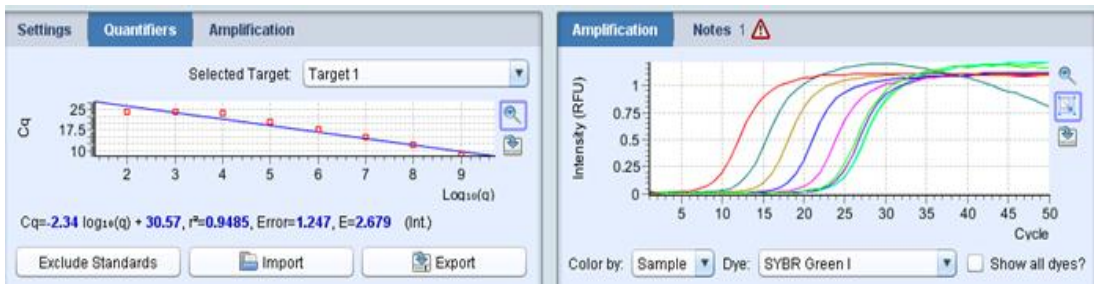


ภาพที่ 47 แสดงการตรวจหา HBeAg โดยวิธี ELISA เมื่อการตรวจให้ผลบวกของ HBeAg จะแสดงผลเป็นสีเหลืองเข้ม

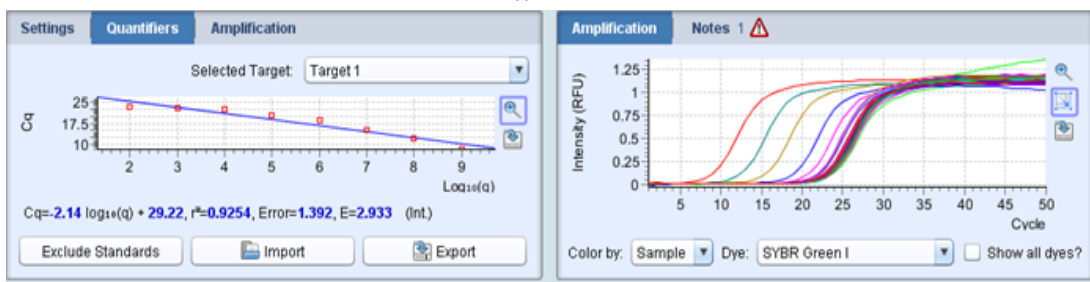
จากการตรวจสอบถ้าตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg แสดงว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสในเลือดจำนวนมาก (high levels of viral replication)

### 10. การวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส (HBV DNA) ในซีรัม

จากการตรวจสอบปริมาณไวรัสด้วยวิธี real-time PCR ทั้งหมด 132 ตัวอย่าง การคำนวณหาปริมาณไวรัสในตัวอย่างซีรัม ทำโดยใช้การคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่ได้จากการทำ 10-fold serial dilution เพื่อให้ผลเป็น copy number จำนวนต่างๆ ได้แก่  $10^9$ ,  $10^8$ , .....,  $10^2$  และใช้เป็นกราฟมาตรฐาน กราฟมาตรฐานที่ได้แสดงดังรูปที่ 48 และการหาปริมาณไวรัสในซีรัมของตัวอย่างสามารถคำนวณได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยแสดงดังรูปที่ 49 จากการตรวจสอบพบตัวอย่างที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณของไวรัสได้จำนวน 59 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 44.7



ภาพที่ 48 กราฟมาตรฐานในการหาปริมาณของไวรัส



ภาพที่ 49 ปริมาณไวรัสในตัวอย่างเมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส (HBV DNA) ในซีรัมและผลการตรวจสอบ HBeAg พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน โดยถ้าพบว่า HBeAg ให้ผลบวกจะตรวจพบปริมาณไวรัสในซีรัมด้วย แสดงถึงว่าไวรัสกำลังมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ในเลือด โดยความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสในซีรัมและ HBeAg มี  $p$ -value น้อยกว่า 0.001 ผลการตรวจสอบแสดงดังตารางที่ 32

**ตารางที่ 32** ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไวรัส (HBV DNA) ในซีรัมและผลการตรวจสอบ HBeAg ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg

	ตัวอย่างที่ตรวจพบ ปริมาณไวรัส (N=59)	ตัวอย่างที่ตรวจไม่ พบปริมาณไวรัส (N=83)	p-value
อายุ (mean±SD)	36.2±15.1	44.0±11.6	0.003
เพศ			
ผู้ชาย, จำนวน (ร้อยละ)	33 (55.9)	30 (36.1)	0.060
ผู้หญิง, จำนวน (ร้อยละ)	26 (44.1)	53 (63.9)	
HBeAg			
ผลบวกต่อ HBeAg, จำนวน (ร้อยละ)	19 (32.2)	-	< 0.001
ผลลบต่อ HBeAg, จำนวน (ร้อยละ)	40 (67.8)	83 (100)	

หลังจากประเทศไทยเริ่มให้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (EPI program) มาเป็นเวลา 22 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงผลของการได้รับวัคซีนโดยแบ่งตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เกิดก่อน EPI (อายุมากกว่า 22 ปี) และกลุ่มที่เกิดหลัง EPI (อายุน้อยกว่า 22 ปี) พบว่าประชากรกลุ่มที่เกิดหลัง EPI มีผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จำนวน 121 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 4.3 มากกว่ากลุ่มที่เกิดหลัง EPI ที่พบ 11 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 0.3 โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่า p-value น้อยกว่า 0.001 และในประชากรที่เกิดก่อนและเกิดหลัง EPI มีสายพันธุ์และ subtype ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่าประชากรกลุ่มที่เกิดหลัง EPI ตรวจพบปริมาณไวรัสมากกว่ากลุ่มที่เกิดก่อน EPI อย่างมีนัยสำคัญโดยมีทางสถิติค่า p-value น้อยกว่า 0.001 และการตรวจหา HBeAg พบประชากรส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อ HBeAg โดยทั้งกลุ่มที่เกิดก่อนและหลัง EPI พบประชากรอยู่ในกลุ่มที่ให้ผลลบต่อ HBeAg มากกว่ากลุ่มที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า p-value น้อยกว่า 0.001 และการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง “a” determinant ใน S gene และ PC ใน *precore* gene โดยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง *pre-S* ใน

*pre-S* gene และ BCP ใน *precore* gene ทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่า *p*-value เท่ากับ 0.017 และ 0.042 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 33

