

ความซุก และจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในประเทศไทย



นางสาวศรัณย์ธร สุนันทชัยการ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREVALENCE AND GENOTYPE OF HEPATITIS C VIRUS IN THAILAND

Miss Srunthron Sunanchaikarn

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491852



ศรัณย์ธร สุนันท์ชัยการ : ความชุกและจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทย  
(PREVALENCE AND GENOTYPE OF HEPATITIS C VIRUS IN THAILAND)

อ.ที่ปรึกษา ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ : 85 หน้า.

ไวรัสตับอักเสบ ซี เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันหรือเรื้อรัง มีผู้ติดเชื้อทั่วโลกกว่า 170 ล้านคน ไวรัสตับอักเสบ ซี ถูกจัดจำแนกตามความแตกต่างของรหัสพันธุกรรม ได้เป็น 6 จีโนไทป์ และมีการกระจายของแต่ละจีโนไทป์แตกต่างออกไปตามแต่ละภูมิภาคของโลก ในประเทศไทย พบ 3 จีโนไทป์หลัก คือ จีโนไทป์ 1, 3 และ 6 โดยที่จีโนไทป์ 3 พบมากที่สุด การศึกษานี้ศึกษาระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทย เก็บตัวอย่างจาก 4 จังหวัดตามภูมิภาคของประเทศ ได้แก่ ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย) ภาคกลาง (จังหวัดชลบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุดรธานี) และภาคใต้ (จังหวัดนครศรีธรรมราช) จำนวนทั้งหมด 5825 ตัวอย่าง ตรวจความชุกของ HCV antibody โดยวิธี ELISA พบว่าให้ผลบวกทั้งหมด 125 ตัวอย่าง (2.15%) นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาตรวจสอบหา viral RNA ด้วยวิธี RT-PCR บริเวณ 5'UTR มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 58 (58.00%) ตัวอย่าง และทำการตรวจยืนยันผลบวก PCR ในบริเวณ 5'UTR ด้วยการทำให้ RT-PCR ในบริเวณ core ได้ 50 (86.21%) ตัวอย่าง ถอดรหัสพันธุกรรมและจำแนกจีโนไทป์จำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่าเป็น จีโนไทป์ 3a และ 3b จำนวน 23 (51.11%) และ 1 (2.22%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 1a และ 1b จำนวน 3 (6.66%) และ 12 (26.66%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 2a และ 2c จำนวน 1 (2.22%) และ 1 (2.22%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 6 จำนวน 4 (8.89%) ตัวอย่างตามลำดับ ผลจากการทำให้ RT-PCR ในบริเวณ NS5B ได้ผลบวก 54 (93.11%) ตัวอย่าง สามารถถอดรหัสพันธุกรรมและจำแนกจีโนไทป์ได้ 16 ตัวอย่าง จีโนไทป์ 1a และ 1b จำนวน 3 (18.75%) และ 4 (25.00%) จีโนไทป์ 3a และ 3b จำนวน 6 (37.50%) และ 1 (6.25%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 6 จำนวน 2 (12.50%) ตัวอย่างตามลำดับ พบตัวอย่างที่ให้ผลการจำแนกจีโนไทป์ด้วยยีนสองบริเวณนี้ไม่สัมพันธ์กัน 5 ตัวอย่าง ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป จากผลที่ได้ทำให้ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบ ซี ซึ่งเป็นตัวแทนของทั้งประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันรักษา และวางแผนเฝ้าระวังทางสาธารณสุขต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์  
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต..... *ศรัณย์ธร สุนันท์ชัยการ*  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *ยง ภู่วรวรรณ*

# # 4874788030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: HEPATITIS C VIRUS / GENOTYPE / PREVALENCE / CORE / 5'UTR

SRUNTHRON SUNANCHAİKARN: PREVALENCE AND GENOTYPE OF HEPATITIS  
C IN THAILAND. THESIS ADVISOR: PROF YONG POOVORAWAN, M.D., 85 pp.

Hepatitis C virus is a major cause of acute and chronic hepatitis worldwide. At least 170 million world populations have been infected with this virus. Hepatitis C virus can be classified into 6 major genotypes based on phylogenetic analysis of the genomic sequences. Some genotypes (genotype 1, 2 and 3) are endemic worldwide, while others may be restricted to distinct geographical regions. The 3 major genotypes found in Thailand are genotype 1, 3 and 6. Genotype 3 is the most prevalence genotype in the country. In this study, 5825 serum samples of people of 4 provinces from the North (Chiangrai), North-east (Udonthani), Southern (Nakornsrihammaraj) and Centre (Chonburi) of Thailand were collected and 125 (2.15%) samples were positive for anti-HCV by ELISA. To investigate HCV-RNA, all of the Anti-HCV positive samples were 58 (58.00%) positive performed by RT-PCR based on 5'UTR. Among RNA positive samples, there were 50 (86.21%) core RT-PCR positive samples. These core-PCR positive samples were sequenced and classified into genotype 1a; 3 (6.66%), 1b; 12 (26.66%), 2a; 1 (2.22%), 2c;1 (2.22%), 3a; 23 (51.11%), 3b; 1 (2.22%) and genotype 6 variants; 4 (8.89%). In case of NS5B RT-PCR, there were 54 (93.11%) positive samples and divided into genotype 1a; 3 (18.75%) 1b; 4 (25.00%), 3a; 6 (37.50%), 3b; 1 (6.25%) and genotype 6 variants; 2 (12.50%). We found that there are 5 irrelevant genotyping results between core and NS5B region. Those results need further investigation. The study revealed an anti-HCV seroprevalence rate representing the whole nation's perspective. In addition, this information might play important roles in public health surveillance and prevention

Field of study: Medical Science

Academic year: 2006

Student's signature: *Srunthron Sunanchaikarn*  
Advisor's signature: *Yong Paw*

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต ในห้องปฏิบัติการที่ทันสมัยเพียบพร้อม ได้ชี้แนะแนวความคิดของการเป็นนักวิจัยที่ดี พร้อมทั้งกรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษาอันมีประโยชน์ และคุณค่ายิ่งต่องานวิจัยนี้มาโดยตลอด ตลอดจนให้ความกรุณาตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกคนที่เกี่ยวข้องกับโครงการประเมินผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันโรคในโรงงานสร้างเสริมภูมิคุ้มกันโรคแห่งชาติ สำนักควบคุมโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และการเก็บรวบรวมน้ำเหลืองผู้ป่วย สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของเจ้าหน้าที่พยาบาล และห้องปฏิบัติการทุกคน จากโรงพยาบาล แพทย์ประจำ จังหวัดเชียงราย นครศรีธรรมราช อุตรธานี และชลบุรี รวมทั้งโรงพยาบาลในชุมชน อำเภอพาน อำเภอแม่จัน อำเภออ่าวอุดม อำเภอบ้านบึง อำเภอภาน์สนิคม อำเภอวังซอ อำเภอหนองหาน อำเภอทุ่งสง อำเภอสิชล รวมทั้งอาสาสมัคร และผู้ป่วยที่ร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจาก เงินทุนวิจัย งบประมาณแผ่นดินผ่านทาง กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสตับอักเสบ และสกว.

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ผู้วิจัย จนบรรลุวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต ในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์เชี่ยวชาญพิเศษหน่วยวิจัยไวรัสตับอักเสบ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ คำแนะนำ กำลังใจ ซึ่งมีค่า และประโยชน์ต่อผู้วิจัยเป็นอย่างมาก

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำแนะนำด้านทะเบียน และประมวลผลการศึกษาดังแต่แรกเข้าศึกษาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เหน็ดเหนื่อยเพื่อให้โอกาสทางการศึกษาที่มีคุณค่า รวมทั้งสนับสนุน ให้ความรัก และกำลังใจจนสำเร็จการศึกษาครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายคำย่อ.....	ฑ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
- คำถามของการวิจัย.....	2
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
- สมมติฐานของการวิจัย.....	3
- กรอบแนวความคิดของการวิจัย.....	3
- ข้อจำกัดของการวิจัย.....	4
- คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....	4
- คำสำคัญ.....	4
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
- ไวรัสตับอักเสบ.....	5
- การค้นพบ.....	5
- อณูกรรมวิธาน.....	6
- ไวรัสตับอักเสบ ซี.....	8
- ลักษณะทางชีวโมเลกุลและโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบ ซี.....	8
- วงชีวิต.....	10
- Cell entry.....	10
- Translation.....	12
- Structural protein.....	15
- Nonstructural protein.....	15

	หน้า
- Replication .....	17
- Diversity of hepatitis C virus.....	17
- HCV genotype.....	18
- HCV genotyping.....	20
- การติดต่อ.....	22
- ลักษณะอาการทางคลินิก.....	22
- การรักษา.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
- รูปแบบการวิจัย.....	26
- ประชากรศึกษา.....	26
- การคำนวณขนาดตัวอย่าง.....	27
- เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย.....	28
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	30
- วิธีการดำเนินการวิจัย.....	31
- การวิเคราะห์ข้อมูล.....	38
บทที่ 4 ผลการการวิเคราะห์ข้อมูล.....	40
- ผลการตรวจด้วย ELISA.....	40
- ผลการตรวจ HCV RNA.....	42
- ผลการตรวจด้วย RT-PCR บริเวณ Core region.....	43
- ผลการตรวจด้วย RT-PCR บริเวณ NS5B region.....	43
- ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Core region.....	45
- Phylogenetic analysis ในส่วนของ Core region.....	49
- ผลการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน.....	54
- ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ NS5B region.....	58
- Phylogenetic analysis ในส่วนของ NS5B region.....	61
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	67
รายการอ้างอิง.....	73
ภาคผนวก.....	78



ภาคผนวก ก.....	79
ภาคผนวก ข.....	80
ภาคผนวก ค.....	83
ภาคผนวก ง.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	85



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงร้อยละความแตกต่างของไวรัสตับอักเสบ ซี จีโนม.....	20
2. Primer และสารต่างๆที่ใช้ในการทำ reverse transcription ของ HCV.....	33
3. แสดงลำดับเบส ของ Primer ที่ใช้ในการทำ PCR.....	34
4. สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ 5'UTR.....	34
5. สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ Core ยีน.....	35
6. สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ NS5B ยีน.....	35
7. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน 5'UTR และ CORE ยีน.....	35
8. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน NS5B ยีน ทั้ง 1 <sup>st</sup> PCR และ 2 <sup>nd</sup> PCR... 36	
9. แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing.....	36
10. อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR cycle Sequencing.....	37
11. แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....	40
12. แสดงผลการตรวจสอบซีรัมตัวอย่างด้วยวิธี PCR.....	42
13. แสดงผลแสดงสรุปผลการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ 5'UTR, Core region และส่วน ของ NS5B ด้วยวิธี PCR ของแต่ละจังหวัด.....	44
14. แสดงร้อยละของตัวอย่างที่สามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้ในส่วนของ Core และ NS5B ของแต่ละจังหวัด.....	45
15. แสดงผลจากการจำแนกจีโนไทป์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region.....	47
16. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแต่ละ genotype.....	54
17. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน ของแต่ละ genotype.....	55
18. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของต่างประเทศ .....	56
19. แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน กับกรดอะมิโนของต่างประเทศ.....	57
20. แสดงผลการจำแนกจีโนไทป์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region.....	59
21. แสดงตัวอย่างที่ให้ผลในการจำแนกจีโนไทป์ไม่สัมพันธ์กัน.....	65
22. สรุปผลการจำแนกจีโนไทป์ ด้วย Core และ NS5B region โดยวิธี Phylogenetic analysis.....	65

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ภาพวาดแสดงอนุภาคของไวรัสตับอักเสบ ซี.....	6
2. แสดงอนุกรมวิธานของไวรัสใน Family <i>Flaviviridae</i> .....	7
3. ภาพวาดแสดงลักษณะอนุภาคของไวรัสตับอักเสบ ซี.....	8
4. แสดงวงชีวิตของไวรัสตับอักเสบ ซี.....	9
5. การเข้าจับของไวรัสตับอักเสบ ซี กับตัวรับบนผิวเซลล์เป้าหมาย.....	10
6. แสดงกระบวนการ Cell entry ของไวรัสตับอักเสบ ซี.....	11
7. แสดงภาพวาดของ โมเลกุลบนผิวเซลล์ CD81 และ SR-BI.....	12
8. แสดงการเรียงตัวของ Genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบ ซี.....	13
9. แสดงโครงสร้างของ 5'UTR.....	14
10. แสดงโครงสร้างของ 3'UTR.....	14
11. แสดงโครงสร้างของโปรตีน NS5B.....	16
12. Dendrogram แสดงการจัดจำแนกไวรัสตับอักเสบ ซี ออกเป็น 6 Type.....	18
13. แสดงการกระจาย Genotype ของไวรัสตับอักเสบ ซี ในแต่ละภูมิภาคของโลก.....	19
14. ภาพแสดงความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ในแต่ละภูมิภาคของโลก.....	22
15. กราฟแสดงระดับของ HCV RNA และเอนไซม์ ALT ของผู้ป่วยแบบเฉียบพลัน.....	23
16. กราฟแสดงระดับของ HCV RNA และเอนไซม์ ALT ของผู้ป่วยแบบเรื้อรัง.....	24
17. กราฟแสดงระยะเวลาการพัฒนาของโรค.....	25
18. กราฟแท่งแสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ELISA ในแต่ละจังหวัดแยกตามช่วง อายุ.....	41
19. กราฟแสดงจำนวนร้อยละผู้ที่ให้ผลบวกต่อ ELISA กับช่วงอายุ แยกตามแต่ละจังหวัด.....	41
20. แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของ 5'UTR.....	42
21. แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของ Core region.....	43
22. แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของ NS5B.....	44
23. ตัวอย่างผลจากการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (1).....	46

ภาพที่	หน้า
24. ตัวอย่างการ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (2).....	46
25. แสดงตัวอย่างของ Chromatogram ของยีน Core region ด้วยโปรแกรม Bioedit.....	47
26. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region จากสี่จังหวัดของประเทศ.....	49
27. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region จากจังหวัดเชียงราย.....	50
28. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region จากจังหวัดนครศรีธรรมราช.....	51
29. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region จากจังหวัดอุดรธานี.....	52
30. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region จากจังหวัดชลบุรี.....	53
31. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี C ในส่วน NS5B region ด้วยโปรแกรม Blast (1) .....	58
32. แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบบี C ในส่วน NS5B region ด้วยโปรแกรม Blast (2) .....	58
33. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region จากสี่จังหวัดของประเทศ.....	61
34. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region จากจังหวัดเชียงราย.....	62
35. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region จากจังหวัดอุดรธานี.....	63
36. Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region จากจังหวัดชลบุรี.....	64
37. กราฟแสดงร้อยละของผู้ติดเชื้อจากผู้บริจาคโลหิต.....	67

## คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
ALT	Alanine aminotransferase
Anti-HCV	Antibody of hepatitis C virus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
E1, E2	envelope glycoprotein E1, E2
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EtOH	Ethanol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HCV	Hepatitis C virus
IAA	Isoamyl alcohol
IRES	Internal ribosome entry site
IgG	Immunoglobulin G
LDL	low density lipoprotein
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mRNA	messenger ribonucleic acid
ml	Milliliter
NaOAc	Sodium acetate
NANBH	Non-A non-B hepatitis virus
NS5B	Nonstructural protein 5 B
nt	Nucleotide
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid

+ssRNA	Positive single stranded RNA
T <sub>m</sub>	Melting temperature
UTR	Untranslated region
VLDL	Very low density lipoprotein



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหา (Background and Rationale)

ไวรัสตับอักเสบซี (hepatitis C virus, HCV) เป็นไวรัสสำคัญที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลัน และเรื้อรัง ส่วนใหญ่กว่า 80% ของผู้ติดเชื้อจะกลายเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง ปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อมากกว่า 170 ล้านคนทั่วโลก และมีผู้ป่วยเพิ่มขึ้น 3-4 ล้านคนต่อปี (1) ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการทางคลินิกแต่สามารถตรวจการติดเชื้อด้วยการตรวจแอนติบอดี (antibody) หรือ การตรวจ HCV RNA นอกจากนี้สามารถตรวจการทำงานของตับด้วยการวัดระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) จะช่วยบ่งบอกถึงการอักเสบของตับ HCV สามารถก่อให้เกิดโรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) โรคตับแข็ง (cirrhosis) และที่รุนแรงที่สุดคือ โรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) มะเร็งตับส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นหลังจากผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็งมานานกว่า 10-20 ปี ปัจจัยที่มีผลต่อการเป็นโรคเรื้อรัง (chronicity rate) ขึ้นอยู่กับ อายุ ภาวะภูมิคุ้มกัน และความรุนแรงของโรคในระยะเฉียบพลันด้วย (2)

ผู้ติดเชื้อ HCV ในประเทศไทยที่มีการสำรวจ seroprevalence (anti-HCV) ประมาณ 0.98-1.5% (3,4) และในผู้บริจาคโลหิตใหม่ของผู้ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติในปี 2545 ประมาณ 0.77% (5) genotype ที่พบบ่อยได้แก่ genotype 1,3 และ 6 (6) จากการศึกษาพบว่าผู้ที่มีประวัติใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน เช่น กลุ่มผู้เสพยาเสพติดโดยการใช้เข็มฉีดยา (IVDU) หรือได้รับการให้เลือดหรือผลิตภัณฑ์จากเลือด มีปัจจัยเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ HCV (7) เช่นเดียวกับประเทศในทวีปยุโรปและอเมริกา (8) ดังนั้นมาตรการป้องกันด้วยการตรวจคัดกรองเลือดที่มี sero positive ต่อ HCV ออกก่อนการให้เลือด รวมทั้งให้การศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อโรค และการไม่ใช้เข็มฉีดยาร่วมกันจึงมีความสำคัญ

ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันเนื่องจากอุปสรรคต่างๆ เช่น ไม่สามารถเพาะเลี้ยง HCV ได้จนกระทั่งเมื่อไม่นานมานี้ สามารถเพาะเลี้ยง HCV จีโนไทป์ 2a สายพันธุ์ JFH1 ใน hepatoma cell line (Huh7) ได้เป็นครั้งแรก แต่อยู่ในขั้นตอนศึกษาถึงความสามารถในการติดเชื้อ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host) รวมทั้งคุณสมบัติอื่นๆ ของเชื้อด้วย (9)

เนื่องจาก คุณสมบัติของไวรัสที่มีความหลากหลาย (heterogeneity) และอัตราการกลายพันธุ์สูง การรักษาในปัจจุบันจะใช้ Interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) ควบคู่กับการใช้ยา ribavirin (10,11) ซึ่งการตอบสนองต่อยาขึ้นอยู่กับ genotype ของไวรัส โดยที่ HCV สามารถถูกจำแนกได้เป็น 6 genotype, genotype 1 ถึง 6 (12) ส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ genotype 1 และ 4 มักตอบสนองได้ไม่ดีหรือดื้อต่อยา Interferon (13,14) Interferon ที่ใช้ได้ผลดี ขึ้นในปัจจุบันเป็น Interferon ที่มีฤทธิ์ยาวนานขึ้นคือ Pegylated Interferon (polyethylene glycol Interferon)

ดังนั้น genotype นอกจากมีผลทางด้านระบาดวิทยาแล้ว ยังมีผลต่อการวางแผนการรักษา ระยะเวลาที่ใช้ในการรักษา และปริมาณยาที่ใช้ด้วย (13,14)

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ส่วนใหญ่จะใช้ประชากรกลุ่มย่อยของประเทศ หรือจากผู้บริจาคโลหิต (3, 4, 15, 16) ซึ่งเป็นตัวแทนของทั้งประเทศที่ไม่ดีนัก เพราะใช้ประชากรกลุ่มเล็ก และผู้บริจาคโลหิตส่วนใหญ่มักจะถูกตรวจหาการติดเชื้อชนิดอื่น และคัดกรองออกไป ทำให้ได้ค่าที่อาจน้อยกว่าความจริง

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้ประชากรจากสี่ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัด เชียงราย (ภาคเหนือ) นครศรีธรรมราช (ภาคใต้) อุตรธานี (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) และชลบุรี (ภาคกลาง)จำนวนทั้งหมด 5,825 ตัวอย่าง ดังนั้นความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี จากการศึกษาี้สามารถใช้เป็นตัวแทนของทั้งประเทศ

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาระบาดของไวรัสตับอักเสบ ซี โดยการตรวจหา HCV antibody prevalence และนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก ต่อ HCV antibody มาหา HCV RNA และ genotype ไวรัสในประเทศไทย การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจาก โครงการศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี และความชุกของโรคตับอักเสบบีและซี (17, 18) โดยได้ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมของกระทรวงสาธารณสุข และได้ทำการขออนุญาตใช้ซีรัมที่เหลือ เพื่อการตรวจในรายละเอียดไวรัสตับอักเสบ ซี จาก อธิบดีกรมควบคุมโรคติดต่อแล้ว

#### คำถามงานวิจัย (Research question)

1. ความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทย จากกลุ่มตัวอย่างในภูมิภาคต่างๆเป็นเท่าไร
2. จีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทยเป็นอย่างไร

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

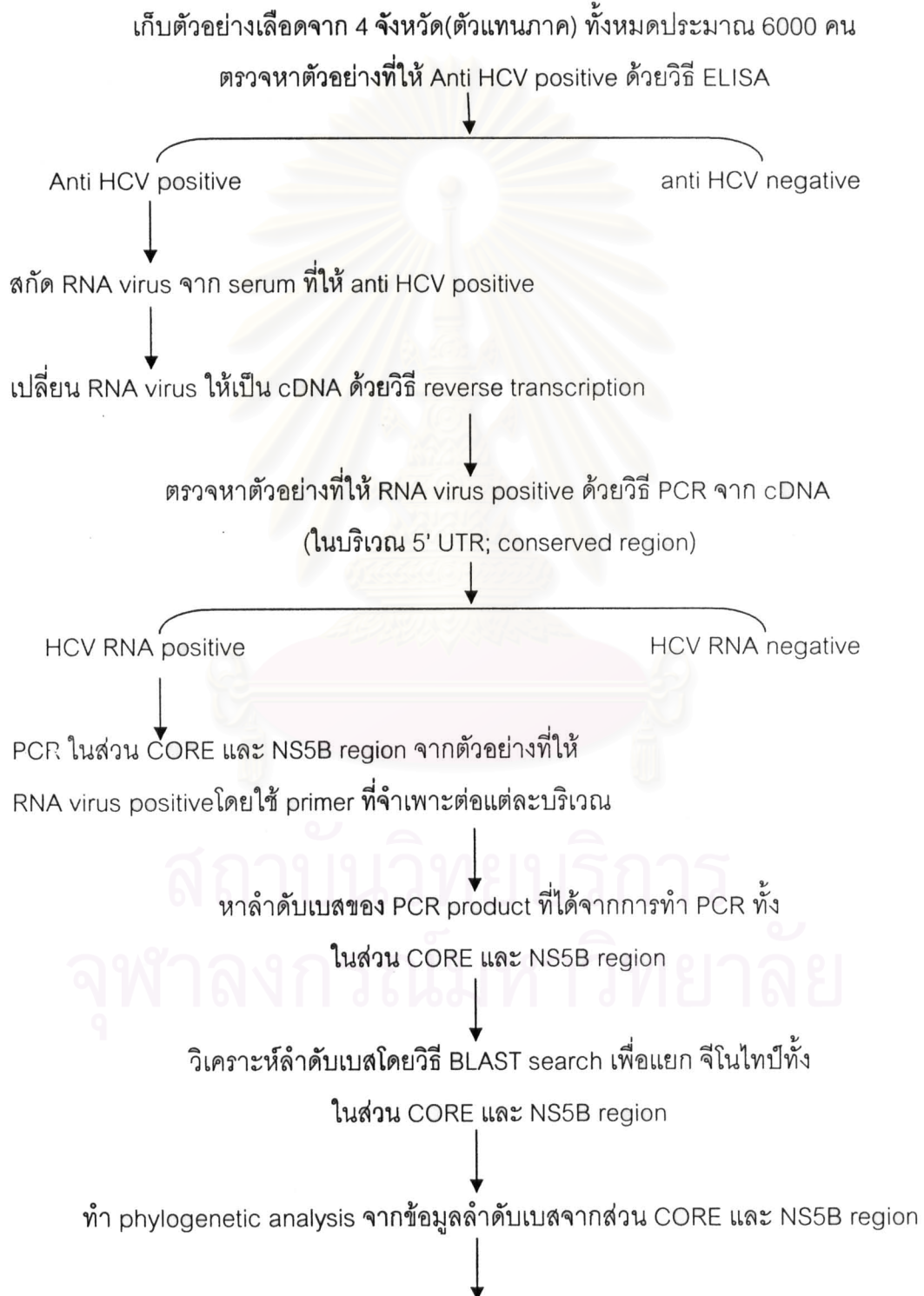
1. หาความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในประเทศไทย
2. เพื่อจำแนกจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทย
3. สัดส่วนของจีโนไทป์ 6 และจีโนไทป์อื่นในประเทศไทยเป็นอย่างไร



### สมมติฐาน (Hypothesis)

1. ความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจากกลุ่มตัวอย่างในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยมีอัตราการตรวจพบใกล้เคียงกับในอดีต (1-2%)
2. Genotype ไวรัสตับอักเสบ ซี ที่พบมากที่สุดในประเทศไทยเป็น จีโนไทป์ 3

### กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



เปรียบเทียบข้อมูล Phylogenetic analysis จากส่วน CORE กับ NS5B เพื่อจำแนก genotype



วิเคราะห์และสรุปผล

ประโยชน์ : ทราบความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทยที่เป็นข้อมูลขนาดใหญ่และเป็นตัวแทนของภาคต่างๆในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการป้องกัน ต่อไป

: ทราบจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทย

#### ข้อจำกัดของการวิจัย

- ซีรั่มมีปริมาณจำกัด เพราะเป็นซีรั่มเหลือจากโครงการศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี และความชุกของโรคตับอักเสบบี และซี ดังนั้นบางตัวอย่างจึงไม่เพียงพอต่อการทำซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลองได้

- แบบสอบถามอาจมีการกรอกข้อมูลไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดอุปสรรคแก่การวิเคราะห์ข้อมูล

#### คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

Genotype คือ การแบ่งกลุ่มของไวรัสตับอักเสบซี โดยวิธีการตรวจสอบรหัสพันธุกรรม

Phylogenetic analysis คือการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยรหัสพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

#### คำสำคัญ

Hepatitis C virus

Genotype

Prevalence

NS5B

CORE

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบระบาดวิทยาของไวรัสตับอักเสบซี ในประเทศไทยที่เป็นตัวแทนภาคต่างๆของประเทศ
2. นำข้อมูลไปเพื่อประกอบการติดตาม เฝ้าระวัง วางแผนป้องกัน การรักษาและวางแผนทางสาธารณสุข