**ตารางที่ 33** การเปรียบเทียบการตรวจหาอนุไวรัสวิทยาในกลุ่มที่เกิดก่อนและหลัง EPI



	กลุ่มที่เกิดก่อน EPI	กลุ่มที่เกิดหลัง EPI	p-value
ประชากรจำนวนทั้งหมด 5,964 (ร้อยละ)	2,805(47.0)	3,159 (53.0)	
เพศ (ชาย/หญิง)	1,282/1,523	2,039/1,120	<0.001
<b>การวิเคราะห์ทางอนุไวรัสวิทยา</b>			
ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg จำนวนทั้งหมด 132 (ร้อยละ)	121 (4.3)	11 (0.3)	<0.001
ตัวอย่างที่ตรวจพบปริมาณไวรัสจำนวนทั้งหมด 119 (ร้อยละ)	108 (90.8)	11 (100)	0.579
<b>สายพันธุ์</b>	108	11	0.970
สายพันธุ์ C	101 (93.5)	10(90.9)	
สายพันธุ์ B	7 (6.5)	1 (9.1)	
<b>Subtype</b>	108	11	0.601
adr	96(88.8)	9 (81.8)	
adw	10 (9.5)	1 (9.1)	
ayr	2(1.9)	1 (9.1)	
<b>การกลายพันธุ์ที่ "a" determinant จำนวนทั้งหมด 9 (ร้อยละ)</b>	9 (8.3)	0	0.221
<b>การกลายพันธุ์ที่ pre-s จำนวนทั้งหมด 23 (ร้อยละ)</b>	22 (20.4)	1 (9.1)	0.017
<b>การตรวจหาปริมาณไวรัส จำนวนทั้งหมด 132 (ร้อยละ)</b>			
ปริมาณไวรัส (> 10 <sup>2</sup> copies/mL)	48 (39.7)	11 (100)	
mean±SD (log copies/mL)	7.1±2.0	8.0±2.2	0.123
ปริมาณไวรัส (< 10 <sup>2</sup> copies/mL)	84 (69.4)	0	
<b>การตรวจหา HBeAg จำนวนทั้งหมด 132 (ร้อยละ)</b>			
ให้ผลบวกต่อ HBeAg จำนวนทั้งหมด 19 (ร้อยละ)	13 (10.7)	6 (54.5)	<0.001
ให้ผลลบต่อ HBsAg จำนวนทั้งหมด 113 (ร้อยละ)	108 (89.3)	5 (45.5)	
ตัวอย่างที่ตรวจพบ จำนวนทั้งหมด 56 ตัวอย่าง	48	8	
<b>การกลายพันธุ์ที่ BCP จำนวนทั้งหมด 31 (ร้อยละ)</b>	30 (62.5)	1 (12.5)	0.042
<b>การกลายพันธุ์ที่ PC จำนวนทั้งหมด 17 (ร้อยละ)</b>	17 (35.4)	0	0.052



## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

หลังจากประเทศไทยเริ่มมี EPI program ตั้งแต่ปี 2535 ทำให้ในปัจจุบัน อุบัติการณ์ของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีแนวโน้มลดลง การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องเพื่อประเมินผลกระทบของการให้วัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในประชากรไทย โดยทำการศึกษาในแนวลึกทางด้านระบาดวิทยาในระดับโมเลกุล โดยการทำให้ molecular characterization ของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทย ผลของการศึกษานี้ทำให้พบลักษณะที่ผิดปกติจากปกติของไวรัสตับอักเสบบี เช่น deletion และ point mutation ในส่วนของ HBsAg ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างจากประชากรชาวไทย อายุระหว่าง 1-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ตัวอย่างซีรัมที่ใช้เก็บรวบรวมมาจากจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ ภาคเหนือเก็บจากจังหวัด พิจิตร โลกและอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บจากจังหวัด ขอนแก่น ภาคกลางเก็บจากจังหวัด พระนครศรีอยุธยาและลพบุรี และภาคใต้เก็บจากจังหวัด ตรังและนราธิวาส โดยตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด 5,964 ตัวอย่าง พบว่ามีอัตราผู้ติดเชื้อที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg ด้วยวิธี ELISA จำนวน 132 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.2 โดยการติดเชื้อมีแนวโน้มลดลงจากการศึกษาของ Suwannakarn และคณะ เมื่อปี พ.ศ. 2547 ที่พบผู้ติดเชื้อร้อยละ 4 (1) โดยส่วนใหญ่อายุเฉลี่ยของผู้ที่ติดเชื้อจะสูงกว่า 40 ปีขึ้นไป และจากการศึกษาของ Chongsrisawat และคณะพบว่าในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 18 ปีพบการติดเชื้อในปัจจุบันลดลงจากปี พ.ศ. 2542 อย่างมาก (65) จากการนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBsAg ทั้งหมด 132 ตัวอย่าง พบ 19 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 14.4 ที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg และพบผู้ที่ให้ผลลบต่อ HBeAg 123 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 93.2 ผลของ PCR นั้น มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับช่วงระยะการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส (active HBV replication) และเป็นระยะที่สามารถแพร่เชื้อได้สูง ดังนั้นในระยะนี้จึงสามารถตรวจพบ HBsAg ในซีรัมได้ ในขณะที่บางคนตรวจโดยวิธี PCR ไม่พบ HBsAg อาจเป็นเพราะเชื้อไม่อยู่ในระยะการแบ่งตัวและไม่มีเชื้อไวรัสอยู่ในซีรัมก็เป็นได้

จากการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี semi-nested PCR ของยีน *pre-S1* จนถึงบริเวณ “a” determinant พบว่าให้ผลบวกจำนวน 119 ตัวอย่าง คิดเป็น ร้อยละ 90.2 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม viral genotyping tool และ วิธี Phylogenetic analysis พบว่าจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อวิธี PCR 119 ตัวอย่าง สามารถจำแนกอยู่ใน สายพันธุ์ C มากที่สุดจำนวน 111 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 93.3 ทั้งหมดเป็น subgenotype C1 และ สายพันธุ์ B จำนวน 8 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 6.7 ทั้งหมดเป็น subgenotype B2 ซึ่งไม่แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Suwannakarn และคณะ ที่พบสาย

พันธุ์ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ C (ร้อยละ 87.1) และ B (ร้อยละ 11.6) เช่นกันนอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ A (ร้อยละ 1.3) ในการศึกษาครั้งก่อนด้วย และการศึกษาที่แตกต่างจากการศึกษาของ Wang และคณะ (32) ที่มณฑลยูนนาน ประเทศจีนที่อยู่ในทวีปเอเชียเหมือนกันซึ่งพบ สายพันธุ์ B, C, D และ I รวมถึง subgenotype ที่พบได้แก่ B2, C1, C2, C5, และ C7 ซึ่งมีความแตกต่างกันเช่นกัน เมื่อศึกษาในกลุ่มที่เกิดก่อน EPI และกลุ่มที่เกิดหลัง EPI พบว่าสายพันธุ์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ที่มีสายพันธุ์ C จะมีความรุนแรงของโรคมมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ (36, 66)