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ไวรัสตับอักเสบ

ไวรัสตับอักเสบ เป็นไวรัสที่มีเซลล์เป้าหมาย คือ เซลล์ตับ ไวรัสในกลุ่มนี้สามารถทำให้เกิดโรคตับอักเสบ โรคตับแข็ง และมีการพัฒนาของโรคจนกลายเป็นมะเร็งตับ ซึ่งเป็นการดำเนินโรคขั้นสุดท้าย ไวรัสในกลุ่มนี้มีอย่างน้อย 7 ชนิดที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่

1. ไวรัสตับอักเสบ เอ (Hepatitis A virus : HAV)
2. ไวรัสตับอักเสบ บี (Hepatitis B virus : HBV)
3. ไวรัสตับอักเสบ ซี (Hepatitis C virus : HCV)
4. ไวรัสตับอักเสบ ดี (Hepatitis D virus : HDV)
5. ไวรัสตับอักเสบ อี (Hepatitis E virus : HEV)
6. ไวรัสตับอักเสบ จี (Hepatitis G virus : HGV)
7. ไวรัสทีที (Transfusion transmitted virus : TTV)

ไวรัสในกลุ่มนี้ แตกต่างกันในทาง พันธุกรรม ลักษณะโครงสร้างของเชื้อ และความสามารถในการติดเชื้อ ซึ่งสามารถแบ่งไวรัสตับอักเสบได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะการติดต่อ ดังนี้

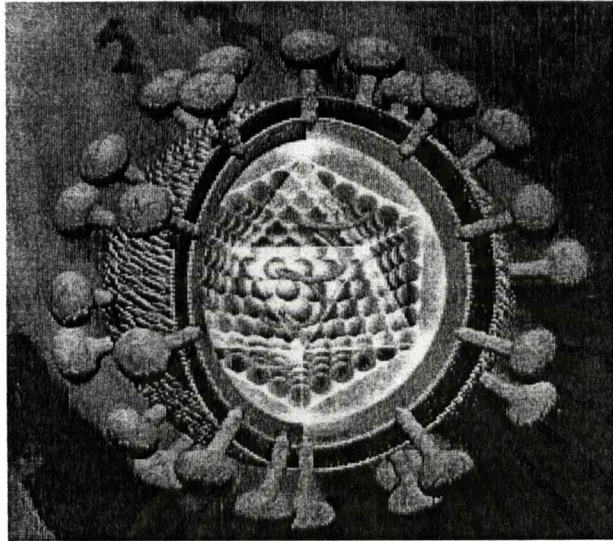
1. ไวรัสที่ติดต่อโดยการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเป็นหลัก (Enterically-transmitted virus)
2. ไวรัสที่ติดต่อโดยการได้รับเลือดหรือผลิตภัณฑ์ของเลือดที่ปนเปื้อนเชื้อ (Transfusion-transmitted virus)

#### การค้นพบ

ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 ไวรัสตับอักเสบ ถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มตามลักษณะของโรค คือ infectious hepatitis และ homologous serum hepatitis ต่อมาจึงให้ชื่อว่าไวรัสตับอักเสบ เอ และ บี (HAV, HBV) ตามลำดับ ภายหลังพบว่ามีผู้ป่วยโรคตับอักเสบที่เกี่ยวข้องกับการได้รับเลือด บางส่วนไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี แสดงว่าอาจจะมีไวรัสชนิดใหม่นอกเหนือจากสองชนิดนี้ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งยังไม่สามารถค้นพบ โดยให้ชื่อไวรัสตัวนี้ว่า non-A, non-B hepatitis virus (NANBH) (19)

เนื่องจากความเจริญก้าวหน้าทางเทคนิคอนุพันธุศาสตร์ (Molecular biology technique) ในปี ค.ศ. 1980 กลุ่มนักวิทยาศาสตร์จาก Chiron corporation นำโดย Michael Houghton สร้าง cDNA library ด้วยวิธีโคลนนิ่ง จากผู้ป่วย NANBH เทียบกับคนปกติ เพื่อหา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกินออกมา พบว่าโปรตีนที่สร้างจากโคลน 5-1-1 สามารถ ทำปฏิกิริยาทาง  
น้ำเหลืองได้กับซีรัมของผู้ป่วย NANBH และตั้งชื่อ NANBH ใหม่ ว่า ไวรัสตับอักเสบ ซี (Hepatitis  
C virus, HCV) (19)



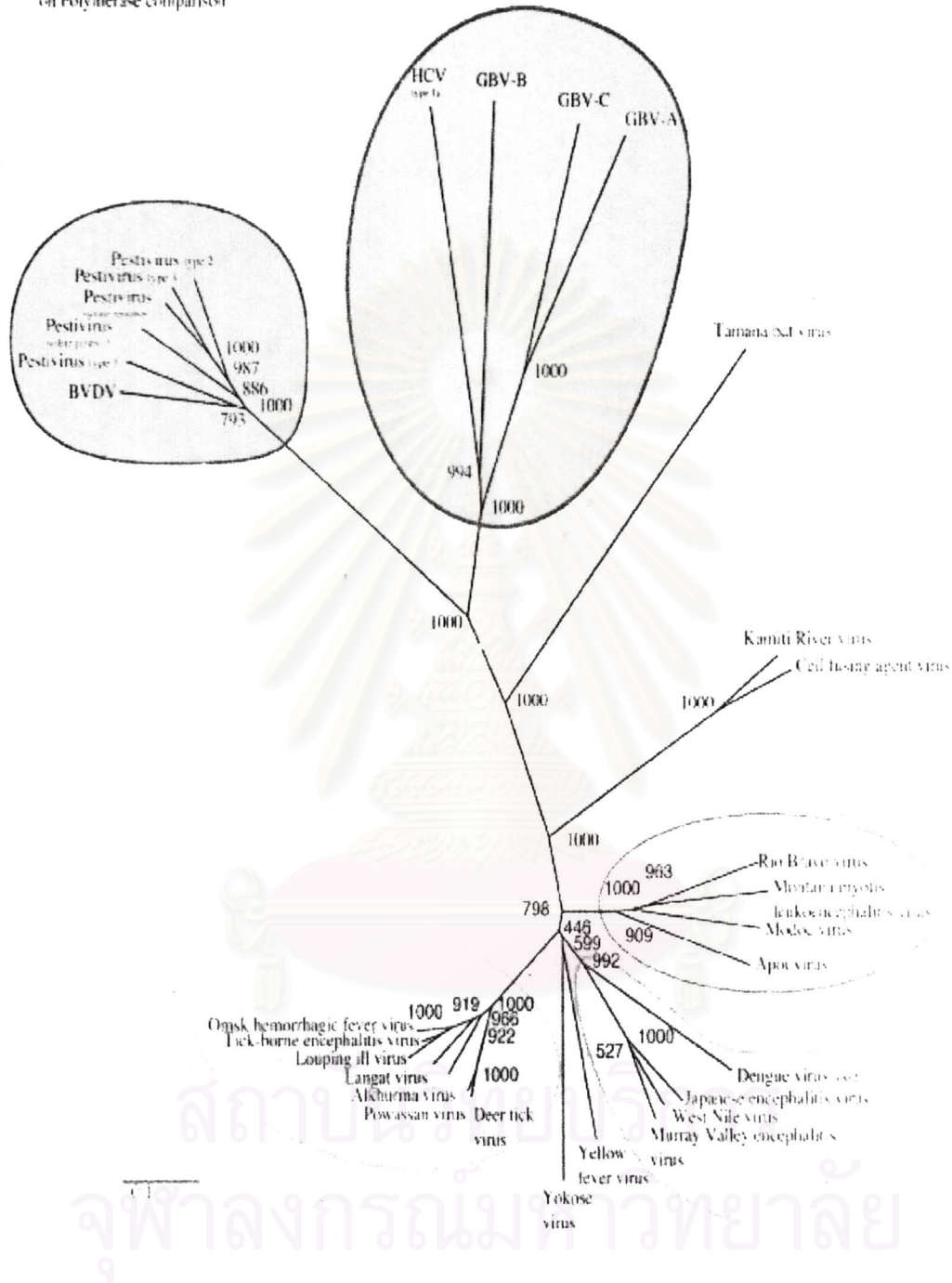
รูปที่ 1 ภาพวาดแสดงอนุภาคของไวรัสตับอักเสบ ซี

### อนุกรมวิธาน

ไวรัสตับอักเสบ ซี ถูกจัดอยู่ใน Family *Flaviviridae* Genus *Hepacivirus* ไวรัส  
ใน Family เดียวกันได้แก่ Dengue virus, Yellow Fever virus และ Japanese Encephalitis  
virus ซึ่งไวรัสตับอักเสบ ซี ถูกจำแนกเป็นจีนัสใหม่ คือ *Hepacivirus* เนื่องจากเป็นไวรัสที่มีความ  
หลากหลายทางพันธุกรรมสูง

ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัสในแฟมิลีนี้คือ มีขนาดเล็กประมาณ 40-60 nm มี  
เปลือกหุ้ม (enveloped virus) มีแคปซิดโปรตีนหุ้มสารพันธุกรรม (capsid protein) และมีสาร  
พันธุกรรมเป็น positive single stranded RNA (+ssRNA) ลักษณะโครงสร้างของสารพันธุกรรมมี  
open reading frame เดียว และถูกขนาบด้วย 5' และ 3' untranslated region (5'UTR, 3'UTR)  
ซึ่งสำคัญในกระบวนการ replication และ translation coding region ประกอบด้วย  
nonstructural และ structural region (19, 20, 21)

Phylogenetic tree based on Polymerase comparison



รูปที่ 2 แสดงอนุกรมวิธานของไวรัสใน Family *Flaviviridae* โดยการจำแนกตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี phylogenetic analysis สร้างต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (22)

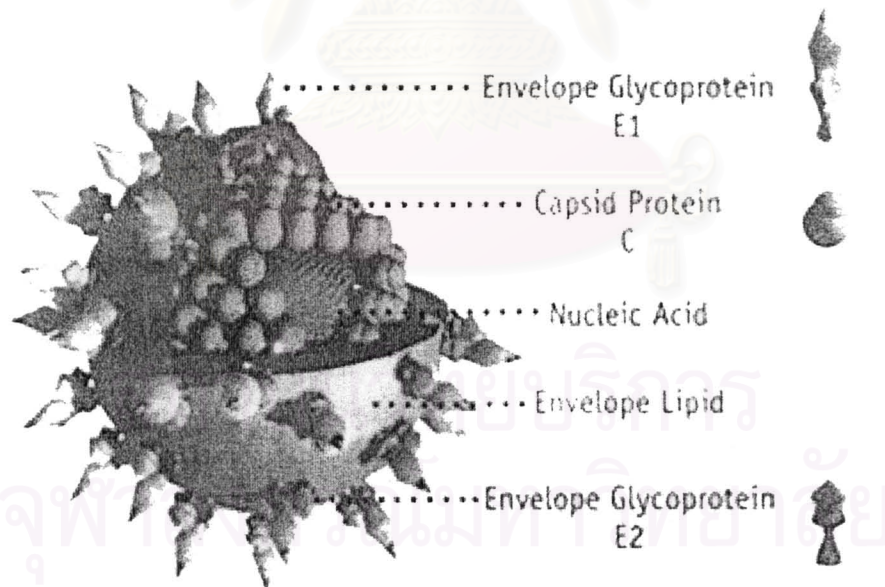
## ไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุสำคัญก่อให้เกิดโรคตับอักเสบบี โรคตับแข็ง และมะเร็งตับ ผู้ป่วยส่วนใหญ่ 50-80% จะกลายเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) (23)

ปัจจุบันพบว่า มีประชากรโลกประมาณ 170 ล้านคนทั่วโลกติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี และยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เป็นสาเหตุหลักให้เกิดความต้องการปลูกถ่ายตับ (1, 23)

### ลักษณะทางชีวโมเลกุลและโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี

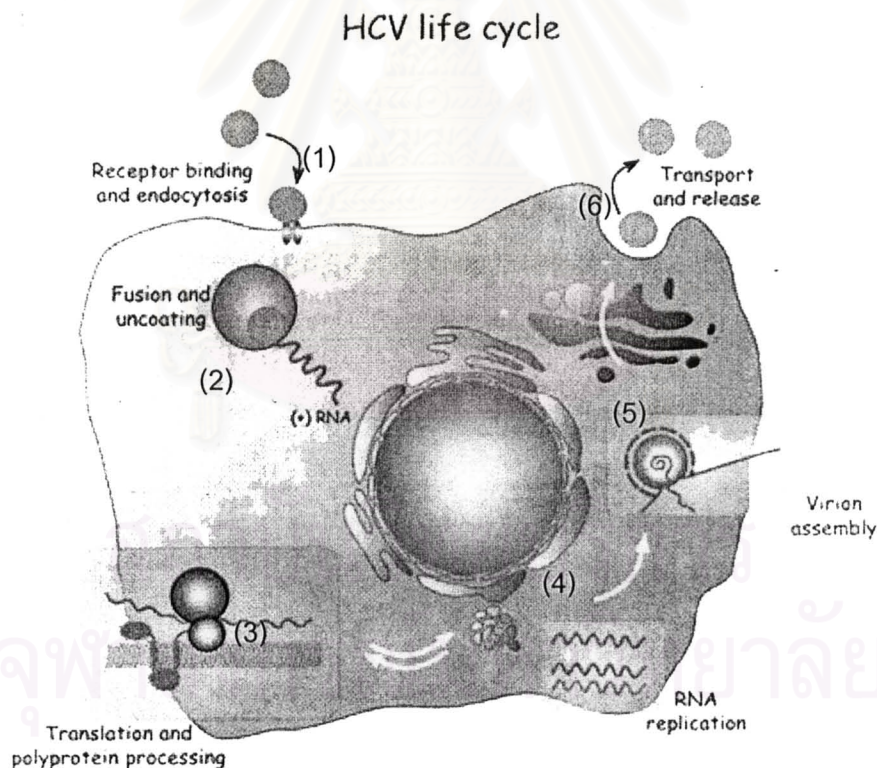
ไวรัสตับอักเสบบี เป็นไวรัสขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 40-60 nm อนุภาคไวรัสมีโครงสร้างเป็น icosahedral ด้วยการจัดเรียงของโมเลกุล core protein และถูกหุ้มด้วยเปลือกซึ่งได้จาก membrane ของ host cell ขณะที่ไวรัสออกจากเซลล์ บนเปลือกหุ้มมีโมเลกุล envelope glycoprotein E1 และ E2 ซึ่งทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเข้าสู่เซลล์ และเป็นบริเวณ (epitope) ที่ระบบภูมิคุ้มกันของ host จดจำ และตอบสนอง ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้มีความหลากหลายมากโดยเฉพาะ บริเวณ hypervariable region บน E2 protein (19, 20,24)



รูปที่ 3 ภาพวาดแสดงลักษณะอนุภาคของไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งมีเปลือกหุ้ม อนุภาคมีลักษณะ icosahedral ประกอบด้วย envelope glycoprotein ที่ผิวของไวรัสสำคัญต่อกระบวนการเข้าสู่เซลล์ และ core protein มีหน้าที่ห่อหุ้มสารพันธุกรรม

อนุภาคของไวรัส ส่วนใหญ่มีความหนาแน่นประมาณ 1.03-1.08 g/ml และ 1.17-1.25 g/ml ซึ่งเป็นอนุภาคไวรัส ที่จับกับ VLDL/LDL ซึ่งเป็น lipoprotein และ อนุภาคไวรัสที่ไม่จับกับ lipoprotein ตามลำดับ ทำให้อนุภาคไวรัสมีขนาดหลากหลายตั้งแต่ 50-100 nm มีการศึกษาพบว่าไวรัสตับอักเสบ ซี กลุ่มที่จับกับ lipoprotein มีความสามารถในการติดเชื้อได้ดีกว่าอีกกลุ่ม (25)

จีโนมของไวรัสมีขนาด 9,400-9,600 nt (24) เป็น positive single stranded RNA มีลักษณะเหมือน mRNA ซึ่งสามารถถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนได้ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น ใน host cell โดยอาศัยโปรตีนของเซลล์ จีโนมของไวรัสตับอักเสบ ซี มีเพียง open reading frame เดียว ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนสายยาวก่อนที่จะถูกตัดให้เป็นโปรตีนย่อยๆ ซึ่งถูกแบ่งออกเป็นสองประเภท คือ โปรตีนโครงสร้าง(structural protein) และโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง(nonstructural protein) Structural protein ประกอบด้วย Core, E1 และ E2 protein โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง ได้แก่ p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B



รูปที่ 4 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบ ซี เริ่มจาก 1) การเข้าจับกับผิวเซลล์ 2) เข้าสู่เซลล์ 3) เกิดกระบวนการถอดรหัส 4) แปลรหัสสร้างสารพันธุกรรม 5) ประกอบตัวเป็นไวรัสตัวใหม่ และ 6) ออกจากเซลล์ (26)

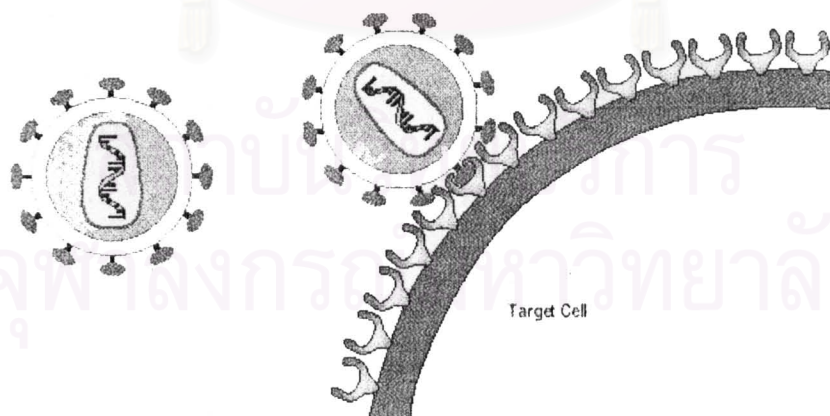
## วงชีวิต

วงชีวิตของไวรัสเริ่มจาก

1. การเข้าจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ (cell entry)
2. การสร้างโปรตีน (translation)
3. การจำลองตัวเองเพื่อเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม (replication)
4. การประกอบตัวเป็นไวรัสตัวใหม่ (assembly) และออกจากเซลล์ (release)

### Cell entry

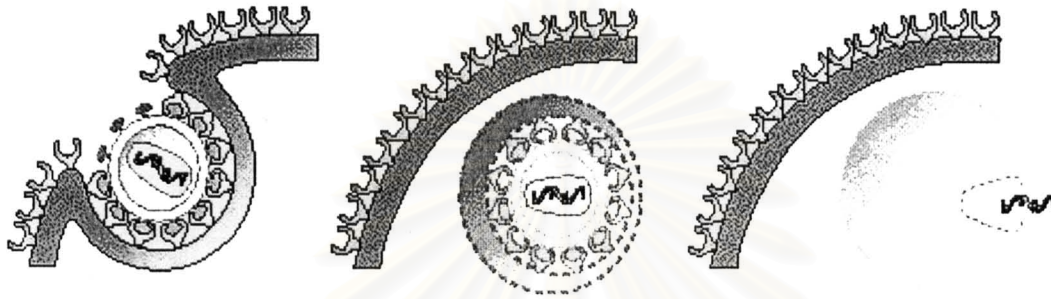
ไวรัสจะเริ่มจากการเข้าจับกับตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์เป้าหมายโดยที่ ไรรัศดับอักษร ซี มีโครงสร้างโปรตีนที่สำคัญ คือ Envelope glycoprotein; E1 และ E2 ทำหน้าที่ในการเข้าจับกับตัวรับบนผิวเซลล์เพื่อให้อนุภาคไวรัสสามารถรวมตัวกับเซลล์เมมเบรน และเข้าสู่เซลล์ได้ กระบวนการเข้าจับนี้ (attachment) เป็นกระบวนการที่สำคัญ หากสามารถขัดขวางกระบวนการนี้ จะนำไปสู่การลดการติดเชื้อ และลดการแพร่กระจายของเชื้อได้ เมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์ (เชื่อว่าโดยกระบวนการ endocytosis ) แล้วจึงเริ่มกระบวนการถอดเปลือกปล่อย genomic RNA ออกสู่ไซโตพลาส (19, 20,21)



รูปที่ 5 ไวรัสดับอักษร ซี เข้าจับ (attachment) กับตัวรับบนผิวเซลล์ (receptor) เป้าหมาย (27)



ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบซี เนื่องจาก epitope ในบริเวณ envelope glycoprotein มีความหลากหลายสูงทำให้ เชื้อไวรัสสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ และในอดีตยังไม่สามารถหาเซลล์ไลน์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไวรัสได้จนเมื่อไม่นานมานี้มีการพบว่า Huh 7 cell line สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสได้ (9)

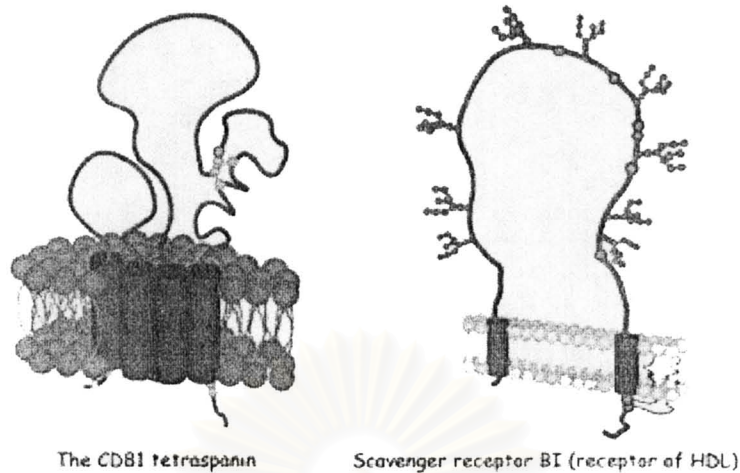


รูปที่ 6 แสดงกระบวนการ cell entry ของไวรัสตับอักเสบ ซี โดยเริ่มจาก การเข้าจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ เข้าสู่เซลล์ด้วยกระบวนการ endocytosis และ ปล่อย genomic RNA ออกสู่ไซโตพลาส (เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา) (27)

CD81 เป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ซึ่งแสดงออกบนผิวเซลล์เกือบทุกชนิด เชื่อว่าเป็นตัวรับจับกับโปรตีน E2 ของไวรัสตับอักเสบ ซี ได้ มีบางการศึกษาพบว่า ไวรัสตับอักเสบ ซี ไม่สามารถติดเซลล์ไลน์ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD81 โมเลกุลชนิดนี้จำเป็นต่อการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส แต่ไม่ใช่ทุกเซลล์ที่มีการแสดงออกของ CD81 จะถูกติดไวรัส แสดงว่าต้องมีโมเลกุลบนผิวเซลล์ชนิดอื่นที่เกี่ยวข้อง (25)

SR-BI เป็น multiligand receptor มีการแสดงออกบนเซลล์ตับ และ steroidogenic tissue สามารถจับกับ lipoprotein และนำเข้าสู่เซลล์ เป็นอีกโมเลกุลที่เชื่อว่าจะเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส (25)

LDL receptor เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่ใช้ในการนำอนุภาค LDL เข้าสู่เซลล์จึงเชื่อว่าเป็นอีกโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ (23, 28)



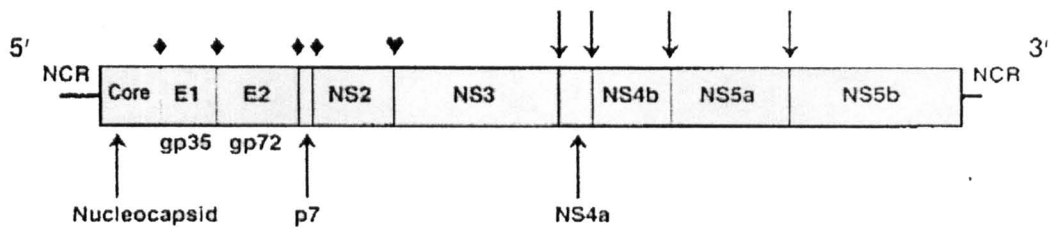
รูปที่ 7 แสดงภาพวาดของ โมเลกุลบนผิวเซลล์ CD81 และ SR-BI ซึ่งเชื่อว่าเป็นตัวรับของไวรัสตับอักเสบบี (29)

#### Translation.

เมื่อจีโนมของไวรัสถูกปล่อยออกสู่เซลล์แล้ว เนื่องจากไวรัสมีจีโนมเป็น positive single stranded RNA ซึ่งคล้ายกับ mRNA สามารถถูกแปลรหัสได้ทันที โดยอาศัย cell machinery เริ่มการแปลรหัส และสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อกระบวนการ replication และ assembly ของไวรัส

ไวรัสมีโครงสร้างของจีโนมที่สำคัญ คือ บริเวณ 5'UTR และ 3'UTR ซึ่งมีลักษณะเป็นโครงสร้าง (secondary structure) ซึ่งจำเป็นต่อ replication และ translation บริเวณ 5'UTR มีโครงสร้างที่เรียกว่า internal ribosome entry site (IRES) initiation factor จะเข้าจับบริเวณนี้ และตามด้วยการเข้าจับของ ribosome เริ่มกระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน

ไวรัสจะถูกแปลรหัสได้โปรตีนสายยาว (polyprotein) มีความยาวกรดอะมิโน ประมาณ 3,000 อะมิโน โปรตีนสายยาวจะถูกตัดให้ได้โปรตีนสิบชนิด คือ Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B โปรตีน Core, E1, E2 และ p7 จะถูกตัดด้วย cellular signal peptidase ส่วน nonstructural protein ทั้งหมดจะถูกตัดด้วย viral enzyme โดยที่ NS2 จะถูกตัดด้วย NS2-NS3 Zinc-dependent autoprotease และ โปรตีนที่เหลือจะถูกตัดด้วย NS3 serine protease โดยมี NS4A เป็น co-factor



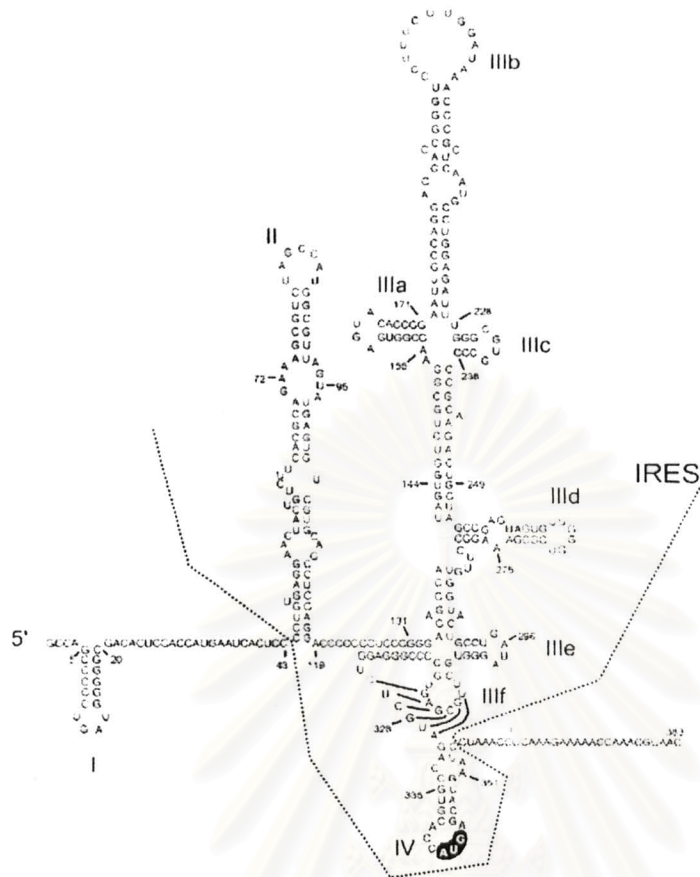
รูปที่ 8 แสดงการเรียงตัวของ genomic RNA ของไวรัสตับอักเสบ ซี บริเวณบน polyprotein ที่ถูกตัดด้วย host enzyme และ viral enzyme ( ◆ : บริเวณที่ถูกตัดด้วย host enzyme, ↓ : บริเวณที่ถูกตัดด้วย viral enzyme, ♥ : บริเวณที่ถูกตัดด้วย autoenzyme )