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ “a” determinant เพื่อทำการจำแนก subtype โดยการแปลงให้เป็นลำดับกรดอะมิโนและจำแนกความแตกต่างจากกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 122 กับ 160 สามารถจำแนก subtype ได้เป็น adr พบร้อยละ 88.24, adw พบร้อยละ 9.24 และ ayr พบร้อยละ 2.52 การกระจายตัวของ subtype adr พบทุกภูมิภาคแต่พบ subtype adw และ ayr เฉพาะภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง โดยทั่วไป ไวรัสตับอักเสบ บี ที่พบในประเทศไทย และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ genotype C จะมี subtype เป็น adr และ ayr genotype B จะมี subtype เป็น adw (64) จากการศึกษาพบว่า genotype C ส่วนใหญ่จะมี subtype เป็น adr และ genotype B ทั้งหมดจะมี subtype เป็น adw แต่มี genotype C บางตัวที่มี subtype เป็น ayr ซึ่งสามารถพบได้บ่อยใน genotype C โดยการศึกษาที่แตกต่างจากการศึกษาของ Suwannakarn และคณะ ที่พบ genotype B ซึ่งมี subtype ayw จากความหลากหลายของ subtype ที่เพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นถึงบริเวณ “a” determinant มีความหลากหลายที่เพิ่มขึ้นจากเดิมเมื่อศึกษาในกลุ่มที่เกิดก่อน EPI และกลุ่มที่เกิดหลัง EPI พบว่า subtype ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากประชากรตัวอย่างในแต่ละภาคมีจำนวนไม่เท่ากันทำให้การกระจายตัวของ subtype ในแต่ละภาคไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการจำแนก subtype ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนบน HBsAg เพียงบางตำแหน่งเท่านั้นบางครั้ง subtype อาจสามารถเปลี่ยนได้โดยการเปลี่ยนของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงตัวเดียวบน S gene (45) โดยไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางคลินิกแต่อย่างใด

การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant พบว่าทำให้เกิด การกลายพันธุ์ escape mutant พบการกลายพันธุ์จำนวน 9 คนคิดเป็นร้อยละ 7.6 โดยพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G145R, T126S/N, Q129H และ D144A ในการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant เพิ่มขึ้นจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2547 ที่พบในตำแหน่ง T126N จำนวน 4 คน แต่ส่วนใหญ่พบในผู้ที่มีอายุมากกว่า 50 ปีแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับ การได้รับวัคซีน อาจเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติก็เป็นได้ โดยจากการศึกษาของ Theamboonlers และคณะ พบผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์ที่ส่วนของ “a” determinant ในผู้ที่ได้รับ

วัคซีนมากกว่าผู้ที่ไม่ได้รับวัคซีนแต่การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทั้งสองกลุ่มนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (67) และในงานวิจัยนี้ยังแตกต่างจากการศึกษาของ Hsu และคณะ ที่ทำการศึกษาในประเทศไต้หวันแล้วพบว่าหลังจากมีการให้วัคซีนไปแล้วเป็นเวลา 15 ปี ในประชากรเด็กพบการกลายพันธุ์ที่ส่วนของ “a” determinant เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7.8 ไปเป็นร้อยละ 23.1 (47) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างงานวิจัยนี้และงานวิจัยในประเทศไต้หวันอาจยังสรุปไม่ได้ว่าวัคซีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ที่ส่วนของ “a” determinant เนื่องจากจำนวนประชากรที่ใช้ในการศึกษาในไต้หวันและที่ใช้ในงานวิจัยนี้แตกต่างกัน ประเทศไต้หวันเริ่มมี EPI มาก่อนประเทศไทยทำให้ระยะเวลาการเริ่มให้วัคซีนแตกต่างกันซึ่งอาจเป็นปัจจัยทำให้ประเทศไต้หวันพบการกลายพันธุ์มากกว่า ในการวิจัยนี้ไม่ได้รับประวัติการได้รับวัคซีนจึงทำให้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลได้ยาก หรืออาจเป็นเพราะประชากรเด็กที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้อาจไม่ได้รับวัคซีนทั้งหมดก็เป็นได้ การกลายพันธุ์ที่บริเวณนี้จะทำให้การตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแฝง (occult HBV infection) ผิดพลาดได้ (68, 69) เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ S gene ยังมีการสร้าง HBsAg อยู่แต่ในปริมาณที่น้อยลง เมื่อศึกษาในกลุ่มที่เกิดก่อน EPI และกลุ่มที่เกิดหลัง EPI พบว่าการกลายพันธุ์ในส่วนของ “a” determinant ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ในส่วนของ *pre-S* gene ทั้งหมด 23 ตัวอย่างร้อยละ 19.3 โดยการกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 4 แบบดังนี้ 1.) *pre-S2* deletion พบมากที่สุด 15.99% 2.) *pre-S2* start codon mutation พบ 4.20% 3.) *pre-S1* deletion พบ 2.52% 4.) *pre-S2* deletion and start codon mutation พบน้อยที่สุด 0.84% และการกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่ก่อให้เกิด frame shift mutation แต่อย่างใด เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลของตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์พบว่า ส่วนอายุของผู้ที่เกิดการกลายพันธุ์  $45.9 \pm 12.4$  ปี ซึ่งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์มีอายุเฉลี่ย  $39.8 \pm 13.9$  ปี อายุเฉลี่ยทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p = 0.062$ ) การศึกษาก่อนหน้าพบการกลายพันธุ์ในส่วนของ *pre-S* gene เพียง 14 ตัวอย่างร้อยละ 9.5 และในกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์จะมีอายุเฉลี่ยมากกว่าในกลุ่มที่ไม่มีมีการกลายพันธุ์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มที่เกิดก่อน EPI พบว่ามีการกลายพันธุ์ในส่วนของ *pre-S* gene มากกว่าในกลุ่มที่เกิดหลัง EPI ซึ่งกลุ่มทั้งสองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยถ้าผู้ป่วยมีการติดเชื้อมาหลายปีจึงทำให้ระยะเวลาในการดำเนินโรคนานขึ้นจึงมีโอกาที่เชื้อไวรัสจะกลายพันธุ์จนนำไปสู่อาการที่รุนแรงขึ้น (70) จากการศึกษาในหลายรายงานพบว่าการกลายพันธุ์ในส่วนของ *pre-S* โดยเฉพาะ *pre-S1* deletion หรือ *pre-S2* deletion ทำให้การสร้าง large protein หรือ large hepatitis B surface protein (LHBs) และ medium hepatitis B surface protein (MHBs) ไม่เป็นไปตามปกติ และมีการสะสมโปรตีนที่ผิดปกตินี้ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum, ER) มาก

ขึ้นจึงทำให้เกิดความเครียดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER stress) แล้วยังมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้นอีกด้วย ดังนั้นผลที่เกิดตามมาคือดีเอ็นเอในเซลล์ดับถูกทำลายมากขึ้นและอาจนำไปสู่สภาวะขาดความเสถียรของจีโนม (genomic instability) และเมื่อติดตามต่อไปกลไกดังกล่าวอาจนำไปสู่การพัฒนาเกิดเป็นโรคตับอักเสบและมะเร็งตับในอนาคต (8)