#### 5'-Untranslated region (5'UTR)

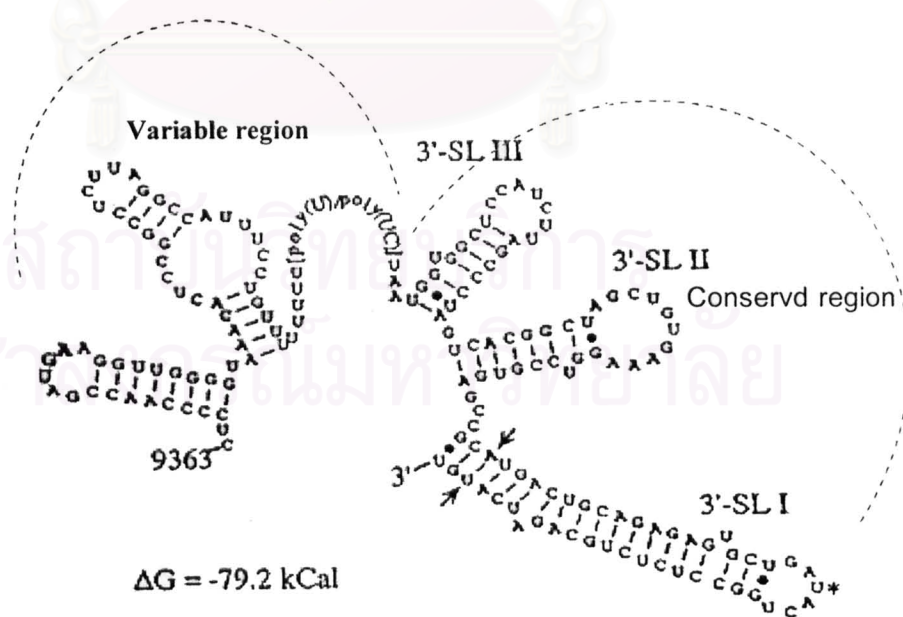
บริเวณนี้มีความยาวประมาณ 340 nt มีโครงสร้างเป็น secondary structure บริเวณนี้มีความ conserved มากที่สุดในจีโนม (13) และยังมีหลากหลายแตกต่างกันในแต่ละไทป์ (type) แต่โครงสร้างโดยรวม (RNA secondary structure) ยังคงเดิม บริเวณ IRES มีอยู่ในทุกไทป์ และทำหน้าที่ในกระบวนการแปลรหัสแบบ cap dependent translation โดยตรง ที่บริเวณนี้มีโปรตีนหลายชนิดสามารถเข้าจับได้ เช่น eIF3 5'UTR ต่างจีโนมไทป์กันมีประสิทธิภาพในการ translation ต่างกัน เพราะ ลำดับนิวคลีโอไทด์ downstream บริเวณหลัง start codon มีผลต่อการทำงานของ IRES (19) (ดังรูปที่ 9)

#### 3'-Untranslated region (3'UTR)

นิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ประกอบด้วย polyuridine และ polypyrimidine ความยาวประมาณ 30 nt (variable region) มีความแตกต่างกันออกไปตามแต่ละจีโนมไทป์ ตามด้วยบริเวณ highly conserved region ยาวประมาณ 98 nt ซึ่งเชื่อว่าส่วนนี้มีความเกี่ยวข้องกับ infectivity ของไวรัส 3'UTR มีโครงสร้างเฉพาะ (ดังรูปที่ 10) เช่นเดียวกับ 5'UTR และมีความสำคัญในกระบวนการจำลองตัวเองของไวรัส (replication) เชื่อว่าอาจเกี่ยวข้องในกระบวนการแปลรหัสด้วย (translation) (19)



รูปที่ 9 แสดงโครงสร้างของ 5'UTR (RNA secondary structure) บริเวณ IRES และ AUG start codon 5'UTR มี pseudoknot ที่ stem loop IIIIf มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของ IRES (30)



รูปที่ 10 แสดงโครงสร้างของ 3'UTR (RNA secondary structure) บริเวณ variable region และ conserved region UGA คือ codon ตัวสุดท้ายอยู่ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 9375 (31)

## Structural protein

### Core protein

มีความยาวประมาณ 600 nt ค่อนข้าง conserved แต่มีความแตกต่างกันในแต่ ละจีโนไทป์ สามารถจับกับสารพันธุกรรมได้ที่ปลายอะมิโนของโปรตีน (N-terminal) ทำหน้าที่ใน การห่อหุ้มสารพันธุกรรม เชื่อว่า core protein สามารถเข้าจับกับโปรตีนอื่นในเซลล์ มีผลต่อ cell signaling pathway บางชนิด ทั้งยังมีผลควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์ด้วย (20, 24)

### Envelope glycoprotein E1, E2

E1 และ E2 เป็น heterodimer จับกันด้วยแรง noncovalent bond มีหน้าที่ สำคัญในกระบวนการประกอบตัวเป็นไวรัสที่มีความสามารถในการติดเชื้อ ทำหน้าที่ในการจับกับ ตัวรับของเซลล์เจ้าบ้าน และกระตุ้นให้เกิดการรวมตัวระหว่าง viral envelope และ host endosome membrane บน E2 มีบริเวณที่สำคัญเรียกว่า hypervariable region 1 (HVR1) ลำดับอะมิโนในบริเวณนี้มีความหลากหลายสูงถึง 80% HVR1 อาจทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการ attachment ความหลากหลายในบริเวณนี้บ่งบอกถึง HCV quasispecies และ การตอบสนอง ทางภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้ป่วยด้วย (24)

### p 7

เป็นโปรตีนขนาดเล็ก ยังไม่รู้ว่าหน้าที่ชัดเจนนัก แต่จากการศึกษาพบว่า อาจ เกี่ยวข้องกับ Ion permeability บน membrane ซึ่งจำเป็นต่อการ หลุดออกจากเซลล์ (release) และการพัฒนาไปเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (maturation) (24)

## Nonstructural protein

### NS2

เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ NS2-NS3 autocatalytic cleavage ตัดระหว่าง NS2- NS3 ออกจากกัน ซึ่งการทำงานของ NS2-NS3 autocatalytic enzyme ต้องการ Zinc เป็น co-factor ด้วย (24)

### NS3

เป็นโปรตีนที่หลายหน้าที่ และหลาย domain serine protease domain ทำ

หน้าที่ในการตัดโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างออกจากกันทั้งหมด (ยกเว้น NS2) การทำงานจำเป็นต้องมีโปรตีน NS4A มาเป็นตัวช่วยเพื่อให้มีโครงสร้างที่เหมาะสม helicase domain ทำหน้าที่ในกระบวนการ replication คลายเกลียว secondary RNA structure และแยก positive-negative strand RNA ออกจากกัน (24)

#### NS4B

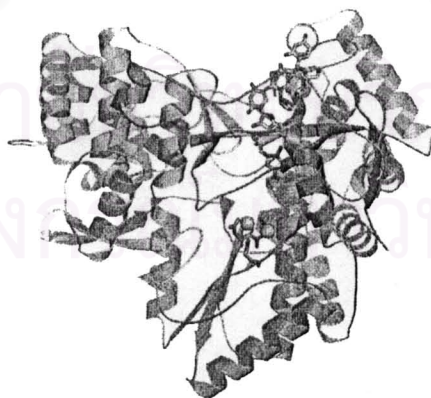
ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอนของโปรตีนนี้ แต่มีความจำเป็นต่อการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ให้กับ NS5B และ การเกิด replication complex (24)

#### NS5A

ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนของโปรตีนนี้ แต่มักปรากฏในรูปที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ และสำคัญต่อกระบวนการ replication (24) และจากการศึกษาผลการรักษาด้วยยา IFN-Alpha พบว่าบางบริเวณบนโปรตีนนี้มีผลต่อการตอบสนองต่อยาด้วย เรียกว่า Interferon sensitivity- determining region (ISDR)

#### NS5B

เป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการจำลองตัวเองเรียกว่า RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ทั้งสร้าง negative stranded RNA เพื่อเป็นแม่แบบในการสร้าง จีโนม positive stranded RNA มีลักษณะคล้าย เอนไซม์ Polymerase ทั่วไปคือ Finger, Palm และ Thumb subdomain (19, 24) ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงโครงสร้างของโปรตีน NS5B มีหน้าที่เป็น RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ซึ่งจับอยู่กับ RNA สายเดี่ยว (32)

## Replication

เอนไซม์ในกระบวนการนี้ เชื่อว่าเป็นโปรตีนเชิงซ้อนหลายชนิดรวมกัน และจับอยู่กับเมมเบรนของเซลล์ ส่วนประกอบที่สำคัญของโปรตีนเชิงซ้อนคือ NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NSS5B และโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านอื่นๆ NS3 มีหน้าที่ คลายเกลียว RNA (helicase activity) NS5B มีหน้าที่สร้างสารพันธุกรรม (polymerase activity)

เอนไซม์เชิงซ้อนจะเริ่มต้นจากการสร้างสาย negative stranded RNA ขึ้นมาก่อน เพื่อเป็นต้นแบบในการสร้างสาย positive stranded genomic RNA ซึ่งสาย +ssRNA จะถูกใช้ในกระบวนการ translation, replication และ assembly

เนื่องจาก NS5B เป็น RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งไม่มีความสามารถในการตรวจความผิดพลาดในการสังเคราะห์ RNA (proof reading activity) ดังนั้นจึงมีการใส่เบสผิดระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรมเป็นเหตุให้เกิด mutation และ เกิดความหลากหลายของไวรัส (19, 24)

## Diversity of hepatitis C virus

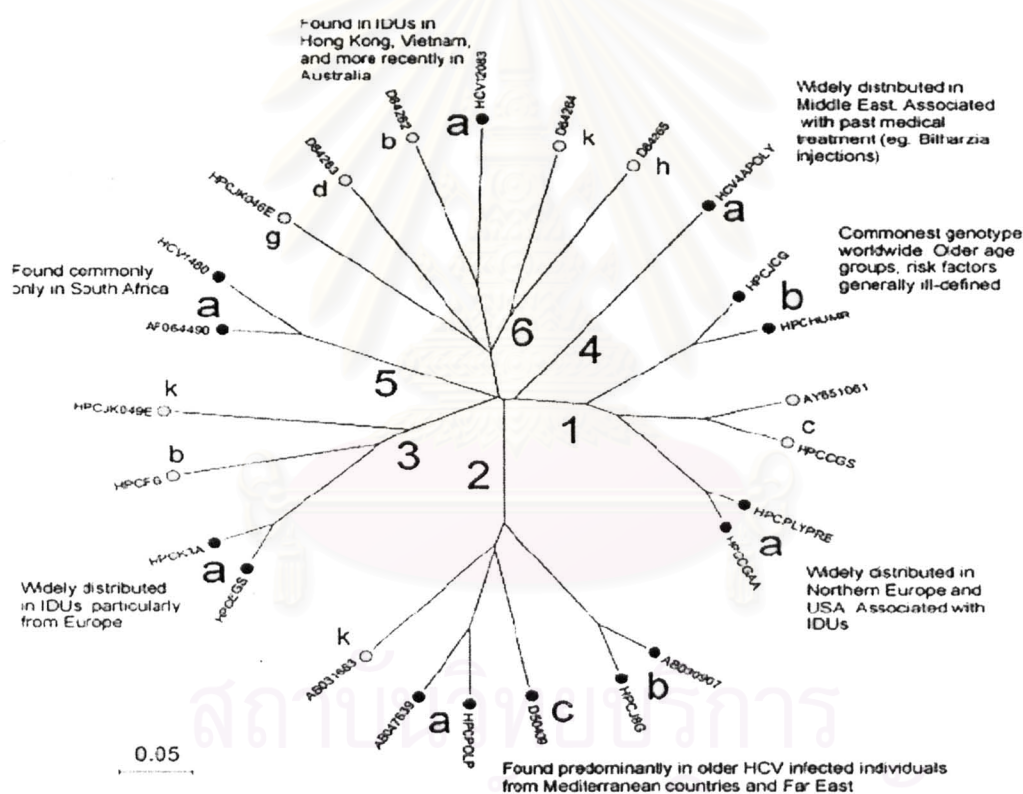
ความหลากหลายของไวรัสเกิดจาก ความสามารถในการผลิตไวรัส (replication rate) มีปริมาณสูงถึง  $10^{12}$  อนุภาค ต่อวันในผู้ใหญ่ และอัตราการกลายพันธุ์สูง เนื่องจากความไม่แม่นยำในการเติมนิวคลีโอไทด์ โดยเฉลี่ยความผิดพลาดในการเติมนิวคลีโอไทด์ประมาณ  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  ต่อหนึ่ง nucleotide copy จีโนมไวรัสยาวประมาณ 9,400-9,600 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้น โดยเฉลี่ยจะเกิดการกลายพันธุ์หนึ่งจุดต่อหนึ่ง RNA โมเลกุล (33)

เหตุผลหลักของการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) มาจาก เอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase ซึ่งขาดคุณสมบัติ 3'-5' proofreading exonuclease activity และกระบวนการอื่นที่ช่วยซ่อมแซมนิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาด หากเกิด mutation ที่ RNA สายลบที่ใช้เป็นแม่แบบสร้างจีโนม จะทำให้เกิดการถ่ายทอด mutation ไปยังไวรัสรุ่นลูกได้อย่างรวดเร็ว และเป็นจำนวนมาก แต่ไวรัสที่ได้มีเพียงบาง mutation เท่านั้นที่สามารถอยู่รอดได้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมขณะนั้น ผลที่ตามมาจากการปรากฏการณ์นี้ คือทำให้เกิดการคัดเลือกไวรัสบางสายพันธุ์ที่จำเพาะต่อแต่ละภูมิภาค และแต่ละกลุ่มประชากร และทำให้เกิดความแตกต่างหลากหลายของประชากรไวรัสตัวอักษร ซี ในผู้ป่วยหนึ่งคน (quasispecies) (33)

Viral quasispecies หมายถึง เป็น pool ของพันธุกรรมของไวรัสที่หลากหลาย แต่ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันอยู่ คือ ไวรัสตับอักเสบ ซี ทุกอนุภาคที่พบในผู้ป่วยหนึ่งคนจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมที่ไม่เหมือนกันหมดทุกตัว แต่จีโนมนั้นยังมีความใกล้เคียงกันอยู่ ซึ่งความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จะอยู่ที่ประมาณ 1-5% (2, 13, 33)

HCV genotype

ในปีค.ศ. 1993 Peter Simmonds และคณะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B จัดจำแนกไวรัสตับอักเสบ ซี ออกเป็น 6 type ในแต่ละ type แบ่งย่อยลงไปเป็น subtype โดยใช้ตัวอักษร a, b, c,... กำกับเรียงตามลำดับการค้นพบ และยังสามารถแบ่งเป็น isolate ซึ่งอาจตั้งตามชื่อประเทศ หรือชื่อโคลน (12)



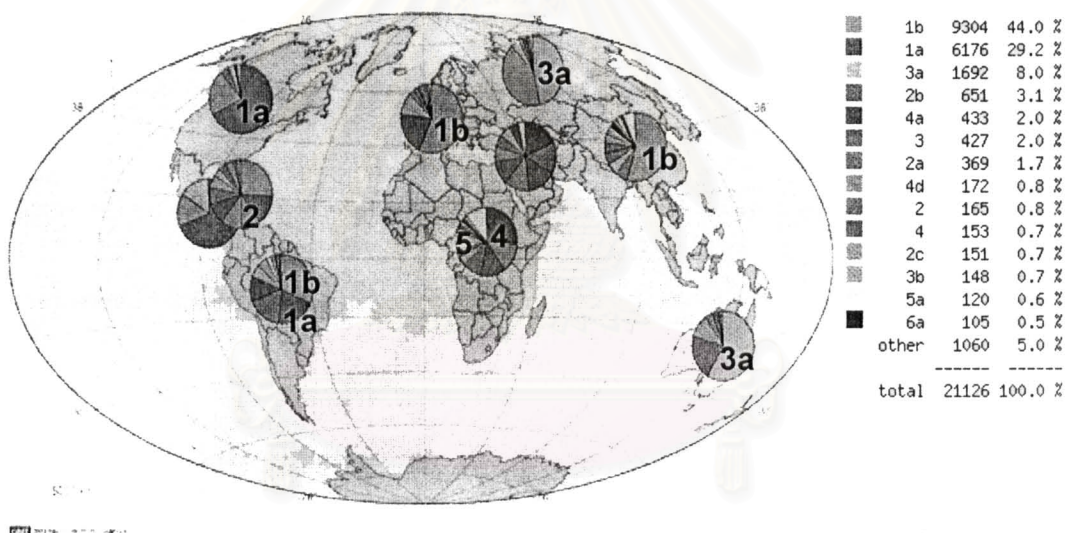
รูปที่ 12 Dendrogram แสดงการจัดจำแนกไวรัสตับอักเสบ ซี ออกเป็น 6 type โดยใช้ complete coding sequences ในการเปรียบเทียบจีโนม (13)

อุบัติการณ์ในการพบ HCV ในแต่ละจีโนมที่แตกต่างกันออกไปตามภูมิภาคของโลก (34) genotype 1, 2 และ 3 พบได้ทั่วโลก พบจีโนม 1 ประมาณ 70% ของทั้งหมด (35)



จีโนไทป์ 1a พบมากที่ยุโรปเหนือ อเมริกาเหนือ ขณะที่ 1b พบได้มากในญี่ปุ่น ทางตอนเหนือของสเปน ยุโรปตะวันออก และได้ จีโนไทป์ 2 พบได้มากที่ อเมริกาเหนือ ยุโรป และญี่ปุ่น จีโนไทป์ 3 พบมากบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ บางบริเวณในยุโรป จีโนไทป์ 4 เป็นจีโนไทป์หลักของ ตะวันออกกลาง อียิปต์ และแอฟริกากลาง จีโนไทป์ 5 พบได้เฉพาะที่แอฟริกาใต้ จีโนไทป์ 6 พบมากบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮองกง เวียดนาม และไทย (2, 35)

ในประเทศไทยพบจีโนไทป์ 3a มากที่สุด รองลงมาคือจีโนไทป์ 1 และจีโนไทป์ 6 (6, 36)



รูปที่ 13 แสดงการกระจาย genotype ของไวรัสตับอักเสบบี ในแต่ละภูมิภาคของโลก (37)

## HCV genotyping

การแบ่งจีโนมไทป์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่แม่นยำที่สุด (Gold standard) คือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจำแนกจีโนมไทป์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละความแตกต่างของไวรัสตับอักเสบ ซี จีโนม (2)

Term	Nomenclature	Degree of nucleotide sequence variation (Range)
Quasispecies		1%-5%
Isolate		5%-15%
Subtype	a,b,c,....	15%-30%
Genotype	1, 2, 3,...., 6	30%-50%

จีโนมไทป์จะหมายถึงทั้ง type และ subtype เช่น genotype 1a หรือ 1b

จากตารางที่ 1 เป็นการจำแนกจีโนมไทป์โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง whole genome ของไวรัสตับอักเสบ ซี

ตั้งแต่มีการค้นพบ HCV การแบ่งจีโนมไทป์ใช้ whole genome sequence แต่เนื่องจากต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง จึงหันมาใช้เพียง subgenomic sequence ที่มีความหลากหลายมากพอที่จะจำแนกทุกจีโนมไทป์ของไวรัส แต่ในขณะเดียวกันต้องมีความ conserved พอที่จะทำการทดลองได้

โดยทั่วไปนิยมใช้ส่วนของ polymerase gene ของไวรัส ซึ่ง HCV คือ NS5B ในการเปรียบเทียบจีโนมไทป์ ด้วยความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ NS5B ทำให้ใช้ในการจำแนกจีโนมไทป์ได้ค่อนข้างแม่นยำเช่นเดียวกับจีโนมไทป์ที่ได้จาก whole genome sequence แต่เนื่องจากความหลากหลายนี้ ทำให้ยากแก่การ amplified DNA และ sequencing ต้องใช้วิธีการ cloning ช่วย ซึ่งเป็นปัญหาในการทดลองอย่างมาก ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงหาบริเวณอื่นที่สามารถให้ผลการจำแนกจีโนมไทป์ได้ดีเช่นเดียวกัน และให้ผลเช่นเดียวกับผลจาก whole genome sequence

Core region เป็นอีกบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกจีโนไทป์ของ HCV เป็นบริเวณที่ค่อนข้าง conserved ขณะเดียวกันยังมีความหลากหลายมากพอที่จะใช้จำแนกจีโนไทป์ สามารถ amplified DNA และ sequenced บริเวณนี้ได้ง่ายกว่าบริเวณ NS5B แต่บางกรณีอาจให้ผลการจำแนกจีโนไทป์ขัดแย้งกับจีโนไทป์ที่ได้จาก NS5B เนื่องจากหลายสาเหตุ คือ เกิด mix infection, recombination หรือ เป็นการจำแนกจีโนไทป์ที่ไม่ถูกต้อง ต้องยืนยันผลการจำแนกจีโนไทป์ที่ได้จาก whole genome sequence

E1 เป็นอีกบริเวณที่มีการใช้จำแนกจีโนไทป์ เพราะมีความหลากหลายมากพอแต่ทำให้ยากแก่การ amplified DNA และ sequencing เช่นเดียวกับการใช้บริเวณ NS5B

5'UTR เป็นบริเวณที่มีความ conserved มากที่สุดบริเวณหนึ่งใน genome แต่มีความแตกต่างกันในแต่ละไทป์ พบว่าใช้ในการจำแนกไทป์ได้ แต่อาจจำแนก subtype ไม่ได้ เนื่องจากบาง subtype มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้อย่างมาก ทั้งมีการพบจีโนไทป์ 1 และ 6 มีความคล้ายกันบริเวณ 5'UTR มาก อาจไม่สามารถจำแนกสองจีโนไทป์นี้ออกจากกันได้ ปัจจุบันใช้เทคนิค reverse hybridization assay โดยใช้ probe ที่จำเพาะกับบริเวณนี้ ซึ่งให้ความรวดเร็วในการจำแนกไทป์ของ HCV (38)

การหาจีโนไทป์สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้ (35)

- Serologic genotyping (EIA) เป็นการตรวจปฏิกิริยาทางน้ำเหลือง ใช้โปรตีนสังเคราะห์ เพื่อตรวจหา genotype-specific anti-NS4 antibodies
- Reverse hybridization assay เป็นการใช้ line probe (LiPA) ซึ่งออกแบบให้จำเพาะกับส่วน 5'UTR ของแต่ละจีโนไทป์ แต่อาจไม่สามารถแยกความแตกต่างของ subtype ได้
- PCR-RFLP เป็นการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย PCR แล้วใช้ restriction enzyme ตัดแบบจำเพาะต่อแต่ละจีโนไทป์ (genotype-specific cleavage site) ทำให้ได้รูปแบบที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละจีโนไทป์
- Subtype specific PCR เป็นการออกแบบ primer ในการทำ RT-PCR ให้จำเพาะกับ genotype และเพิ่มจำนวนได้ PCR product ที่มีขนาดจำเพาะ

- Sequencing เป็น RT-PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ และทำการถอดรหัสนิวคลีโอไทด์ และใช้ในการแยกจีโนมไปเทียบกับตัวอ้างอิง (reference) จากธนาคารพันธุกรรม (GenBank)

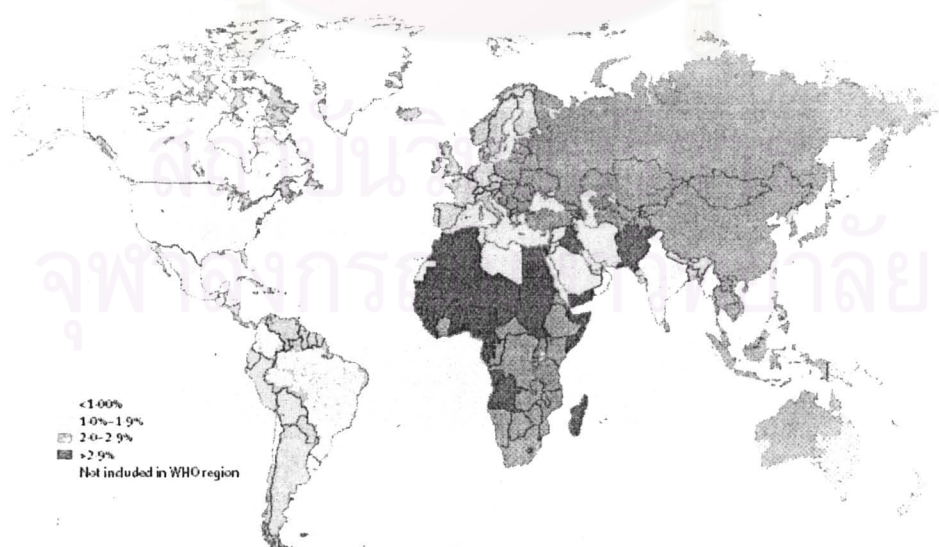
### การติดต่อ

ไวรัสตับอักเสบ ซี สามารถติดต่อได้หลายทาง

1. การได้รับเลือดที่มีการปนเปื้อนเชื้อ (Blood transfusion)
2. ติดต่อจากแม่สู่ลูก (Perinatally infected children)
3. การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน (Intravenous drug use)
4. การฟอกไต (Hemodialysis)
5. การสัก Tatoo (Tattooing)