จากผลการวิเคราะห์ HBeAg พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg จำนวน 19 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 13.38 การตรวจพบ HBeAg ในตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อมีประโยชน์ทางคลินิก เนื่องจากเป็นตัวบ่งชี้ว่ากำลังอยู่ในระยะที่มีเชื้อไวรัสในเลือดจำนวนมาก (40) เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับการตรวจปริมาณไวรัสในเลือด (HBV DNA) พบว่าทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg จะตรวจพบปริมาณไวรัสในเลือดสูงด้วย แต่ในประชากรที่ศึกษาส่วนใหญ่พบตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อ HBeAg จำนวน 117 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 86.03 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีมาแล้วในประเทศจีนจะพบผู้ที่ให้ผลลบต่อ HBeAg มากกว่าผู้ที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg (71) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสาเหตุที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสแต่ตรวจไม่พบ HBeAg เนื่องจากการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg ที่ตำแหน่ง basic core promoter (BCP) และ *precore* (PC) (9)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Basic core promoter (BCP) และ *precore* (PC) gene โดยการกลายพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 แบบดังนี้ 1.) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1762T/G1764A ที่บริเวณ Basic core promoter พบ 23 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 23.53 จากการศึกษาพบการกลายพันธุ์นี้ทั้งในประชากรที่ให้ผลลบต่อ HBeAg และในประชากรที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg โดยการกลายพันธุ์นี้จะทำให้สร้าง HBeAg ลดลง แต่จากการศึกษานี้ยังพบ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ HBeAg หรือตัวอย่างที่สามารถสร้าง HBeAg ได้ อาจมีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบบี เป็นไวรัสที่อยู่ร่วมกันจำนวนมากจึงอาจมีเชื้อไวรัสที่เป็น wild type บางตัวสามารถสร้าง HBeAg ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มที่เกิดก่อน EPI พบว่าการกลายพันธุ์ในส่วนของ BCP มีจำนวนมากกว่าในกลุ่มที่เกิดหลัง EPI อย่างมีนัยสำคัญ 2.) การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง G1896A/ G1899A พบ 17 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 14.29 การกลายพันธุ์นี้พบส่วนใหญ่ในประชากรที่ให้ผลลบต่อ HBeAg การกลายพันธุ์นี้ทำให้ไม่สามารถสร้าง HBeAg ได้ แต่จากการศึกษานี้ยังพบ ตัวอย่างที่สามารถสร้าง HBeAg ได้โดยสาเหตุมาจากยังมีการสร้าง HBeAg อยู่แต่ประสิทธิภาพในการตรวจจับของชุด kits ต่ำ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบ HBeAg ได้ จากการศึกษาพบในกลุ่มที่เกิดก่อนและหลัง EPI มีการกลายพันธุ์ในส่วนของ PC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเนื่องจากการกลายพันธุ์ที่ A1762T และ G1764A พบในเชื้อไวรัส genotype C มากกว่า genotype B ด้วยเหตุนี้การติดเชื้อไวรัส genotype C มีการดำเนินของโรคที่รุนแรงกว่า genotype B (10) จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ทั้งสองส่วนมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคตับอักเสบบีเรื้อรังโดยเฉพาะการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับ

จากการศึกษาทำให้ทราบถึงระบาดวิทยาในระดับโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทยซึ่งในปัจจุบันลดลงเหลือเพียง 2.2% และในระยะเวลาอันใกล้ประเทศไทยน่าจะอยู่ในภูมิภาคที่มีความชุกของการติดเชื้อที่ต่ำ และ genotype ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังเป็น genotype C กระจายตามภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยดังเช่นการศึกษาก่อนหน้านี้ การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในส่วนของ “a” determinant ที่เป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดการกลายพันธุ์ vaccine escape mutant นั้นในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอาจไม่เกี่ยวข้องกับการได้รับวัคซีนมาก่อนเนื่องจากพบผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์นั้นมีอายุมาก และการกลายพันธุ์ในตำแหน่งอื่นได้แก่ *pre-S1*, *pre-S2*, BCP และ PC พบในคนที่มีอายุมากเช่นกัน การกลายพันธุ์ที่เกิดอาจเป็นเพราะเมื่อระยะเวลาผ่านไปเชื้อไวรัสอาจเกิดการหลบหลีกจากการทำลายของระบบภูมิคุ้มกัน โดยการกลายพันธุ์ที่บริเวณ BCP และ PC ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง HBeAg ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นตัวบ่งบอกชี้ถึงว่าไวรัสกำลังมีการเพิ่มจำนวนอยู่ในเลือด

ข้อจำกัดของงานวิจัยนี้คือการเลือกประชากรที่จะนำมาศึกษาส่วนใหญ่ไม่ทราบประวัติการเจ็บป่วย ประวัติวัคซีน ประวัติการดื่มเหล้าและสูบบุหรี่ ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์และประเมินผลประสิทธิภาพในการตรวจทาง serological test ของงานวิจัยนี้ sensitivity ของเครื่องไม่สามารถตรวจได้ถึง 100% ทำให้ผลที่ได้ อาจเป็นผลบวกปลอมหรือผลลบปลอมมีผลต่อการประเมินผลอาจเกิดการคลาดเคลื่อนได้ การตรวจหา genotype และการกลายพันธุ์ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี direct sequencing เป็นการตรวจเฉพาะในประชากรส่วนใหญ่เท่านั้น ซึ่ง sensitivity อาจยังไม่เพียงพอในการวัดได้ถึงกลุ่มประชากรที่มีอยู่จำนวนน้อยได้ การวัดปริมาณของ HBsAg ในงานวิจัยนี้ใช้ค่า S/CO (sample rate / cut off rate) ไม่ได้ทำการวัดเป็นปริมาณที่แน่นอนทำให้ยากต่อการแปลผล และในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการตรวจค่าการทำงานของตับ (ALT) ในผู้ป่วยทำให้ขาดข้อมูลที่สำคัญในการประเมินผลต่อไป

ปัจจุบันพบผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทยลดลงจากการศึกษาในปี พ.ศ. 2547 และจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงระบาดวิทยาโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบบี ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็น genotype C และไม่พบว่าการฉีดวัคซีนทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในบริเวณ “a” determinant เพิ่มขึ้น และพบการกลายพันธุ์ในส่วน of *pre-S* gene ในตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์ในส่วน BCP และ PC ซึ่งการกลายพันธุ์ทั้งส่วนนี้ทำให้เกิดตับแข็งและมะเร็งตับในอนาคต ผลของการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับไวรัสตับอักเสบบี รวมถึงเป็นประโยชน์ในการพัฒนาแผนการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ต่อไป

### รายการอ้างอิง

1. Suwannakarn K, Tangkijvanich P, Thawornsuk N, Theamboonlers A, Tharmaphornpilas P, Yoocharoen P, et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of pre-S and S genes. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2008;38(3):244-51.
2. Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *The New England journal of medicine*. 2008;359(14):1486-500.
3. Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet*. 2009;373(9663):582-92.
4. Lok AS, Lai CL. A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children. *Hepatology*. 1988;8(5):1130-3.
5. Villeneuve JP, Desrochers M, Infante-Rivard C, Willems B, Raymond G, Bourcier M, et al. A long-term follow-up study of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive carriers in Montreal. *Gastroenterology*. 1994;106(4):1000-5.
6. Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2009;15(46):5761-9.
7. Weber B. Recent developments in the diagnosis and monitoring of HBV infection and role of the genetic variability of the S gene. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(1):75-91.
8. Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer science*. 2006;97(8):683-8.
9. Chotiyaputta W, Lok AS. Hepatitis B virus variants. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2009;6(8):453-62.
10. Yuen MF, Sablon E, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Doutrelouine J, et al. Epidemiological study of hepatitis B virus genotypes, core promoter and precore mutations of chronic hepatitis B infection in Hong Kong. *Journal of hepatology*. 2004;41(1):119-25.
11. Gerlich WH, Robinson WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell*. 1980;21(3):801-9.