### ลักษณะอาการทางคลินิก

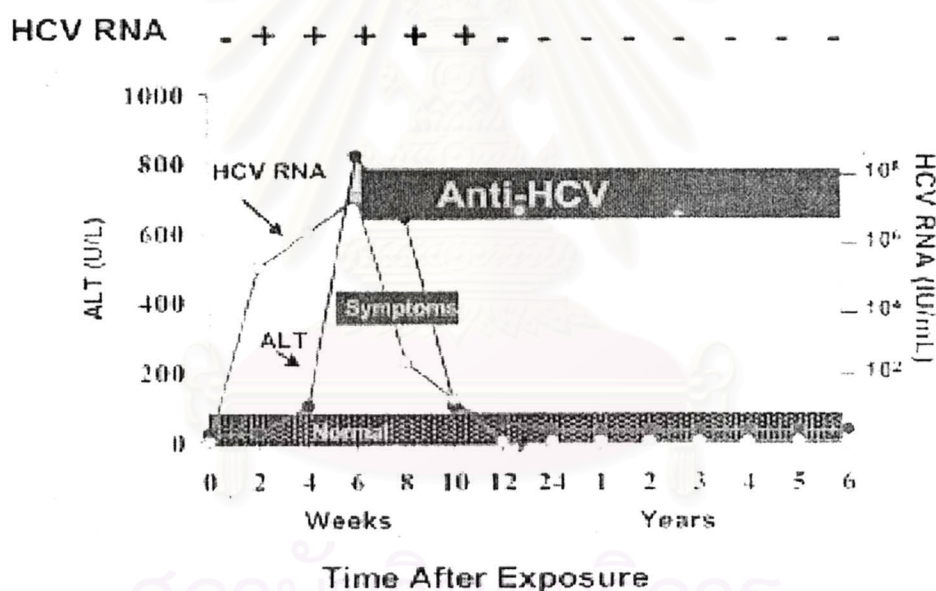
ปัจจุบันไวรัสตับอักเสบ ซี มีผู้ติดเชื้อทั่วโลกประมาณ 170 ล้านคน หรือประมาณ 3% ของประชากรโลก (1) ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการ และกว่า 80% ของผู้ติดเชื้อเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง มีเพียง 20% เท่านั้นที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน



รูปที่ 14 ภาพแสดงความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ในแต่ละภูมิภาคของโลก (39)

การตรวจการติดเชื้อ และการเกิดตับอักเสบ สามารถตรวจได้จากการวัดระดับของเอนไซม์ตับในกระแสเลือด คือ alanine aminotransferase (ALT) หากพบระดับของ ALT เพิ่มขึ้นแสดงว่ามีการถูกทำลายของตับ

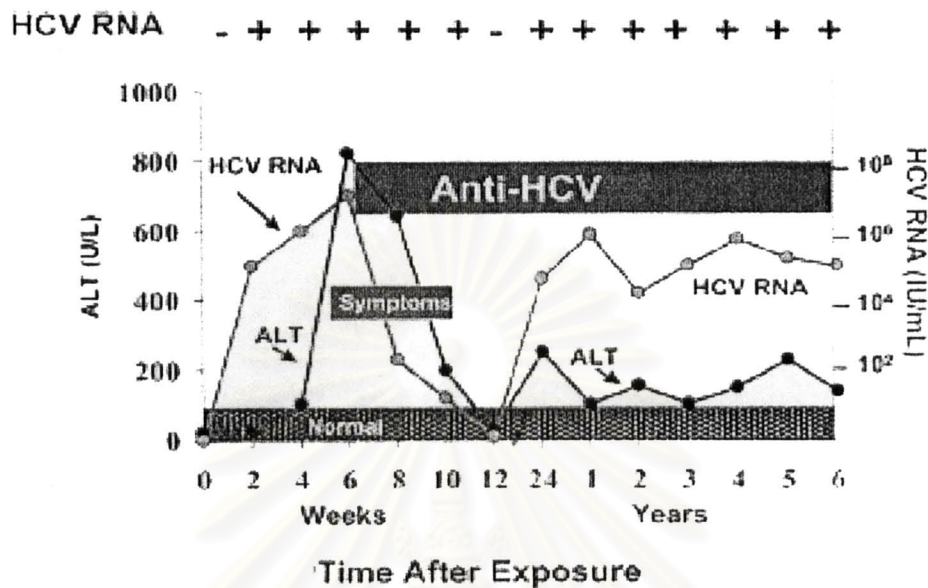
การติดเชื้อแบบเฉียบพลัน (acute infection) สามารถตรวจพบ RNA ไวรัสได้ในซีรัม 1-2 สัปดาห์ หลังการติดเชื้อ ระดับของ RNA ไวรัส จะสูงขึ้นในช่วงสองสามอาทิตย์แรก ก่อนที่ระดับเอนไซม์ ALT จะขึ้นสูงที่สุดในช่วงเริ่มต้นของอาการ ระดับ ALT ที่สูงขึ้นมีค่ามากกว่าระดับสูงสุดของคนปกติถึง 10 เท่า บ่งบอกว่าตับกำลังถูกทำลาย anti-HCV มักตรวจพบในช่วงหลังจากอาทิตย์ที่หกของการติดเชื้อแล้ว แสดงว่าผู้ป่วยที่แสดงอาการมักตรวจไม่พบ anti-HCV ในช่วงแรก (ดังรูปที่ 15) ระดับ RNA ไวรัส และ ALT จะลดลงหลังจากที่มีการสร้าง antibody โดยเฉลี่ยผู้ป่วยจะแสดงอาการ 3-12 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ ผู้ป่วยมักจะหายได้เองแต่มีโอกาสติดเชื้อซ้ำได้ เพราะ anti-HCV อาจไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำ ได้เนื่องจากความหลากหลายของไวรัส



รูปที่ 15 กราฟแสดงระดับของ HCV RNA, เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ของผู้ป่วยแบบเฉียบพลัน และปกติ (แถบสีดำ) และระยะเวลาในการสร้าง HCV antibody (anti-HCV) (2)

การติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronic infection) เกิดขึ้นเมื่อระดับ HCV RNA ยังคงอยู่มากกว่า 6 เดือน หลังจากการติดเชื้อ อัตราการเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรังเฉลี่ย 75-85% แต่จะแตกต่างกันตาม อายุ เพศ เชื้อชาติ และสภาวะภูมิคุ้มกันของแต่ละคน อาการช่วงแรกคล้ายกับการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน แต่ผู้ป่วยแบบเรื้อรังมักไม่แสดงอาการเหมือนแบบเฉียบพลัน ซึ่ง

มักจะหายจากโรค ระดับของ HCV RNA และ ALT จะไม่คงที่ และระยะเวลาที่ตรวจพบ HCV RNA และ ALT หลังจากช่วงเฉียบพลันไปแล้วจะแตกต่างกันออกไป (ดังรูปที่ 16)

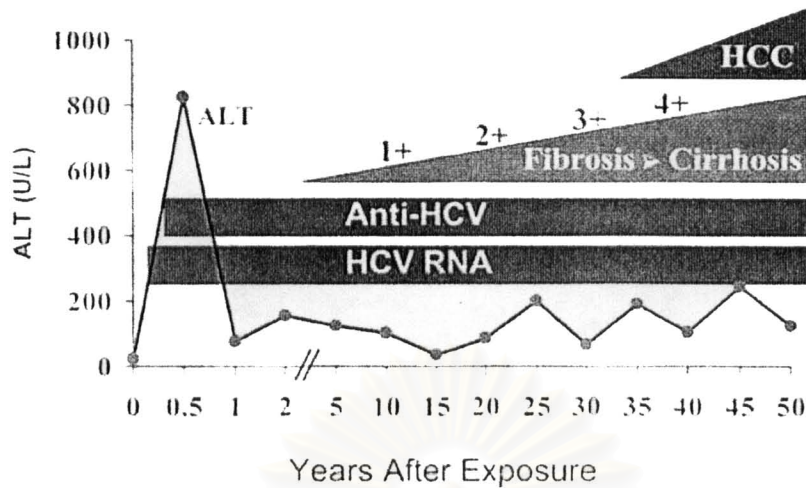


รูปที่ 16 กราฟแสดงระดับของ HCV RNA, เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ระดับปกติ (แถบสีดำ) ของผู้ป่วยแบบเรื้อรัง และระยะเวลาในการสร้าง HCV antibody (anti-HCV) (2)

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (chronicity rate)

- อายุ พบว่าในผู้ป่วยที่อายุน้อยจะมี chronicity rate ต่ำกว่า
- เพศ พบว่า chronicity rate ในเพศหญิงจะต่ำกว่าเพศชาย โดยเฉพาะเพศหญิงที่อายุน้อย
- เชื้อชาติ ในอเมริกา พบว่า chronicity rate สูงในกลุ่มคนผิวดำเมื่อเทียบกับคนผิวขาว
- สภาวะภูมิคุ้มกัน ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อร่วมกับ HIV พบว่า chronicity rate สูงกว่า ผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อ HIV

การพัฒนาของโรค จะเริ่มจาก ตับอักเสบ เกิดพังผืดในตับ เกิดเป็นตับแข็ง และระยะสุดท้าย คือ มะเร็งตับ ซึ่งใช้เวลาจนถึงระยะสุดท้ายประมาณ 20-30 ปี



รูปที่ 17 กราฟแสดงระยะเวลาการพัฒนาของโรค ไปสู่การเกิดพังผืดในตับ (fibrosis) ตับแข็ง (cirrhosis) โรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma)

### การรักษา

ปัจจุบันไวรัสตับอักเสบ ซี ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และยังไม่มียาวัคซีนป้องกันเนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงไวรัสใน cell culture ได้ จนกระทั่งปัจจุบัน (9) ไม่มีสัตว์ทดลองขนาดเล็ก มีเพียงลิงชิมแปนซี ซึ่งมีราคาแพงไม่สะดวกต่อการศึกษาวิจัย

ยารักษาที่มีอยู่ 2 ชนิด คือ IFN-alpha และ Ribavirin โดย IFN-alpha จะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ ส่วน Ribavirin จะเป็น guanosine analogue มักใช้ยาสองชนิดนี้ควบคู่กัน จะให้ผลการรักษาดีกว่า ปัจจุบันมียา Pegylated IFN-alpha ซึ่งจะให้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์นานกว่า ให้ผลในการรักษาดีกว่า (10)

การตอบสนองต่อยาจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับจีโนไทป์ของไวรัส และปริมาณของไวรัส พบว่าจีโนไทป์ 1 และ 4 ให้การตอบสนองต่อยาที่ไม่ดีนัก

- ปริมาณยาที่ใช้ในการรักษา จีโนไทป์ 1 ใช้ปริมาณยาในการรักษา มากกว่า จีโนไทป์ 2 และ 3

- ระยะเวลาในการรักษา จีโนไทป์ 1 ใช้ระยะเวลาในการรักษามากกว่า จีโนไทป์ 2 และ 3

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research) ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee) และการใช้สิริที่เหลือนับได้ขออนุญาตจากอธิบดีกรมควบคุมโรคติดต่อแล้ว

#### ประชากรศึกษา

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการใช้สิริที่เหลือนับได้จากโครงการศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีและความชุกของโรคตับอักเสบบี ซึ่ง ทำ การ เก็บ ตัวอย่างเลือดจากประชากรไทยตั้งแต่ เมษายน 2547 ถึง สิงหาคม 2547 ที่มีอายุระหว่าง 2-60 ปี ในจังหวัด เชียงราย อุดรธานี ชลบุรี และนครศรีธรรมราช ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลประจำจังหวัด (หรือโรงพยาบาลศูนย์) ของรัฐ 1 แห่ง และโรงพยาบาลชุมชน 2 แห่ง โรงพยาบาลชุมชนทำการเลือกโดยพิจารณาจากความเหมาะสมด้านความพร้อมทางด้านการแพทย์ ห้องปฏิบัติการและความสมัครใจในการเข้าร่วมโครงการ โดยประชากรที่นำมาศึกษามีคุณสมบัติดังนี้

- เป็นประชาชนชาวไทย
- มีภูมิลำเนาในจังหวัดดังกล่าว
- มีอายุระหว่าง 2-60 ปี
- ไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคเอดส์ระยะที่มีอาการของโรคชัดเจนที่มีการทราบมาก่อนแล้ว หรือมีอาการชัดเจน โรคมะเร็งในเลือด โรคมะเร็งในต่อมน้ำเหลือง SLE
- ไม่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเกินกว่า 1 เดือน ภายใน 1 ปีที่ผ่านมา (นับจากวันที่เข้าร่วมการศึกษา) เช่น steroids, immunosuppressive drugs, chemotherapy เป็นต้น
- ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยเรื้อรัง ไม่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลเกินกว่า 1 เดือน ภายใน 1 ปีที่ผ่านมา (นับจากวันที่เข้าร่วมการศึกษา)
- ไม่เป็นโรคประจำตัวหรือเป็นโรคเรื้อรัง รวมทั้งโรคที่เป็นอันตรายจากการเจาะเลือด ทั้งร่างกายและจิตใจ เช่น Hemophilia โรคหัวใจ โรคจิต เป็นต้น



### การคำนวณขนาดตัวอย่าง

คำนวณตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลผู้ติดเชื้อ เท่ากับ 1.5% (3)

### สูตรการคำนวณตัวอย่าง

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

โดย : Z ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.96

: p อัตราการติดเชื้อต่ออีกเสบซีในประเทศไทย 1.5% = 0.015

: q = 1-p

: ค่าความคลาดเคลื่อน (d) = 20% ของอัตราการติดเชื้อต่ออีกเสบซีในประเทศไทย

$$n = \frac{(1.96)^2 * (0.015) * (1-0.015)}{((20/100) * 0.015)^2} = 6,307 \text{ คน}$$

สามารถเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมดเป็นจำนวน

- จังหวัดเชียงราย รวมจำนวน 1,467 ตัวอย่าง
  - จังหวัดนครศรีธรรมราช รวมจำนวน 1,406 ตัวอย่าง
  - จังหวัดอุดรธานี รวมจำนวน 1,626 ตัวอย่าง
  - จังหวัดชลบุรี รวมจำนวน 1,326 ตัวอย่าง
- รวมทั้งสิ้น 5,825 ตัวอย่าง

หลังจากทำการเก็บตัวอย่าง ได้มีการรวบรวมข้อมูลการวิจัย โดย การทำแบบสัมภาษณ์ซึ่งประกอบไปด้วยข้อคำถามเกี่ยวกับประวัติการได้รับวัคซีนในอดีต ประวัติการเจ็บป่วยของผู้ป่วยและบุคคลในครอบครัว และข้อมูลพื้นฐานอันประกอบด้วย ชื่อ สกุล วัน เดือน ปี เกิด เพศ จำนวนพี่น้อง ที่อยู่อาศัย อาชีพตนเอง จากนั้นทำการตรวจทางห้องปฏิบัติการใช้ซีรัมตัวอย่างของอาสาสมัครตรวจ ในห้องปฏิบัติการ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสตับอักเสบ ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทำการตรวจด้วยวิธี ELISA

(AxSYM HCV version 3.0 Kit, Abbott Laboratory, North Chicago, IL) เพื่อทำการหาแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และซี

ทำการคัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวก ต่อแอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี จำนวนทั้งสิ้น

- จังหวัดเชียงราย จำนวน 23 ตัวอย่าง
- จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 36 ตัวอย่าง
- จังหวัดอุดรธานี จำนวน 25 ตัวอย่าง
- จังหวัดชลบุรี จำนวน 41 ตัวอย่าง

รวมทั้งสิ้น 125 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ แอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี มาทำการหาตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ RNA ไวรัสด้วยการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ 5'UTR ด้วยวิธี RT-PCR จากนั้นจึงทำการหาจีโนไทป์โดยแบ่งออกเป็นสองการทดลองคือ นำมาเพิ่มจำนวน DNA และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region และบริเวณ NS5B region เพื่อเปรียบเทียบและยืนยันผลการแยกจีโนไทป์ โดยซีรั่มตัวอย่างที่เหลือจะเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

## เครื่องมือและวัสดุที่ใช้ในการวิจัย

### 1. เครื่องมือ

- 1.1 Pipet tip: 10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l และ 1,000  $\mu$ l (Elkay, Ireland)
- 1.2 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)
- 1.3 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)
- 1.4 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500ml, 1000 ml (Pyrex, USA)
- 1.5 Flask: 250 ml, 500 ml, 1000ml (Pyrex, USA)
- 1.6 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)
- 1.7 Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA)
- 1.8 Pipette rack (Eppendorf, Germany)

- 1.9 Thermometer (Precision, Germany)
- 1.10 Parafilm (American Nation Can, USA)
- 1.11 Plastic wrap
- 1.12 Stirring-magnetic bar
- 1.13 sequence ABI310 kit (Perkin-Elmer, USA)
- 1.14 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)
- 1.15 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

## 2. อุปกรณ์

- 2.1 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), P1000 (100-1,000  $\mu$ l) (Eppendorf, Germany)
- 2.2 Vortex mixer (Scientific industry, USA)
- 2.3 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)
- 2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)
- 2.5 Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)
- 2.6 Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)
- 2.7 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)
- 2.8 Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany)
- 2.9 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
- 2.10 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)
- 2.11 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)
- 2.12 Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)
- 2.13 Thermal paper (Bio-RAD, USA)
- 2.14 Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)
- 2.15 Freezer-20°C (Sanyo, Japan)
- 2.16 Freezer-70°C (Forma Scientific, USA)
- 2.17 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)
- 2.18 ABIPRISM<sup>TM</sup> 310 Genetic (Perkin-Elmer, USA)
- 2.19 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

2.20 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

## สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

### 1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)
- 1.2 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)
- 1.3 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)
- 1.4 Sucrose (USB, Hongkong)
- 1.5 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)

### 2. สารเคมีสำหรับการสกัด RNA (RNA EXTRACTION)

- 2.1 Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)
- 2.2 Guanidine thiocyanate
- 2.3 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)
- 2.4 Glycogen (USB, Ohio)
- 2.5 Isopropanol (Sigma, Singapore)
- 2.6 Sodium acetate (Sigma, Singapore)
- 2.7 Phenol (Pierce, USA)
- 2.8 Chloroform (Sigma, Singapore)

### 3. สารเคมีสำหรับการทำ PCR

- 3.1 Eppendorf Mastermix (2.5x) (Eppendorf, Hamburg, Germany)

### 4. สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

- 4.1 PERFECT Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- 4.2 Isopropanol (Sigma, Singapore)

### 5. สารเคมีสำหรับการทำ DNA Sequencing

- 5.1 BigDye terminator v.3.1 cycle sequencing RR-100 (Perkin-Elmer)
- 5.2 BigDye terminator v.3.1 cycle 5x buffer (Perkin-Elmer, USA)
- 5.3 Template suspension reagent (TSR) (Perkin-Elmer, USA)

## วิธีการดำเนินการวิจัย

### Positive control

ได้ตัวอย่างจากซีรัมผู้บริจาคโลหิต ซึ่งให้ผลตรวจ anti-HCV positive และตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบ ซี ด้วยวิธี PCR

### Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จาก 4 จังหวัด จำนวน 6060 ตัวอย่าง ผู้วิจัยคัดเลือกตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาโดยคัดเลือกตัวอย่างซีรัมเฉพาะผู้ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี (anti-HCV ) โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้สารเคมี AxSYM HCV version 3.0 Kit (Abbott Laboratory, North Chicago, IL) ซึ่งเป็น recombinant HCV protein : CORE, NS3, NS4 และ NS5 protein และในรายที่ตรวจพบ anti HCV จะทำการสกัด RNA ต่อไป

### 1. การสกัด RNA ด้วยวิธี Guanidine extraction

นำ serum ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด

↓  
ใส่ serum 100  $\mu$ l

↓  
เติม Guanidine thiocyanate (GTC+2 ME) 500 $\mu$ l/ Tube

(GTC 9000  $\mu$ l : 2 ME 70  $\mu$ l)

↓  
Mix โดยการ invert นาน 15 วินาที แล้วนำไป vortex นาน 15 วินาที

↓  
เติม 2M Sodium Acetate 50  $\mu$ l

↓  
Phenol 500  $\mu$ l,  $\text{CHCl}_3$ : IAA (49:1) 100  $\mu$ l

↓



นำไปทำ RT-PCR ต่อไป

## 2. Reverse transcription เตรียม cDNA

ตารางที่ 2 Primer และสารต่างๆที่ใช้ในการทำ reverse transcription ของ ไวรัส HCV

สารเคมี	ปริมาณ (ul)
H <sub>2</sub> O	5.8
buffer (ของ Enzyme MMLV)	5.8
Enzyme MMLV	1.0
Specific primer หรือ random primer	1.0 หรือ 0.5
RNase inhibitor	0.5

วิธีการ

RNA ที่ได้จากการสกัดในข้อ 2, 10  $\mu$ l



Heat ที่ 65 °C, 5 นาที และแช่ที่ 0°C, 2 นาที



นำมาเติมสารละลายผสมดังตารางข้างต้น



บ่ม ที่ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง



เก็บ cDNA เก็บที่ -20°C

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 3. PCR amplification

เพิ่มจำนวน DNA ของ HCV ในบริเวณของ 5'UTR, CORE และ NS5B  
 ยีน

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบส ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR

Region	Primer ( nucleotide position)	Sequence	Product size(bp)
5'UTR	OC1 (18-37)	GCC GAC ACT CCA CCA TGA AT	260
	OC2 (328-347)	CAT GGT GCA CGG TCT ACG AG	
	IC3 (51-71)	GGA ACT ACT GTC TTC ACG CAG	
	IC4 (293-313)	TCG CAA GCA CCC TAT CAG GCA	
CORE(40)	954F ( 291-314)	ACT GCC TGA TAG GGT GCT TGC GAG	405
	953F (324-347)	AGG TCT CGT AGA CCG TGC ATC ATG	
	410R (735-754)	ATG TAC CCC ATG AGG TCG GC	
	951R (708-729)	CAC TGT RAG GGT ATC GAT GAC	
NS5B	NS5B_F1 (8011-8032)	CAA TWS MMA CBA CCA TCA TGG C	660
	NS5B_F2 (8171-8193)	GAT GGG HHS BKC MTA YGG ATT CC	
	NS5B_R1 (8818-8838)	CCA GGA RTT RAC TGG AGT GTG	

ตารางที่ 4 สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ 5'UTR

สารเคมี	1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR
Distilled water	11.25	11.25
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	11.25	11.25
Forward primer (25M/uL)	0.375	0.375
Reverse primer (25M/uL)	0.375	0.375
DNA template	2.5	1.0



ตารางที่ 5 สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ Core ยีน

สารเคมี	1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR
Distilled water	11.25	11.25
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	11.25	11.25
Forward primer (25M/uL)	0.375	0.375
Reverse primer (25M/uL)	0.375	0.375
DNA template	2.5	0.25

ตารางที่ 6 สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ NS5B ยีน

สารเคมี	1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR
Distilled water	11	13.5
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	10	10
Forward primer (25M/uL)	0.5	0.5
Reverse primer (25M/uL)	0.5	0.5
DNA template	3.0	0.5

ตารางที่ 7 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน 5'UTR และ CORE ยีน ทั้ง 1<sup>st</sup> PCR และ 2<sup>nd</sup> PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	เวลา(นาที)
Pre-denaturation	95	3
Denaturation	95	1
Annealing	49	1
Extension	72	1.30
Post-extension	72	7

ทำซ้ำ 35 รอบ

ตารางที่ 8 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน NS5B ยีน ทั้ง 1<sup>st</sup> PCR และ 2<sup>nd</sup> PCR

PCR cycle	1 <sup>st</sup> PCR	2 <sup>nd</sup> PCR
Pre-denaturation	94°C, 5 นาที	94°C, 5 นาที
Denaturation	94°C, 1 นาที	94°C, 1 นาที
Annealing	49°C, 1 นาที	52°C, 1.0 นาที
Extension	72°C, 1.30 นาที	72°C, 1.30 นาที
Post-extension	72°C, 7 นาที	72°C, 7 นาที

} ทำซ้ำ 40 รอบ

#### 4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- PCR product ที่ได้นำมาแยกใน 2% agarose gel electrophoresis โดยใช้ 100 bp DNA ladder เป็น marker เพื่อตรวจสอบขนาด DNA ที่ต้องการ ย้อมดูแถบ DNA ด้วย สารละลาย ethidium bromide
- ตัด gel ที่มีแถบ DNA ที่ต้องการ ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf)
- นำ DNA ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing (Apply Biosystems), โดยเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

ตารางที่ 9 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing

สารละลาย	ปริมาณสารที่ใส่ในแต่ละหลอด (μl)
Distilled water	15-A
5X buffer	2
BigDye RR-100	2
Primer (25M/uL)	0.35
ผลิตภัณฑ์ทำให้บริสุทธิ์แล้ว (pure product)	A

A ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์โดยให้มีความการดูดกลืนแสง (OD) = 60 μg/15ml

จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไว้ดังตาราง เข้าเครื่อง GeneAmp PCR system 9600 (Perkin elmer)

ตารางที่ 10 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR cycle Sequencing

PCR Cycle	1 <sup>o</sup> PCR
Denaturation	96 °c 0.10 นาที
Annealing	50 °c 0.05 นาที
Extension	60 °c 4.00 นาที (ทำซ้ำ 25 รอบ)
Post- extension	4 °c 15.00 นาที

หลังจากผ่านการทำ cycle sequencing แล้ว นำผลผลิตที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการตกตะกอนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABIPRISM™ ดังนี้

ผลผลิตที่ได้จาก cycle sequencing



เติม 4 µl glycogen + 80 µl 75% Isopropanal



ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที



ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 30 นาที



เทส่วนใสทิ้ง



ล้างด้วย 250 µl 75% Isopropanal



ปั่นเหวี่ยงที่ 13,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที



ทำให้ pellet แห้งด้วย vacuum 5 นาที



เติม template suspension reagent 25 µl



ทำการอ่านผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

## 5. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

โดยใช้โปรแกรม

- Clustal X เพื่อทำการเปรียบเทียบ sequence ที่เราได้มาจากการทำ DNA sequencing กับ sequence ที่เป็นตัวอ้างอิง (references)
- Chromas เป็นโปรแกรมที่ใช้ดูกราฟที่ได้จากการทำ sequencing
- Oligos เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับ sequence ที่เกิดจากการใช้ reverse primer
- Bioedit เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบ primers
- MEGA เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree
- Seqman เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการประกอบสายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมากกว่า 1 สายเข้าด้วยกัน

### การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

- ทำการหาความซุกของ anti-HCV
- ทำการหาความซุกของ HCV RNA
- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มี

อยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก [www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)

- ทำการจำแนก genotype โดยการ เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ ซี แต่ละ Genotype ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และ โปรแกรม MEGA version 3.1

- ทำการเปรียบเทียบความเหมือน หรือ ความต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ กรดอะมิโน ด้วยวิธี Cluster Analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X Version 1.83 และ BioEdit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษา กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ไวรัสตับอักเสบ ซี ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

#### เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ Program Sequin version 7.25 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin>) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Accession number EF543198-EF543258