12. Harrison TJ. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Seminars in liver disease*. 2006;26(2):87-96.
13. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. *Virus research*. 2007;127(2):164-76.
14. Locarnini S. Molecular virology and the development of resistant mutants: implications for therapy. *Seminars in liver disease*. 2005;25 Suppl 1:9-19.
15. Hatton T, Zhou S, Stranding DN. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *Journal of virology*. 1992;66(9):5232-41.
16. Persing DH, Varmus HE, Ganem D. The preS1 protein of hepatitis B virus is acylated at its amino terminus with myristic acid. *Journal of virology*. 1987;61(5):1672-7.
17. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2003;38(5):1075-86.
18. Zhang Z, Torii N, Hu Z, Jacob J, Liang TJ. X-deficient woodchuck hepatitis virus mutants behave like attenuated viruses and induce protective immunity in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(10):1523-31.
19. Cross JC, Wen P, Rutter WJ. Transactivation by hepatitis B virus X protein is promiscuous and dependent on mitogen-activated cellular serine/threonine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(17):8078-82.
20. Hu Z, Zhang Z, Kim JW, Huang Y, Liang TJ. Altered proteolysis and global gene expression in hepatitis B virus X transgenic mouse liver. *Journal of virology*. 2006;80(3):1405-13.
21. Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *Journal of virology*. 2004;78(23):12725-34.
22. Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus. *Intervirology*. 2014;57(3-4):141-50.
23. Deterding K, Constantinescu I, Nedelcu FD, Gervain J, Nemecek V, Srtuneky O, et al. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe. *Journal of medical virology*. 2008;80(10):1707-11.

24. Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes in Europe. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2007;37(s1):S20-6.
25. Kramvis A, Kew MC. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2007;37(s1):S9-S19.
26. Sakamoto T, Tanaka Y, Orito E, Co J, Clavio J, Sugauchi F, et al. Novel subtypes (subgenotypes) of hepatitis B virus genotypes B and C among chronic liver disease patients in the Philippines. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 7):1873-82.
27. Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti S, et al. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. *Journal of viral hepatitis*. 2009;16(10):749-56.
28. Hubschen JM, Andernach IE, Muller CP. Hepatitis B virus genotype E variability in Africa. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;43(4):376-80.
29. Garmiri P, Loua A, Haba N, Candotti D, Allain JP. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 10):2442-51.
30. Osiowy C, Gordon D, Borlang J, Giles E, Villeneuve JP. Hepatitis B virus genotype G epidemiology and co-infection with genotype A in Canada. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 12):3009-15.
31. Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, et al. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *The Journal of infectious diseases*. 2007;195(1):5-11.
32. Wang B, Feng Y, Li Z, Duan H, Zhao T, Zhang A, et al. Distribution and diversity of hepatitis B virus genotypes in Yunnan, China. *Journal of medical virology*. 2014;86(10):1675-82.
33. Schaefer S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(1):14-21.



34. Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *Journal of viral hepatitis*. 1999;6(4):299-304.
35. Halfon P, Bourliere M, Pol S, Benhamou Y, Ouzan D, Rotily M, et al. Multicentre study of hepatitis B virus genotypes in France: correlation with liver fibrosis and hepatitis B e antigen status. *Journal of viral hepatitis*. 2006;13(5):329-35.
36. Tangkijvanich P, Mahachai V, Komolmit P, Fongsarun J, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Thailand. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2005;11(15):2238-43.
37. Lin CL, Kao JH. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. *Journal of biomedical science*. 2008;15(2):137-45.
38. Hollinger FB. Hepatitis B virus genetic diversity and its impact on diagnostic assays. *Journal of viral hepatitis*. 2007;14 Suppl 1:11-5.
39. Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annual review of pathology*. 2006;1:23-61.
40. Liang TJ. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*. 2009;49(5 Suppl):S13-21.
41. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus research*. 2008;134(1-2):235-49.
42. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(1):48-64.
43. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinics in liver disease*. 2007;11(4):685-706, vii.
44. Rodriguez-Frias F, Buti M, Tabernero D, Homs M. Quasispecies structure, cornerstone of hepatitis B virus infection: mass sequencing approach. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(41):6995-7023.
45. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;32(2):102-12.

46. Pourkarim MR, Sharifi Z, Soleimani A, Amini-Bavil-Olyaei S, Elsadek Fakhr A, Sijmons S, et al. Evolutionary analysis of HBV "S" antigen genetic diversity in Iranian blood donors: a nationwide study. *Journal of medical virology*. 2014;86(1):144-55.
47. Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut*. 2004;53(10):1499-503.
48. Bian T, Yan H, Shen L, Wang F, Zhang S, Cao Y, et al. Change in hepatitis B virus large surface antigen variant prevalence 13 years after implementation of a universal vaccination program in China. *Journal of virology*. 2013;87(22):12196-206.
49. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common mutants. *Seminars in liver disease*. 2003;23(1):5-20.
50. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 6):1267-80.
51. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*. 2000;31(5):1037-44.
52. Malmassari SL, Deng Q, Fontaine H, Houitte D, Rimlinger F, Thiers V, et al. Impact of hepatitis B virus basic core promoter mutations on T cell response to an immunodominant HBx-derived epitope. *Hepatology*. 2007;45(5):1199-209.
53. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007;26(15):2166-76.
54. Parekh S, Zoulim F, Ahn SH, Tsai A, Li J, Kawai S, et al. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *Journal of virology*. 2003;77(12):6601-12.
55. Jammeh S, Tavner F, Watson R, Thomas HC, Karayiannis P. Effect of basal core promoter and pre-core mutations on hepatitis B virus replication. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 4):901-9.
56. Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of two new automated assays for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):135-43.

57. Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *Journal of hepatology*. 2006;44(1 Suppl):S71-6.
58. Servoss JC, Friedman LS. Serologic and molecular diagnosis of hepatitis B virus. *Clinics in liver disease*. 2004;8(2):267-81.
59. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S173-81.
60. Yuen MF. Revisiting the natural history of chronic hepatitis B: impact of new concepts on clinical management. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(7):973-6.
61. Fung J, Lai CL, Yuen MF. Hepatitis B virus DNA and hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *Expert review of anti-infective therapy*. 2010;8(6):717-26.
62. Sa-Nguanmoo P, Tangkijvanich P, Tharmaphornpilas P, Rasdjarmrearnsook AO, Plianpanich S, Thawornsuk N, et al. Molecular analysis of hepatitis B virus associated with vaccine failure in infants and mothers: a case-control study in Thailand. *Journal of medical virology*. 2012;84(8):1177-85.
63. Payungporn S, Tangkijvanich P, Jantaradsamee P, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Simultaneous quantitation and genotyping of hepatitis B virus by real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of virological methods*. 2004;120(2):131-40.
64. Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47(6):289-309.
65. Chongsrisawat V, Yoocharoen P, Theamboonlers A, Tharmaphornpilas P, Warinsathien P, Sinlaparatsamee S, et al. Hepatitis B seroprevalence in Thailand: 12 years after hepatitis B vaccine integration into the national expanded programme on immunization. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2006;11(10):1496-502.
66. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. *Journal of viral hepatitis*. 2005;12(2):111-24.
67. Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Jantaradsamee P, Poovorawan Y. Variants within the "a" determinant of HBs gene in children and adolescents with and without

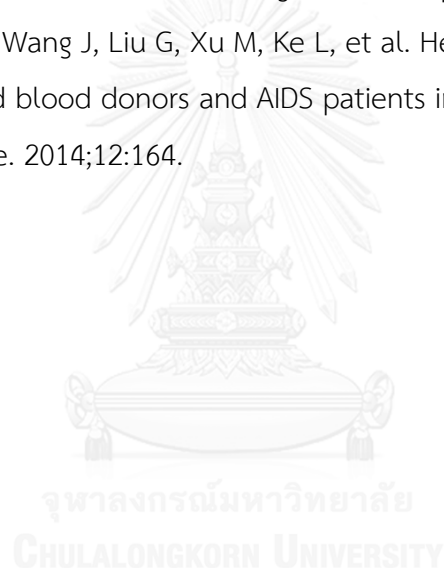
hepatitis B vaccination as part of Thailand's Expanded Program on Immunization (EPI). *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2001;193(3):197-205.

68. Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, Roig R, Casamitjana N, Iudicone P, et al. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or genotype D strains. *Journal of hepatology*. 2008;49(4):537-47.

69. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 2008;49(4):652-7.

70. Perrillo RP. Hepatitis B surface antigen quantification as a current-day paradox: obtaining the gold in the face of diminishing returns. *Hepatology*. 2009;49(4):1063-5.

71. Liu Y, Zeng P, Wang J, Liu G, Xu M, Ke L, et al. Hepatitis B virus infection in a cohort of HIV infected blood donors and AIDS patients in Sichuan, China. *Journal of translational medicine*. 2014;12:164.





## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. 5x Tris borate buffer (5x TBE) ปริมาตร 1,000 ml เตรียมโดยเตรียมสารต่างๆ ดังนี้

- 1.1 Tris-base 54 g
- 1.2 Boric acid 27.5 g
- 1.3 0.5 M EDTA 20 ml

เมื่อเตรียมสารต่างๆ ได้ตามปริมาณที่ต้องการแล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณ 1,000 ml แล้ว ผสมให้เข้ากัน เมื่อจะใช้งานจะเตรียมเป็น 1x Tris borate buffer (1x TBE) โดยเติม 5xTBE ปริมาตร 200 ml แล้วจึงเติมน้ำกลั่นลงไป 800 ml แล้วผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. 2% โดยมวลต่อปริมาตร (w/v) agarose gel เตรียมโดยเตรียมสารต่างๆ ดังนี้

- 1.1 Agarose 2 g
- 2.1 1x TBE buffer 100 ml

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose จะละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. 10% ethidium bromide

- 1.1 Ethidium bromide 30  $\mu$ l
- 1.2 น้ำกลั่น 300  $\mu$ l

4. loading dye

- 0.25% Bromphenol blue
- 40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 ml แล้วเก็บที่ 4 °C

5. Proteinase K (20 mg/ml)

- Proteinase K 100 mg
- Distilled water 5 ml

## 6. Lysis buffer

Tris – HCl 0.105 g

EDTA 0.1245 g

SDS 0.335 g

น้ำกลั่น 50 ml

## การเตรียมสารเคมีในการทำ DNA cloning

## 1. การเตรียม LB agar 100 ml

1.1 Agar 1.5 g

1.2 Yeast extract 0.5 g

1.3 Peptone 1 g

1.4 NaCl 0.5 g

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch<sup>2</sup> ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นรอกให้อุณหภูมิลดลง แล้วจึงเติม ampicilin 100 µg/ml แล้วจึงเทใส่ plate ปริมาตร 35 ml/plate

## 2. การเตรียม LB broth 50 ml

1.1 Yeast extract 0.25 g

1.2 Peptone 0.5 g

1.3 NaCl 0.25 g

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 50 ml แล้วนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วย วิธีการ autoclave ที่ความดัน 15 lb/inch<sup>2</sup> ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

## 3. การเตรียม SOC medium 100 ml

1.1 Yeast extract 0.5 g

1.2 Peptone 2 g

1.3 NaCl 1 mg

1.4 KCl 0.25 mg

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรเป็น 100 ml จากนั้นเติม glucose และ Mg<sup>2+</sup> อย่างละ 100 µl

## ภาคผนวก ข

## ข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

code	sex	age	PCR	genotype	subtype	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs
KK0410	F	33	+	C	adr	3814.58 S/CO	15.04 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0424	F	49	+	C	adr	1857.05 S/CO	13.53 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0429	F	36	+	C	adr	1579.07 S/CO	13.14 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0445	F	51	+	C	adr	2722.77 S/CO	13.85 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0513	F	56	+	C	adr	4537.71 S/CO	16.03 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0545	M	39	+	C	adr	3461.51 S/CO	13.36 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0560	F	23	+	C	adr	740.63 S/CO	11.93 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0565	F	44	+	C	adr	1.52 S/CO	0.15 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0582	M	43	+	C	adr	4852.76 S/CO	13.67 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0681	F	45	+	C	adr	3327.21 S/CO	13.77 S/CO	0.19 mIU/mL
KK0685	F	41	+	C	adr	3956.89 S/CO	14.92 S/CO	0.18 mIU/mL
KK0753	F	33	+	C	adr	3976.16 S/CO	14.10 S/CO	0.03 mIU/mL
KK0757	M	52	+	C	ayr	3597.58 S/CO	14.42 S/CO	0.14 mIU/mL
KK0758	M	54	+	C	adr	5259.52 S/CO	13.70 S/CO	0.06 mIU/mL
KK0759	F	32	ND	ND	ND	4.46 S/CO	0.12 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0777	M	34	ND	ND	ND	1.88 S/CO	0.19 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0801	M	13	+	C	adr	1539.58 S/CO	10.95 S/CO	0.00 mIU/mL
KK0915	F	7	ND	ND	ND	3.08 S/CO	0.47 S/CO	0.91 mIU/mL
KK0957	F	8	ND	ND	ND	1.03 S/CO	0.07 S/CO	0.80 mIU/mL
KK1159	F	55	+	C	adw	6053.55 S/CO	16.09 S/CO	0.56 mIU/mL
KK1178	F	57	+	C	adr	887.40 S/CO	12.58 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1184	F	33	+	C	adr	3576.34 S/CO	14.03 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1194	F	59	+	C	adr	2.69 S/CO	14.00 S/CO	0.42 mIU/mL
KK1210	F	59	+	C	adr	6249.29 S/CO	14.03 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1270	M	32	+	C	adr	3963.45 S/CO	14.19 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1272	F	40	+	C	adr	3005.15 S/CO	16.97 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1277	F	28	+	C	adr	2919.60 S/CO	14.02 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1309	M	50	+	C	adr	5405.07 S/CO	15.25 S/CO	0.43 mIU/mL
KK1313	F	55	+	C	adr	3493.31 S/CO	15.62 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1315	F	55	+	C	adr	5356.65 S/CO	14.49 S/CO	0.02 mIU/mL
KK1401	M	40	+	C	adr	1171.75 S/CO	13.38 S/CO	0.08 mIU/mL



code	sex	age	PCR	genotype	subtype	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs
KK1428	M	52	+	C	adr	216.31 S/CO	10.52 S/CO	0.51 mIU/mL
KK1435	F	39	+	C	adr	5826.30 S/CO	14.38 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1443	F	55	+	C	adr	5185.42 S/CO	15.56 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1445	M	42	+	C	adr	3814.29 S/CO	15.10 S/CO	1.01 mIU/mL
KK1456	F	26	+	C	adr	2537.11 S/CO	14.07 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1489	M	25	ND	ND	ND	6325.75 S/CO	13.73 S/CO	0.29 mIU/mL
KK1532	F	33	+	C	adr	5171.00 S/CO	14.17 S/CO	0.64 mIU/mL
KK1557	M	23	+	C	adr	5524.33 S/CO	14.12 S/CO	0.00 mIU/mL
KK1582	M	25	ND	ND	ND	4954.52 S/CO	14.18 S/CO	2.75 mIU/mL
KK1597	F	35	ND	ND	ND	1.06 S/CO	8.44 S/CO	166.34mIU/mL
KK1603	M	23	+	C	adr	4853.68 S/CO	13.91 S/CO	0.94 mIU/mL
KK1751	M	22	+	C	adr	663.17 S/CO	11.52 S/CO	0.47 mIU/mL
KK1762	M	21	+	C	adr	2.51 S/CO	0.10 S/CO	2.65 mIU/mL
LP0006	M	51	+	C	adr	7078.85 S/CO	13.00 S/CO	0.17 mIU/mL
LP0018	M	25	+	B	adw	6219.41 S/CO	12.71 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0033	M	37	-	-	-	1551.74 S/CO	13.15 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0245	M	58	+	C	adr	3879.52 S/CO	16.11 S/CO	0.85 mIU/mL
LP0256	F	44	+	C	adr	6087.44 S/CO	15.29 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0265	M	32	+	C	adr	3352.02 S/CO	13.73 S/CO	3.85 mIU/mL
LP0269	M	54	+	C	adr	5563.76 S/CO	13.63 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0333	M	44	+	C	adr	2676.46 S/CO	13.09 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0352	M	24	+	C	adr	5482.70 S/CO	12.78 S/CO	0.07 mIU/mL
LP0428	M	50	+	B	adw	6425.86 S/CO	15.21 S/CO	0.07 mIU/mL
LP0437	M	30	+	C	adr	4593.43 S/CO	13.50 S/CO	2.73 mIU/mL
LP0438	M	52	+	C	adr	3289.30 S/CO	12.57 S/CO	0.25 mIU/mL
LP0451	F	53	+	C	adr	2154.56 S/CO	13.96 S/CO	1.13 mIU/mL
LP0528	M	33	+	C	adr	2992.16 S/CO	13.87 S/CO	1.87 mIU/mL
LP0581	M	44	+	C	adr	4844.94 S/CO	13.19 S/CO	0.07 mIU/mL
LP0609	M	51	+	C	adr	1933.33 S/CO	13.22 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0610	M	48	+	C	adr	4216.10 S/CO	12.15 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0654	M	47	ND	ND	ND	14.81 S/CO	7.40 S/CO	> 1000.00mIU/mL
LP0663	F	27	+	C	adr	4562.51 S/CO	13.68 S/CO	0.00 mIU/mL
LP0704	M	19	+	C	adr	642.66 S/CO	13.53 S/CO	0.09 mIU/mL
LP0716	M	20	+	C	adr	1.27 S/CO	0.07 S/CO	0.47 mIU/mL

code	sex	age	PCR	genotype	subtype	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs
LP0727	M	27	+	C	adr	3.55 S/CO	11.15 S/CO	> 1000.00mIU/mL
LP0768	F	56	ND	ND	ND	2.71 S/CO	14.12 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0042	M	0	+	C	adr	1065.18 S/CO	12.33 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0318	M	44	+	C	adr	1992.70 S/CO	13.31 S/CO	0.04 mIU/mL
AY0385	F	50	ND	ND	ND	1464.29 S/CO	11.13 S/CO	0.26 mIU/mL
AY0388	F	37	+	C	adr	1134.40 S/CO	11.96 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0395	F	15	+	B	adw	1.18 S/CO	12.60 S/CO	55.08 mIU/mL
AY0432	F	20	-	-	-	5002.68 S/CO	11.98 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0447	M	21	+	C	adr	2642.07 S/CO	13.01 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0479	F	59	+	C	adr	3312.07 S/CO	13.35 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0482	M	54	+	C	adr	145.55 S/CO	13.16 S/CO	1.03 mIU/mL
AY0488	F	59	ND	ND	ND	197.75 S/CO	12.44 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0560	F	28	+	C	adr	1030.29 S/CO	12.20 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0569	M	46	ND	ND	ND	5106.40 S/CO	15.46 S/CO	0.07 mIU/mL
AY0571	M	15	+	C	adr	2903.67 S/CO	14.06 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0584	M	47	+	C	ayr	3498.30 S/CO	14.01 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0656	F	52	+	C	adr	4176.96 S/CO	13.22 S/CO	1.55 mIU/mL
AY0698	M	44	+	C	adr	3525.45 S/CO	15.15 S/CO	9.79 mIU/mL
AY0713	F	31	+	C	adr	5112.11 S/CO	13.55 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0730	M	44	+	C	adr	4809.42 S/CO	11.94 S/CO	0.00 mIU/mL
AY0745	M	40	ND	ND	ND	3129.13 S/CO	13.70 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0018	F	49	ND	ND	ND	10.05 S/CO	1.11 S/CO	2.99 mIU/mL
CR0109	F	44	+	C	adr	5776.44 S/CO	14.37 S/CO	2.19 mIU/mL
CR0117	F	48	+	C	adr	4771.00 S/CO	13.34 S/CO	0.74 mIU/mL
CR0120	M	59	+	C	adr	1979.97 S/CO	14.11 S/CO	0.31 mIU/mL
CR0139	F	52	ND	ND	ND	3233.03 S/CO	12.47 S/CO	0.21 mIU/mL
CR0197	F	24	+	C	adr	2699.58 S/CO	14.70 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0226	M	47	+	B	adw	6933.52 S/CO	13.64 S/CO	0.03 mIU/mL
CR0229	M	55	+	C	adr	5103.94 S/CO	11.00 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0250	M	59	+	C	adr	4896.63 S/CO	13.68 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0348	F	34	+	C	adr	3014.52 S/CO	18.30 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0372	M	55	+	C	adw	2742.86 S/CO	10.66 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0395	M	47	+	C	adr	3612.93 S/CO	12.05 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0399	M	51	ND	ND	ND	4582.10 S/CO	11.90 S/CO	0.00 mIU/mL