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

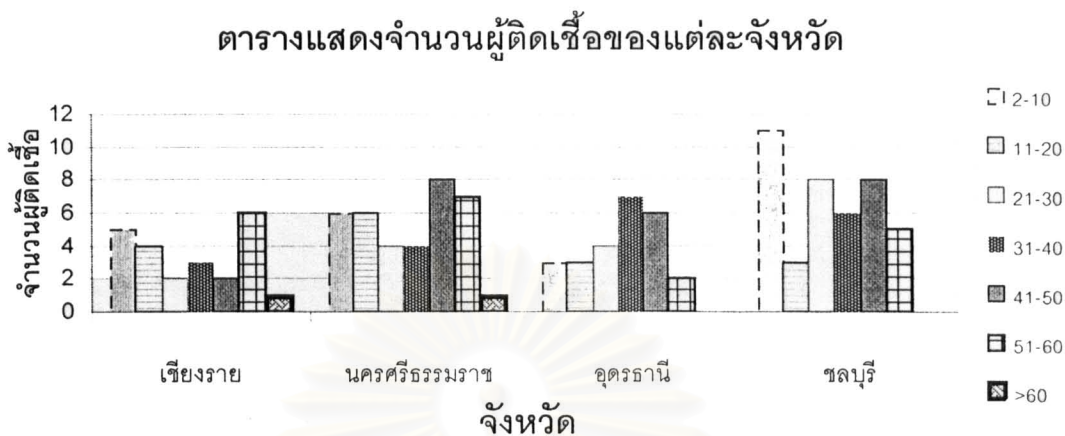
จากการเก็บตัวอย่างซีรัมจากประชากรชาวไทย อายุระหว่าง 2-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ในจังหวัด เชียงราย อุดรธานี ชลบุรี และนครศรีธรรมราช ได้จำนวนทั้งหมด 5825 คน จากนั้นได้ทำการคัดเลือกตัวอย่างซีรัมจากผู้ให้ผลบวกของแอนติบอดีของไวรัสตับอักเสบ ซี ด้วยวิธี ELISA จำนวนทั้งหมด 125 คน แต่เนื่องจากผลการตรวจด้วย ELISA จากห้องปฏิบัติการพบว่า บางตัวอย่างจำเป็นต้องมีการตรวจซ้ำ และตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อจาก โครงการศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบ บี และความชุกของไวรัสตับอักเสบ เอ และ บี จึงเป็นเหตุให้ปริมาณซีรัมตัวอย่าง บางตัวอย่างไม่เพียงพอต่อการตรวจ หรือทำซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง จึงทำการคัดเลือก ซีรัมตัวอย่างที่สามารถนำมาทำการศึกษา ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 11

#### ผลจากการตรวจด้วย ELISA

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

จังหวัด	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ ELISA	คิดเป็นร้อยละ (%)	จำนวนที่ใช้ในการศึกษา
เชียงราย	1467	23	1.57	21
นครศรีธรรมราช	1406	36	2.56	30
อุดรธานี	1626	25	1.54	20
ชลบุรี	1326	41	2.94	29
รวม	5825	125	2.15	100

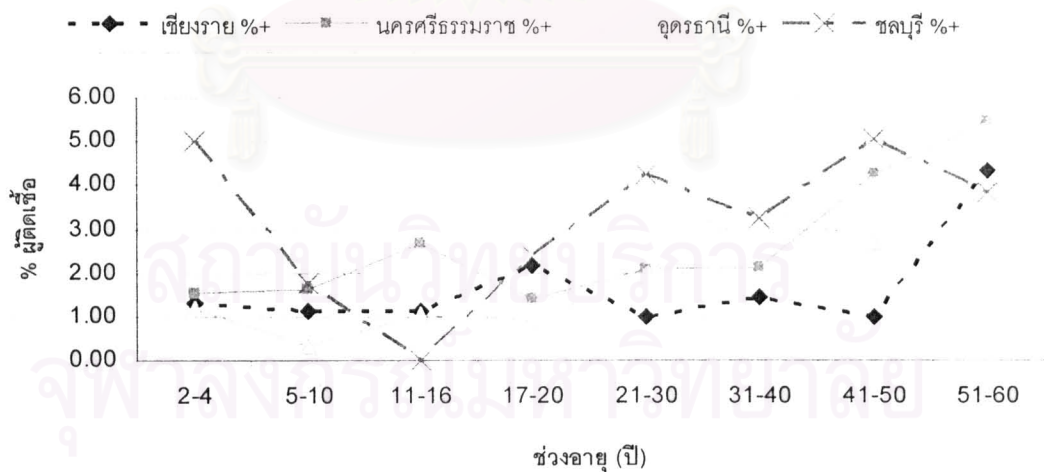
จากตารางที่ 11 จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้มีจำนวน 107 ตัวอย่าง แต่ละตัวอย่างได้ทำการใส่ Code ด้วย รหัสจังหวัด ตามด้วย รหัสตัวอย่าง ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก ข



รูปที่ 18 กราฟแท่งแสดงจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ELISA ในแต่ละจังหวัดแยกตามช่วงอายุ

จากรูปที่ 18 และตารางที่ 11 พบว่าจังหวัดชลบุรีมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ HCV Ab มากที่สุด

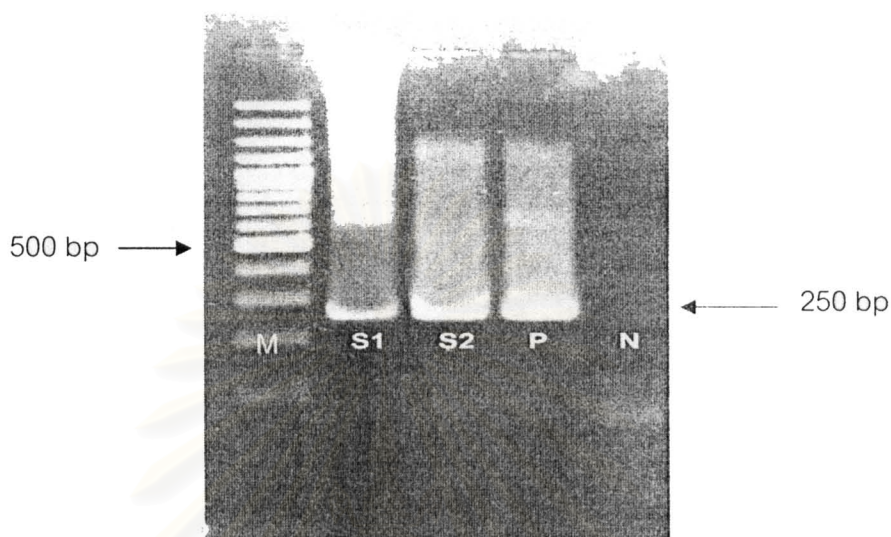
จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อ ELISA เมื่อแยกตามช่วงอายุจากแต่ละจังหวัดได้ดังรูป



รูปที่ 19 กราฟแสดงจำนวนร้อยละผู้ที่ให้ผลบวกต่อ ELISA กับช่วงอายุ แยกตามแต่ละจังหวัด จำนวนตัวอย่างแยกตามช่วงอายุของแต่ละจังหวัดได้แสดงรายละเอียดไว้ในภาคผนวก ค

### ผลการตรวจ HCV RNA

จากการทำ PCR ในส่วนของ 5'UTR ด้วย วิธี nested PCR โดย primer คู่แรก OC1, OC2 และ primer คู่สอง IC3, IC4 จะได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาด 250 bp ตามรูป



รูปที่ 20 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HCV ในส่วนของ 5'UTR ด้วย วิธี nested PCR โดย primer คู่แรก OC1, OC2 และ primer คู่สอง IC3, IC4 ได้ผลผลิตขนาด 250 bp

จากการตรวจสอบด้วยวิธี PCR จาก ซีรัม ตัวอย่างทั้งหมด ได้ผลบวกทั้งหมด 58 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 58.00 ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบซีรัมตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ RNA ไวรัสด้วยการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ 5'UTR ด้วยวิธี PCR

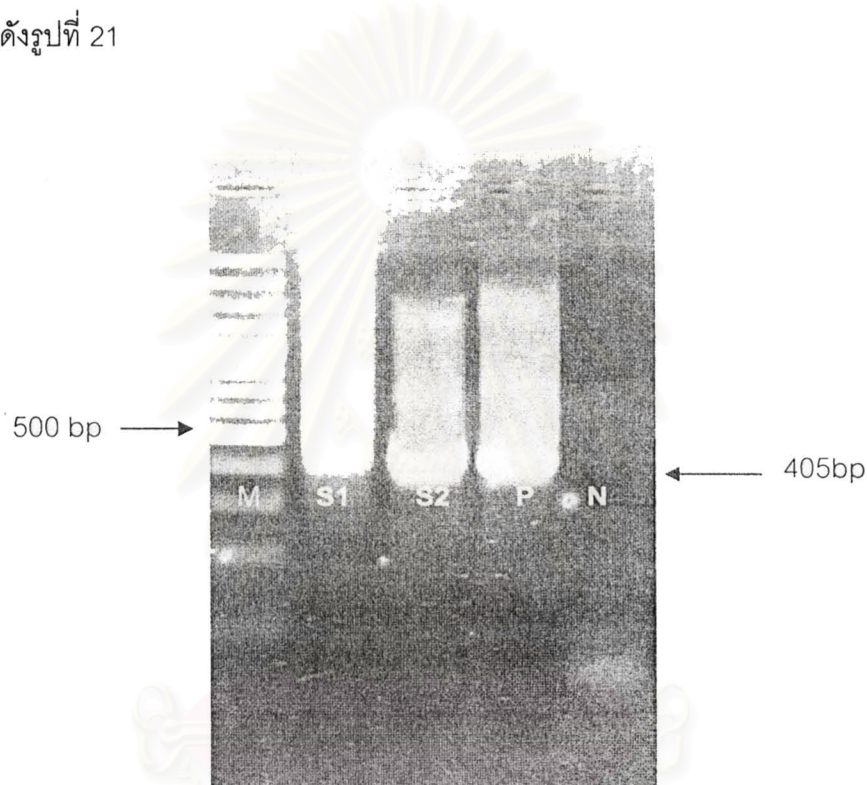
จังหวัด	จำนวนที่ใช้ในการศึกษา	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ PCR	คิดเป็นร้อยละ (%)
เชียงราย	21	18	31.03
นครศรีธรรมราช	30	14	24.14
อุดรธานี	20	16	27.59
ชลบุรี	29	10	17.24
<b>รวม</b>	<b>100</b>	<b>58</b>	<b>58.00</b>



เมื่อตรวจสอบ Viral RNA positive แล้ว ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะทำการเพิ่มจำนวน DNA ในสองบริเวณคือ Core region และ NS5B region เพื่อยืนยันผล viral RNA positive และใช้ในการหาจีโนไทป์ของไวรัสต่อไป

#### ผลการตรวจด้วย RT-PCR บริเวณ Core region

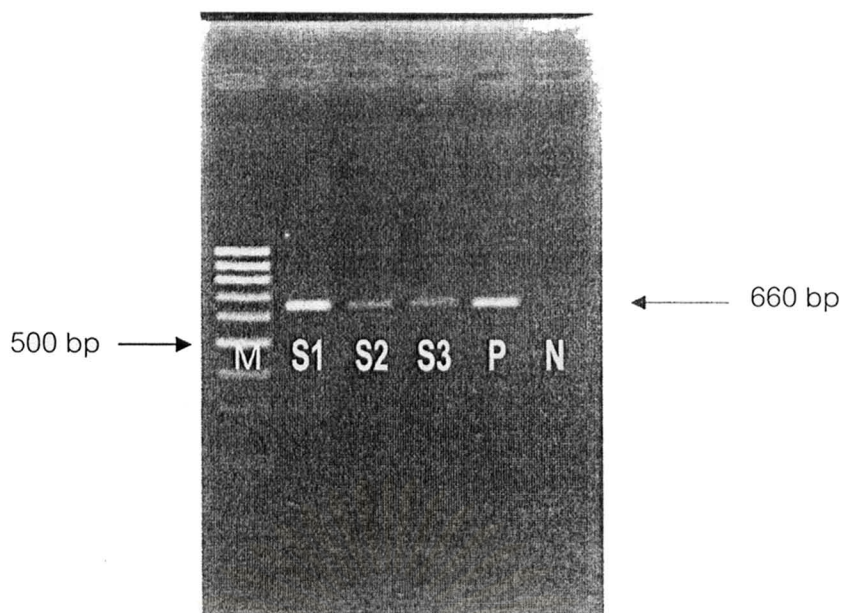
จากการทำ PCR ในส่วนของ Core region ด้วยวิธี nested PCR โดย primer คู่แรก 954F, 410R และ primer คู่สอง 953F, 951R ได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาดประมาณ 405 bp ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HCV ในส่วนของ Core region ได้ผลผลิตขนาด 405 bp โดย M คือ 100 bp marker, S1 คือ ตัวอย่างที่ 1, S2 คือ ตัวอย่างที่ 2, P คือ positive control และ N คือ negative control

#### ผลการตรวจด้วย RT-PCR บริเวณ NS5B region

จากการทำ PCR ในส่วนของของ NS5B ด้วยวิธี semi-nested PCR โดย primer คู่แรก NS5BF1, NS5BR1 และ NS5BF2, NS5BR1 จะได้ผลผลิตจากการทำ PCR ขนาดประมาณ 660 bp ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (DNA amplification) ของ HCV ในส่วนของ NS5B ได้ผลผลิตขนาด 660 bp โดย M คือ 100 bp marker, S1 คือ ตัวอย่างที่ 1, S2 คือ ตัวอย่างที่ 2, P คือ positive control และ N คือ negative control

ตารางที่ 13 สรุปผลการเพิ่มจำนวน DNA ในส่วนของ 5'UTR, Core region และส่วนของ NS5B ด้วยวิธี PCR ของแต่ละจังหวัด

จังหวัด	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ	จำนวนที่ให้ผลบวก	จำนวนที่ให้ผลบวกต่อ
	5'UTR	ต่อ Core	NS5B
เชียงราย	18	16	16
นครศรีธรรมราช	14	12	13
อุดรธานี	16	14	15
ชลบุรี	10	8	10
รวม	58	50	54

จากผลการถอดรหัสพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบ ซี ตัวอย่างที่สามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้มีดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงร้อยละของตัวอย่างที่สามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้ในส่วนของ Core และ NS5B ของแต่ละจังหวัด

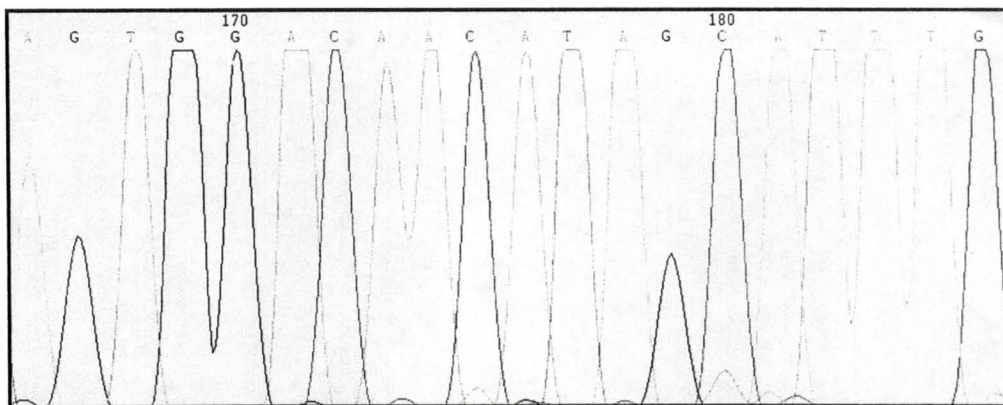
จังหวัด	จำนวนที่ให้ผลบวก		จำนวนที่สามารถถอดรหัสพันธุกรรม	
	Core	NS5B	Core (%)	NS5B (%)
เชียงราย	16	16	14 (87.50)	5 (31.25)
นครศรีธรรมราช	12	13	11 (91.67)	0 (0.00)
อุดรธานี	14	15	13 (92.86)	7(46.67)
ชลบุรี	8	10	7 (87.50)	4 (40.00)
รวม	50	54	45 (90.00)	16 (29.63)

#### ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Core region

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ Core region โดยได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้ เมื่อนำไปทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่ามีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ทุกตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างของ Chromatogram ของยีน core region ด้วยโปรแกรม Bioedit

ผลการตรวจสอบ genotype โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ นิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 3.1 พบว่าสามารถแยก genotype ของเชื้อตัวอย่างได้เป็น genotype 1, 2, 3 และ 6 ดัง ตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงผลจากการจำแนกจีโนไทป์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core region

จังหวัด	Core จีโนไทป์ (%)							รวม
	1a	1b	2a	2c	3a	3b	6	
เชียงใหม่	-	2(14)	1(7)	1(7)	8(57)	1(7)	1(7)	14
นครศรีธรรมราช	-	6(55)	-	-	4(36)	-	1(9)	11
อุดรธานี	2(15)	2(15)	-	-	9(69)	-	-	13
ชลบุรี	1(14)	2(29)	-	-	2(29)	-	2(29)	7
รวม	3(7)	12(27)	1(2)	1(2)	23(51)	1(2)	4(9)	45

จีโนไทป์ที่จำแนกได้ มาจากการสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบ กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ จาก GenBank โดยรหัสพันธุกรรมที่ใช้ในอ้างอิงได้แก่

Genotype 1a: AF482730, AF484969, AF484971

Genotype 1b: U45461, AY089748, AY089747, AY522238, AF482729

Genotype 2a: D10075

Genotype 2b: D10077, AY232740

Genotype 2c: AY587383

Genotype 3a: D14309, AF484989, D14311, AM263149, AF484981

Genotype 3b: DQ485279

Genotype 3i: AY434137

Genotype 4a: AF029298, D45193

Genotype 4c: L38338

Genotype 5a: D50466, U33434

Genotype 6a: AF484980, AF484976

Genotype 6b: D37841

Genotype 6f: DQ640360

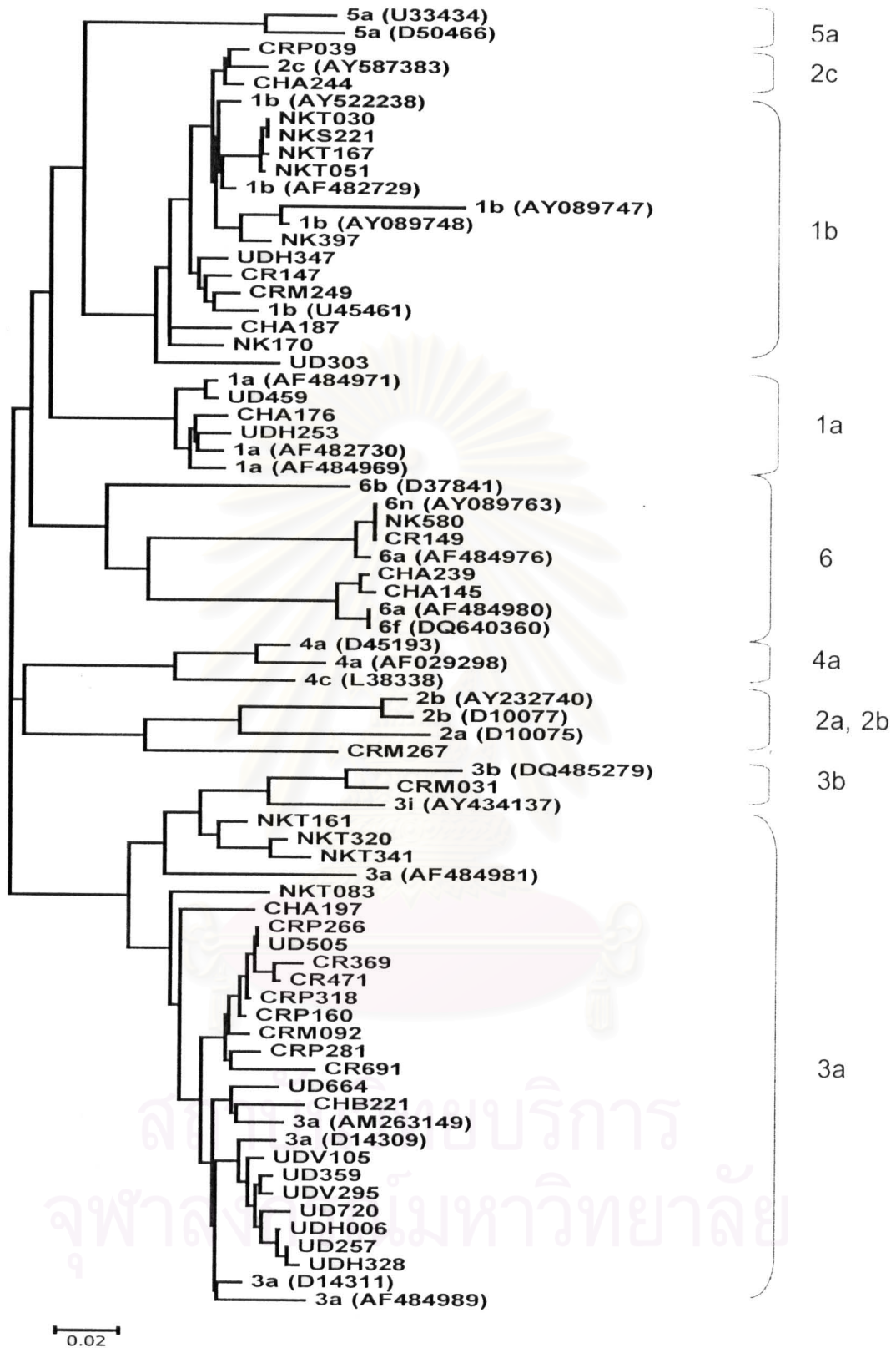
Genotype 6n: AY089763

ผลการจำแนกจีโนไทป์ในบริเวณ core region ด้วยการสร้าง phylogenetic tree

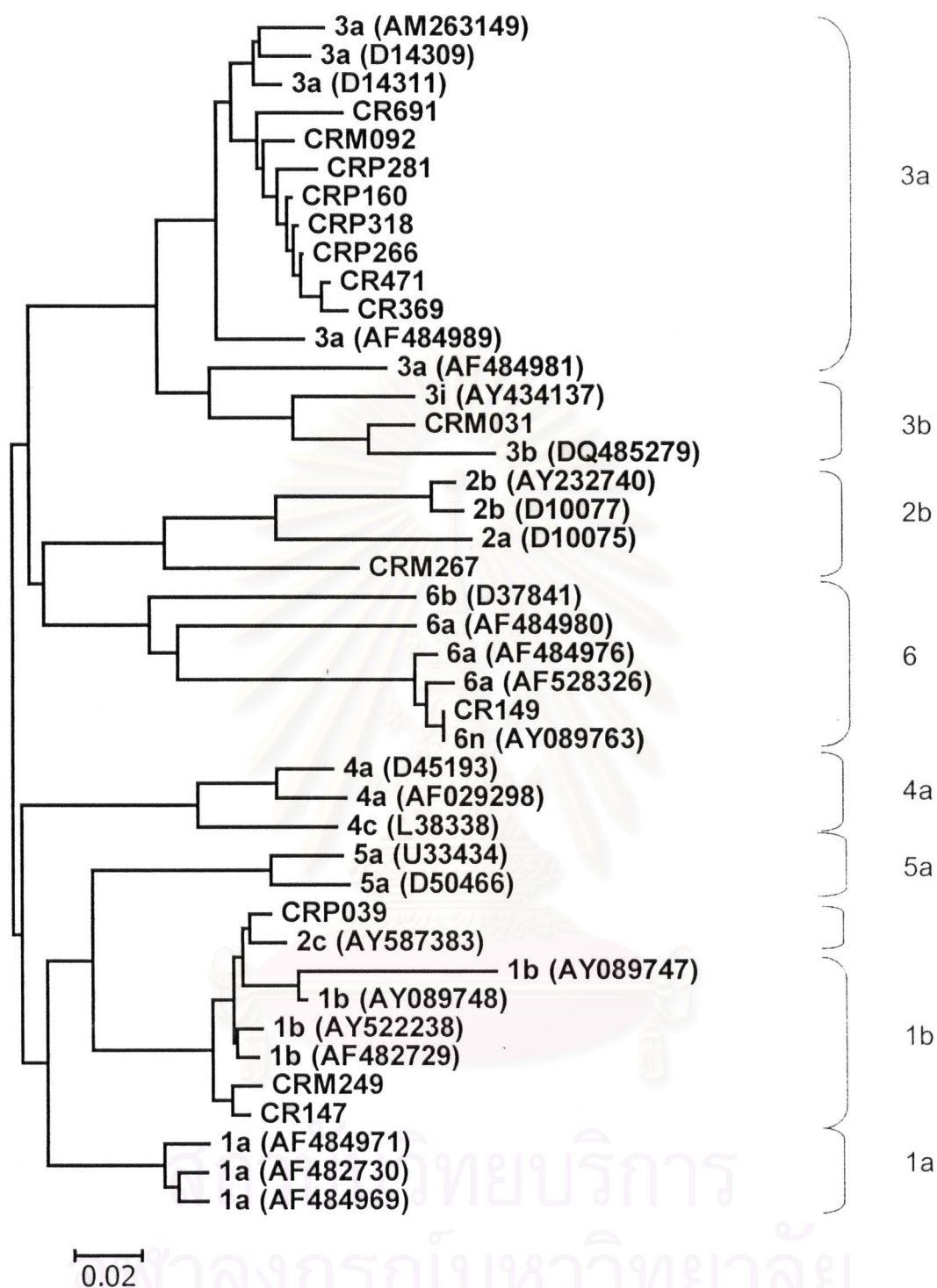
แสดงไว้ดังรูปที่ 26



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

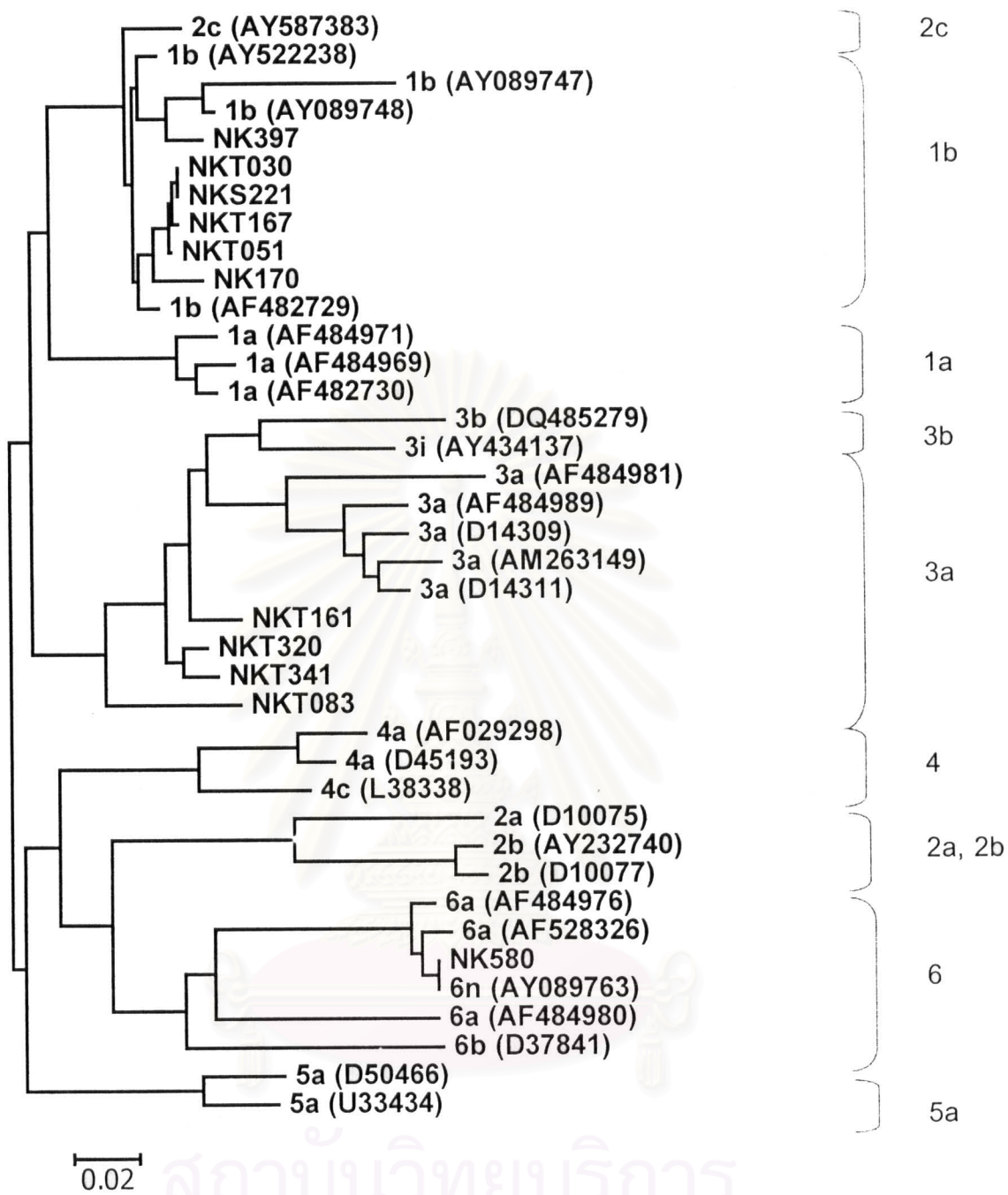


รูปที่ 26 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ core region โดย ตัวอย่างซีรัมในประเทศไทยจากสี่จังหวัดของประเทศได้แก่ จังหวัดเชียงราย, นครศรีธรรมราช, อุตรธานี และชลบุรี จีโนไทป์ที่พบคือ 1a, 1b, 2a, 2c, 3a, 3b และ 6 variants

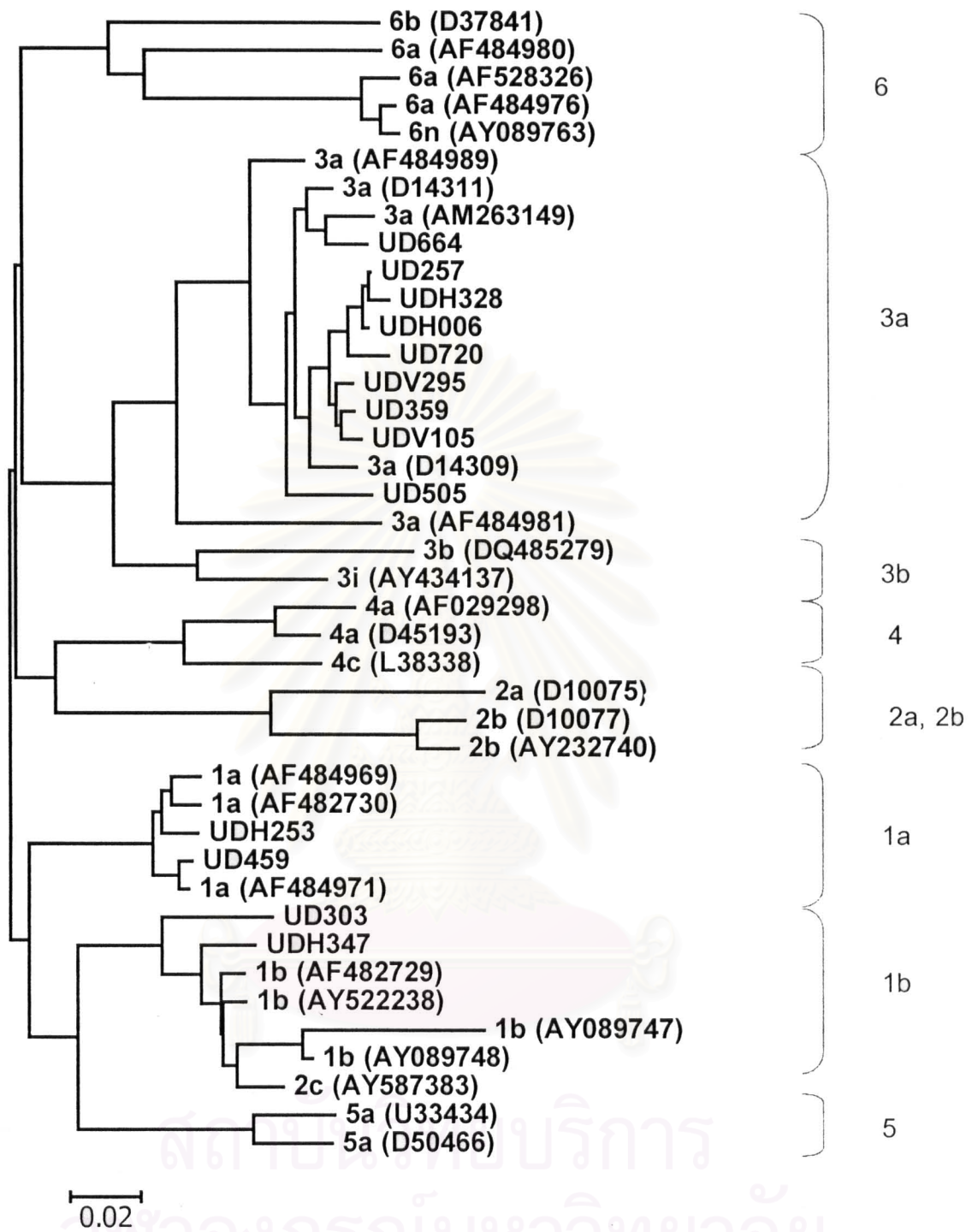


รูปที่ 27 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ core region โดย ตัวอย่างที่รับมาจากจังหวัดเชียงราย พบจีโนไทป์ 1b, 2a, 2c, 3a, 3b และ 6 variants

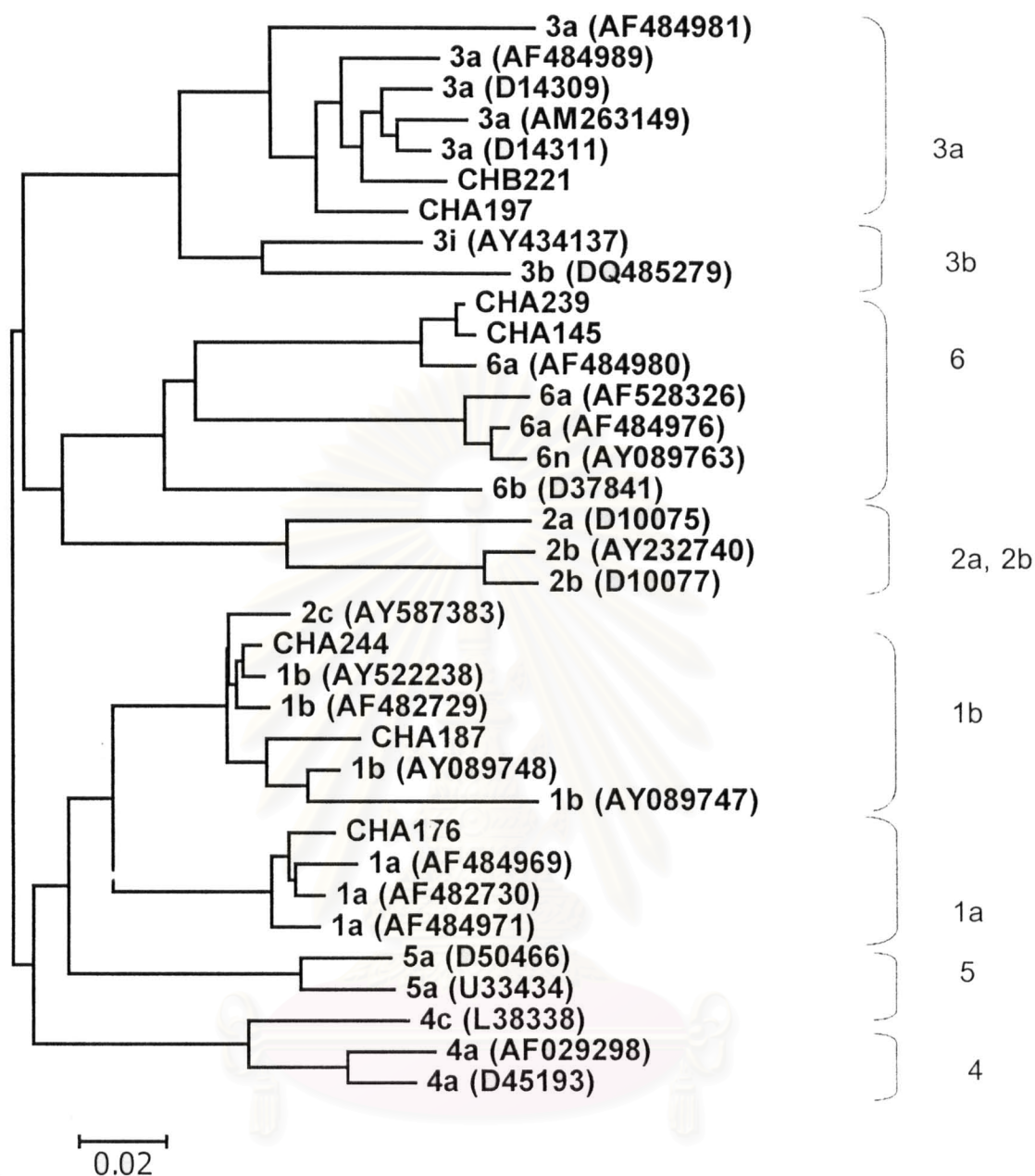




รูปที่ 28 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ core region โดยตัวอย่างที่รั้มาจากจังหวัดนครศรีธรรมราช จีโนไทป์ที่พบ 1b, 3a และ 6 variants



รูปที่ 29 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ core region โดยตัวอย่างซีรัมจากจังหวัดอุดรธานี จีโนไทป์ที่พบ 1a, 1b และ 3a



รูปที่ 30 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ core region โดย ตัวอย่างที่รับมาจากจังหวัดชลบุรี จีโนไทป์ที่พบ 1a, 1b, 3a และ 6 variants

### ผลการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน

จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม MEGA3.1 โดยใช้ แบบจำลองของ Kimura 2-parameter

ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละจีโนไทป์โดยเปรียบเทียบจีโนไทป์เดียวกันกับจังหวัดอื่น

ตารางที่ 16 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของแต่ละ genotype

	%ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)			
	เชียงราย	นครศรีธรรมราช	อุดรธานี	ชลบุรี
<b>Genotype 1</b>				
เชียงราย	1.41±0.69	-	-	-
นครศรีธรรมราช	3.58±0.85	1.78±0.53	-	-
อุดรธานี	6.63±1.09	7.27±1.12	8.39±1.38	-
ชลบุรี	5.99±1.00	5.39±0.87	7.18±1.07	8.23±1.44
<b>Genotype 3</b>				
เชียงราย	4.56±0.74	-	-	-
นครศรีธรรมราช	7.66±1.23	7.17±1.22	-	-
อุดรธานี	5.34±0.94	8.19±1.33	2.70±0.59	-
ชลบุรี	6.32±1.06	7.79±1.27	4.69±0.91	5.47±1.48
<b>Genotype 6</b>				
เชียงราย	-	-	-	-
นครศรีธรรมราช	0.00±0.00	-	-	-
ชลบุรี	14.68±2.32	14.68±2.32	-	7.02±0.49

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโน ของแต่ละ genotype

	ความแตกต่างของกรดอะมิโน (%)			
	เชียงราย	นครศรีธรรมราช	อุดรธานี	ชลบุรี
<b>Genotype 1</b>				
เชียงราย	2.13±1.45	-	-	-
นครศรีธรรมราช	3.21±1.51	2.13±1.29	-	-
อุดรธานี	4.32±1.59	4.17±1.63	3.59±1.41	-
ชลบุรี	4.67±1.74	4.12±1.56	2.86±1.01	3.59±1.55
<b>Genotype 3</b>				
เชียงราย	2.13±0.76	-	-	-
นครศรีธรรมราช	5.66±2.14	2.55±1.26	-	-
อุดรธานี	2.23±1.10	5.50±2.28	0.72±0.41	-
ชลบุรี	2.92±1.13	5.54±2.14	2.43±1.11	4.39±2.15
<b>Genotype 6</b>				
เชียงราย	-	-	-	-
นครศรีธรรมราช	0.00±0.00	-	-	-
ชลบุรี	4.30±2.07	4.30±2.07	-	0.00±0.00

ทำการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของตัวอย่างที่ทำการศึกษา เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของต่างประเทศ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่นำมาเปรียบเทียบได้แก่

#### Genotype 1

ประเทศจีนได้แก่ AY460204, AY587016, DQ859967

ประเทศญี่ปุ่นได้แก่ AB008442, AB061927, AB061946

ประเทศเวียดนามได้แก่ AB162862, AB162862, AB162866

ประเทศอินโดนีเซียได้แก่ D14853, D16189

#### Genotype 3

ประเทศจีนได้แก่ DQ5859943, U10197

ประเทศญี่ปุ่นได้แก่ AB092965, D11443, D49374

ประเทศอินโดนีเซียได้แก่ D49749, D49750, D49752

## Genotype 6

ประเทศจีนได้แก่ AY878650, DQ859953

ประเทศเวียดนามได้แก่ DQ155566, AB162866, L38341

ประเทศอินโดนีเซียได้แก่ D49748, D49751, D49758

ไม่พบข้อมูล Genotype 3 ของประเทศเวียดนาม และ Genotype 6 ของประเทศญี่ปุ่นใน GenBank

ตารางที่ 18 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ต่างประเทศ

	ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)			
	จีน	ญี่ปุ่น	เวียดนาม	อินโดนีเซีย
<u>Genotype 1</u>				
เขียงราย	10.46±3.20	6.99±2.64	11.45±2.72	20.41±5.32
นครศรีธรรมราช	7.65±2.44	4.42±1.72	10.55±2.38	19.37±5.66
อุดรธานี	17.51±3.61	16.89±3.46	15.64±3.25	23.62±4.08
ชลบุรี	14.09±2.89	12.35±2.71	13.69±2.97	19.26±4.32
<u>Genotype 3</u>				
เขียงราย	19.93±3.60	27.88±4.55	-	39.92±7.15
นครศรีธรรมราช	20.09±3.62	26.13±4.33	-	33.37±6.45
อุดรธานี	20.69±3.69	26.81±4.32	-	43.59±8.20
ชลบุรี	21.24±3.83	26.83±4.38	-	43.47±8.04
<u>Genotype 6</u>				
เขียงราย	25.65±4.89	-	29.25±4.90	30.74±5.92
นครศรีธรรมราช	25.65±4.89	-	29.25±4.90	30.74±5.92
ชลบุรี	20.39±5.40	-	28.05±4.73	24.85±5.32

ตารางที่ 19 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของกรดอะมิโนกับกรดอะมิโนของต่างประเทศ

	ความแตกต่างของกรดอะมิโน (%)			
	จีน	ญี่ปุ่น	เวียดนาม	อินโดนีเซีย
<u>Genotype 1</u>				
เซียงราย	4.67±1.75	3.21±1.37	4.31±1.57	6.52±2.38
นครศรีธรรมราช	4.43±1.67	2.85±1.30	3.89±1.49	6.52±2.41
อุดรธานี	3.31±1.27	3.58±1.31	3.50±1.25	4.87±1.89
ชลบุรี	3.23±1.22	3.57±1.35	3.47±1.25	5.05±1.91
<u>Genotype 3</u>				
เซียงราย	4.05±1.65	9.45±2.34	-	7.79±2.64
นครศรีธรรมราช	6.62±2.29	11.49±2.77	-	8.71±2.99
อุดรธานี	2.57±1.10	7.98±1.94	-	6.29±2.35
ชลบุรี	3.58±1.46	8.73±2.09	-	7.05±2.36
<u>Genotype 6</u>				
เซียงราย	2.67±1.41	-	3.21±1.29	7.28±2.46
นครศรีธรรมราช	2.67±1.41	-	3.21±1.29	7.28±2.46
ชลบุรี	4.857±2.35	-	4.31±1.68	6.15±2.19

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ NS5B region**

จากการตรวจสอบผลการถอดรหัสพันธุกรรมในส่วนของ NS5B โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่ามีความเหมือนกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ทุกตัวอย่าง

<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus gene for NS5B, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate sbd120(W) NS5B protein (NS5B) gene, partial	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate 159 NS5B gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus gene for NS5B, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate ER55 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate M10 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate sbd120(D) NS5B protein (NS5B) gene, partial	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate EH55 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">F51550.1</a>	Hepatitis C virus isolate 5522 RNA-dependent RNA polymerase gene	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate ER51 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate M3 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate 414 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate 44 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate EH510 NS5B gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate 32E poliprotein gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus gene for NS5B, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate UCL6 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate EH58 NS5B gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate G16 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate G10 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate G4 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate EH53 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate 52 poliprotein gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate sbd121(D) NS5B protein (NS5B) gene, partial	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate M8 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate sbd124 NS5B protein (NS5B) gene, partial	700	700	100%
<a href="#">U110111.1</a>	Hepatitis C virus isolate ER59 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds	700	700	100%

รูปที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ในส่วน NS5B region ด้วยโปรแกรม Blast ปรากฏว่ามีความเหมือนกับไวรัสตับอักเสบ ซี ทุกตัวอย่าง

U110111.1: Hepatitis C virus gene for NS5B, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate sbd120(W) NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate 159 NS5B gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus gene for NS5B, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate ER55 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate M10 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate sbd120(D) NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate EH55 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

F51550.1: Hepatitis C virus isolate 5522 RNA-dependent RNA polymerase gene

U110111.1: Hepatitis C virus isolate ER51 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate M3 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate 414 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate 44 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate EH510 NS5B gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate 32E poliprotein gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus gene for NS5B, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate UCL6 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate EH58 NS5B gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate G16 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate G10 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate G4 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate EH53 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate 52 poliprotein gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate sbd121(D) NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate M8 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate sbd124 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

U110111.1: Hepatitis C virus isolate ER59 NS5B protein (NS5B) gene, partial cds

รูปที่ 32 แสดงผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ในส่วน NS5B region พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน NS5B region จริง และมีความต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในธนาคารพันธุกรรมเพียงเล็กน้อย



จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของ NS5B region และถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกจีโนไทป์นั้นสามารถถอดรหัสพันธุกรรมได้ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง จาก 59 ตัวอย่าง

ผลการตรวจสอบ genotype โดยการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 3.1 พบว่าสามารถแยก genotype ของเชื้อตัวอย่างได้เป็น genotype 1, 3 และ 6 ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงผลการจำแนกจีโนไทป์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region

จังหวัด	NS5B จีโนไทป์ (%)							รวม
	1a	1b	2a	2c	3a	3b	6	
เชียงใหม่	-	1(20)	-	-	1(20)	1(20)	2(40)	5
นครศรีธรรมราช	-	-	-	-	-	-	-	-
อุดรธานี	2(26)	1(14)	-	-	4(57)	-	-	7
ชลบุรี	1(25)	2(50)	-	-	1(25)	-	-	4
รวม	3(19)	4(25)	-	-	6(38)	1(6)	2(13)	16

จากผลการถอดรหัสพันธุกรรม ไม่สามารถถอดรหัสตัวอย่างจากจังหวัดนครศรีธรรมราชได้

จีโนไทป์ที่จำแนกได้ มาจากการสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก GenBank โดยรหัสพันธุกรรมที่ใช้ในการอ้างอิงได้แก่

Genotype 1

Genotype 1a: DQ889253, AY683101, DQ838739

Genotype 1b: AY682784, AY587016

Genotype 2

Genotype 2a: AY973858

Genotype 2b: D10988

Genotype 2c: D50409

## Genotype 3

Genotype 3a: EF189902, D17763, DQ437509

Genotype 3b: D49374

Genotype 3k: D63821

## Genotype 4

Genotype 4a: AY973864

## Genotype 5

Genotype 5a: Y13184

## Genotype 6

Genotype 6a: Y12083

Genotype 6b: D84262

Genotype 6d: D84263

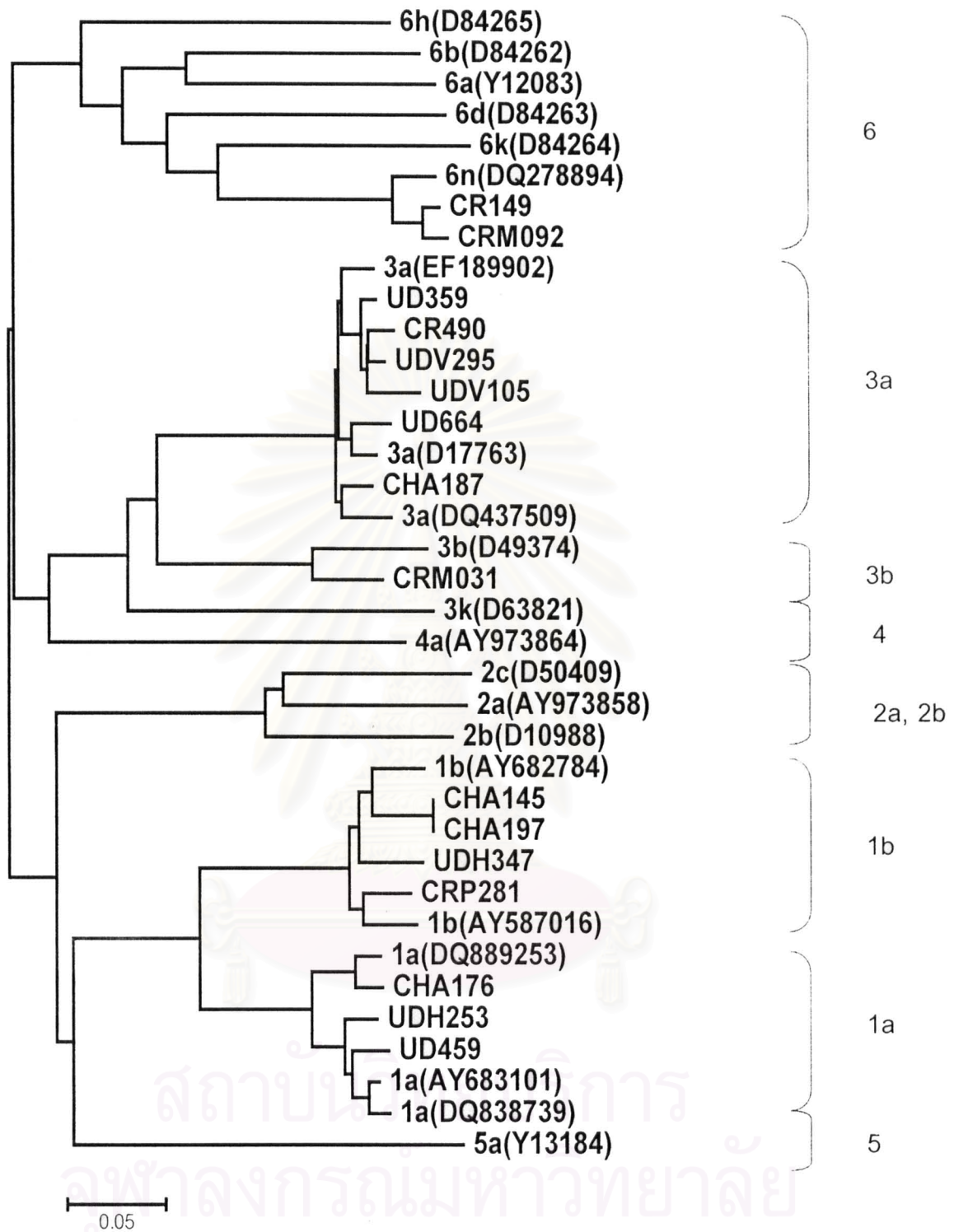
Genotype 6h: D84265

Genotype 6k: D84264

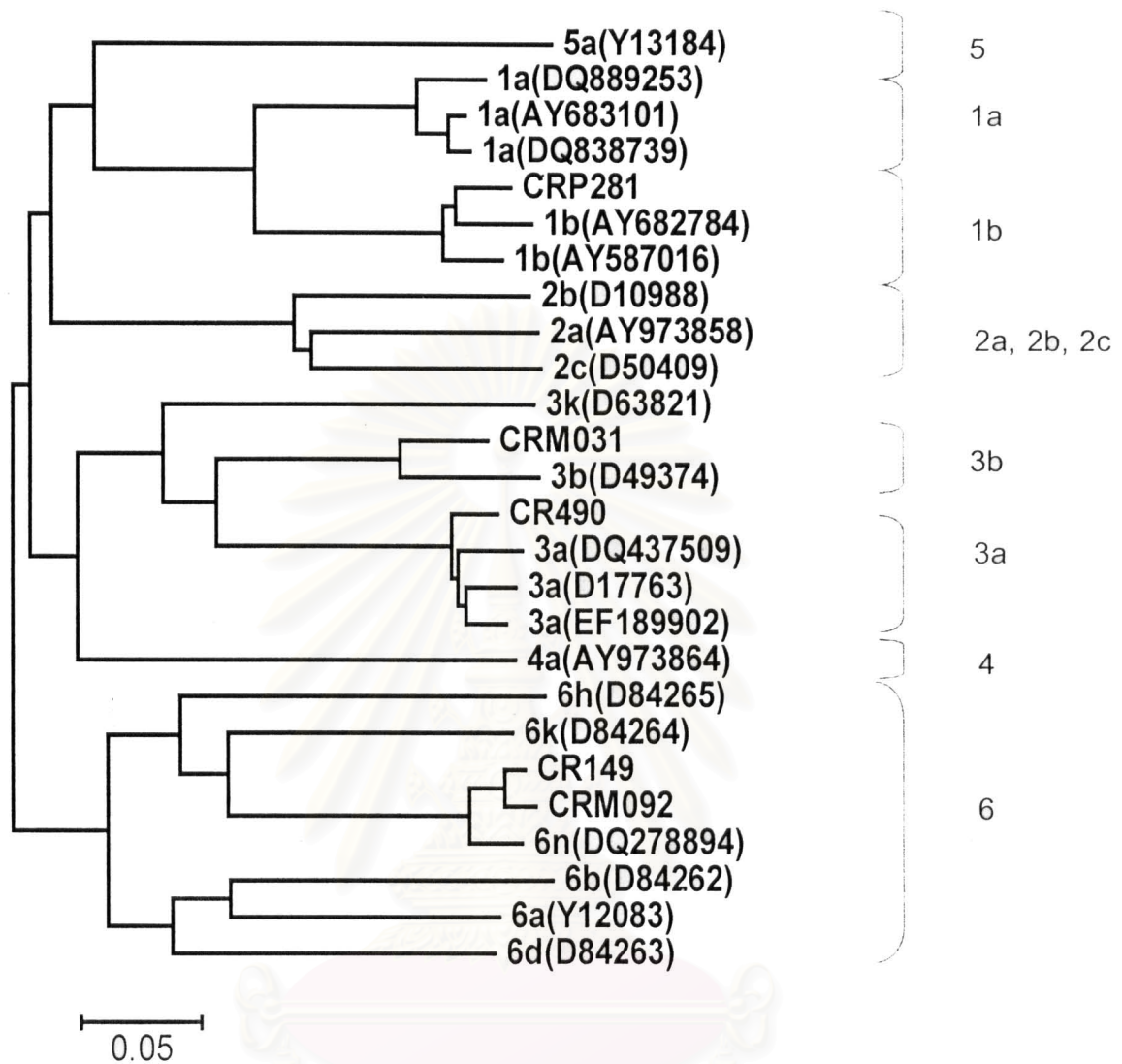
Genotype 6n: DQ278894

ผลการจำแนกจีโนไทป์ในบริเวณ NS5B region ด้วยการสร้าง phylogenetic tree แสดงไว้ดังรูปที่ 33