code	sex	age	PCR	genotype	subtype	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs
CR0401	M	42	+	C	adr	5454.26 S/CO	12.17 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0443	F	53	+	C	adr	3976.47 S/CO	11.43 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0452	F	46	+	C	adr	3614.29 S/CO	19.53 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0464	F	44	+	C	adr	5328.19 S/CO	11.95 S/CO	0.37 mIU/mL
CR0471	M	56	+	B	adw	2672.71 S/CO	11.27 S/CO	0.17 mIU/mL
CR0517	F	46	+	C	adr	4000.30 S/CO	13.87 S/CO	4.80 mIU/mL
CR0918	M	7	+	C	ayr	1563.68 S/CO	13.75 S/CO	0.00 mIU/mL
CR0954	F	44	ND	ND	ND	1928.25 S/CO	14.07 S/CO	0.11 mIU/mL
CR1127	F	46	+	C	adr	6497.80 S/CO	13.61 S/CO	0.00 mIU/mL
CR1163	M	18	ND	ND	ND	16.13 S/CO	2.52 S/CO	0.18 mIU/mL
CR1165	F	34	+	C	adr	6408.83 S/CO	13.32 S/CO	0.06 mIU/mL
CR1177	M	52	+	B	adw	6.30 S/CO	13.12 S/CO	1.25 mIU/mL
CR1234	F	48	+	B	adw	6501.03 S/CO	15.37 S/CO	0.34 mIU/mL
CR1322	M	38	ND	ND	ND	30.78 S/CO	12.30 S/CO	0.23 mIU/mL
CR1347	M	34	+	C	adr	4992.10 S/CO	14.16 S/CO	0.41 mIU/mL
CR1361	F	37	+	B	adw	1375.12 S/CO	13.66 S/CO	0.28 mIU/mL
CR1685	M	30	+	C	adr	3088.99 S/CO	11.72 S/CO	0.66 mIU/mL
CR1714	F	54	+	C	adr	4130.73 S/CO	13.88 S/CO	1.65 mIU/mL
CR1715	F	55	+	C	adr	606.74 S/CO	13.61 S/CO	0.60 mIU/mL
CR1719	F	52	+	C	adw	5525.86 S/CO	12.79 S/CO	0.00 mIU/mL
CR1720	F	51	+	C	adr	5930.44 S/CO	14.06 S/CO	0.00 mIU/mL
CR1740	F	54	+	C	adr	151.46 S/CO	11.69 S/CO	0.00 mIU/mL
CR1812	M	10	+	C	adr	2690.86 S/CO	12.17 S/CO	0.00 mIU/mL
ST0064	M	59	+	C	adr	827.70 S/CO	12.71 S/CO	0.49 mIU/mL
ST0118	F	34	ND	ND	ND	10.19 S/CO	0.11 S/CO	0.50 mIU/mL
ST0119	F	37	+	C	adr	3666.93 S/CO	12.78 S/CO	0.00 mIU/mL
ST0120	F	37	+	C	adr	2.86 S/CO	0.13 S/CO	5.57 mIU/mL
ST0121	F	59	+	C	adr	2574.82 S/CO	14.44 S/CO	0.01 mIU/mL
ST0180	F	47	+	C	adr	4790.73 S/CO	12.87 S/CO	1.30 mIU/mL
ST0236	F	56	ND	ND	ND	2678.37 S/CO	11.98 S/CO	0.00 mIU/mL
ST0301	F	27	+	C	adr	633.78 S/CO	12.76 S/CO	0.99 mIU/mL
ST0340	F	52	+	C	adr	5780.09 S/CO	12.84 S/CO	0.12 mIU/mL
ST0441	F	28	+	C	adr	1707.48 S/CO	12.32 S/CO	0.00 mIU/mL
ST0488	M	31	+	C	adr	758.20 S/CO	10.75 S/CO	0.00 mIU/mL

code	sex	age	PCR	genotype	subtype	HBsAg	Anti-HBc	Anti-HBs
ST0799	M	57	+	C	adr	3766.83 S/CO	10.83 S/CO	0.50 mIU/mL
ST1044	M	48	+	C	adr	6684.67 S/CO	12.71 S/CO	0.16 mIU/mL
ST1066	M	52	+	C	adr	5368.32 S/CO	12.95 S/CO	0.51 mIU/mL
ST1331	M	42	+	C	adr	786.37 S/CO	12.96 S/CO	1.59 mIU/mL
ST1345	F	60	+	C	adr	955.00 S/CO	10.61 S/CO	1.74 mIU/mL
ST1353	F	34	ND	ND	ND	4030.13 S/CO	13.67 S/CO	0.38 mIU/mL
ST1363	F	51	+	C	adr	5497.60 S/CO	13.44 S/CO	0.52 mIU/mL
ST1383	F	54	+	C	adr	5149.68 S/CO	11.75 S/CO	0.18 mIU/mL
ST1428	F	48	ND	ND	ND	5515.19 S/CO	11.52 S/CO	0.38 mIU/mL



**ภาคผนวก ค**

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร  
วารสารกุมารเวชศาสตร์ (Thai Journal of Pediatrics)



## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล : นางสาวปาริฉัตร ยี่มน้อย เพศ หญิง

เกิดเมื่อวันที่ : 18 กันยายน พ.ศ. 2533 อายุ 24 ปี

สัญชาติ : ไทย เชื้อชาติ : ไทย ศาสนา : พุทธ

สถานที่เกิด : โรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ปัจจุบัน : 24/139 ถนนพหลโยธิน แขวงสายไหม เขตสายไหม  
กรุงเทพฯ 10220

ประวัติการศึกษา : ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
(วท.บ.) สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา พ.ศ. 2555

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
(วท.ม.) หลักสูตรชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

วารสารกุมารเวชศาสตร์ (Thai Journal of Pediatrics)