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

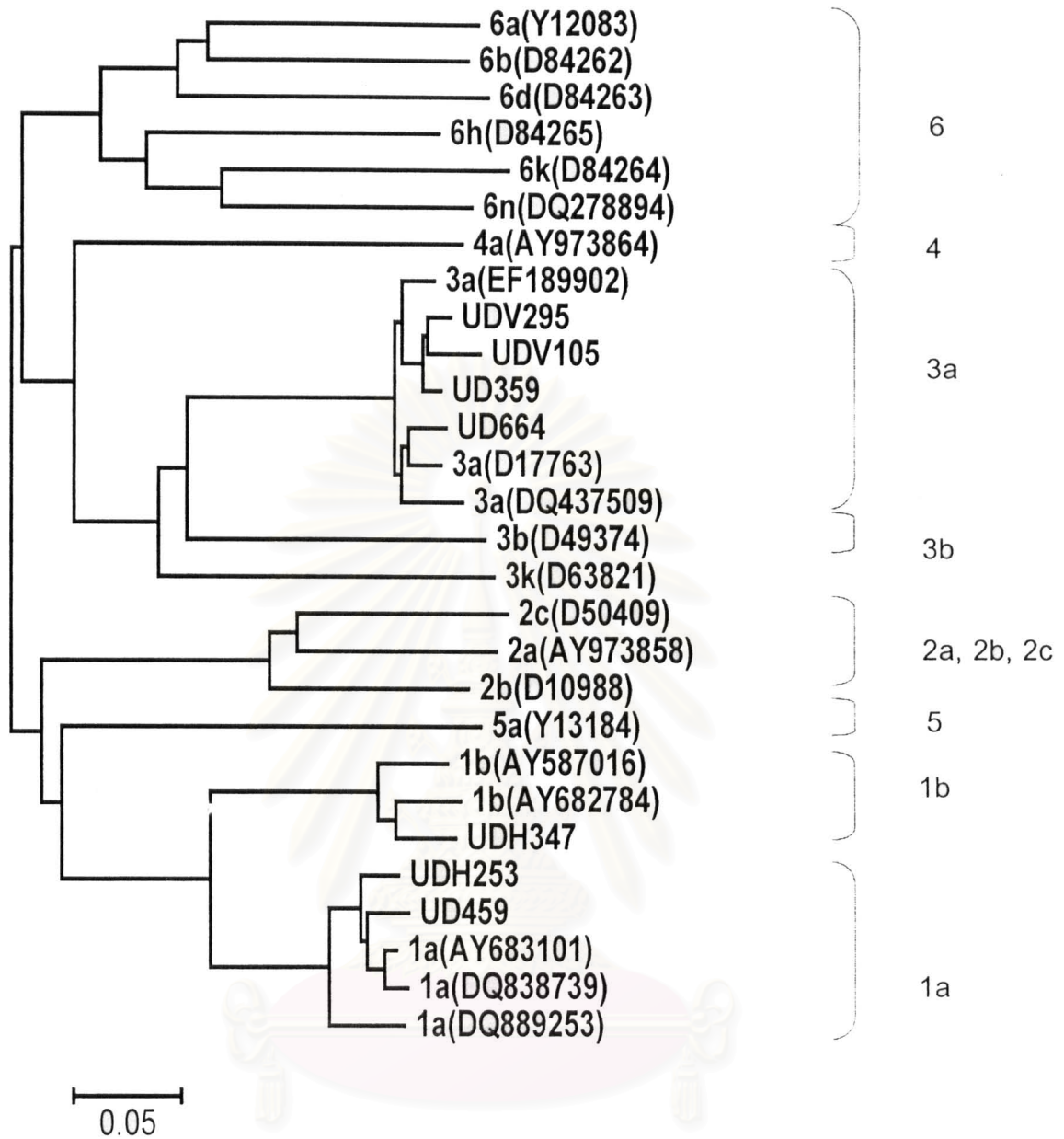


รูปที่ 33 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region โดยตัวอย่างซีรัมในประเทศไทยจากสี่จังหวัดของประเทศได้แก่ จังหวัดเชียงราย, นครศรีธรรมราช, อุตรธานี และชลบุรี จีโนไทป์ที่พบคือ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6 variants



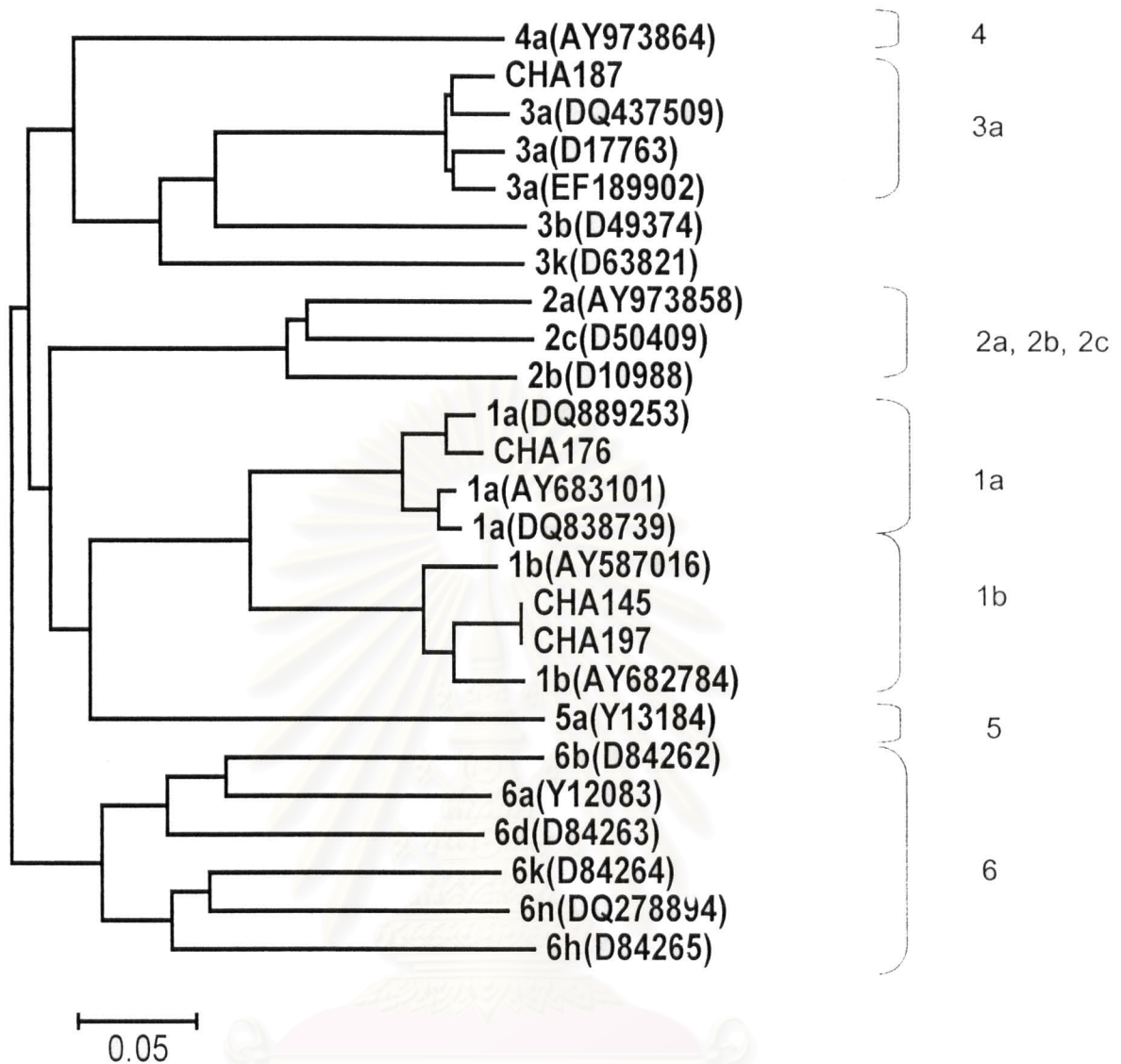
รูปที่ 34 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region โดยตัวอย่างซีรัมจากจังหวัด เชียงรายจีโนไทป์ที่พบ 1b, 3a, 3b และ 6 variants

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region โดยตัวอย่างที่เริ่มจากจังหวัดอุดรธานีจีโนไทป์ที่พบ 1a, 1b และ 3a

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 36 Phylogenetic tree แสดงการแยกจีโนไทป์ด้วยนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ NS5B region โดยตัวอย่างซีรัมจากจังหวัดชลบุรี จีโนไทป์ที่พบ 1a, 1b และ 3a

โดยทั่วไปไวรัสตับอักเสบซีที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็น จีโนไทป์ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6 variants โดยจีโนไทป์ 3a พบได้มากที่สุด (6) เมื่อเทียบกับทั่วโลกซึ่งพบจีโนไทป์ 1 มากที่สุด ส่วนจีโนไทป์ 6 จะพบได้เฉพาะบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น

จากการแยกจีโนไทป์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core และ NS5B region มี 5 ตัวอย่าง ให้ผลในการจำแนกไม่สัมพันธ์กัน ดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงตัวอย่างที่ให้ผลในการจำแนกจีโนไทป์ไม่สัมพันธ์กัน

ตัวอย่าง	Core จีโนไทป์	NS5B จีโนไทป์
CRM092	3a	6
CRP281	3a	1b
CHA145	6	1b
CHA187	1b	3a
CHA197	3a	1b

ตัวอย่างที่ให้ผลการจำแนกที่ไม่สอดคล้องกันดังตารางที่ 16 ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น intergenotypic recombinant ได้ จำเป็นต้องทำการเพิ่มจำนวน DNA ให้ได้ขนาดที่ยาวมากขึ้น เพื่อหาบริเวณที่เกิด recombination ต่อไป

ผลการจำแนกจีโนไทป์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ Core และ NS5B region และ Accession number EF543198-EF543258 แสดงไว้ในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 สรุปผลการจำแนกจีโนไทป์ ด้วย Core และ NS5B region โดยวิธี phylogenetic analysis

ตัวอย่าง	Core จีโนไทป์	Accession no.	NS5B จีโนไทป์	Accession no.
CR147	1b	EF543227	-	-
CR149	6	EF543222	6	EF543243
CR369	3a	EF543212	-	-
CR471	3a	EF543213	-	-
CR490	-	-	3a	EF543245
CR691	3a	EF543217	-	-
CRM031	3b	EF543218	3b	EF543251
CRM092	3a	EF543214	6	EF543244
CRM249	1b	EF543226	-	-
CRM267	2a	EF543242	-	-
CRP266	3a	EF543208	-	-
CRP039	2c	EF543233	-	-
CRP160	3a	EF543211	-	-

ตัวอย่าง	Core จีโนมไทย	Accession no.	NS5B จีโนมไทย	Accession no.
CRP281	3a	EF543215	1b	EF543255
CRP318	3a	EF543210	-	-
NK170	1b	EF543237	-	-
NK397	1b	EF543235	-	-
NK580	6	EF543223	-	-
NKS221	1b	EF543230	-	-
NKT030	1b	EF543229	-	-
NKT051	1b	EF543232	-	-
NKT083	3a	EF543216	-	-
NKT161	3a	EF543221	-	-
NKT167	1b	EF543231	-	-
NKT320	3a	EF543219	-	-
NKT341	3a	EF543220	-	-
UD257	3a	EF543200	-	-
UD303	1b	EF543238	-	-
UD359	3a	EF543198	3a	EF543247
UD459	1a	EF543239	1a	EF543256
UD505	3a	EF543209	-	-
UD664	3a	EF543206	3a	EF543249
UD720	3a	EF543203	-	-
UDH006	3a	EF543202	-	-
UDH253	1a	EF543240	1a	EF543257
UDH328	3a	EF543201	-	-
UDH347	1b	EF543228	1b	EF543254
UDV105	3a	EF543204	3a	EF543248
UDV295	3a	EF543199	3a	EF543246
CHA145	6	EF543225	1b	EF543252
CHA176	1a	EF543241	1a	EF543258
CHA187	1b	EF543236	3a	EF543250
CHA197	3a	EF543207	1b	EF543253
CHA239	6a	EF543224	-	-
CHA244	1b	EF543234	-	-
CHB221	3a	EF543205	-	-

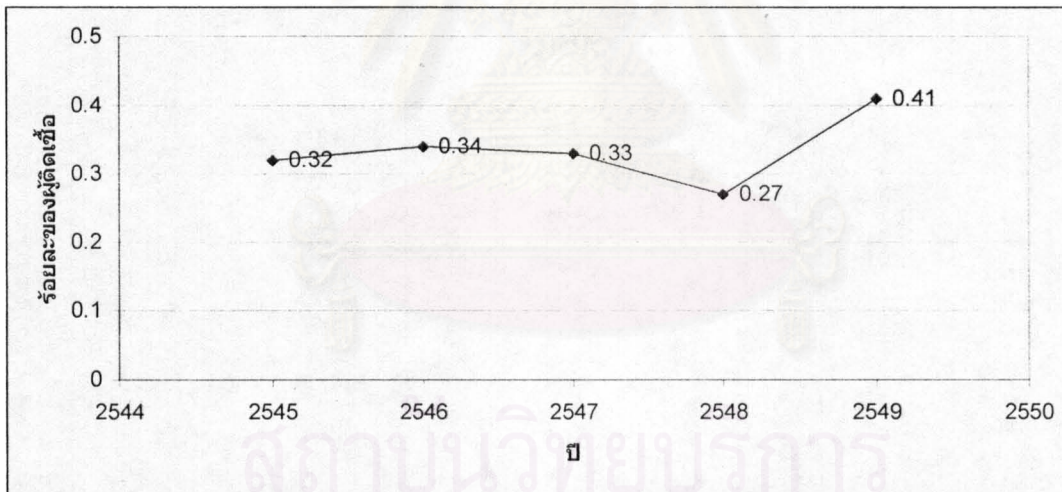


## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ที่เคยมีรายงานในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้ประชากรกลุ่มย่อย (3, 4, 16) หรือผู้บริจาคโลหิต (7, 30) ค่าความชุกที่ได้เป็นตัวแทนของประเทศที่ไม่ดีนัก เนื่องจากไม่มีการกระจายตัวของตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างจากผู้บริจาคโลหิต ต้องตรวจหาการติดเชื้อชนิดอื่น และถูกคัดกรองออกไป ทำให้ค่าที่ได้ต่ำกว่าความน่าจะเป็น ในการศึกษานี้ เก็บตัวอย่างจากสี่ภาคของประเทศในปี 2547 โดยใช้วิธีการเลือกจังหวัดในแต่ละภาคแบบจำเพาะเจาะจง เลือกโรงพยาบาลประจำจังหวัดหนึ่งแห่ง และโรงพยาบาลระดับชุมชนอีกสองแห่ง เพื่อการกระจายตัวอย่างที่เหมาะสม รวมทั้งสิ้น 5,925 ตัวอย่าง ดังนั้นความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถใช้เป็นตัวแทนของทั้งประเทศได้

การศึกษานี้เก็บตัวอย่างจาก ประชากรไทย อายุระหว่าง 2-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลของรัฐ ในภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย) ภาคกลาง (จังหวัดชลบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดอุดรธานี) และภาคใต้ (จังหวัดนครศรีธรรมราช) พบว่ามีผู้ติดเชื้อที่ให้ผลบวกของ anti-HCV ด้วยวิธี ELISA จำนวน 125 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.15 (ดังตารางที่ 11)



รูปที่ 37 กราฟแสดงร้อยละของผู้ติดเชื้อจากผู้บริจาคโลหิตทั้งหมด ที่มาบริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ระหว่างปี พ.ศ. 2545-2549 (ที่มา: ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย)

จากรูปที่ 37 รายงานร้อยละของผู้ติดเชื้อ HCV ในผู้บริจาคโลหิตทั้งหมดจาก สภากาชาดไทยพบว่า ผู้ติดเชื้อตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2548 มีแนวโน้มลดลง แต่เพิ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2549 ร้อยละที่เพิ่มขึ้นนั้นอาจเนื่องมาจาก มีผู้บริจาคโลหิตรายใหม่ในปี พ.ศ. 2549 เพิ่มขึ้น (ผู้

บริจาคโลหิตรายใหม่ยังไม่เคยถูกตรวจคัดกรองหาการติดเชื้ออื่น) หรือมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่เพิ่มขึ้น ความชุกที่รายงานจากสภากาชาดไทยในปี 2547 เท่ากับ 0.33% เมื่อเปรียบเทียบกับความชุกจากการศึกษานี้ ที่เก็บตัวอย่างในปีเดียวกัน เท่ากับ 2.15% พบว่ารายงานจากสภากาชาดไทยมีค่าน้อยกว่า สอดคล้องกับเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

จากตารางที่ 11 และรูปที่ 18 พบว่าจังหวัดชลบุรี มีจำนวนผลบวกของ anti-HCV สูงที่สุด โดยพบว่า ช่วงอายุตั้งแต่ 2-10 ปี มีจำนวนมากที่สุด ผู้ติดเชื้อในช่วงอายุนี้อาจติดเชื้อทางแม่สู่ลูก (vertical transmission) และเนื่องจาก inclusion criteria ของงานวิจัยนี้ จะคัดกรองผู้ป่วย IVDU และ HIV ที่ทราบอาการ หรือจากการสอบถามคนไข้ที่มาเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลในแต่ละภูมิภาค ซึ่งไม่สามารถคัดกรอง คนไข้ที่อาจติดเชื้อ HIV โดยที่ผู้ป่วยเองไม่ทราบมาก่อน หากผู้ป่วยมีการติดเชื้อ HIV จะมีโอกาสสูงในการติดเชื้อ HCV ง่ายกว่าคนปกติ รวมทั้งมีโอกาสถ่ายทอดสู่ลูกได้ ดังนั้นทำให้ค่าความชุกที่ได้มากกว่าคนปกติ จากรูปที่ 19 พบว่าในทุกจังหวัดมีแนวโน้มของ anti-HCV เพิ่มขึ้นแปรผันตามอายุ แม้ว่าการติดต่อทางเพศสัมพันธ์ยังไม่ได้รับการยืนยันที่ชัดเจน แต่พบว่าร้อยละของ anti-HCV กลับมีค่าสูงในช่วงวัยเจริญพันธุ์ที่มีอายุตั้งแต่ 15-40 ปี

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี และความชุกของโรคตับอักเสบบี ทำให้มีซีรัมบางตัวอย่างไม่เพียงพอต่อการทดลอง และทำซ้ำเพื่อยืนยันผล จากตัวอย่างที่ให้ผลบวก 125 ตัวอย่าง ได้ทำการเลือกตัวอย่างที่พอจะทำการตรวจสอบได้ ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำ RT-PCR เพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอในส่วน 5'UTR ซึ่งเป็นส่วนที่ conserve (13) ที่สุดในจีโนมเพื่อ ตรวจหา HCV-RNA ปรากฏว่าให้ผลบวก 58 ตัวอย่าง คิดเป็น 58.00% (ดังตารางที่ 12) จากรายงานการศึกษาหลายชิ้นระบุว่า สามารถตรวจพบ HCV RNA ได้ 70-80% จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ anti-HCV (6, 8, 15) ตัวอย่างที่ให้ผลลบด้วยวิธี PCR ในการศึกษานี้ อาจเกิดจาก ระดับของ RNA ไวรัสอยู่ในระดับต่ำจนไม่สามารถตรวจได้ด้วย PCR อีกทั้งเนื่องจากการซีรัมตัวอย่างเป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการศึกษาผลกระทบการให้วัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งตัวอย่างถูกเก็บตั้งแต่ปี 2547 และถูกนำมาทำการทดลองหลายครั้ง ส่วนงานวิจัยนี้ได้เริ่มดำเนินการในปี 2549 ประกอบกับไวรัสมีธรรมชาติของจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอที่ไม่เสถียร แม้จะเก็บในอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส แต่มีโอกาสที่ อาร์เอ็นเอจะถูกย่อยสลายไปได้ง่าย ดังนั้นทำให้ตัวอย่างบางส่วนไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี PCR ได้

หลังจากทำการตรวจหา HCV RNA แล้ว จึงทำการยืนยันผลการทดลองด้วยการทำ RT-PCR ในบริเวณ core region พบตัวอย่างที่ให้ผลบวก PCR จำนวน 50 ตัวอย่างคิดเป็น 86.21% เนื่องจากนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ค่อนข้าง conserve แต่มีความหลากหลายมากพอใน

การใช้จำแนกจีโนไทป์ (41) และจากความหลากหลายของ HCV ทำให้พบไวรัสสายพันธุ์ใหม่มากขึ้นเรื่อยๆ จนปัจจุบันสามารถแยกจีโนไทป์ออกเป็น 6 จีโนไทป์หลัก แต่การจำแนกจีโนไทป์ด้วย 5'UTR อาจไม่แม่นยำมากพอเนื่องมาจาก นิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้ของ จีโนไทป์ 1 และ 6 มีความคล้ายคลึงกันมากจนอาจไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับ genotype หรือ subtype ได้ (41, 42)

ในการศึกษานี้สามารถถอดรหัส และแยกจีโนไทป์จากบริเวณ core region ด้วยวิธี Phylogenetic analysis ได้ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 90 แบ่งเป็น จีโนไทป์ 1a จำนวน 3 (7%) จีโนไทป์ 1b จำนวน 12 (27%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 2a จำนวน 1 (2%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 2c จำนวน 1 (2%) จีโนไทป์ 3a จำนวน 23 (51%) จีโนไทป์ 3b จำนวน 1 (2%) ตัวอย่าง และ จีโนไทป์ 6 จำนวน 4 (9%) ตัวอย่าง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Theamboonlers A. และคณะ (36) ในปี พ.ศ. 2545 ซึ่งได้ทำการศึกษาในผู้บริจาคโลหิต ณ สภากาชาดไทย ที่ให้ผลบวกของ anti-HCV จำนวน 100 ตัวอย่าง พบจีโนไทป์ 3a มากที่สุด และจากงานวิจัยของ Kanitanon D. และคณะ (6) ในปี 2540 ได้ทำการทดลองจากตัวอย่างในสิ่ภูมิภาคของประเทศ ได้แก่ ภาคเหนือ จังหวัดเชียงราย (6 ตัวอย่าง) ภาคกลาง กรุงเทพฯ (191 ตัวอย่าง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดขอนแก่น (97 ตัวอย่าง) ภาคใต้ จังหวัดสงขลา (38 ตัวอย่าง) ซึ่งมีการกระจายกลุ่มตัวอย่างที่ดี แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี ในประเทศไทย เป็นจีโนไทป์ 3a มากที่สุด ตามด้วยจีโนไทป์ 1b และ 6 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลจากการศึกษานี้

จากการวิเคราะห์ จัดกลุ่มตัวอย่างด้วย phylogenetic analysis และสร้าง phylogenetic tree พบว่า จีโนไทป์ของกลุ่มตัวอย่างจากทั้งสี่จังหวัด ไม่มีการจัดกลุ่ม (cluster) แยกตามจังหวัดที่ชัดเจน แสดงว่าแต่ละจีโนไทป์ ซึ่งได้แก่ จีโนไทป์ 1 จีโนไทป์ 3 และ จีโนไทป์ 6 มีการกระจายอยู่ทั่วทุกภาค แต่มีการพบจีโนไทป์ 2 เฉพาะในจังหวัด เชียงราย จำนวน 2 ตัวอย่าง (2a และ 2c) และเมื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของแต่ละจังหวัดเปรียบเทียบกัน พบว่ามีความใกล้เคียงกัน แสดงว่าลักษณะทางพันธุกรรมในส่วนของ Core region มีความใกล้เคียงกันในแต่ละภูมิภาคของประเทศ เมื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน จากการศึกษาี้กับประเทศเพื่อนใกล้เคียงที่มีรายงานใน GenBank ได้แก่ประเทศ จีน ญี่ปุ่น เวียดนาม และ อินโดนีเซีย พบว่า จีโนไทป์ 1 ของประเทศไทย มีความใกล้เคียงกับประเทศญี่ปุ่นมากที่สุด ส่วนจีโนไทป์ 3 และ จีโนไทป์ 6 มีความใกล้เคียงกับประเทศจีนมากที่สุด

โดยทั่วไปประเทศไทยมักพบ จีโนไทป์ 1, 3 และ 6 ส่วนจีโนไทป์อื่นพบได้น้อยมาก ซึ่งจีโนไทป์ 2 จะพบมากที่ประเทศอินเดีย แต่การศึกษานี้พบ จีโนไทป์ 2 ในจังหวัดเชียงราย 2 ตัวอย่าง มีความเป็นไปได้ว่าหากจีโนไทป์ 2 จากประเทศอินเดียระบาดมาสู่ประเทศพม่า ซึ่งไทยมี

การติดต่อค้าขายกับพม่าอย่างใกล้ชิด รวมทั้งมีแรงงานพม่าในประเทศไทยจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีโอกาสพบ จีโนไทป์ 2 ในประเทศไทยได้

จากงานวิจัยของ Kalinina O. *et al.*, 2002 (43) พบว่าจีโนไทป์ที่ได้จากการวิเคราะห์ในบริเวณ structural protein และ nonstructural protein ไม่สัมพันธ์กัน และพิสูจน์ว่า HCV เกิด Intergenotypic recombinant ดังนั้น การวิเคราะห์จีโนไทป์โดยใช้นิวคลีโอไทด์จากบริเวณเดียวอาจไม่สามารถทำนายผลทาง clinic และการวางแผนการรักษาได้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงวิเคราะห์หาจีโนไทป์เพิ่มเติมในบริเวณ NS5B region ด้วย

จากการทำ RT-PCR ในบริเวณ NS5B region ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 54 (93.10%) ตัวอย่าง สามารถถอดรหัสนิวคลีโอไทด์ และจำแนกจีโนไทป์ได้ 16 (29.63%) ตัวอย่าง เนื่องจากขั้นตอนการเปลี่ยน RNA ไปเป็น cDNA ใช้ random hexamer ในการทำ reverse transcription อาจทำให้ได้ชิ้น cDNA ที่ไม่สมบูรณ์ รวมทั้งในขั้นตอน PCR primer ที่ใช้ เป็น degenerated primers และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้มีความหลากหลายสูง อาจเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไวรัสในบริเวณดังกล่าวได้มากกว่า 1 population ดังนั้นทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวลดลง ทั้งยากแก่การถอดรหัส และวิเคราะห์ผล ประกอบกับซีรัมตัวอย่างมีอายุพอสมควร และถูกใช้ในโครงการอื่นหลายครั้ง ทำให้ซีรัมบางตัวอย่างหมด จึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลได้

ตัวอย่างที่สามารถถอดรหัสในบริเวณ NS5B region ได้ ได้แก่ตัวอย่างจากจังหวัดเชียงราย อุตรดิตถ์ และชลบุรี ไม่สามารถถอดรหัสดีเอ็นเอ จากตัวอย่างจังหวัดนครศรีธรรมราชได้ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการถอดรหัสทั้งหมด ทำการหาจีโนไทป์ด้วยวิธี phylogenetic analysis เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีรายงานไว้ใน GenBank พบว่าแบ่งเป็น จีโนไทป์ 1a จำนวน 3 (9%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 1b จำนวน 4 (25%) ตัวอย่าง จีโนไทป์ 3a จำนวน 6 (38%) จีโนไทป์ 3b จำนวน 1 (6%) ตัวอย่าง และ จีโนไทป์ 6 จำนวน 2 (13%) ตัวอย่าง

ผลการวิเคราะห์หาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบ ซี ด้วยวิธี phylogenetic analysis โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ core พบจีโนไทป์ 6 ร้อยละ 9 (ตารางที่ 15) และ ร้อยละ 13 เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ NS5B เปรียบเทียบกับจีโนไทป์อื่นที่พบ จีโนไทป์ 6 เป็นจีโนไทป์ที่มีความหลากหลายมาก มีแนวโน้มการพบ subtype ใหม่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนในปัจจุบันอาจพบถึง จีโนไทป์ 6q (44, 45) ซึ่งจีโนไทป์ 6 เป็นจีโนไทป์ที่พบในประเทศไทย (พบได้ไม่มากนัก) และพบเฉพาะบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น

เมื่อทำการเปรียบเทียบ จีโนไทป์ที่ได้จากการแยกด้วยนิวคลีโอไทด์บริเวณ core region กับ NS5B region พบตัวอย่างที่ให้ผลไม่สัมพันธ์กันจำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 31.25 (เทียบกับจำนวนตัวอย่างที่สามารถถอดรหัสได้ในบริเวณ NS5B region) ได้แก่ ตัวอย่าง

จากจังหวัดเชียงราย 2 ตัวอย่าง และชลบุรี 3 ตัวอย่าง (ดังตารางที่ 21) ดังนี้คือ ตัวอย่างที่ปลาย 5' end เป็นจีโนไทป์ 3a โดยที่ปลาย 3' end เป็นจีโนไทป์ 1b จำนวนสองตัวอย่าง และเป็นจีโนไทป์ 6 หนึ่งตัวอย่าง ตัวอย่างที่ปลาย 5' end เป็นจีโนไทป์ 1b โดยที่ปลาย 3' end เป็นจีโนไทป์ 3a จำนวนหนึ่งตัวอย่าง และตัวอย่างที่ปลาย 5' end เป็นจีโนไทป์ 6 โดยที่ปลาย 3' end เป็นจีโนไทป์ 1b จำนวนหนึ่งตัวอย่าง

จากงานวิจัย Chinchai T *et al.*, (46) พบว่า การจำแนกจีโนไทป์ด้วย coding region คือ core และ NS5B region อาจให้ผลที่ไม่สัมพันธ์กันได้ เพราะเนื่องจาก นิวคลีโอไทด์ บริเวณ core ค่อนข้าง conserve จึงง่ายต่อการทำ RT-PCR มากกว่าบริเวณ NS5B ที่มีความหลากหลายมากกว่า ซึ่งหากไม่ใช้วิธีการ cloning แล้ว ผลที่ได้จากการทำ RT-PCR ปกติจะค่อนข้างยากแก่การวิเคราะห์ เป็นผลให้เกิดความขัดแย้งในการจำแนกจีโนไทป์จากทั้งสองบริเวณนี้

จากผลการจำแนกจีโนไทป์ที่ไม่สัมพันธ์กันด้วย core และ NS5B region อาจแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ของสองข้อคือ เกิดจากมี mix infection ของไวรัสตับอักเสบ ซี มากกว่าหนึ่งจีโนไทป์ในซีรัมตัวอย่าง และ เกิดจาก HCV recombination จากงานวิจัยของ ViaZov S. *et al.*, 2000 (47) พบว่า การเกิด Mix infection มีโอกาสเกิดได้น้อยเป็น rare event แม้ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง (IVDU) โดยธรรมชาติของไวรัส หากมีการติดเชื้อของสองจีโนไทป์ จีโนไทป์ใดที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนได้มากกว่าจะมีโอกาสอยู่รอดได้มากกว่า ส่วนจีโนไทป์ที่อ่อนแอกว่า จะหายไปหรือมีอยู่น้อยมาก ทำให้พบไวรัสในผู้ป่วยเพียงจีโนไทป์เดียว คือตัวที่มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่า กรณีเกิด recombination จากการศึกษาของ Kalinina O. *et al.*, 2002 (43) Noppornpanth S. *et al.*, 2006 (48) และ Leqrand-Abravanel F. *et al.*, 2007 (49) ทำการหาจีโนไทป์จากสอง บริเวณคือ core กับ NS5B region และ E2 กับ NS5B region ตามลำดับ พบว่าผลจากการหาจีโนไทป์ในสองบริเวณไม่สัมพันธ์กัน และทำการพิสูจน์ว่าไวรัสที่พบเกิดจาก recombination ไม่ใช่ mix infection ด้วยการทำ whole genome sequencing หากจุดที่เกิด recombination (ซึ่งมักเกิดที่บริเวณ nonstructural protein ตัวแรก) ด้วยเหตุนี้ตัวอย่างจีโนไทป์ที่ไม่สัมพันธ์กันในการศึกษานี้ ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็น mix infection หรือ recombination ต้องทำการทดลองพิสูจน์เพื่อยืนยันผลการทดลองต่อไป

จากหลายงานวิจัยพบว่า HCV เกิด recombination ขึ้นตามธรรมชาติ (43, 48, 49) แม้ว่าพบอัตราการเกิด HCV recombinant ไม่สูงนัก และอาจไม่ทำให้ไวรัสมีความรุนแรงมากขึ้น แต่เป็นผลให้เกิดวิวัฒนาการของไวรัสเพิ่มขึ้น ดังนั้นกระบวนการ recombination จึงมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความหลากหลายของไวรัส เนื่องจากจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบ ซี มีความสัมพันธ์ต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา IFN-alpha (50) ซึ่งการตอบสนองขึ้นอยู่กับ

ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ NS5A และ E2 protein ดังนั้นการวิเคราะห์จีโนม  
ไทป์โดยอาศัย coding region เพียงบริเวณเดียว ไม่สามารถตรวจได้ว่า คนไข้มีไวรัสลูกผสม  
หรือไม่ และอาจไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ วางแผนการรักษา และทำนายผลการรักษา ด้วยเหตุนี้  
จึงมีความสำคัญในการวิเคราะห์จีโนมไทป์โดยอาศัยผลจาก coding region มากกว่าหนึ่งบริเวณ  
เพื่อประโยชน์ในการให้การรักษา และทำนายผลการรักษาที่ดีขึ้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

- 1) WHO; face sheet.: October 2000
- 2) Hoofnagle J. H. Course and Outcome of Hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:521-529.
- 3) Chainuvati T., Poovorawan Y. and Luengrojanakul P. The prevalence of hepatitis C virus antibody in high risk group of Thai children and adults. *Gastroenterol Jpn* 1991;26:176-178.
- 4) Verachai V., Phutiprawan T., Theamboonlers A., Chinchai T., Tanprasert S., Haagmans B. L., Osterhaus A. and Poovorawan Y. Prevalence and genotypes of Hepatitis C virus infection among drug addicts and blood donors in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33: 849-851 .
- 5) ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ปี 2545
- 6) Kanistanon D., Neelamek M., Songsivilai T. and Songsivilai S. Genotype distribution of Hepatitis C virus in different region of Thailand . *J. Clin. Microbiol* 1997;35:1772-1776.
- 7) Thaikruea L., Thongsawat S., Maneekarn N., Netski D., Thomus D. L. and Nelson K. E. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in northern Thailand. *Transfusion*. 2004;44:1433-1440.
- 8) Alter M. J., Moran D. K., Nainan O. V., McQuilian G. M., Gao F., Moyer L. A., Kalow R. A., Margolis M. P. H. and Margolis H. S., The prevalence of Hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999;341:556-562.
- 9) Wakita T., Pietschman T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H. G., Mizokami M., Bartenschlager R. and Liang T. J. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*. 2005;11:791-796.
- 10) Jordan J., Hoofnagle F. and Hoofnagle J. H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 2005;436:972.
- 11) Clercq E. D. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Opinion in Microbiology*.2005;8:1-9.

- 12) Simmonds P., Holmes E. C., Cha T. A., Chan S.W., McOmish F., Irvine B., Beall E., Yap P. L., Kolberg J., Urdea M. S. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol*.1993 Nov;74:2391-9.
- 13) Simmonds P., Bukh J., Combet C., Deleage G., Enomoto N., Feinstone S., Halfon P., Inchauspe G., Kuiken C., Maertens G., Mizokami M., Murphy D. G., Okamoto H., Pawlotsky J. M., Penin F., Sablon E., Shin I. T., Stuyver L. J., Thiel H. J., Viazov S., Weiner A. J., Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005;42:962-973.
- 14) Ramadori G. and Meier V. Hepatitis C virus infection: 10 years after the discovery of the virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:465-471.
- 15) Songsivilai S., Jinathongthai S., Wongsena W., Tiangpitayakarn C., Dharakul T. High prevalence of hepatitis C infection among blood donors in northeastern Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:66-69.
- 16) Ishida T., Takao S., Ishida S. W., Tiwawech D. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in rural ethnic population of northern Thailand. *J Clin Virol* 2002;24:31-35.
- 17) Chongsrisawat V., Yoocharoen P., Theamboonlers A., Tharmaphornpilas P., Warinsathien P., Sinlaparatsamee S., Paupunwatana S., Chaiear K., Khwanjaipanich S., Poovorawan Y. Hepatitis B seroprevalence in Thailand: 12 years after hepatitis B vaccine integration into the national expanded programme on immunization. *Trop Med Inter Heal* 2006;11:1496-1502.
- 18) Chatproedprai S., Chongsrisawat V, Chatchatee P, Theamboonlers A, Yoocharoen P, Warinsathien P, Tharmaphornpilas P, Warinrawat S, Sinlaparatsamee S, Chaiear K, Khwanjaipanich S, Paupunwatana S, Poovorawan Y. Declining trend in the seroprevalence of infection with hepatitis A virus in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* 2007;101:61-68
- 19) Knipe D. M., Howley P. M. *Fields virology*, 2, Fourth, Vol 1 chapter 34, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 20) Knipe D. M., Howley P. M. *Fields virology*, 2, Fourth, Vol 1 chapter 32, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.



- 21) Rice C. M., Phair J. P. HCV life cycle and targets for drug development, Northwestern University; *iMedOptions*, 2003: 123-142.
- 22) Ferron F., Bussetta C., Dutartre H., Canard B. The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C Virus suggests a role for motif E in *Flaviviridae* RNA polymerases. *BMC Bioinformatics* 2005;6:255.
- 23) Lavillette D., Morice Y., Germanidis G., Donot P., Soulier A., Pagkalos E., Sakellariou G., Intretor L., Bartosch B., Powlotsky J-M., Cosset F-L.. Human serum facilitates hepatitis C virus with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:6023-6034.
- 24) Penin F., Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003;7:1-21
- 25) Diedrich G. How does hepatitis c virus enter cell. *FEBS J* 2006;273:3871-3885.
- 26) Lindenbach B. D., Rice M. C. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature* 2005;438:933-938.
- 27) Racanelli V., Rehermann B. Hepatitis C virus infection: when silence is deception. *Trends Immunol* 2003;24:456-464.
- 28) Meunier J-C., Engle R. E., Faulk K., Zhao M., Bartosch B., Alter H., Emerson S. U., Cosset F-L., Purcell R. H., Bukh J. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1. *PNAS* 2005;102:4560-4565.
- 29) Dubuisson J., <http://www.ibl.fr/spip.php?article4>. France; Centre National de la Recherche Scientifique, 2006
- 30) Honda M., Beard M. R., Ping L-H., Lemon S. M. A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* 1999;73:1165-174.
- 31) Kolykhalov A., Feinstone S. M., Rice C. M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 1996;70:3363-3371.
- 32) Jaeger J. [www.wadsworth.org/resnres/bios/jaeger.htm](http://www.wadsworth.org/resnres/bios/jaeger.htm). New York state department of health; Wadsworth Center, 2007

- 33) Powlotsky J-M. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 2003;7:45-46
- 34) Dusheiko G., Weiss H. S., Brown D., Mcomish F., Yap P-L., Sherlock S., Mcintyre N., P. Simmond. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994;19:13-18.
- 35) Nole F. S. Hepatitis C virus genotyping: clinical implications and methods. *Mol Diag* 2001;6:265-277.
- 36) Theamboonlers A., Chinchai T., Bedi K., Jantaramee P., Sripong M., Poovorawan Y. Molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) core region in HCV-infected Thai blood donor. *Acta Virologica* 2002;46:169-173.
- 37) Los Alamos National Security, <http://hcv.lanl.gov>; USA, 2006
- 38) Simmond P., Smith D. B., Mcomish F., Yap P. L., Kolberg J., Urdea M. S., Holmes E. C. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994;75:1053-1061.
- 39) Shepard C. W., Finelli L., Alter M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet* 2005;5:558-567.
- 40) Mellor J., Homes E C., Yap P L., Simmond P. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. The International HCV Collaborative Study Group. *J Gen Virol* 1995;76:2493-2507.
- 41) Mellor J., Walsh E. A., Jarvis L. E., Davidson F., Yap P. L., P. Simmonds and International HCV Collaborative Study Group. Survey of type 6 group variants of Hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J. Clin. Microbiol* 1996;34:417-423.
- 42) Hraher P. T., Fischer W., Bruno W. J., Leitner T., Kuiken C. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology J* 2006;3:103

- 43) Kalinina O., Norder H., Mukomolov S., Magnius L. O. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 2002;76:4034-4043.
- 44) Lu L., Nakano T., Li C., Fu Y., Miller S., Kuiken C., Robertson B. H., Hagedorn C. H. Hepatitis C virus complete genome sequences identified from China representing subtypes 6k and 6n and a novel, as yet unassigned subtype within genotype 6. *J Gen Virol* 2006;87:629-634.
- 45) Lu L., Li C., Fu Y., Gao F., Pybus O. G., Abe K., Okamoto H. Hagedorn C. H., Murphy D. Complete genomes of hepatitis C virus (HCV) subtypes 6c, 6l, 6p and 6q: completion of a full panel of genomes for HCV genotype 6. *J Gen Virol* 2007;88:1519-1525.
- 46) Chinchai T., Noppornpanth S., Bedi K., Theamboonlers A., Poovorawan Y. 222 base pairs in NS5B region and the determination of hepatitis C virus genotype 6. *Intervirology* 2006;49:224-229.
- 47) Viazov S., Widell A., Nordenfelt E. Mix infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. *Infection* 2000;28:21-25.
- 48) Noppornpanth S., Lien T. X., Poovorawan Y., Smits S. L., Osterhaus A. D. M. E., Haggmans B. L. Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. *J Virol* 2006;80:7569-7577.
- 49) Legrand-Abravanel F. L., Claudinon J., Nicot F., Dubois M., Regaud S. C., Saune K. S., Pasquier C., Izopet J. New natural intergenotype (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J virol* 2007;81:4357-4362.
- 50) Mondelli M. U., Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatology* 1999;31:65-70.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมี

#### 1. 5xTris borate buffer (5 x TBE)

Tris-base 54 กรัม

Boric acid 27.5 กรัม

EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

#### 2. 2% (w/v) agarose gel

Agarose gel 4 กรัม

1 x TBE 200 มิลลิลิตร

เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

#### 3. 10% Ethidium bromide

Ethidium bromide 30 ไมโครลิตร

น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

#### 4. Loading dye

0.25% Bromphenol blue

40% (w/v) sucrose in water

จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4 0 °c

#### 5. DEPC water

DEPC 0.1 มิลลิลิตร

Water 100 ml

เขย่าแล้วนำไป incubate ที่ 37 °c นาน 12 ชั่วโมง แล้ว นำไป autoclave

## ภาคผนวก ข

## ข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

No	Name	Age	sex	PCR			sequence		genotype		antiHAV	antiHBc	antiHBs	HBsAg
				5'UTR	CORE	NS5B	CORE	NS5B	CORE	NS5B				
1	CR147	52	1	+	+	+	+	-	1b		+	+	+	-
2	CR149	62	1	+	+	+	+	+	6n	6n	+	+	+	-
3	CR369	19	1	+	+	+	+	-	3a		+	-	-	-
4	CR388	9	1	+	-	-	-	-			-	-	-	-
5	CR471	39	2	+	+	+	+	-	3a		-	+	-	-
6	CR490	50	2	+	+	+	-	+		3a	-	+	+	-
7	CR683	51	1	-	-	-	-	-			-	+	-	-
8	CR684	52	1	-	-	-	-	-			-	+	+	-
9	CR691	3	1	+	+	+	+	-	3a		-	-	+	-
10	CRM008	46	1	+	-	-	-	-			-	-	-	-
11	CRM031	14	1	+	+	+	+	+	3b	3b	-	-	-	-
12	CRM092	54	2	+	+	+	+	+	3a	6n	-	+	+	-
13	CRM122	19	1	-	+	+	-	-			-	+	+	-
14	CRM249	54	2	+	+	+	+	-	1b		-	+	+	-
15	CRM267	6	1	+	+	+	+	-	2a		-	-	+	-
16	CRP039	51	2	+	+	+	+	-	2c		+	-	-	-
17	CRP160	36	1	+	+	+	+	-	3a		-	+	+	-
18	CRP266	26	1	+	+	+	+	-	3a		-	+	+	-
19	CRP281	33	2	+	+	+	+	+	3a	1b	-	+	+	-
20	CRP288	2	2	+	+	+	-	-			-	-	+	-
21	CRP318	15	1	+	+	+	+	-	3a		+	-	-	-
22	NK170	11	2	+	+	+	+	-	1b		-	-	+	-
23	NK379	54	1	+	+	-	-	-			+	-	-	-
24	NK397	12	2	+	+	+	+	-	1b		+	+	+	-
25	NK453	6	1	-	-	-	-	-			-	-	-	-
26	NK455	31	2	-	-	-	-	-			-	-	-	-
27	NK473	4	2	-	-	-	-	-			-	-	+	-
28	NK571	44	1	+	-	+	-	-			-	-	-	-
29	NK573	39	1	-	-	-	-	-			-	+	+	-
30	NK576	36	2	-	-	-	-	-			-	-	-	-
31	NK580	42	1	+	+	+	+	-	6n		+	+	+	-
32	NK638	21	2	-	-	-	-	-			-	-	-	-
33	NK647	56	2	-	-	-	-	-			-	+	+	-

No	Name	Age	sex	PCR			sequence			genotype		antiHAV	antiHBc	antiHBs	
				5'UTR	CORE	NS5B	CORE	NS5B	CORE	NS5B	HBsAg				
34	NK686	7	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35	NK709	48	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
36	NK726	52	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	
37	NKS031	51	2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
38	NKS061	30	1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
39	NKS076	38	2	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
40	NKS125	25	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
41	NKS145	57	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
42	NKS178	15	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
43	NKS221	53	2	+	+	+	+	-	-	1b	-	-	-	-	
44	NKT030	49	2	+	+	+	+	-	-	1b	-	+	+	-	
45	NKT051	68	2	+	+	+	+	-	-	1b	-	-	-	-	
46	NKT083	21	2	+	+	+	+	-	-	3a	+	-	-	-	
47	NKT161	45	2	+	+	+	+	-	-	3a	+	-	-	-	
48	NKT167	38	1	+	+	+	+	-	-	1b	+	-	-	-	
49	NKT311	49	2	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	
50	NKT320	4	1	+	+	+	+	-	-	3a	-	-	-	-	
51	NKT341	7	2	+	+	+	+	-	-	3a	-	-	-	-	
52	UD111	23	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
53	UD257	38	2	+	+	+	+	-	-	3a	-	-	-	-	
54	UD259	46	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
55	UD303	29	1	+	+	+	+	-	-	1b	-	+	+	-	
56	UD359	42	1	+	+	+	+	+	-	3a	3a	+	+	+	-
57	UD459	33	2	+	+	+	+	+	-	1a	1a	+	-	-	-
58	UD505	36	1	+	+	+	+	-	-	3a	+	-	-	-	-
59	UD588	58	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	UD664	50	1	+	+	+	+	+	-	3a	3a	-	+	+	-
61	UD720	15	2	+	+	+	+	+	-	3a	-	-	+	-	-
62	UDH006	22	2	+	+	+	+	-	-	3a	-	-	+	-	-
63	UDH230	22	2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	UDH253	26	2	+	+	+	+	+	-	1a	1a	-	+	-	-
65	UDH328	36	1	+	+	+	+	-	-	3a	-	+	-	-	-
66	UDH347	42	1	+	+	+	+	+	-	1b	1b	-	+	-	-
67	UDV105	32	1	+	+	+	+	+	-	3a	3a	-	+	+	-
68	UDV144	40	2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	UDV231	35	1	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
70	UDV288	10	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	UDV295	52	2	+	+	+	+	+	-	3a	3a	+	-	-	-

No	Name	Age	sex	PCR			sequence		genotype		antiHAV	antiHBc	antiHBs	
				5'UTR	CORE	NS5B	CORE	NS5B	CORE	NS5B			HBsAg	
72	CH061	3	1	-	-	-	-	-			-	-	+	-
73	CH077	3	nd	-	-	-	-	-			-	-	-	-
74	CH363	22	2	+	-	+	-	-			-	+	+	-
75	CH444	55	1	-	-	-	-	-			-	+	+	-
76	CH457	17	nd	-	-	-	-	-			-	-	-	-
77	CH637	41	2	-	-	-	-	-			-	+	+	-
78	CH653	50	nd	-	-	-	-	-			-	-	+	-
79	CH677	19	2	-	-	-	-	-			-	-	-	-
80	CH696	29	2	-	-	-	-	-			+	-	-	-
81	CH761	55	2	-	-	-	-	-			-	+	+	-
82	CH762	59	1	-	-	-	-	-			-	-	-	-
83	CH860	6	2	+	-	+	-	-			-	-	+	-
84	CH865	7	nd	-	-	-	-	-			-	-	+	-
85	CHA145	50	1	+	+	+	+	+	6a	1b	+	+	+	-
86	CHA171	29	1	-	-	+	-	-			+	-	-	-
87	CHA176	22	1	+	+	+	+	+	1a	1a	+	+	+	-
88	CHA187	36	1	+	+	+	+	+	1b	3a	+	+	+	-
89	CHA197	40	1	+	+	+	+	+	3a	1b	+	+	+	-
90	CHA239	34	1	+	+	+	+	-	6a		+	+	+	+
91	CHA244	35	1	+	+	+	+	-	1b		+	+	+	-
92	CHB156	25	1	-	-	-	-	-			+	-	+	-
93	CHB221	47	1	+	+	+	+	-	3a		-	-	+	-
94	CHB250	57	1	+	+	+	-	-			+	+	-	-
95	CHP005	43	2	-	-	-	-	-			-	-	-	-
96	CHP030	38	2	-	-	+	-	-			-	-	-	-
97	CHP048	43	2	-	-	-	-	-			-	+	+	-
98	CHP055	2	1	-	-	-	-	-			-	-	+	-
99	CHP064	44	2	-	-	-	-	-			-	-	-	-
100	CHP067	3	1	-	-	-	-	-			-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ค

Age(years)	Chiangrai			Nakc.nsrithamaraj			Udonthani			Cholburi			Total		
	No.	No.+	%+	No.	No.+	%+	No.	No.+	%+	No.	No.+	%+	No.	No.+	%+
2-4	153	2	1.31	131	2	1.53	170	2	1.18	120	6	5.00	574	12	2.09
5-6	80	1	1.25	83	2	2.41	111	0	0.00	92	2	2.17	366	5	1.37
7-8	100	0	0.00	86	2	2.33	102	0	0.00	91	1	1.10	379	3	0.79
9-10	83	2	2.41	79	0	0.00	120	1	0.83	103	2	1.94	385	5	1.30
11-12	64	0	0.00	58	2	3.45	62	0	0.00	47	0	0.00	231	2	0.87
13-14	64	1	1.56	50	0	0.00	72	0	0.00	53	0	0.00	239	1	0.42
15-16	46	1	2.17	43	2	4.65	63	2	3.17	32	0	0.00	184	5	2.72
17-18	44	0	0.00	97	2	2.06	65	1	1.54	71	2	2.82	277	5	1.81
19-20	49	2	4.08	47	0	0.00	44	0	0.00	54	1	1.85	194	3	1.55
21-30	199	2	1.01	193	4	2.07	207	4	1.93	189	8	4.23	788	18	2.28
31-40	206	3	1.46	188	4	2.13	203	7	3.45	184	6	3.26	781	20	2.56
41-50	206	2	0.97	188	8	4.26	221	6	2.71	158	8	5.06	773	24	3.10
51-60	138	6	4.35	128	7	5.47	184	2	1.09	131	5	3.82	581	20	3.44
>60	35	1	2.86	35	1	2.86	2	0	0	1	0	0	73	2	2.74
total	1467	23	1.57	1406	36	2.56	1626	25	1.54	1326	41	2.94	5825	125	2.15

## ภาคผนวก ง

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology  
หัวข้อเรื่อง Prevalence and genotype of hepatitis C virus in Thailand.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล ศรัณย์ธร สุนันทชัยการ เพศ หญิง

อายุ 24 ปี เกิด 30 กรกฎาคม 2526

สถานที่เกิด โรงพยาบาล กรุงเทพมหานคร จังหวัด กรุงเทพฯ

ที่อยู่ 71 ซอย จันทร 18/7 แยก 14 ถนน ตรอกจันทรสะพาน 3 แขวง ทุ่งวัดดอน เขต สาทร จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10120

### ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์ บัณฑิต (วท.บ.) จากคณะ  
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2547

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา  
วิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย เมื่อ ปี พ.ศ. 2548

### การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : Prevalence and genotype of hepatitis C virus in Thailand

เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Asian pacific journal of allergy and  
immunology

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย