รายงานการวิจัย

โครงการศึกษาความชุกและลักษณะทางโมเลกุลของไวรัสตับอักเสบ ชนิด เอ บี และซี ในแรงงานต่างด้าว (พม่า กัมพูชา และลาว) ในประเทศไทย

Seroprevalence and molecular characterization of Hepatitis Virus A, B and C of migrant workers (Myanmar, Cambodian and Laos) in Thailand

โดย

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ และคณะ

ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2552

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014683
วัน, เดือน, ปี 27 ส.ค. 53

บทคัดย่อ

ปัจจุบันอุบัติการณ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และซี ในประเทศเพื่อนบ้าน พม่า กัมพูชา และลาว ยังมีข้อมูลน้อยมากหรือมีไม่เพียงพอโดยเฉพาะในแนวลึก งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์หาความชุก และจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และซี ของแรงงานต่างด้าวในประเทศไทย ตรวจหา mutation ของไวรัสในบริเวณส่วนของยีนที่สนใจ เพื่อเป็นแนวทางในการบอกวิวัฒนาการและเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการป้องกันโรคให้กับคนไทยในอนาคต

ไวรัสตับอักเสบ เอ: ตัวอย่างชาวต่างด้าวทั้งหมด 1,183 คน (394 คน, 394 คน และ 395 คน จากชาวพม่า กัมพูชา และลาวตามลำดับ) เป็นเพศชาย 594 คน เพศหญิง 589 คน อายุโดยเฉลี่ย 28.1 ปี (ค่าความแปรปรวนมาตรฐานเท่ากับ 9 ปี) จากการตรวจ Anti-HAV ด้วยวิธี ELISA พบความชุก 85.6% ในผู้ป่วยชาวลาว และประมาณ 100% ในผู้ป่วยชาวพม่าและกัมพูชา

ไวรัสตับอักเสบ บี: ตัวอย่างน้ำเหลืองจากชาวพม่า กัมพูชา และลาว จำนวน 1,103 คน, 1,119 คน และ 787 คน ตามลำดับ พบความชุกของ HBsAg 9.7%, 10.8% และ 6.9% ในแรงงานชาวพม่า กัมพูชา และลาว ตามลำดับ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ HBsAg ทั้งหมด 282 ตัวอย่าง ตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัส จำนวน 224 ตัวอย่าง (9.4%) โดยจำแนกออกเป็นจีโนไทป์ C (86%, 99% จำแนกเป็นจีโนไทป์ย่อย C1) และจีโนไทป์ B (11.6%, 30.8% จำแนกเป็นจีโนไทป์ย่อย B2, 34.6% จำแนกเป็นจีโนไทป์ย่อย B3 และ 30.8% จำแนกเป็นจีโนไทป์ย่อย B4) 18% ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกของดีเอนเอไวรัส พบ point mutation ในบริเวณ "a" determinant หลายจุด โดยการกลายพันธุ์ที่พบมากเป็นแบบ Ile126/Ser/Asn จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสทั้งหมดพบ 19.1% เป็น pre-s mutation 7.7% เป็น pre-s start deletion 3.8% เป็น pre-s start codon mutation 3.3% เป็น pre-s start codon deletion/mutation

ไวรัสตับอักเสบ ซี: ชาวต่างด้าวอายุตั้งแต่ 15-60 ปี จากชาวพม่า กัมพูชา และลาว จำนวน 1,594 คน, 143 คน และ 882 คน ตามลำดับ พบความชุกของ Anti-HCV ในแรงงานชาวพม่า 1.7%, กัมพูชา 2.3% และลาว 0.8% ในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ Anti-HCV ตรวจพบพบสารพันธุกรรมของไวรัสในชาวพม่าจำนวน 15 คน กัมพูชา 25 คน และลาว 1 คน ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์รหัสสารพันธุกรรม และจัดจำแนกจีโนไทป์เรียงตามลำดับความชุกที่พบได้ดังนี้ จีโนไทป์ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6 (6e, 6f, 6m, 6p และ 6m)

กลุ่มผู้ใช้แรงงานชาวต่างด้าวจากพม่า กัมพูชา และลาว พบความชุกของไวรัสตับอักเสบ เอ ในอัตราสูงมาก ความชุกของไวรัสตับอักเสบ บี ในอัตราค่อนข้างสูง โดยพบจีโนไทป์ C1 มากที่สุด และพบความหลากหลายจากการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบ บี หลายชนิด และพบความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ในอัตราใกล้เคียง และต่ำกว่าประเทศไทย รวมทั้ง พบความหลากหลายของไวรัสตับอักเสบ ซี จีโนไปท์ 6 ทั้งที่พบได้ในประเทศไทย และไม่พบในประเทศไทยหลายชนิด งานวิจัยนี้อาจสะท้อนให้เห็นแนวโน้ม

ของการติดเชื้อไวรัสทั้งสามชนิดในประชากรปกติของประเทศพม่า กัมพูชา และลาว รวมทั้งชาวไทยควรได้รับวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบ เอ และบี ก่อนเดินทางไปยังประเทศดังกล่าวด้วย

Abstract

Little is known on the epidemiology of Hepatitis A virus, Hepatitis B virus and Hepatitis C virus in neighboring countries such as Myanmar, Cambodia and Laos. The data on anti-HAV, HBsAg and anti-HCC seroprevalence among subjects from Laos, Cambodia and Myanmar are limited. Therefore, this study has been aimed at exploring the seroepidemiology, molecular characterization and genetics variability of these hepatitis viruses among these migrant workers in Thailand. Data from this study may directly reflect on the seroepidemiology within those countries and thus be useful for planning a preventive strategy.

HAV: Overall, 1,183 subjects (394, 394, and 395 from Myanmar, Cambodia and Laos, respectively) were investigated for anti-HAV seroprevalence by ELISA. They comprised 594 males and 589 females. The mean age ± standard deviation was 28.1±9.0 years. The seroprevalences of anti-HAV varied from 85.6% in Laos workers to almost 100% in those from Myanmar and Cambodia.

HBV: Sera collected from 1,119 Cambodian, 787 Laotian and 1,103 Myanmarese workers were tested for HBsAg. HBV DNA was amplified and the preS/S region was sequenced for genotyping and genetic mutation analysis. HBsAg was detected in 282 (9.4%). The prevalence of HBsAg among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar was 10.8%, 6.9% and 9.7%, respectively. Of 224 subjects positive for HBV DNA, 86% were classified as genotype C (99% were sub-genotype C1) and 11.6% were genotype B (30.8%, 34.6% and 30.8% were sub-genotypes B2, B3 and B4, respectively). Various point mutations in the 'a' determinant region were detected in approximately 18% of these samples, of which Ile126Ser/Asn was the most frequent variant. Sequencing analysis showed that 19.1% of samples had pre-S mutations, with pre-S2 deletion as the most common mutant (7.7%) followed by pre-S2 start codon mutation (3.8%) and both pre-S2 deletion and start codon mutation (3.3%).

HCV: Immigrants aged between 15 and 60 years (143 Cambodians, 1,594 Myanmar and 882 Laotians) were recruited to investigate hepatitis C virus infection. The prevalence of HCV infection in immigrant workers from Cambodia, Myanmar and Laos was 33 (2.3%) and 27 (1.7%) and 7 (0.8%) samples, respectively. Of the anti-HCV positive individuals, 25 samples from Cambodia, 15 samples from Myanmar and 1 sample from Laos harbored viral RNA. Phylogenetic analysis showed that the predominant HCV genotypes in this group were 1a, 1b, 3a, 3b and 6 (6e, 6f, 6m, 6p and 6r).

Seroprevalence of HAV among immigrant workers was extremely high. High prevalence of HBV infection (approximately 7-11%) was found among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar. Our data also demonstrated that HBV sub-genotype C1 was the predominant strain and various naturally occurring mutations of HBV were not uncommon among these populations. HCV seroprevalence among

these groups was closely related to those in Thailand. Most HCV isolates can be found in Thailand, though some subtypes of HCV-6 are uncommon. Travelers from countries with low prevalence will require HAV and HBV immunization prior to entering these neighboring countries since hepatitis A and B epidemics might occur as a consequence of travelers returning from HAV and HBV endemic countries.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วิธีการศึกวิจัย	7
วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ	
ไวรัสตับอักเสบ เอ	9
ไวรัสตับอักเสบ บี	10
ไวรัสตับอักเสบ ซี	14
การวิเคราะห์ข้อมูล	18
วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย	22
การวิเคราะห์ข้อมูล	23
ผลการวิจัย ไวรัสตับอักเสบ เอ	24
ไวรัสตับอักเสบ บี	25
ไวรัสตับอักเสบ ซี	28
วิจารณ์	30
สรุป	32
บรรณานุกรม	33
ภาคผนวก	34

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงรายละเอียดของ primer ที่ใช้	12
ตารางที่ 2	แสดงส่วนผสมของปฏิกริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV	12
ตารางที่ 3	แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ "a" determinant	13
ตารางที่ 4	Primer และสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ reverse transcription ของไวรัส HCV	15
ตารางที่ 5	แสดงลำดับเบส ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR	16
ตารางที่ 6	สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ Core และ NS5B ยีน	17
ตารางที่ 7	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน NS5 และ CORE ยีน ทั้ง 1st PCR และ 2nd PCR	17
ตารางที่ 8	แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing	19
ตารางที่ 9	Anti-HAV จำแนกตามกลุ่มอายุ และประเทศ	25
ตารางที่ 10	ความชุกของไวรัสตับอักเสบ บี genotype และ subtype ในแรงงานต่างด้าว	26
ตารางที่ 11	ความชุกของ 'a' determinant mutations ในแรงงานต่างด้าว	27
ตารางที่ 12	ความชุกของ pre-S mutations ในแรงงานต่างด้าว	28
ตารางที่ 13	ความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี อายุ เพศ ของแรงงานต่างด้าวในประเทศไทย	29
ตารางที่ 14	ไวรัสตับอักสบ ซี จีโนไทป์ จากแรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาว ในประเทศไทย	29

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงตัวอย่างของ Chromatogramme ของ gene ที่ต้องการศึกษาในการทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์	20
รูปที่ 2	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์อื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST	21

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

HAV	=	Hepatitis A virus
HBV	=	Hepatitis B virus
HCV	=	Hepatitis C virus
Anti-HAV	=	Hepatitis A virus antibody
Anti-HBV	=	Hepatitis B virus antibody
Anti-HCV	=	Hepatitis C virus antibody
ELISA	=	Enzyme link immunosorbent assay
HBsAg	=	Hepatitis B s antigen
HBeAg	=	Hepatitis B e antigen
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid
ALT	=	Alanine aminotransferase
IgG	=	Immunogobulin G
IgM	=	Immunogobulin M
IVDU	=	Intravenous drug user
Huh7	=	Human hepatoma cell line 7
Ads EtOH	=	Absolute ethanol
PCR	=	Polymerase chain reaction
DepC	=	Diethyl pyrocarbonate water
BLAST	=	Basic local alignment search tool
µL	=	Micro liter
Ser	=	Serine amino acid
Asn	=	Asparagine amino acid

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

โรคตับอักเสบเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบมีสาเหตุได้หลายอย่าง ที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อของไวรัสตัวอย่าง เช่น ไวรัสตับอักเสบ เอ บี ซี ดี และอี ในปัจจุบันประเทศไทยอุบัติการณ์ของโรคไวรัสตับอักเสบ เอ และบี ลดลงอย่างมาก แต่ขณะเดียวกันอุบัติการณ์ในประเทศเพื่อนบ้าน พม่า กัมพูชา และลาว ยังมีข้อมูลที่น้อยมากหรือไม่มีเพียงพอ โดยเฉพาะในแนวลึกอาจมีผลกระทบต่อประชากรไทย ในกรณีที่มีการเคลื่อนย้ายของประชากรจำนวนมากได้

ไวรัสตับอักเสบ เอ

ไวรัสตับอักเสบ เอ จัดอยู่ใน Family Picornaviridae, Genus hepatovirus เป็น RNA virus มีขนาดเล็กประมาณ 27-32 nmไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped) genome เป็น RNAเส้นตรงเส้นเดียว (single stranded RNA) มีขนาดประมาณ 7.5 Kb. โดยที่ genome ประกอบด้วย 5'untranslated region, single open-reading frame และ 3' untranslated region ไวรัสตับอักเสบ เอ ทำให้เกิดโรคตับอักเสบเฉียบพลันติดต่อโดยการรับประทานอาหาร หรือเครื่องดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัสเข้าไป ไวรัสจะออกมากับอุจจาระของผู้ป่วยแล้วปนเปื้อนอยู่ในอาหารและน้ำ นอกจากนี้สัตว์บางชนิดที่เป็นแหล่งเก็บของเชื้อไวรัส เช่น หอย 2 ฝา จำพวกหอยนางรม หากยังปรุงไม่สุกพอก็สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ได้ ไวรัสตับอักเสบ เอ เป็นสาเหตุของตับอักเสบเฉียบพลันที่สำคัญ พบได้บ่อยในประเทศที่มีประชากรหนาแน่นหรือมีสาธารณูปโภคและการสุขาภิบาลที่ไม่ดี เช่น ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย คนมักติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ในช่วงวัยเด็กจนถึงวัยรุ่น เพราะเป็นช่วงที่เด็กไปอยู่รวมกันในโรงเรียน มีการรับประทานอาหารนอกบ้านร่วมกัน ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อหลังจากรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ แล้วไวรัสจะมีระยะฟักตัวอยู่นานประมาณ 15-50 วัน โดยทั่วไปประมาณ 30 วัน ในช่วงระยะท้ายของการฟักตัวจะพบเชื้อไวรัสขับถ่ายออกมาทางอุจจาระ การติดเชื้อเป็นได้ทั้งมีอาการและแบบไม่มีอาการ การเกิดอาการจะพบสูงขึ้นตามอายุ การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสตับอักเสบ เอ ในระยะแรกจะตรวจดูการทำงานของตับโดยดู SGOT (AST) และ SGPT (ALT) การตรวจ IgM และ IgG ต่อไวรัสตับอักเสบ เอ (anti-HAV IgG, anti-HAV IgM) จะเป็นการตรวจจำเพาะเพื่อบ่งบอกว่ามีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบ เอ ถึงแม้ว่าโรคไวรัสตับอักเสบ เอ จะไม่ได้เป็นโรคที่ร้ายแรงสามารถหายได้เอง แต่ก็พบว่าในบางรายเกิดอาการขั้นรุนแรงถึงเสียชีวิต เมื่อเปรียบเทียบถึงอัตราการตายเมื่อติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ชนิดอื่น

กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ถือได้ว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ นั้น พบอัตราการตายต่ำ แต่ในปัจจุบันก็ยังพบการระบาดเกิดขึ้นในประเทศไทยเป็นครั้งคราว และที่ผ่านมาพบว่ามีการระบาดครั้งใหญ่เกิดขึ้นโดยมีผู้ป่วยเกิดขึ้นนับพันราย ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ในปี พ.ศ. 2535 หลังจากนั้นก็ยังพบว่ามีการระบาดเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวที่จังหวัดนนทบุรี จังหวัดนครปฐม อำเภอรือเสาะ อำเภอยี่งอ จังหวัดนราธิวาส จังหวัดฉะเชิงเทราและจังหวัดสุพรรณบุรี จนกระทั่งครั้งล่าสุดในเดือนพฤษภาคม 2548 มีการระบาดครั้งใหญ่ที่ภาคเหนือที่อำเภอเวียงป่าเป้า อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย และอำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง มีผู้ป่วยจำนวนนับพันรายและมีเสียชีวิต 2 ราย และ ในเดือนกรกฎาคม 2548 มีการระบาดเกิดขึ้นที่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา การระบาดที่เชียงรายเข้าใจว่าน่าจะมีสาเหตุจากการอพยพของประชากร โดยเฉพาะชาวพม่าจำนวนมากที่อพยพแรงงานเข้ามาในประเทศไทย

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาระดับชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ที่มีอยู่ในกลุ่มแรงงานต่างด้าวพม่า กัมพูชา และลาวในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่าง serum มาตรวจ Anti-HAV IgG หลังจากนั้นก็นำมาทำ PCR เพื่อตรวจสอบผลให้แน่ชัดว่าผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบจริง และ เปรียบเทียบลำดับเบสในส่วน VP1-P2A junction ของตัวอย่างที่ทำการศึกษาในครั้งนี้กับผลที่มีรายงานไว้ใน Genbank โดยดู molecular characterization ด้วยการทำ multiple alignment และสร้าง phylogenetic tree เพื่อจำแนก genotype ที่เกิดการระบาดขึ้นว่าเป็น genotype ใด งานที่ทำมีจุดมุ่งหมายหลักเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการแพร่ระบาด และการควบคุมป้องกันการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบ เอ ต่อไปในอนาคต

ไวรัสตับอักเสบ บี

เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี (hepatitis B virus : HBV) เป็นเชื้อไวรัสที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคตับอักเสบ และเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้เกิดโรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับ มีผู้ติดเชื้อแบบเรื้อรังทั่วโลกมากกว่า 350 ล้านคน อาการของผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ส่วนใหญ่ จะเป็นการติดเชื้อแบบไม่มีอาการ มีเพียงส่วนน้อยที่จะพบอาการของโรคตับอักเสบซึ่งตรวจพบได้จากอาการแสดงทางคลินิก หรือตรวจได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) ผู้ป่วยร้อยละ 0.5-1 ที่มีการติดเชื้อแบบรุนแรงจนเสียชีวิต ผู้ติดเชื้อร้อยละ 5-10 จะไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้และเกิดเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง โดยอาจจะเป็นพาหะของโรคโดยไม่มีอาการ (carrier) หรือเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis B) ผลที่ตามมาของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ที่รุนแรง (serious outcome) คือ การเกิดโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) โดยมักจะเกิดโรคตับแข็งภายในเวลา 10-20 ปี การดำเนินโรคต่อไปเป็นโรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาที่ติดเชื้อ อายุของผู้ป่วย

สภาวะภูมิคุ้มกันเป็นต้น และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมและถิ่นที่อยู่ของผู้ติดเชื้อด้วย ผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นมะเร็งตับมากกว่าผู้ที่ไม่ติดเชื้อประมาณ 30-200 เท่า ขึ้นกับปัจจัยอื่นด้วย เช่น เชื้อชาติ

ปัจจุบันประเทศไทย มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคตับในประเทศไทยเป็นจำนวนมาก หากไม่รวมมะเร็งตับ ส่วนใหญ่นั้นเสียชีวิตจากตับแข็ง โรคตับเรื้อรังและภาวะตับวาย การสูญเสียในการดูแลรักษาเป็นมูลค่ามากมาย นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งตับปีละไม่น้อยกว่า 10,000 ราย (ประมาณ 11,000-12,000 ราย/ปี) พบว่าร้อยละ 60 มีความสัมพันธ์เกี่ยวกับไวรัสตับอักเสบ บี แต่เดิมในอดีตประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความชุกชุมของไวรัสตับอักเสบ บี สูง มีอัตราการเป็นพาหะในประชากรไทยประมาณร้อยละ 6-8 ในสตรีตั้งครรภ์จะเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบ บี ประมาณร้อยละ 6 ในจำนวนที่เป็นพาหะนี้จะตรวจพบ hepatitis B e antigen (HBeAg) ประมาณร้อยละ 40 กระทรวงสาธารณสุขจึงได้มีนโยบายในการควบคุมป้องกันไวรัสตับอักเสบ บี โดยเริ่มโครงการป้องกันไวรัสตับอักเสบ บี ด้วยวัคซีน โดยวางแผนให้วัคซีนกับทารกทุกคนที่เกิดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 เป็นต้นไป

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อดูระบาดวิทยาทางด้านพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบ บี และ genotype และ subtype ใด โดยศึกษาทางด้าน molecular epidemiology โดยการทำ molecular characterization ของไวรัสตับอักเสบ บี ที่พบในแรงงานต่างด้าวพม่า กัมพูชา และลาวในประเทศไทย การศึกษานี้อาจทำให้พบสายพันธุ์ใหม่หรือลักษณะที่ผิดแปลกจากปกติของไวรัสตับอักเสบ บี เช่น deletion หรือ insertion ในส่วนของ HBsAg

ไวรัสตับอักเสบ ซี

ไวรัสตับอักเสบ ซี (hepatitis C virus, HCV) เป็นไวรัสสำคัญที่ทำให้เกิดโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ส่วนใหญ่กว่า 80% ของผู้ติดเชื้อจะกลายเป็นโรคตับอักเสบเรื้อรัง ปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อมากกว่า 170 ล้านคนทั่วโลกและมีผู้ป่วยเพิ่มขึ้น 3-4 ล้านคนต่อปี ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการทางคลินิกแต่สามารถตรวจการติดเชื้อด้วยการตรวจแอนติบอดี (antibody) หรือการตรวจ HCV RNA นอกจากนี้สามารถตรวจการทำงานของตับด้วยการวัดระดับเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) จะช่วยบ่งบอกถึงการอักเสบของตับ HCV สามารถก่อให้เกิดโรคตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) โรคตับแข็ง (cirrhosis) และที่รุนแรงที่สุดคือ โรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) มะเร็งตับส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นหลังจากผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็งมานานกว่า 10-20 ปี ปัจจัยที่มีผลต่อการเป็นโรคเรื้อรัง (chronicity rate) ขึ้นอยู่กับอายุ ภาวะภูมิคุ้มกัน และความรุนแรงของโรคในระยะเฉียบพลันด้วย

ผู้ติดเชื้อ HCV ในประเทศไทย ที่มีการสำรวจ seroprevalence (anti-HCV) ประมาณ 0.98-1.5% และในผู้บริจาคโลหิตใหม่ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติในปี 2545 ประมาณ 0.77% genotype ที่พบบ่อยได้แก่ genotype 1,3 และ6 จากการศึกษาพบว่าผู้ที่มีประวัติใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน เช่น กลุ่มผู้เสพยาเสพติดโดยการใช้เข็มฉีดยา (IVDU) หรือได้รับการให้เลือดหรือผลิตภัณฑ์จากเลือด มีปัจจัยเสี่ยงสูงในการติดเชื้อ HCV เช่นเดียวกับประเทศในทวีปยุโรปและอเมริกา ดังนั้นมาตรการป้องกันด้วยการตรวจคัดกรองเลือดที่มี sero positive ต่อ HCV ออกก่อนการให้เลือด รวมทั้งให้การศึกษาเกี่ยวกับการติดโรค และการไม่ใช้เข็มฉีดยาร่วมกันจึงมีความสำคัญ

ปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนป้องกันเนื่องจากอุปสรรคต่างๆ เช่น ไม่สามารถเพาะเลี้ยง HCV ได้จนกระทั่งเมื่อไม่นานมานี้ สามารถเพาะเลี้ยง HCV จีโนไทป์ 2a สายพันธุ์ JFH1ใน hepatoma cell line (Huh7) ได้เป็นครั้งแรก แต่อยู่ในขั้นตอนศึกษาถึงความสามารถในการติดเชื้อและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (host) รวมทั้งคุณสมบัติอื่นๆ ของเชื้อด้วย เนื่องจาก คุณสมบัติของไวรัสที่มีความหลากหลาย (heterogeneity) และอัตราการกลายพันธุ์สูง การรักษาในปัจจุบันจะใช้ Interferon α (IFNα) ควบคู่กับการใช้ยา ribavirin ซึ่งการตอบสนองต่อยาขึ้นอยู่กับ genotype ของไวรัส โดยที่ HCV สามารถถูกจำแนกได้เป็น 6 genotype, genotype 1 ถึง 6 ส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ genotype 1 และ 4 มักตอบสนองได้ไม่ดีหรือดื้อต่อยา Interferon Interferon ที่ใช้ได้ผลดีขึ้น ในปัจจุบันเป็น Interferon ที่มีฤทธิ์ยาวนานขึ้นคือ Pegylated Interferon (polyethylene glycol Interferon) ดังนั้น genotype นอกจากมีผลทางด้านระบาดวิทยาแล้ว ยังมีผลต่อการวางแผนการรักษา ระยะเวลาที่ใช้ในการรักษา และปริมาณยาที่ใช้ด้วย

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี ส่วนใหญ่จะใช้ประชากรกลุ่มย่อยของประเทศหรือจากผู้บริจาคโลหิต ส่วนการศึกษากลุ่มใหญ่ที่เป็นตัวแทนของประเทศ 6,000 รายนั้น มีข้อมูลของประเทศไทยพบว่าไวรัสตับอักเสบ เอ และ บี ลดลงอย่างมาก กล่าวคือไวรัสตับอักเสบ บี ในเด็กมีอัตราการเป็นพาหะในเด็กที่เกิดภายใต้ EPI ของประเทศไทย เพียงร้อยละ 0.7 ซึ่งจะสูงขึ้น ในผู้ใหญ่ก็มีแนวโน้มโดยภาพรวมแล้วอัตราการติดเชื้อลดลงอย่างมาก สำหรับไวรัสตับอักเสบ ซี โดยเฉลี่ยทั้งประเทศมีผู้ติดเชื้อร้อยละ 2.2

ในปัจจุบันมีแรงงานต่างด้าวพม่า กัมพูชา และลาวที่เข้ามาอาศัยอยู่ในประเทศไทยเป็นจำนวนมากจากตัวเลขอย่างเป็นทางการมากกว่า 2 ล้านคน และมีอีกจำนวนมากที่เข้ามาอย่างไม่เป็นทางการ โดยเฉพาะแรงงานชาวพม่า ข้อมูลการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และ ซี ในแรงงานต่างด้าวดังกล่าวยังไม่มีการศึกษา และเนื่องจากประเทศพม่าเป็นประเทศปิดทำให้เราไม่ทราบข้อมูลดังกล่าว การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนั้นจะ

มีผลกระทบต่อประชากรไทยอย่างมากในอนาคต การศึกษาวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อความมั่นคงของประเทศ และระบบสาธารณสุข การวางแผนป้องกัน ข้อมูลของพม่า กัมพูชา และลาว จะเป็นข้อมูลที่ทำให้รู้ถึงอุบัติการณ์ของไวรัสดังกล่าวในทางอ้อมต่อประเทศ อันจะใช้วางแผนในการป้องกัน

ประเภทของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยประยุกต์ (applied research)

สาขาวิชาการและกลุ่มงานที่ทำวิจัย

วิทยาศาสตร์การแพทย์

คำสำคัญ (Keywords) ของโครงการวิจัย

Hepatitis Virus A, Hepatitis Virus B, Hepatitis Virus C, Myanmar, Combodian and Loas immigrant.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. หาความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ บี ซี ของแรงงานต่างด้าวพม่า กัมพูชาและลาว ในประเทศไทย
2. จำแนก genotype และ subtype ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และซี ที่ตรวจพบด้วยวิธีการทาง molecular biology จากกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดนั้นๆ
3. ตรวจหา mutation ของไวรัส ในบริเวณส่วนของยีนที่สนใจเพื่อเป็นแนวทางในการบอกวิวัฒนาการและเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการป้องกันโรคให้กับคนไทยในอนาคต
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการแพร่ระบาดและการหาแหล่งที่มาของเชื้อในกรณีที่มีการติดต่อมาสู่ประชากรไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ทำให้ทราบระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และซี ใน ในแรงงานต่างด้าว (พม่า กัมพูชา และลาว) อันจะเป็นข้อมูลทางอ้อมที่ทั่วโลกยังไม่ทราบข้อมูลดังกล่าว
2. สามารถนำข้อมูลไปเพื่อประกอบการวางแผนเพื่อติดตาม เฝ้าระวังและประเมินผลในการป้องกันโรคการติดต่อข้ามสายพันธุ์มาสู่ประชากรไทย

3. สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการพิจารณา เฝ้าติดตามด้านระบาดวิทยา โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ดื้อต่อวัคซีน และวางแผนในการใช้วัคซีน เพื่อป้องกันการระบาดของโรค (ไวรัสตับอักเสบ บี)

รวมทั้งการศึกษาสายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบ ซี จะทำให้ทราบและวางแผนในการป้องกันโรคในอนาคตโดยเฉพาะการระบาดติดเชื้อสู่ประชากรไทย ข้อมูลของแรงงานต่างด้าว (พม่า กัมพูชา และลาว) ทางด้านตับอักเสบยังไม่มีการศึกษากันน้อยมาก

องค์ความรู้ใหม่

- ข้อมูลลำดับเบสในส่วนต่างๆ ของเชื้อ hepatitis ของแรงงานต่างด้าว (พม่า กัมพูชา และลาว) ในประเทศไทย จะถูกเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยแนวลึกเกี่ยวกับเชื้อ hepatitis virus ต่อไป
- มีผลงานวิชาการเผยแพร่ในวารสารนานาชาติไม่น้อยกว่า 2 เรื่อง
- พัฒนาบุคลากรนักวิทยาศาสตร์ นิสิตปริญญาโท และ นิสิตปริญญาเอก

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยราชการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมป้องกันการระบาดของโรคไวรัสตับอักเสบ เช่น กรมควบคุมโรค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข สามารถนำผลการวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์เพื่อประกอบการวางแนวนโยบายในการควบคุม และป้องกันโรคไวรัสตับอักเสบ รวมทั้งการกำจัดและเฝ้าระวังโรค การหาแหล่งรังโรคและพาหะต่อไป พร้อมทั้งเป็นข้อมูลระดับนานาชาติ และเป็นฐานข้อมูลในการนำมาพัฒนาวัคซีนต่อไป

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ทางศูนย์พร้อมที่จะถ่ายทอดข้อมูลทางด้านองค์ความรู้ใหม่ทั้งหมด ไปยังผู้ใช้ทั้งทางภาครัฐและภาคเอกชน พร้อมกับพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสตับอักเสบ เพื่อประโยชน์สำหรับประเทศไทยในการใช้เป็นพื้นฐานในการตรวจวินิจฉัย การพัฒนาวัคซีน การคัดเลือกสายพันธุ์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำสายพันธุ์ไปพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต รวมทั้งการเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ที่จะเป็นปัญหา

วิธีการศึกษาวิจัย

เป็นการศึกษาแบบภาคตัดขวางโดยทำการเก็บข้อมูลจากประชากรกลุ่มเป้าหมายเป็นแรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาว ที่เข้ามาทำงานในประเทศไทย

การศึกษาได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรม ศึกษาวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประชากรศึกษา

แรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาวที่อยู่ในประเทศไทย อายุระหว่าง 15-60 ปี ที่มารับบริการจากโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล ในส่วนของการตรวจแรงงานประจำปี แรงงานส่วนใหญ่จะทำงานในเขตจังหวัดสมุทรสาคร

คุณสมบัติของผู้ป่วยที่น่าเข้าศึกษาในโครงการ (Inclusion criteria)

- อาสาสมัครที่ยินยอมเข้าโครงการศึกษาโดยสมัครใจ
- เป็นแรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาวโดยกำเนิด และเข้ามาอยู่ในประเทศไทยไม่เกิน 5 ปี
- มีร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคเรื้อรัง
- อายุตั้งแต่ 15 ปี ขึ้นไป
- ไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคเอดส์ในระยะที่มีอาการของโรคชัดเจน หรือที่มีการทราบมาก่อนแล้ว โรคมะเร็งในเม็ดเลือด โรคมะเร็งในต่อมน้ำเหลือง SLE (อาสาสมัครทุกรายจะไม่มีการตรวจ Anti-HIV)
- ไม่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเกินกว่า 1 เดือน ภายใน 1 ปีที่ผ่านมา (นับจากปัจจุบัน) เช่น steroids, immunosuppressive drugs, chemotherapy เป็นต้น
- ไม่มีประวัติการเจ็บป่วยเรื้อรัง ไม่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลเกินกว่า 1 เดือน ภายใน 1 ปีที่ผ่านมา (นับจากปัจจุบัน)

เกณฑ์การคัดเลือกออกจากศึกษา

- มีการเจ็บป่วยเรื้อรัง เป็นผู้ที่มีโรคประจำตัวหรือโรคเรื้อรัง รวมทั้งโรคที่เป็นอันตรายจากการเจาะเลือด ทั้งทางร่างกายและจิตใจ เช่น Hemophilia โรคหัวใจ โรคจิต เป็นต้น

ขนาดกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้อายุระหว่าง 15-60 ปี หรือมากกว่า โดยมีการคำนวณกลุ่มตัวอย่าง โดยประมาณการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ร้อยละ 70-90 พาหะไวรัสตับอักเสบ บี ร้อยละ 6-8 ไวรัสตับอักเสบ ซี ร้อยละ 3 โดยจะทำการศึกษาทั้งเพศชายและหญิงจำนวนเท่ากัน โดยมีการคำนวณกลุ่มประชากรดังนี้

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

โดย : Z ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% = 1.96

: อัตราการเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบ ในแต่ละกลุ่มอายุ (p) = ดังแสดงในตารางภาคผนวก

: q = 1-p

: ค่าความคลาดเคลื่อน (d) = 30% - 60% ของอัตราการเป็นพาหะโรคไวรัสตับอักเสบ ในแต่ละกลุ่มอายุ

เครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูลการวิจัย

แบบสัมภาษณ์ ผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นเอง ประกอบไปด้วยข้อคำถามเกี่ยวกับประวัติการได้รับวัคซีนในอดีต ประวัติการเจ็บป่วยของผู้ป่วยและบุคคลในครอบครัว ข้อมูลพื้นฐานอันประกอบไปด้วย ชื่อ-สกุล วัน เดือน ปี เกิด เพศ จำนวนพี่น้อง ที่อยู่ อาชีพตนเอง บิดา มารดา

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ เจาะเลือด clotted blood จำนวน 7 ml ไปตรวจ ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบ เอ บี และ ซี และแอนติเจนของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี และจะทำการตรวจแนวลึกทางชีวโมเลกุล

วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทาง Serology

ไวรัสตับอักเสบ บี HBsAg, anti-HBs, anti-HBc ไวรัสตับอักเสบ เอ anti-HAV IgG และไวรัสตับอักเสบ ซี anti-HCV โดยวิธี Enzyme Linked Immunoassay (EIA) โดยใช้ commercial available kit โดยการตรวจโดยวิธีมาตรฐาน และมีการประเมินความเที่ยงตรงตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทาง Molecular biology

- ตรวจหาลำดับเบสของยีน preS1, preS2 และ S ในไวรัสตับอักเสบ บี ดูการกลายพันธุ์ และ genotype
- ตรวจหาลำดับเบสของยีน core และ NS5 ในไวรัสตับอักเสบ ซี เพื่อแยกกลุ่ม genotype

ดังมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- ไวรัสตับอักเสบ เอ

การตรวจทาง Serology

ไวรัสตับอักเสบ เอ anti-HAV IgG โดยวิธี Enzyme Linked Immunoassay (EIA) โดยใช้ commercial available kit โดยการตรวจโดยวิธีมาตรฐาน และมีการประเมินความเที่ยงตรงตามมาตรฐานทางห้องปฏิบัติการ

EIA (Enzyme Immuno Assay)

การวิเคราะห์ อยู่บนหลักการของ enzyme linkage โดยใช้หลักการ sandwich คือ incubate serum, plasma ใน solid phase ที่มี antigen หรือ antibody เกาะอยู่จากนั้นใส่ enzyme conjugate peroxidase ที่มี antibody หรือ antigen link อยู่ซึ่ง conjugate นี้จะเข้าไปจับกับ antigen หรือ antibody ที่เกาะอยู่ที่ solid phase

จากนั้นจะทำการ develop สีโดยการใส่ substrate คือ O-Phenylenediamine เพื่อทำปฏิกริยาให้เกิดสี จากนั้นจะทำไปวัดความเข้มของสีที่ optimal density (OD) ที่กำหนดค่า OD นี้จะแปรตามปริมาณของ antibody หรือ antigen ในสิ่งตรวจ

ลักษณะการตรวจ EIA แบบที่ 2 คือ เป็น competitive enzyme link Assay โดยการใส่สิ่งตรวจเช่น serum หรือ plasma ลงไปพร้อมกับ antigen หรือ antibody เพื่อแย่งกันจับ antigen หรือ antibody บน solid phase จากนั้นก็ดำเนินการวิเคราะห์เช่นเดียวกับ EIA แบบที่ 1

- ไวรัสตับอักเสบ บี

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. Control

1.1 Positive control

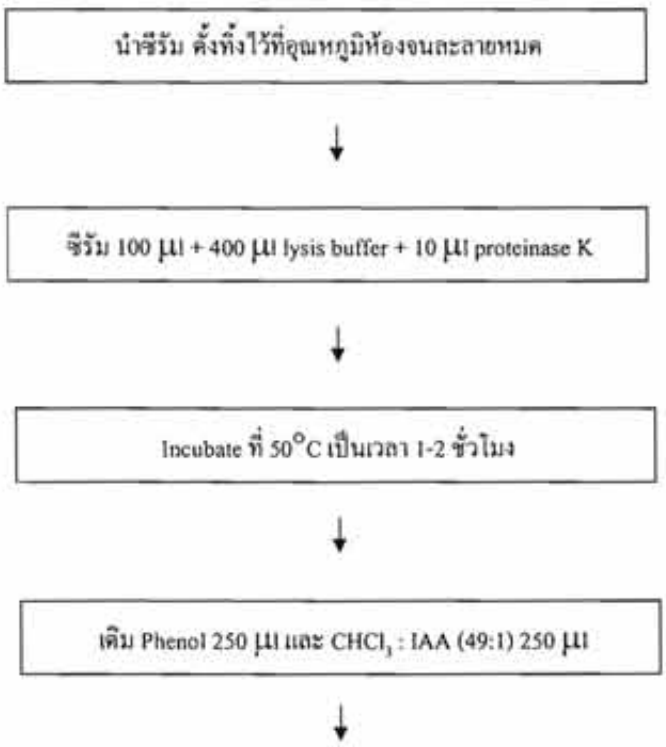
ได้ตัวอย่างจากผู้บริจาคโลหิตที่สภากาชาดไทย และตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบ บี ด้วยวิธี PCR

1.2 Negative control

เนื่องจาก HBV เป็น DNA ไวรัส เพราะฉะนั้น Negative control ในการศึกษาครั้งนี้ คือ น้ำที่ปราศจากเอ็นไซม์ย่อย DNA (DNase) คือ Distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ใช้ซีรั่มปริมาณ 100 µl ในการสกัด DNA ด้วยวิธี phenol/chloroform ดังแสดงในแผนภูมิด้านล่าง



ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

↓

นำส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม NaOac (2M) 40 µl + glycogen 4 µl + Abs EtOH 800 µl

↓

Incubate ที่ -70°C เป็นเวลา 30 นาที

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

↓

ดูด EtOH ทิ้งและล้าง DNA ด้วย 70% EtOH 1 ml

↓

ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

↓

ทำให้แห้งด้วยระบบสูญญากาศ เป็นเวลา 10 นาที

↓

ละลาย DNA ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 µl

↓

เก็บที่ -4 °C

3. **เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ** (DNA amplification) ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1, PreS2 และ S gene จนถึงบริเวณ "a" determinant

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ "a" determinant โดยวิธี PCR ใช้ primer ที่ ครอบคลุมบริเวณของ Pre-S1 และ "a" determinant

ทำการเตรียมส่วนผสมของสารเรียงตามลำดับลงใน microtube ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 แสดงรายละเอียดของ primer ที่ใช้

Primers	ลำดับเบส	ตำแหน่ง	Tm (°C)
Pre-S1 F (forward primer)	5' TCACCATATTCTTGGGAACAAGA 3'	2,817-2,839*	64
R4 (reverse primer)	5' ATGGCACTAGTAAACTGAGCC 3'	689-668*	62

*เปรียบเทียบกับตำแหน่งบนลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ HBV accession number AB115417

ตารางที่ 2 แสดงส่วนผสมของปฏิกริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV

สารละลาย	ปริมาตร (volume/tube)
Distilled water	12 µl
Eppendorf MasterMix (Hamburg, Germany)	10 µl
Pre-S1 F primer (10 pmol)	0.5 µl
R4 primer (10 pmol)	0.5 µl
DNA Template	2 µl
Total volume	**25 µl**

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลาย ทั้งหมดใส่ในเครื่อง Eppendorf Mastercycler personal (Hamburg, Germany) โดยมีอุณหภูมิและเวลาดังตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ "a" determinant

ตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิและเวลาของการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ของ HBV ในส่วนของ Pre-S1 จนถึงบริเวณ "a" determinant

PCR Cycle	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา
Pre-denaturation	94	1 นาที
	55	1 นาที
	72	1 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
	55	30 วินาที
	72	1 นาที 30 วินาที
	ทำซ้ำ 35 รอบ	ทำซ้ำ 35 รอบ
Post extension	72	7 นาที

ตรวจสอบผลผลิตจากการทำ PCR โดยการนำผลผลิตที่ได้ทั้งหมดผสมกับ loading dye แล้วใส่ลงในหลุมของ 2% agarose gel electrophoresis ที่ได้ทำการเตรียม gel แบบแผ่นนอนราบเรียบร้อยแล้ว จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ marker 100 bp เป็นตัวมาตรฐานเปรียบเทียบ นำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 10-15 นาที และนำมาเข้าเครื่องฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (Gel Doc) เก็บ DNA ใน gel นำไปทำการ purification เพื่อเตรียมหาลำดับเบส

- ไวรัสตับอักเสบ ซี

วิธีการดำเนินการวิจัย

Positive control

ได้ตัวอย่างจากซีรั่มผู้บริจาคโลหิต ซึ่งให้ผลตรวจ anti-HCV positive และตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบ ซี ด้วยวิธี PCR

Negative control

ในการศึกษาครั้งนี้ คือ distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง ผู้วิจัยคัดเลือกตัวอย่างที่จะนำมาศึกษา โดยคัดเลือกตัวอย่างซีรั่มเฉพาะผู้ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี (anti-HCV) โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้สารเคมี Murex HCV Kit (Abbott Laboratory, North Chicago, IL) ซึ่งเป็น recombinant HCV protein : CORE, NS3, NS4 และ NS5 protein และในรายที่ตรวจพบ anti HCV จะทำการสกัด RNA ต่อไป

การสกัด RNA ด้วยวิธี Guanidine extraction

นำ serum ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนละลายหมด

↓

ใส่ serum 100 µl

↓

เติม Guadinine thiocyanate (GTC+2 ME) 500µl/ Tube (GTC 9000 µl: 2 ME 70 µl)

↓

Mix โดยการ invert นาน 15 วินาที แล้วนำไป vortex นาน 15 วินาที

↓

เติม 2M Sodium Acetate 50 µl, Phenol 500 µl, $CHCl_3$: IAA (49:1) 100 µl

↓

Mix โดย invert 10วินาที, vortex นาน 15 วินาที

↓

บ่มทิ้งไว้ที่ -20 °C, 15 นาที

↓

Centrifuge 13,500 rpm, 25นาที

↓

เตรียม tube ใหม่ ขนาด 1.5 ml ใส่ Glycogen 4 µl

↓

แล้วนำส่วนใสด้านบนที่ได้จากการ centrifuge มาใส่ Tube ที่เตรียมไว้

↓

เติม Isopropanol 600 µl

↓

Mix โดยการ invert, incubate over night -20 °C หรือ ที่ -70 °C, 1 ชั่วโมง

↓

Centrifuge 13,500 rpm, 25นาที

↓

เทสารละลายออกให้เหลือเฉพาะ pellet

↓

ล้าง pellet ด้วย 70% ethanol 500 µl Mix โดยการ invert

↓

Centrifuge 13,500 rpm , 5นาที

↓

ดูดส่วนใสออกจนแห้งเหลือไว้แต่ Pellet

↓

ทำให้ pellet แห้ง

↓

เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 µl (DEPC)

↓

นำไปทำ RT-PCR ต่อไป

↓

Reverse transcription เตรียม cDNA

ตารางที่ 4 Primer และสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ reverse transcription ของไวรัส HCV

สารเคมี	ปริมาตร (ul)
H_2O	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 µl

↓

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

↓

นำมาเติมสารละลายผสมดังตารางข้างต้น

↓

บ่ม ที่ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 1ชั่วโมง

↓

เก็บ cDNA เก็บที่ -20°

PCR amplification

เพิ่มจำนวน DNA ของ HCV ในบริเวณของ CORE และ NS5B ขึ้น

ตารางที่ 5 แสดงลำดับเบส ของ primer ที่ใช้ในการทำ PCR

Region	Primer (nucleotide position)	Sequence	Product size(bp)
CORE	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 6 สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ Core และ NS5 ยีน

สารเคมี	1st PCR	2nd 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 7 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน NS5 และ CORE ยีน ทั้ง 1st PCR และ 2nd PCR

PCR cycle	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
Pre-denaturation	95	3	
Denaturation	95	1	ทำซ้ำ 35 รอบ
Annealing	49	1	
Extension	72	1.30	
Post-extension	72	7	

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

เปรียบเทียบผลการทำ PCR กับ ผลการทำ ELISA โดยแสดงผลเป็นร้อยละ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ : HBV (PreS1, PreS2, S gene) และ HCV (Core และ NS5)

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนก genotype โดยการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบ แต่ละชนิด ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ โปรแกรม Genotyping tool
- ทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน ด้วยวิธี cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X Ver3ion 1.83 และ Bioedit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบที่วิเคราะห์ ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- สร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรมClustal X version 1.83 และ MEGA3.1 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบที่ศึกษาแต่ละ genotype ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)
- วิเคราะห์คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (genetic distance) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของต่างประเทศที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม เพื่อหาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม MEGA3.1
- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนก subtype โดยการแปลงรหัสพันธุกรรมในส่วนที่ศึกษาให้เป็นกรดอะมิโน จากนั้นดูลำดับกรดอะมิโนในตำแหน่งที่สนใจศึกษา
- เปรียบเทียบผลจากการทำกรดอะมิโนในตำแหน่งที่สนใจศึกษา

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยการตัด gel ในส่วนแถบ DNA ที่ต้องการจาก gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Perfect Gel Cleanup kit แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตที่ได้ 5 µl ทำการตรวจด้วย gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่งว่าได้ชิ้นส่วน DNA

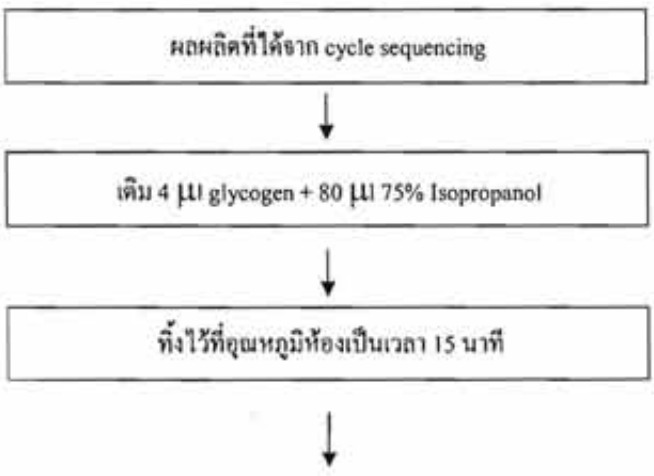
ที่ต้องการหรือไม่และเพื่อตรวจสอบว่าไม่มี DNA อื่นเจือปน หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตที่ผ่านการตรวจสอบแล้วมาทำ cycle sequencing การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะใช้ forward primer เพื่อทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ต้องการ โดยผสมสารที่ใช้ทำ cycle sequencing ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงส่วนผสมของสารที่ใช้ในการทำ cycle sequencing

สารละลาย	ปริมาณ (µl)
Distilled water	5.33
5X buffer	2
BigDye RR-100	4
Primer (ในช่วงยีนที่ต้องการ)	0.67
ผลผลิตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว	8
Total volume	20

หลังจากผ่านการทำ cycle sequencing แล้ว นำผลผลิตที่ได้ไปผ่านขั้นตอนการตกตะกอนเพื่อนำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย ABIPRISM™ ดังนี้

แสดงขั้นตอนการตกตะกอนที่ได้จากการเข้า cycle sequencing



ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 20 นาที

↓

เทส่วนใสทิ้ง

↓

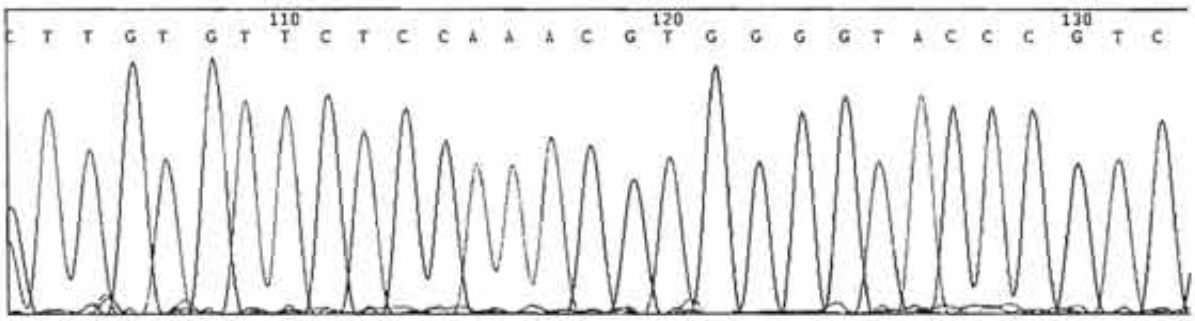
เติม Template suspension reagent 25 µl

↓

นำเข้าเครื่อง ABIPRISM™ 310 เพื่ออ่านผล

ทำการอ่านผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ Chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป (รูปที่ 1)

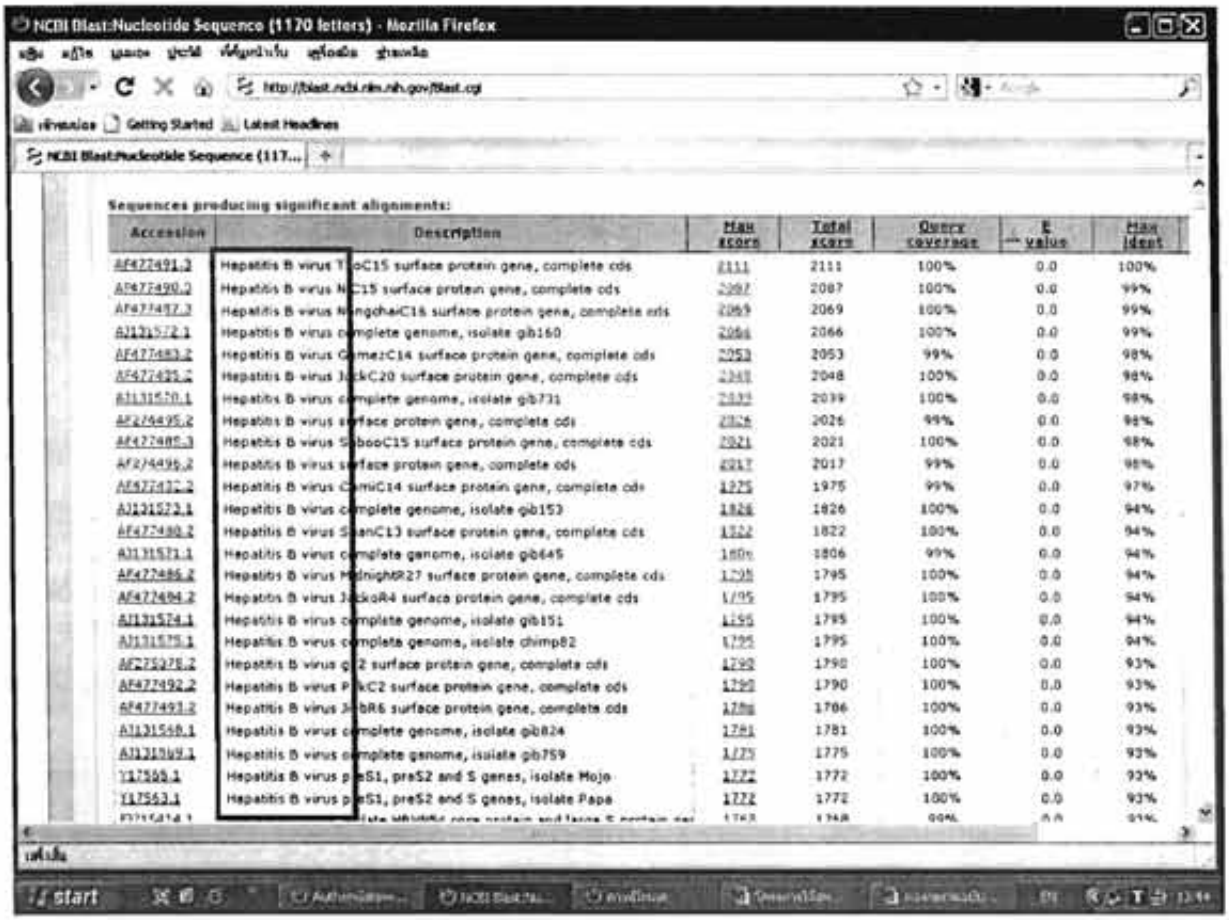
รูปที่ 1 แสดงตัวอย่างของ Chromatogramme ของ gene ที่ต้องการศึกษาในการทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์



1. เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างระดับโมเลกุลระหว่างสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยและสายพันธุ์ที่พบในต่างประเทศ โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์วิวัฒนาการ Phylogenetic analysis) โดยใช้ programme สำเร็จรูป (free programme) จาก website เช่น DNASTAR, Clustal X. BioEdit และ BLAST เป็นต้น โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์อื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast (รูปที่ 2)

รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์อื่นที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST



- ทำการจำแนก genotype โดยการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับนิวคลีโอไทด์ของ enterovirus แต่ละ genotype ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ โปรแกรม Genotyping tool

- ทำการเปรียบเทียบความเหมือนหรือความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ด้วยวิธี cluster analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X Ver3ion 1.83 และ Bioedit version 7.0.4.1 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ enterovirus ที่มีอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

- สร้างรูปของโครงสร้างความสัมพันธ์ (dendrogram หรือ phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรมClustal X version 1.83 และ MEGA3.1 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษากับนิวคลีโอไทด์ของ hepatitis virusesแต่ละ ชนิด และ genotype ที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

- วิเคราะห์คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน (genetic distance) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ได้จากการศึกษา เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของต่างประเทศที่มีรายงานอยู่ในธนาคารรหัสพันธุกรรม เพื่อหาความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม MEGA3.1

- พัฒนาการตรวจวินิจฉัยเพื่อความสะดวกรวดเร็วโดยการใช้วิธี realtime PCR เพื่อช่วยในการวินิจฉัยที่รวดเร็วขึ้น

- ทำการเผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ program Sequin version 6.0 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวอย่างซีรั่มได้จากโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนลที่เหลือจากหลังการให้บริการตรวจ ในส่วนการตรวจทางห้องปฏิบัติการจะทำที่ห้องปฏิบัติการวิจัยศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้บุคลากรในการตรวจของศูนย์ โดยมีการควบคุมคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนดของชนิดการตรวจ เช่น มี positive negative control

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

โครงการจะเริ่มดำเนินการเมื่อได้รับอนุมัติและผ่านขั้นตอนทางจริยธรรมในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะทำการตรวจทุกตัวอย่างสำหรับไวรัสตับอักเสบ เอ บี และซี และ molecular characterization โดยจะรวบรวมข้อมูลแบบสอบถาม วิเคราะห์ข้อมูล และรายงานผล

การควบคุมคุณภาพของข้อมูล

1. ผู้ร่วมในการวิจัยครั้งนี้ทั้งหมด ได้แก่ ผู้วิจัย ผู้วิจัยร่วม ผู้ทำการคัดเลือกประชากรศึกษา ผู้ทำการสัมภาษณ์ ผู้ทำการเจาะเลือด และเจ้าหน้าที่ตรวจทางห้องปฏิบัติการ จะได้รับการอบรมให้เข้าใจในโครงการวิจัย ตลอดจนฝึกการปฏิบัติจนเป็นที่เข้าใจทุกกระบวนการที่เกี่ยวข้อง

2. ห้องปฏิบัติการ จะทำการตรวจสอบมาตรฐานและผ่านการ validate จากบริษัทที่ดูแลเครื่อง โดยในการตรวจสอบจะมีการควบคุมโดยมี positive และ negative control รวมทั้งมีการควบคุมประเมิน sensitivity และ specificity ของ test ตลอดการตรวจ

3. ทำบัญชีรายชื่อผู้ป่วยที่เข้าโครงการ เพื่อสามารถตรวจสอบข้อมูลเพิ่มเติมเมื่อจำเป็น

4. การลงผลข้อมูลในแบบเก็บข้อมูล พยาบาลผู้ได้รับมอบหมายจะเป็นผู้ลงผลในแบบเก็บข้อมูล และมีการตรวจสอบโดยแพทย์ผู้รับผิดชอบโครงการ ซึ่งแบบเก็บข้อมูลจะมีสำเนาเก็บไว้ที่โรงพยาบาลด้วย เพื่อใช้ในการตรวจสอบต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้ได้ภาพรวมของกลุ่มศึกษาในแต่ละกลุ่มอายุและรวมทุกกลุ่มอายุ โดยการถ่วงน้ำหนักด้วยจำนวนประชากรในแต่ละภาค

ข้อพิจารณาทางจริยธรรม

โครงการนี้ได้ผ่านโครงการคณะกรรมการจริยธรรมการศึกษาวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรียบร้อยแล้ว

ในการเจาะเลือดจะทำการเจาะอาสาสมัครเพียง 1 ครั้งต่อคน ประมาณ 5 มล.

อันตรายที่อาจเกิดขึ้นได้จากการเจาะเลือด ได้แก่

<u>การติดเชื้อ</u> โดยอาสาสมัครอาจมีอาการไข้ หรือมีอาการอักเสบของผิวหนังในบริเวณที่ทำการเจาะเลือด ทั้งนี้อาการจะเกิดขึ้นภายในระยะเวลา 7 วัน หลังการเจาะเลือด

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้มีการป้องกันการติดเชื้อเนื่องจากการเจาะเลือด ดังนี้

- ไซริงค์และเข็มที่ใช้ในการเจาะเลือดเป็นชนิดที่ใช้ได้ครั้งเดียว (disposable syringe and needle)
- ใช้ sterile technique ในการเจาะเลือดโดยเจ้าหน้าที่เป็นบุคลากรสาธารณสุขที่มีความชำนาญในการเจาะเลือดเป็นอย่างดี

<u>ภาวะเลือดไหลไม่หยุดหรือมีภาวะเลือดออกใต้ผิวหนังเป็นก้อน (hematoma)</u>

ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการป้องกันภาวะดังกล่าวดังนี้

- ก่อนเจาะเลือด เจ้าหน้าที่จะสอบถามถึงประวัติการเจ็บป่วยในอดีต โดยเฉพาะการเป็นโรคเลือดภาวะเลือดไหลไม่หยุด หากมีประวัติเหล่านี้ก็จะหลีกเลี่ยงการเจาะเลือด

- ในกรณีที่สอบถามแล้วอาสาสมัคร ไม่มีประวัติดังกล่าว แต่เมื่อเจาะเลือดแล้วเลือดไหลไม่หยุด จะทำการห้ามเลือดและคอยสังเกตอาการจนกว่าเลือดจะหยุดไหล หากมีอาการผิดปกติ โรงพยาบาลจะได้ทำการรักษาที่ถูกต้องโดยด่วนต่อไป

- ก่อนทำการเจาะเลือด ผู้วิจัยจะได้อธิบายให้อาสาสมัครหรือผู้ปกครองของอาสาสมัครได้ทราบถึงอันตรายหรือผลแทรกซ้อนที่อาจจะเกิดขึ้นภายหลังการเจาะเลือด ตลอดจนชื่อของแพทย์และสถานที่ที่สามารถติดต่อได้กรณีเกิดผลแทรกซ้อน โดยที่ผู้วิจัยจะทำการเจาะเลือดและสัมภาษณ์อาสาสมัครหรือผู้ปกครองของอาสาสมัครได้ต่อเมื่ออาสาสมัครหรือผู้ปกครองของอาสาสมัคร (ในกรณีที่อาสาสมัครอายุไม่ถึง 20 ปี บริบูรณ์) ได้ลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัย ตามแบบฟอร์มที่แนบมา

สถานที่เก็บตัวอย่าง

ผู้ที่มาตรวจสุขภาพ แรงงานต่างด้าวที่มีในความดูแลของโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล (ส่วนใหญ่เป็นแรงงานในเขตจังหวัดกรุงเทพ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม)

ผลการวิจัย (Results)

ไวรัสตับอักเสบ เอ

ตัวอย่างทั้งหมด 1,183 ตัวอย่าง จากกัมพูชา 394 คน พม่า 394 คน และลาว 395 คน เป็นเพศชาย 594 คน และเพศหญิง 589 คน มีอายุเฉลี่ย 28.1 ปี (ค่าความแปรปรวนมาตรฐาน 9 ปี) ความชุกของ Anti-HAV มีค่าตั้งแต่ 85.6% ในกลุ่มผู้ใช้แรงงานชาวลาว จนถึงเกือบ 100% ในกลุ่มผู้ใช้แรงงานชาวพม่า และกัมพูชา ความชุกของ Anti-HAV จำแนกตามกลุ่มอายุแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 Anti-HAV จำแนกตามกลุ่มอายุและประเทศ

Age	Myanmar			Cambodia			Laos			Thailand*		
(years)	No.	Pos	%	No.	Pos	%	No	Pos	%	No.	Pos	%
16-20	127	127	100	134	134	100	120	92	76.7	369	64	17.3
21-30	135	134	99.3	83	83	100	173	149	86.1	380	136	35.8
31-40	97	97	100	82	81	98.8	86	81	94.2	446	265	59.4
41-60	35	35	100	95	95	100	16	16	100	659	478	72.53
Total	**394**	**393**	**99.7**	**394**	**393**	**99.7**	**395**	**338**	**85.6**	**1,854**	**943**	**50.9**

* Chatproedprai *et al.* 2007

ไวรัสตับอักเสบ บี

ตรวจพบ HBsAg จำนวน 282 (9.4%) ตัวอย่างจากทั้งหมด 3,009 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 121 คน (10.8%) จากชาวกัมพูชา 107 คน (9.7%) จากชาวพม่า และ 54 คน (6.9%) จากชาวลาว พบดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบ บี 102 (84.3%), 80 (74.8%), 42 (77.8%) ในชาวกัมพูชา พม่า และลาว ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 11

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากงานวิจัยนี้ถูกเก็บอยู่ในธนาคารดีเอ็นเอ (GenBank) โดยมี Accession number GQ855313-GQ85570 และ GQ856585 จากการวิเคราะห์ด้วย Phylogenetics ยีน pre-S1/pre-S2/S (รูปที่ 1) พบ 194 (86.6%) ตัวอย่าง จากทั้งหมด 224 ตัวอย่าง ถูกจำแนกเป็นจีโนไทป์ C 25 (11.2%) ตัวอย่าง ถูกจำแนกเป็นจีโนไทป์ B หนึ่งตัวอย่าง (0.44%) ถูกจำแนกเป็นจีโนไทป์ A และหนึ่งตัวอย่างเป็นจีโนไทป์ D (ตารางที่ 11)

การกระจายของ subtype adr พบมากที่สุด (68.3%), ayw (8.9%), adw (6.7%) และ ayr (0.9%) การกระจายของ genotype และ subtype ในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ กัมพูชา และลาว พบความชุกของจีโนไทป์ B แต่ จีโนไทป์ C ต่ำกว่า พบในพม่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รวมทั้งแรงงานต่างด้าวชาวลาวยังพบ subtype ayw สูง แต่พบ subtype adr ต่ำกว่าที่พบในแรงงานชาวพม่าและกัมพูชาอย่างมีนัยสำคัญ (ตางรางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความชุกของไวรัสตับอักเสบ บี genotype และ subtype ในแรงงานต่างด้าว

	Cambodia (n = 1,119)	Laos (n = 787)	Myanmar (n = 1,103)	Total (n = 3,009)	P-value
No. HBsAg positive	121 (10.8)	54 (6.9)	107 (9.7)	282 (9.4)	0.013*
No. HBV DNA positive	102 (84.3)	42 (77.8)	80 (74.8)	224 (79.4)	0.008*
Gender (M : F: ND[a])	81:20:1	31:11:0	46:28:6	158:59:7	0.030*
Age (yr; mean ± SD)	29.2±8.6	26.2±7.4	28.3±6.1	28.3±7.6	NS
Genotype					
A2[b]	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.44)	NS
B	13 (12.7)	11 (26.2)	1 (1.25)	25 (11.2)	0.000*
B2	7 (6.9)	1 (2.4)	0 (0)	8 (3.6)	
B3	1 (1.0)	7 (16.7)	1 (1.3)	9 (4.0)	
B4	5 (4.9)	3 (7.1)	0 (0)	8 (3.6)	
C	86 (84.3)	30 (71.4)	78 (97.5)	194 (86.6)	0.000*
C1	86 (84.3)	29 (69.0)	77 (96.3)	192 (85.7)	
C5	0 (0)	1 (2.4)	1 (1.25)	2 (0.9)	
D[b]	0 (0)	0 (0)	1 (1.25)	1 (0.44)	NS
Suspected recombination					NS
B2/C1	1(1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.44)	
B3/C1	0 (0)	1(2.4)	0 (0)	1 (0.44)	
G/C1	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.44)	
Subtype					
adr	76 (74.5)	20 (47.6)	57 (71.25)	153 (68.3)	0.000*
adw	9 (8.8)	5 (11.9)	1 (1.25)	15 (6.7)	NS
ayr	1 (1.0)	1 (2.4)	0 (0)	2 (0.9)	NS
ayw	6 (5.9)	12 (28.6)	2 (2.5)	20 (8.9)	0.000*
Could not be identified	10 (9.8)	4 (9.5)	20 (25.0)	34 (15.2)	

ตัวอย่างที่ให้ผลบวกของดีเอนเอไวรัส พบ point mutation ในบริเวณ "a" determinant หลายจุด ดังตาราง ที่ 11 โดยการกลายพันธุ์ที่พบมากเป็นแบบ Ile126/Ser/Asn จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสทั้งหมด พบ 19.1% เป็น pre-s mutation 7.7% เป็น pre-s start deletion 3.8% เป็น pre-s start codon mutation 3.3% เป็น pre-s start codon deletion/mutation ดังตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ความชุกของ 'a' determinant mutations ในแรงงานต่างด้าว

HBV DNA positive	Cambodia (n = 102)	Laos (n = 42)	Myanmar (n = 80)	Total (n = 224)
Amino acid substitution				
No. HBV sequencing available	94 (92.2)	38 (90.5)	62 (77.5)	194 (86.6)
Ile126Ser/Asn	6 (6.4)	2 (5.3)	4 (6.5)	12 (6.2)
Pro127Arg	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Gly130Arg	0	1 (2.6)	0	1(0.5)
Thr131Asn/Pro	0	1 (2.6)	2 (3.2)	3 (1.5)
Met133Thr	2 (2.1)	0	0	2 (1.0)
Phe134Leu	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Thr140Ile	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Pro142Leu	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Gly145Arg/Ala	3 (3.2)	1 (2.6)	0	4 (2.1)
Trp156Leu	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Ala157Gly	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Ala159Val	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Pro120Thr + Ala128Asp + Cys138Tyr +	0	1 (2.6)	0	1(0.5)
Lys122Gln + Thr131Asn + Met133Thr	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Gly130Arg + Met133Thr	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Thr131Asn + Phe134Tyr	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Thr131Asn + Phe134Tyr + Asp144Glu	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Ala128Val + Phe134Tyr + Phe158Leu +	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Total no. of 'a'determinant mutations	19/94	6/38	10/62	35/194

ตารางที่ 12 ความชุกของ pre-S mutations ในแรงงานต่างด้าว

Mutation/deletions	Cambodia (n = 102)	Laos (n = 42)	Myanmar (n = 80)	Total (n = 224)
No. Sequencing available	98 (96.1)	40 (95.2)	71 (88.8)	209 (93.3)
Pre-S1 start codon mutaion +	1 (1.0)	0	0	1 (0.5)
Pre-S1 start codon deletion +	0	0	1 (1.4)	1 (0.5)
Pre-S1 deletion	2 (2.0)	0	1 (1.4)	3 (1.4)
Pre-S1 deletion + pre-S2 deletion	1 (1.0)	0	0	1 (0.5)
Pre-S2 start codon mutaion	3 (3.1)	3 (7.5)	2 (2.8)	8 (3.8)
Pre-S2 start codon mutation +	2 (2.0)	0	5 (7.0)	7 (3.3)
Pre-S2 start codon deletion +	1 (1.0)	0	1 (1.4)	2 (1.0)
Pre-S2 start codon mutation +	1 (1.0)	0	0	1 (0.5)
Pre-S2 deletion	7 (7.1)	3 (7.5)	6 (8.5)	16 (7.7)
Total no. of pre-S mutations	18 (18.4)	6 (15.0)	16 (22.5)	40 (19.1)

ไวรัสตับอักเสบ ซี

ตัวอย่างซีรั่มจำนวน 1,431 ตัวอย่าง 1,594 ตัวอย่าง และ 882 ตัวอย่าง จากแรงงานต่างด้าวชาวกัมพูชา พม่า และลาวตามลำดับ อายุโดยเฉลี่ย 27.13-27.77 ปี ชาวต่างด้าวส่วนใหญ่อยู่ในวัยกลางคนอายุประมาณ 24-26 ปี พบความชุกของ Anti-HCV ในแรงงานชาวพม่า 1.7%, กัมพูชา 2.3% และลาว 0.8% ในจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกของ Anti-HCV ตรวจพบพบสารพันธุกรรมของไวรัสในชาวพม่าจำนวน15 คน กัมพูชา 25 คน และลาว 1 คน ดังตารางที่ 13 ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมดถูกนำไปวิเคราะห์รหัสสารพันธุกรรม และจัดจำแนกจีโนไทป์ เรียงตามลำดับความชุกที่พบ ได้ดังนี้ จีโนไทป์ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6 (6e, 6f, 6m, 6p และ 6m) ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 13 ความชุกของไวรัสตับอักเสบ ซี อายุ เพศ ของแรงงานต่างด้าวในประเทศไทย

	Cambodia (n =1431)	Laos (n = 882)	Myanmar (n = 1594)
No. Anti-HCV positive	33 (2.3%)	7 (0.8%)	27 (1.69%)
No. HCV-RNA positive	25 (75.8%)	1 (14.3%)	15 (55.6%)
Sex: Male	959	397	631
Female	469	475	865
ND	3	10	98
Mean age (SD)	27.77 (8.14)	25.35 (6.02)	27.13 (6.19)

ตารางที่ 14 ไวรัสตับอักสบ ซี จีโนไทป์ จากแรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาว ในประเทศไทย

	Genotype 1		Genotype 3		Genotype 6						
	1a	1b	3a	3b	6e	6f	6m	6p	6r	6u	6
Cambodia		6	4	1	5	2		1	5	1	
Laos											1
Myanmar	1	1	4	5		2	2				

วิจารณ์

ชาวต่างด้าวจากประเทศเพื่อนบ้านพม่า กัมพูชา และลาว อาจนำโรคติดเชื้อหลาย เช่น tuberculosis, syphilih, malaria, polio และ filariasis ดังนั้นการเพิ่มงบประมาณสำหรับการควบคุมและป้องกันทางสาธารณสุขในประเทศไทยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

งานวิจัยของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2547 แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างอายุและอัตราการเพิ่มขึ้นของความชุกของ Anti-HAV โดยความชุกประมาณ 17.3% ในกลุ่มประชากรอายุต่ำกว่า 20 ปี และเพิ่มขึ้นเป็น 75% ในกลุ่มประชากรอายุมากกว่า 40 ปี (Chatproedprai et al., 2007) ตรงข้ามกับความชุกชาวต่างด้าวเกือบ 100% เคยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ มาแล้ว ซึ่งเป็นกลุ่มอายุ 16-20 ปี เนื่องจากการศึกษาไวรัสชนิดนี้ในกลุ่มประเทศดังกล่าวมีจำกัด ดังนั้นรายงานนี้จึงอาจจะสะท้อนถึงการระบาดในประเทศพม่า กัมพูชา และลาว ได้

การเดินทางไปยังประเทศดังกล่าว จำเป็นต้องได้รับวัคซีนป้องกันล่วงหน้าอย่างน้อยสองอาทิตย์ก่อนการเดินทาง เพราะการได้รับวัคซีนสามารถควบคุมการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Poovorawan et al., 1994) การให้วัคซีนในเด็กเกิดใหม่ของกลุ่มแรงงานต่างด้าวดังกล่าวมีความจำเป็นด้วยเช่นกัน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกในการวิเคราะห์ทางอณูพันธุศาสตร์ของไวรัสตับอักเสบ บี ของประเทศพม่า กัมพูชา และลาว พบ genotype และ sub-genotype C1/adr มากกว่า 85% สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในแรงงานชาวพม่า (Nakai et al., 2001) ส่วน C1 และ B4 พบมากในแรงงานชาวกัมพูชา (Huy et al., 2008) จีโนไทป์ที่พบมักพบได้ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ความชุกของ HBsAg ในแรงงานต่างด้าวมีค่าสูงกว่า ความชุกที่พบในประเทศไทย (4%) (Luksamijarulkul et al., 2002) การเกิด amino acid substitution ในบริเวณ "a" determinant ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงร่างของโปรตีนและอาจกระทบต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของวัคซีน โดยทั่วไป vaccine escape mutant มักเกิดจากการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Gly145 ไปเป็น Arg145 แต่การกลายพันธุ์ที่พบมากในแรงงานต่างด้าว เกิดที่ตำแหน่ง 126 และพบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนสูง (15-20%) กว่าที่เคยมีการรายงาน (6-12%) (Echevarria and Avellon et al., 2006) การกลายพันธุ์แบบ vaccine escape mutant เกิดจาก selective pressure ที่เกิดจากการได้รับวัคซีน แต่ในการกลายพันธุ์ที่พบในแรงงานต่างด้าว อาจไม่เกี่ยวข้องกับการได้รับวัคซีน เนื่องจากในกลุ่มประเทศดังกล่าว มีอัตราการฉีดวัคซีนต้านไวรัสตับอักเสบ บีต่ำ ดังนั้นการกลายพันธุ์ที่พบในงานวิจัยนี้ อาจจะเกิดโดยธรรมชาติ ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับ ผู้ติดเชื้อ HBV pre-s mutations/deletion มักพบได้บ่อยในผู้ป่วยเรื้อรัง ซึ่งมีแนวโน้มเกิดการกลายพันธุ์สะสมในผู้ป่วยระยะตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) และพบการกลายพันธุ์ชนิดนี้ในแรงงานชาวพม่า กัมพูชา และลาว มากกว่าพบในประเทศไทย

ความชุกของ Anti-HCV ในแรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาว ใกล้เคียงกับความชุกที่มีรายงานในประเทศไทย (Sunanchaikarn et al., 2007) แรงงานส่วนใหญ่มีอายุประมาณ 26-27 ปี โดยทั่วไปความชุกของ Anti-HCV มักมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอายุ มีรายงานจากประเทศกัมพูชาพบความชุกของ Anti-HCV (6.5%)

สูงในผู้ใหญ่เพศชาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการรักษาโรคด้วยการฉีดยา ลักษณะนิสัยที่นิยมของชาวกัมพูชา (Thuring et al., 1993) ความหลากหลายของไวรัสตับอักเสบ ซี พบมากในตัวอย่างแรงงานต่างด้าวจากประเทศกัมพูชา บางจีโนไทป์สามารถพบได้ในประเทศไทย แต่บางจีโนไทป์พบเฉพาะประเทศกัมพูชา แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์ดังกล่าวอาจมีแหล่งกำเนิดจากประเทศกัมพูชา เนื่องจากมีแรงงานต่างด้าวจากประเทศพม่าเดินทางเข้ามาทำงานในประเทศไทยจำนวนมาก ดังนั้นความชุกที่พบในกลุ่มแรงงานจากประเทศนี้อาจสะท้อนให้เห็นแนวโน้มในประเทศพม่า จีโนไทป์ 3a พบมากในประเทศไทย แรงงานชาวพม่า และกัมพูชา มีการศึกษาพบความสัมพันธ์กับการเสพยาเสพติดด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยา การติดเชื้อด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน หรือการฉีดยาเสพติดอาจเป็นสาเหตุหลังของการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี จีโนไทป์ดังกล่าวในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จีโนไทป์ 6 ที่พบในงานวิจัยนี้ บางตัวอย่างไม่สามารถจำแนก subtype ได้ เนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีความหลากหลายสูง และอาจมีจีโนไทป์ใหม่ที่ยังไม่ค้นพบในกลุ่มประชากรของประเทศพม่า กัมพูชา และลาว

สรุป

ความชุกของ Anti-HAV ในกลุ่มแรงงานต่างด้าวจากประเทศพม่า กัมพูชา และลาว อาจสะท้อนให้เห็นว่าประเทศดังกล่าวมีความชุกในอัตราสูง และควรได้รับวัคซีนสร้างภูมิคุ้มกันก่อนการเดินทางไปยังประเทศเหล่านี้

งานวิจัยนี้แสดงความชุกของ HBsAg ในอัตราสูง จีโนไทป์ C1/adr พบมากในกลุ่มแรงงานต่างด้าวจากพม่า กัมพูชา และลาว รวมทั้ง amino acid substitution ในบริเวณ "a" determinant และ HBV pre-s mutations/deletion มักพบได้บ่อยในผู้ป่วยเรื้อรังจากประเทศดังกล่าว

ความชุกของ Anti-HCV ในแรงงานต่างด้าวชาวพม่า กัมพูชา และลาว ใกล้เคียงกับความชุกในประเทศไทย จีโนไทป์ที่พบมากได้แก่ จีโนไทป์ 3b และ 3a ซึ่งอาจสัมพันธ์กับการติดเชื้อด้วยการเสพยาเสพติดด้วยเข็มฉีดยา รวมทั้งมีความหลากหลายของจีโนไทป์ 6 สูงในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

บรรณานุกรม

Chatproedprai, S., Chongsrisawat, V., Chatchatee, P., Theamboonlers, A., Yoocharoen, P., Warinsathien, P., Tharmaphornpilas, P., Warintrawat, S., Sinlaparatsamee, S., Chaiear, K., Khwanjaipanich, S., Paupunwatana, S. & Poovorawan, Y. (2007). Declining trend in the seroprevalence of infection with hepatitis A virus in Thailand. Ann Trop Med Parasitol, 101, 61-68.

Poovorawan, Y., Tieamboonlers, A., Chumdermpadetsuk, S., Glück, R., Cryz, S.J. Jr. (1994) Control of a hepatitis A outbreak by active immunization of high-risk susceptible subjects. J Infect Dis, 169, 228-229.

Nakai K, Win KM, Oo SS, Arakawa Y, Abe K. 2001. Molecular characteristic-based epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and GB virus C/hepatitis G virus in Myanmar. J Clin Microbiol 39: 1536-1539.

Huy TT, Sall AA, Reynes JM, Abe K. 2008. Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Cambodia. Virus Genes 36: 299-305.

Luksamijarulkul P, Thammata N, Tiloklurs M. 2002. Seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus among blood donors, Phitsanulok Regional Blood Center, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 33: 272-279.

Echevarria JM, Avellón A. 2006. Hepatitis B virus genetic diversity. J Med Virol 78 Suppl 1:S36-42.

Sunanchaikarn S, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Yoocharoen P, Tharmaphornpilas P, Warinsathien P, Sinlaparatsamee S, Paupunwatana S, Chaiear K, Khwanjaipanich S, Poovorawan Y: Seroepidemiology and genotypes of hepatitis C virus in Thailand. Asian Pac J Allergy Immunol 2007; 25: 175-182

Thuring EG, Joller-Jemelka HI, Sareth H, Sokhan U, Reth C, Grob P: Prevalence of markers of hepatitis viruses A, B, C and of HIV in healthy individuals and patients of a Cambodian province. The Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993; 24: 239-249.

ภาคผนวก

ตารางแสดงอัตราการติดเชื้อตับอักเสบ เอ ค่าความคลาดเคลื่อนและจำนวนตัวอย่างจำแนกตามกลุ่มอายุ

กลุ่มอายุ (ปี)	อัตราการติดเชื้อตับอักเสบ เอ (P:%)	ค่าความคลาดเคลื่อน (d :%)	จำนวนตัวอย่าง
15-20	40	5	369
21-30	60	5	369
31-40	80	5	246
41-50	90	5	138
51-60	90	5	138
รวม	-	-	1,260

ตารางแสดงอัตราการเป็นพาหะตับอักเสบ บี ค่าความคลาดเคลื่อนและจำนวนตัวอย่างจำแนกตามกลุ่มอายุ

กลุ่มอายุ (ปี)	อัตราการเป็นพาหะตับอักเสบ บี (p:%)	ค่าความคลาดเคลื่อน (d:%)	จำนวนตัวอย่าง
15-20	8	3.1	294
21-30	8	3.1	294
31-40	8	3.1	294
41-50	8	3.1	294
51-60	8	3.1	294
รวม	-	-	1,470

ตารางแสดงอัตราการติดเชื้อตับอักเสบ ซี ค่าความคลาดเคลื่อนและจำนวนตัวอย่างจำแนกตามกลุ่มอายุ

กลุ่มอายุ (ปี)	อัตราการติดเชื้อตับอักเสบ ซี (p:%)	ค่าความคลาดเคลื่อน (d:%)	จำนวนตัวอย่าง
15-20	4	2.2	305
21-30	4	2.2	305
31-40	4	2.2	305
41-50	4	2.2	305
51-60	4	2.2	305
รวม	-	-	1,525

I24983521

หัวหน้าโครงการวิจัย

ศ. นพ.ยง ภู่วรวรรณ — ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

คณะผู้วิจัย

รศ. พญ.วรนุช จงศรีสวัสดิ์ — ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564000 ต่อ 3355 โทรสาร 02-2564929

รศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ — ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564482

ดร. สัญชัย พยุงภร — ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น.ส.อภิรดี เทียมบุญเลิศ — ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์สภากาชาดไทย โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

ดร.ทวีศักดิ์ เชี่ยวชาญศิลป์ — ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

น.ส.นุชนาฏ ถาวรสุข — ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

นายกมล สุวรรณการ — ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

น.ส.ศรัณย์ธร อัครธำรงสิน ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

น.ส.วรดี ลือชาชัยวงศ์ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

น.ส.เกษมณี ไพรอนันตถาวร ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

น.ส.จิตติมา ทองมี ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

น.ส.ปิติรัตน์ บุญสุข ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านไวรัสวิทยาคลินิก ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2564909 โทรสาร 02-2564929

นพ.ไพโรจน์ โชติวิทยธารากร โรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล

โทรศัพท์ 02-8771111

ผลงานที่ได้รับการตีพิมพ์ระดับนานาชาติ

1. Poovorawan Y, Chongsrisawat V, Praianantathavorn K, Theamboonlers A. High seroprevalence of hepatitis A virus among migrant workers from Myanmar, Cambodia and Laos who are living in Thailand Ann Trop Med Parasitol. 2009;103:361-3.
2. Akkarathamrongsin S, Praianantathavorn K, Hacharoen N, Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Seroprevalence and Genotype of Hepatitis C Virus among Immigrant Workers from Cambodia and Myanmar to Thailand. Intervirology 2009 (inpress)
3. Sa-nguanmoo P, Tangkijvanich P, Thawornsuk N, Vichaiwattana P, Prianantathavorn K, Theamboonlers A, Tanaka Y, Poovorawan Y. Molecular Epidemiological Study of Hepatitis B Virus among Migrant Workers from Cambodia, Laos and Myanmar to Thailand. J Med Viro 2010 (inpress)

Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 103, No. 4, 361–363 (2009)

SHORT COMMUNICATION

High seroprevalence of hepatitis A virus among migrant workers from Myanmar, Cambodia and Laos who are living in Thailand

In Thailand, the socio-economic development that has occurred over the last few decades has brought general improvements in living standards, sanitation and hygiene. In consequence, there has been a gradual decline in the general seroprevalence of infection with hepatitis A virus (HAV), from a hyper-endemic situation to the current meso-endemicity (Poovorawan *et al.*, 1997; Chatchatee *et al.*, 2002; Chatproedprai *et al.*, 2007). There is, however, some concern that areas with large populations of migrants from the neighbouring countries of Myanmar, Cambodia and Laos may still be hyper-endemic for HAV, although little is known about the HAV situation among these migrants or in their countries of origin. In 2004, the Thai Department of Employment estimated that there were >1,200,000 people from Myanmar, Cambodia and Laos working in Thailand (lib.doe.go.th/doeinfor/pagedata/ebookdoc/020400006369_1.pdf), and this estimate took no account of unregistered and illegal migrants. The annual influx of migrants is predicted to increase over the next few decades, and it is clear that the health problems of these workers could well have an impact on the non-migrant population.

In a cross-sectional study in 2008, the sero-epidemiology of HAV among migrants from Myanmar, Cambodia and Laos working in Thailand was explored. It was hoped that the data collected would help define the sero-epidemiology of HAV within the migrants' countries of origin and thus be useful in planning preventive strategies in those areas.

All legal immigrant workers are registered with the Thai government and are required to have annual health check-ups. The subjects of the present study were legal workers from Myanmar, Cambodia and Laos who were aged between 16 and 60 years and had health insurance at the Bangkok 9 International Hospital, Bangkok. All had immigrated to Thailand within the previous 5 years and worked either in Bangkok or in provinces near Bangkok, such as Samutsakhon and Samutsongkhram. Potential subjects who had chronic illness, were receiving immunosuppressive therapy, and/or had the clinical signs or symptoms associated with HIV/AIDS or any other immunodeficiency-related disease were excluded. The protocol was approved by the ethics committee of Chulalongkorn University's Faculty of Medicine and by the director of the Bangkok 9 International Hospital.

The recruitment of subjects was sequential — as migrant workers presented at the Bangkok 9 International Hospital for their yearly check-ups, a blood sample was collected from each of them (a routine part of such check-ups). The blood (of each eligible subject) that was left after the routine haematology was used in the present study, with each subject given a code number to preserve his or her anonymity. Serum was separated off and stored at −20°C until it could be tested for anti-HAV IgG, in a commercial ELISA (Murex Biotech, Dartford, U.K.), at the Center of Excellence in Clinical Virology in Chulalongkorn University's Faculty of Medicine.

© The Liverpool School of Tropical Medicine 2009
DOI: 10.1179/136485909X435085

Overall, 1183 subjects (394, 394 and 395 from Myanmar, Cambodia and Laos, respectively) were investigated. The 594 males and 589 females investigated had a mean (S.D.) age of 28.1 (9.0) years. The recorded seroprevalences of anti-HAV (see Table) varied from 85.6% among the workers from Laos to almost 100% in those from Cambodia and Myanmar.

Immigrants from Thailand's neighbouring countries bring tuberculosis, syphilis, malaria, polio and filariasis into the country, and have contributed to the revival of infectious diseases that had been eradicated from Thailand, such as leprosy. In 2004, the seroprevalence of anti-HAV in the non-migrant Thai population was found to increase from 17.3% among subjects aged 16–20 years to approximately 75% among those aged >40 years (Chatproedprai *et al.*, 2007; see Table). The subjects of the present study showed no age-specific trends in HAV seroprevalence but even the youngest subjects were very likely to have anti-HAV antibodies (Table).

Although this study was confined to legal migrant workers, illegal immigrants only represent a small percentage of all immigrant workers in Thailand. It therefore seems likely that the present results give fairly accurate estimates of the seroprevalences of HAV among the adult immigrants from Myanmar, Cambodia and Laos who are working in Thailand (although it remains unclear if they also reflect the seroprevalences of HAV in the peoples who live in the countries that surround Thailand). Almost all of the present subjects had already been infected with HAV (presumably in their countries of origin) by the time they had reached the age of 16–20 years. Although information on anti-HAV seroprevalence in Myanmar, Cambodia and Laos is limited, those intending to travel to these countries, from areas where these is a low risk of HAV infection, should receive HAV immunization. Hepatitis A epidemics can occur as a consequence of non-immune travellers returning from HAV-endemic countries (Jong, 2005). Although the current recommendation is to immunize travellers against HAV at least 2 weeks before their trip, hepatitis A vaccine has proven effective in controlling outbreaks (Poovorawan *et al.*, 1994) and might be administered at any time before departure because, even if given immediately before the journey, it will still provide travellers with protection (Connor, 2005).

In Thailand, as in many other countries, access to immunization schedules — outside of the government-sponsored programmes of childhood vaccination — may be particularly challenging for migrant populations because of language, cultural and financial barriers. Programmes of hepatitis A immunization targeted at the migrant workers' children who are born in Thailand might be considered.

In conclusion, anti-HAV prevalence among the adult migrants from Myanmar, Cambodia and Laos who work in Thailand

TABLE. *The seroprevalences of IgG against hepatitis A virus recorded among immigrant workers, from Myanmar, Cambodia and Laos, in Thailand in 2008*

Age (years)	No. of subjects investigated and (% found seropositive)			
	Migrants from Myanmar	Migrants from Cambodia	Migrants from Laos	Non-migrant Thais*
16–20	127 (100)	134 (100)	120 (76.7)	369 (17.3)
21–30	135 (99.3)	83 (100)	173 (86.1)	380 (35.8)
31–40	97 (100)	82 (98.8)	86 (94.2)	446 (59.4)
41–60	35 (100)	95 (100)	16 (100)	659 (72.5)
16–60	394 (99.7)	394 (99.7)	395 (85.6)	1854 (50.9)

*Data collected in 2004 by Chatproedprai *et al.* (2007).

is very high, possibly reflecting high prevalences of hepatitis A in the migrants' countries of origin. Hepatitis A immunization prior to travelling to Myanmar, Cambodia and Laos should be considered.

ACKNOWLEDGEMENTS. This study received financial support from the Thai government's research fund, the National Research Council of Thailand, the Higher Commission of Education, the Ministry of Education, Chulalongkorn Hospital, the Center of Excellence in Clinical Virology, the CU Centenary Academic Development Project and The Center of Excellence Research Fund, Chulalongkorn University. The authors would like to thank all the staff in Bangkok 9 International Hospital for their assistance in the collection of blood samples, and the staff of the Center of Excellence in Clinical Virology, at Chulalongkorn University, for their help. The authors also thank P. Hirsch for reviewing the manuscript.

Y. POOVORAWAN
V. CHONGSRISAWAT
K. PRAIANANTATHAVORN
A. THEAMBOONLERS
Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Received 17 November 2008,
Revised 24 March 2009,
Accepted 25 March 2009

Reprint requests to: Y. Poovorawan.
E-mail: yong.p@chula.ac.th; fax: +66 2 2564929.

REFERENCES

Chatchatee, P., Chongsrisawat, V., Theamboonlers, A. & Poovorawan, Y. (2002). *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, **20**, 53–56.

Chatproedprai, S., Chongsrisawat, V., Chatchatee, P., Theamboonlers, A., Yoocharoen, P., Warinsathien, P., Tharmaphornpilas, P., Warintrawat, S., Sinlaparatsamee, S., Chaiear, K., Khwanjaipanich, S., Paupunwatana, S. & Poovorawan, Y. (2007). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **101**, 61–68.

Connor, B. A. (2005). *American Journal of Medicine*, **118** (Suppl. 10A), 58S–62S.

Jong, E. C. (2005). *American Journal of Medicine*, **118** (Suppl. 10A), 50S–57S.

Poovorawan, Y., Theamboonlers, A., Chumdermpadetsuk, S., Glück, R. & Cryz Jr, S. J. (1994). *Journal of Infectious Diseases*, **169**, 228–229.

Poovorawan, Y., Vimolkej, T., Chongsrisawat, V., Theamboonlers, A. & Chumdermpadetsuk, S. (1997). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **28**, 154–157.

Seroprevalence and Genotype of Hepatitis C Virus among Immigrant Workers from Cambodia and Myanmar to Thailand

Srunthron Akkarathamrongsin[a,b], Kesmanee Praianantathavorn[a], Nisachol Hacharoen[a], Apiradee Theamboonlers[a], Pisit Tangkijvanich[c], Yong Poovorawan[a]

[a]Center of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Bangkok, Thailand

[b]Inter-Department of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[c]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Bangkok, Thailand

Key Words Hepatitis C virus • Seroprevalence • Genotype • Immigrant Workers • Cambodia • Myanmar

Correspondence: Prof. Yong Poovorawan, MD.,
Center of Excellence in Clinical Virology,
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,
Bangkok, 10330 Thailand
Tel: +662-256-4909, Fax: +662-256-4929,
E-mail: Yong.P@chula.ac.th,

Running title: HCV among workers from Cambodia and Myanmar

Abstract: 212 words,

Text: 2483 words,

Reference: 28 references,

Table: 2 tables,

Figure: 2 figures

Abstract

Objective: There are a large number of immigrant workers from Cambodia and Myanmar to Thailand. Our study was aimed at determining seroprevalence and genotypes of HCV in this group. ***Methods:*** Immigrants aged between 15 and 60 years (1431 Cambodians and 1594 Myanmarese) were recruited into this study. Each sample was screened for anti-HCV by ELISA. RNA was extracted from seropositive samples and RT-PCR was performed in order to amplify the HCV core region. Each sample was subsequently sequenced and the genotype was determined by phylogenetic analysis. ***Results:*** The prevalence of HCV infection in immigrant workers from Cambodia and Myanmar was 33 (2.3%) and 27 (1.69%) samples, respectively. Of the anti-HCV positive individuals, 25 (75.8%) from Cambodia and 15 (55.6%) from Myanmar harbored viral RNA. Phylogenetic analysis showed that the predominant HCV genotypes in this group were 1a, 1b, 3a, 3b and 6 (6e, 6f, 6m, 6p and 6r). Most HCV isolates can be found in Thailand, though some subtypes of HCV-6 are uncommon. ***Conclusions:*** This study shows the HCV seroprevalence and genotypes among immigrant Cambodians and Myanmarese which may reflect the prevalence in each country and closely relate to those prevalence in the guest country.

Introduction

A very high degree of genetic diversity of hepatitis C virus has lead to persistent infections. This agent currently infects approximately 170 million people around the world [1]. Chronic HCV carriers are at a significantly increased risk of liver cirrhosis and progression to hepatocellular carcinoma [2].

A high prevalence of hepatitis C virus has been found in Southeast Asia. HCV epidemiology is well documented in Vietnam and Thailand. The prevalence of HCV infection was 1% to 2% in Vietnam [3-5]. Seroprevalence of HCV in Thailand is approximately 2.2% in the whole population [6]. However, HCV prevalence in Cambodia and Myanmar has not been well studied. Cambodia has a high level of HCV infection. In 1991, a community based study reported that 6.5% of the population had developed antibodies to HCV [7]. Another report indicated that 10.4% of jaundice patients had antibodies to HCV [8]. In Myanmar, the first study conducted showed a high prevalence of HCV in thalassemia and liver disease patients [9]. Prevalence varies from approximately 2% to 11.6%, though most studies were performed based on a small sample size [10-12]. This variation may result from differences in geographical sampling area and target population.

Hepatitis C virus (HCV) is a single stranded RNA virus of positive polarity and the only member of the genus Hepacivirus in the Flaviviridae family. This virus shows an extremely high degree of genetic variation and has

been classified into six genotypes, 1 to 6, which comprise various subtypes, assigned letters in alphabetical order [13]. A newly discovered seventh genotype has been documented [14]. Novel subtypes of HCV genotype 6 have been continuously identified in Southeast Asia [10, 12, 15, 16]. Thus, as yet unknown genotypes and subtypes remain to be elucidated in this part of the world.

Immigrant workers, especially from Myanmar and Cambodia have concentrated in Thailand. These groups may harbor some infectious diseases. New agents may be introduced into the indigenous population and impact public health. Therefore, it is essential to investigate and monitor some infectious agents, especially viral hepatitis C. This project has determined seroprevalence and genotypes of HCV among these groups and demonstrated that HCV prevalence of the migrant workers was closely relate to the native population.

Materials and Methods

All study protocols were approved by the Ethics Committee of the hospital and faculty of Medicine, Chulalongkorn University. The anti-HCV positive blood samples were chosen from the specimens obtained during the routine annual check up compulsory for immigrant workers. All the studied specimens were anonymous with a coding number for analysis and permission was granted by the director of the hospital. In addition, all specimens were used exclusively for academic research and the patients were not remunerated.

Sample Collection

Serum samples were collected from immigrant workers in Thailand. Immigrants from Cambodia and Myanmar aged between 15 and 60 years who attended Bangkok 9 international hospital for their annual health check up were recruited. Sera collected from Cambodia and Myanmar workers amounted to 1431 and 1594 samples, respectively. Serum samples were collected from August 2007 to January 2009. Individuals of general good health were included. Immigrants resident in Thailand for more than five years were excluded as prolonged residence in the guest country might increase the potential for de novo HCV infection and thus, HCV prevalence detected would not be indicative for the country of origin. Also, individuals receiving immunosuppressive drugs, infected with HIV or displaying signs of immunodeficiency were excluded.

This protocol was approved by the Ethics Committee, Ministry of Public Health and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok. The specimens were labeled as anonymous with a coding number. Sera were collected and kept at -70°C until further tested.

Serological tests and RT-PCR Amplification

All samples were subjected to enzyme-linked immunosorbent assay for anti-HCV detection using a commercially available kit (Murex anti-HCV v.4.0, Abbott Laboratory, North Chicago, IL). RNA was extracted from anti-HCV positive serum samples applying the guanidine thiocyanate method [17]. Reverse transcription was performed using random primers and M-MLV reverse transcriptase (Promega, Medison, WI). Viral RNA was detected by cDNA amplification of the 5' noncoding region as previously described [6]. Amplification of the non-coding region was performed with 2.5 µl cDNA and the outer primer pair; OC1 (GCCGACACTCCACCATGAAT, position: 18-37) and OC2 (CATGGTGCACGGTCTACGAG, position: 325-344). The PCR reaction mixture contained 5 pmol of each primer, 200 µM dNTP, 1.5 mM Mg^{2+}, 1.25 units of *Taq* DNA polymerase adjusted to a final volume of 25 µl with distilled water. The amplification conditions consisted of a pre-incubation step at 95°C for 3 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 49°C for 1 min and extension at 72°C for 1.30 min, and concluded by a final extension step at 72°C for 7 min. For nested PCR, 1.0 µl of PCR

product was amplified under the same conditions using primers IC3 (GGAACTACTGTCTTCACGCAG, position: 51-71) and IC4 (TCGCAAGCACCCTATCAGGCA, position: 290-310). Nucleotide positions in this study refer to GenBank accession number M62321. The DNA fragment of the core region was amplified by nested PCR using specific primers (954 and 410 for the first round of amplification, and 953 and 951 for nested PCR) as described elsewhere [6, 18]. Some samples which showed ambiguous genotypes were subjected to further amplification of the NS5B region using specific primer pairs [19].

Sequencing and phylogenetic analysis

After gel electrophoresis, the PCR product of the core region was purified (HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, RBC Bioscience, Taiwan) and subjected to sequencing. The sequences were edited manually using Chromas LITE (v.2.01), BioEdit (v.5.0.9) (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA) and SeqMan (DNASTAR, Medison, WI). All sequence results and reference strains of the core coding region were aligned using CLUSTALW version 1.83. Neighbor-joining trees were generated using the Gojobori-Ishi-Nei-six parameter method. Confidence values were calculated based on bootstrap resampling tests multiplied by 1000 (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp). The

reference sequences were retrieved from GenBank, DDBJ and EMBL DNA database.

Nucleotide sequence accession numbers

The nucleotide sequences of HCV from Cambodia and Myanmar have been submitted to the Genbank database under accession numbers GU186925-GU186964

Results

Seroprevalence of HCV among immigrant workers

In total, 1431 and 1594 serum samples were collected from Cambodia and Myanmar immigrant workers in Thailand, respectively. Male gender predominated among immigrants from Cambodia, in contrast to those from Myanmar (table 1). All subjects were between 15 and 57 years old, with a mean age of 27.13 - 27.77 years (table 1).The majority of the subjects in the present study were 24 to 26 years old. Samples retrieved from Cambodian workers showed 33 (2.3%) positive for HCV antibody by ELISA, as well as 25(75.8%) samples positive for viral RNA upon RT-PCR of the 5'UTR. Participants aged between 21-35 years showed a high rate of HCV infection (table 2). Samples obtained from Myanmar workers, the most numerous immigrants to Thailand, showed 27 (1.69%) positive for HCV antibody. The 21-35-year age group showed high infection rate, whereas, none of the 36-40-year age group displayed anti-HCV positive (table 2). Fifteen samples proved positive for viral RNA. All RNA positive samples were subjected to further analysis of the core region and subsequently to direct sequencing.

Phylogenetic analysis of HCV genotypes

HCV genotype of all sequences was determined by phylogenetic analysis based on the core region. HCV-6 was predominant in Cambodian workers

(56%), followed by 1b (24%), 3a (16%) and 3b (4%). This group showed at least 4 clusters of HCV-6, 6e, 6f, 6p and 6r (table 2). One sequence, CBD3571, did not cluster with any of the reference sequences but was grouped close to the clade of 6e and 6u (fig. 1). Subtype 6e from Vietnam and China was grouped with the Cambodian cluster (fig.1). It seemed that subtype 6e was transmitted from Cambodia. Based on the cohort study and previous report, subtypes 6p and 6r were found mainly in Cambodia (fig. 1) [14].

To analyze the ambiguous isolates, the highly divergent strains, CBD3571 was further subjected to amplification and sequencing of the NS5B region using specific primer sets [19]. Phylogenetic analysis of the neighbor-joining tree generated by the 6-parameter model showed that the CBD3751 strain clustered most closely with subtype 6u (61% of 1000 bootstrap resampling tests, data not shown). The respective strain occupied a distinct branch of both core and NS5B phylogenetic trees.

Phylogenetic analysis showed that samples from Myanmar were mainly genotype 3b (33.2%), the most prevalent genotype in this study. The remaining strains were 3a (26.7%), 6 (26.7%), 1a (6.7%) and 1b (6.7%) (table 2). Subtypes 6f and 6m were identified in this group. Subtype 6f was grouped with Cambodian and Thai strains (fig. 1). Subtype 6m is generally detected in Myanmar and Thailand. There was no specific cluster of subtype 1b, 3a, 3b and 6m isolates in this study. Subtype 6f from Cambodia and Myanmar has likely migrated from Thailand (fig. 1)

Discussion

Information on hepatitis C virus infection in some South East Asian countries is quite limited, especially Cambodia and Myanmar. This study was carried out to determine the epidemiology of hepatitis C virus among foreign immigrant workers from Cambodia and Myanmar. Anti-HCV seroprevalence of Cambodian workers was 2.3% which was quite similar to the 2.2% determined for Thailand [6]. Myanmar immigrants showed low prevalence of anti-HCV at 1.69%. The subjects from the two countries recruited into the study were mainly young people with a mean age of 26-27 years, which may account for the low prevalence of anti-HCV in this survey, while older age groups tend to show a higher prevalence of HCV infection [6].

A high level of HCV infection (6.5%) has been detected mainly in adult males from Cambodia. Intravenous injection of various drugs, a popular habit in the Takeo province, may constitute the major source of infection [7]. Another report from rural Cambodia has shown that even in young age groups, HCV prevalence was very high (10.4%) [8]. In 2002, a community-based survey suggested that intravenous drug abuse was common and administered at excess rate among the general population. They knew about HIV transmission associated with dirty needles but only half of the population were concerned that hepatitis virus could be transmitted by the same route [20]. In contrast to previous studies, the present study demonstrated a lower level of HCV infection

(2.3%) mainly representative for healthy male Cambodians. Place of residence in their home country could not be identified. In the meantime, the Cambodian government has made an effort to discourage intravenous drug injection and improve public health [20]. Hence, the decrease in HCV infection rate observed with the samples tested could imply that the health care infrastructure of Cambodia has improved.

Viral RNA was detected in 75.8% and 55.6% of the anti-HCV sero-positive samples from Cambodia and Myanmar, respectively. In agreement with various reports, the percentage of anti-HCV positive samples was ranging from 50-90% [17, 21]. Some individuals who have naturally cleared the virus may remain sero-positive without exhibiting viremia. However, owing to low viral load, HCV RNA could not be detected in some infected individuals. This study has provided information on various HCV genotypes detected in immigrants from Cambodia and Myanmar. The primer sets in this study can be used to detect various genotypes of the virus, especially the divergent HCV genotype 6 [18, 19, 22]. HCV genotypes and subtypes can potentially be determined based on the nucleotide sequence of the core region [23].

Various HCV genotypes were detected among Cambodian immigrants in this survey. Some genotypes are common in Thailand (1b, 3a, 3b, 6e and 6f), while some subtypes of HCV-6 are not found in the native population (6p, 6r and 6u, fig. 1) [19]. Subtype 6e was likely to transmit from Cambodia to other

countries such as China and Vietnam (fig.1). Subtype 6r seemed to originate from Cambodia in correlation with a previous study (fig. 2) [14].

There is a large influx of immigrants from Myanmar and Cambodia to Thailand. In 2007, the annual report from the Office of foreign worker administration Thailand showed that 498091 and 26096 people had immigrated from Myanmar and Cambodia, respectively (http://115.31.137.7/workpermit/main/Stat/syear.asp, reported in Thai). As a large sample size was available, healthy workers were included in this study and they may have migrated from different parts of the country. Based on the results of this study, the trend of HCV infection could be extrapolated to the general population. Even though the HCV infection rate was lower than expected [10, 11], the predominance of genotype 3 (3a; 26.7% and 3b; 33.5%) of Myanmar immigrant workers in this survey was similar to previous studies [11, 12]. HCV-3 is also the predominant genotype in Thailand followed by genotype 1b and genotype 6 (fig. 2) [6]. However, we have no data based on the previous study of HCV genotypes in Cambodia for comparison. Subtype 3a from Cambodia and Myanmar had mingled with subtypes from other countries (fig.1). Genotype 3a is globally prevalent in injection drug users [24, 25], as well as common in some Asian countries [6, 12, 18, 26]. Therefore, unsafe needle sharing or drug abuse may introduce this genotype to the general population. Furthermore, these two countries are connected by trade, travel and migration from which may all contribute to similar patterns of virus transmission and genotype distribution.

HCV-6 is known as the genotype exclusive to South East Asia and as the most diverse genotype [19, 22, 27]. HCV-6 was predominant and subtype 6a was most prevalent in North Vietnam [28]. A previous report based on GenBank, EMBL and BBDJ database study suggested that subtype 6f was most prevalent and seemed to originate in Thailand [19]. The present study showed that this subtype is also circulating in Myanmar and Cambodia which may be due to the close connection and dynamic movement of migrating people among these countries. However, some subtypes are restricted to a specific geographical area. Thus, subtype 6r is specific for Cambodia, subtype 6p is found in Cambodia and Vietnam. Subtype 6m appeared to have migrated from Myanmar and mingled with the subtype prevalent in Thailand (fig. 1). It could be speculated that novel unassigned genotypes or subtypes may have accumulated in this area.

As immigrants can easily find employment in Thailand, their numbers are steadily increasing. Their respective original residence in their home countries could not be ascertained in this study. Despite the low incidence of HCV infection in these foreign workers, infectious diseases such as HIV, HAV and HBV may affect these groups. Hence, additional studies ought to be performed.

The prevalence of HCV infection in Cambodia and Myanmar immigrant workers determined in this study is similar to Thailand. Participants were mainly of a young age group which may provide an explanation for lower infection levels than previously reported. Various and as yet unclassified

subtypes of HCV-6 may have accumulated in Southeast Asia. Further research should be focusing on HCV genotype distribution, novel subtypes of HCV-6, the evolution of the virus and incidence of HCV-related HCC in Southeast Asian countries.

Acknowledgements

This research was supported by the National Research Fund, the Center of Excellence in Clinical Virology Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and, Thai Red Cross Society. Commission on Higher Education, Ministry of Education, Chulalongkorn University, CU Centenary Academic Development Project and the RGJ program of the Thailand Research Fund. Also, we would like to express our gratitude to the Bangpakok9 International Hospital for collecting the specimens. We also would like to thank Ms Petra Hirsch for reviewing the manuscript.

References

1 Lavanchy D: The global burden of hepatitis C. Liver Int 2009;29 Suppl 1:74-81.

2 Hoofnagle JH: Course and outcome of hepatitis C. Hepatology 2002;36:S21-29.

3 Tran HT, Ushijima H, Quang VX, Phuong N, Li TC, Hayashi S, Xuan Lien T, Sata T, Abe K: Prevalence of hepatitis virus types B through E and genotypic distribution of HBV and HCV in Ho Chi Minh city, Vietnam. Hepatol Res 2003;26:275-280.

4 Nguyen VT, McLaws ML, Dore GJ: Prevalence and risk factors for hepatitis C infection in rural North Vietnam. Hepatol Int 2007;1:387-393.

5 Kakumu S, Sato K, Morishita T, Trinh KA, Nguyen HB, Banh VD, Do HC, Nguyen HP, Nguyen VT, Le TT, Yamamoto N, Nakao H, Isomura S: Prevalence of hepatitis B, hepatitis C, and GB virus C/hepatitis G virus infections in liver disease patients and inhabitants in Ho Chi Minh, Vietnam. J Med Virol 1998;54:243-248.

6 Sunanchaikarn S, Theamboonlers A, Chongsrisawat V, Yoocharoen P, Tharmaphornpilas P, Warinsathien P, Sinlaparatsamee S, Paupunwatana S, Chaiear K, Khwanjaipanich S, Poovorawan Y: Seroepidemiology and

genotypes of hepatitis C virus in Thailand. Asian Pac J Allergy Immunol 2007;25:175-182.

7 Thuring EG, Joller-Jemelka HI, Sareth H, Sokhan U, Reth C, Grob P: Prevalence of markers of hepatitis viruses A, B, C and of HIV in healthy individuals and patients of a Cambodian province. The Southeast Asian J Trop Med Public Health 1993;24:239-249.

8 Sarmati L, Andreoni M, Suligoi B, Bugarini R, Uccella I, Pozio E, Rezza G: Infection with human herpesvirus-8 and its correlation with hepatitis B virus and hepatitis C virus markers among rural populations in Cambodia. Am J Trop Med Hyg 2003;68:501-502.

9 Okada S, Taketa K, Ishikawa T, Koji T, Swe T, Win N, Win KM, Mra R, Myint TT: High prevalence of hepatitis C in patients with thalassemia and patients with liver diseases in Myanmar (Burma). Acta Med Okayama 2000;54:137-138.

10 Lwin AA, Shinji T, Khin M, Win N, Obika M, Okada S, Koide N: Hepatitis C virus genotype distribution in Myanmar: Predominance of genotype 6 and existence of new genotype 6 subtype. Hepatol Res 2007;37:337-345.

11 Nakai K, Win KM, Oo SS, Arakawa Y, Abe K: Molecular characteristic-based epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and GB virus C/hepatitis G virus in Myanmar. J Clin Microbiol 2001;39:1536-1539.

12 Shinji T, Kyaw YY, Gokan K, Tanaka Y, Ochi K, Kusano N, Mizushima T, Fujioka S, Shiraha H, Lwin AA, Shiratori Y, Mizokami M, Khin M, Miyahara M, Okada S, Koide N: Analysis of HCV genotypes from blood donors shows three new HCV type 6 subgroups exist in Myanmar. Acta Med Okayama 2004;58:135-142.

13 Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin IT, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A: Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. Hepatology 2005;42:962-973.

14 Murphy DG, Willems B, Deschenes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S: Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. J Clin Microbiol 2007;45:1102-1112.

15 Nopporpanth S, Lien TX, Poovorawan Y, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL: Identification of a naturally occurring recombinant genotype 2/6 hepatitis C virus. J Virol 2006;80:7569-7577.

16 Nopporpanth S, Poovorawan Y, Lien TX, Smits SL, Osterhaus AD, Haagmans BL: Complete genome analysis of hepatitis C virus subtypes 6t and 6u. J Gen Virol 2008;89:1276-1281.

17 Theamboonlers A, Chinchai T, Bedi K, Jantarasamee P, Sripontong M, Poovorawan Y: Molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) core region in HCV-infected Thai blood donors. Acta Virol 2002;46:169-173.

18 Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds 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 (Pt 10):2493-2507.

19 Akkarathamrongsin S, Praianantathavorn K, Hacharoen N, Theamboonlers A, Tangkijvanich P, Tanaka Y, Mizokami M, Poovorawan Y: Geographic distribution of hepatitis C virus genotype 6 subtypes in Thailand. J Med Virol 2010;82:257-262.

20 Vong S, Perz JF, Sok S, Som S, Goldstein S, Hutin Y, Tulloch J: Rapid assessment of injection practices in Cambodia, 2002. BMC Public Health 2005;5:56-62.

21 Liu CJ, Chen PJ, Shau WY, Kao JH, Lai MY, Chen DS: Clinical aspects and outcomes of volunteer blood donors testing positive for hepatitis C virus infection in Taiwan: A prospective study. Liver Int 2003;23:148-155.

22 Mellor J, Walsh EA, Prescott LE, Jarvis LM, Davidson F, Yap PL, Simmonds P: Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. Clin Microbiol 1996;34:417-423.

23 Shinji T, Lwin AA, Gokan K, Obika M, Ryuko H, Khin M, Okada S, Koide N: Three type 6 hepatitis C virus subgroups among blood donors in the Yangon area of Myanmar are identified as subtypes 6m and 6n, and a novel subtype by sequence analysis of the core region. Acta Med Okayama 2006;60:345-349.

24 Watson JP, Brind AM, Chapman CE, Bates CL, Gould FK, Johnson SJ, Burt AD, Ferguson J, Simmonds P, Bassendine MF: Hepatitis C virus: Epidemiology and genotypes in the North East of England. Gut 1996;38:269-276.

25 Morice Y, Cantaloube JF, Beaucourt S, Barbotte L, De Gendt S, Goncales FL, Butterworth L, Cooksley G, Gish RG, Beaugrand M, Fay F, Fay O, Gonzalez JE, Martins RM, Dhumeaux D, Vanderborght B, Stuyver L, Sablon E, de Lamballerie X, Pawlotsky JM: Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users. J Med Virol 2006;78:1296-1303.

26 Khan A, Tanaka Y, Azam Z, Abbas Z, Kurbanov F, Saleem U, Hamid S, Jafri W, Mizokami M: Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan. J Med Virol 2009;81:1189-1197.

27 Simmonds P: Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. J Gen Virol 2004;85:3173-3188.

28 Pham DA: High prevalence of hepatitis C virus genotype 6 in Vietnam. Asian Pac J Allergy Immunol 2009;27:8.

Legend

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed on partial core coding sequences. Sequences determined in this study are label as bold letters and black circle. Hepatitis C virus genotypes are indicated on the branch of the individual cluster. Reference sequences were obtained from GenBank database. Bootstrap values which more than 80 percent were indicated at each node.

Fig.2. Comparison of hepatitis C virus genotypes in this study with those reported from previous studies in Thailand [6] and Myanmar [12]

Table 1. Prevalence of hepatitis C virus infection with age and sex among immigrant workers in Thailand (ND: no data).

Table 2. Distribution of anti-HCV positive samples and genotypes among different age groups of Cambodian and Myanmar immigrant workers.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed on partial core coding sequences. Sequences determined in this study are label as bold letters and black circle. Hepatitis C virus genotypes are indicated on the branch of the individual cluster. Reference sequences were obtained from GenBank database. Bootstrap values which more than 80 percent were indicated at each node.

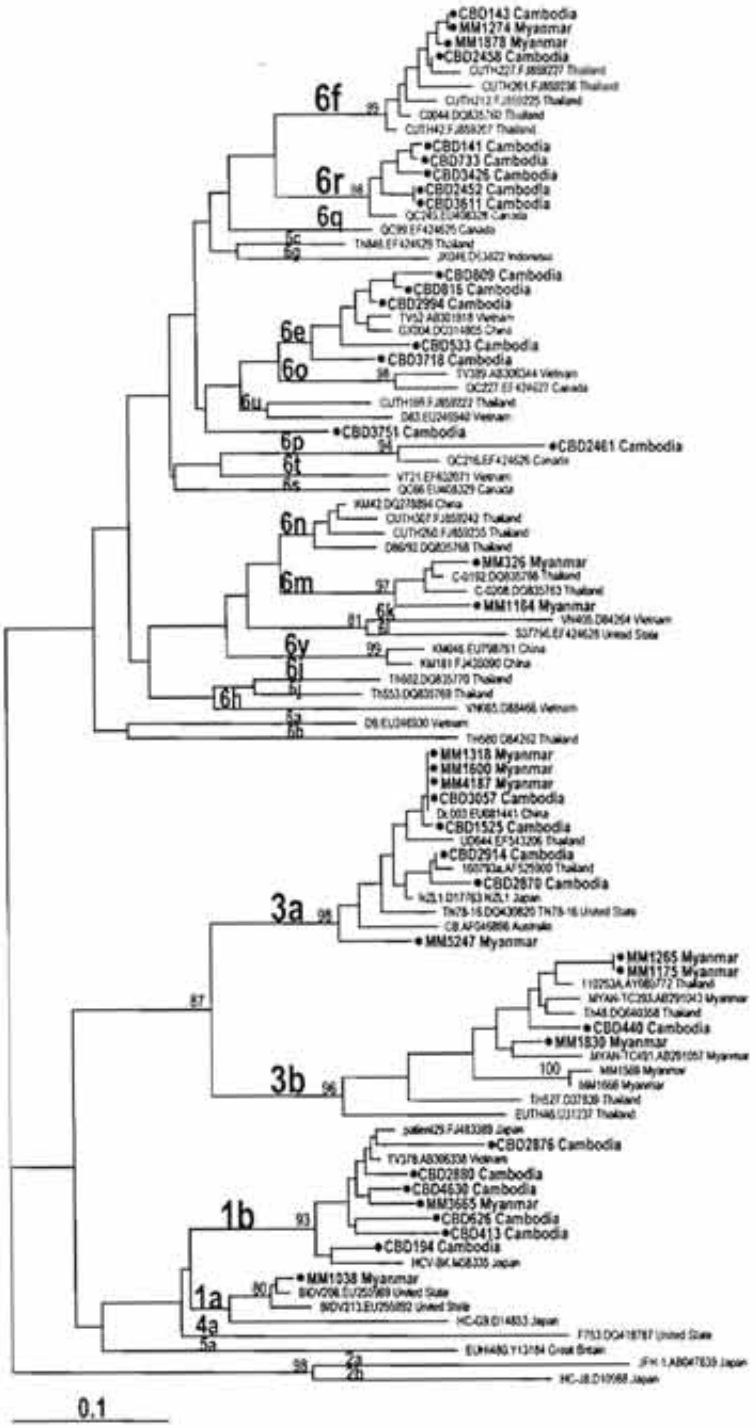


Fig.2. Comparison of hepatitis C virus genotypes in this study with those reported from previous studies in Thailand [6] and Myanmar [12]

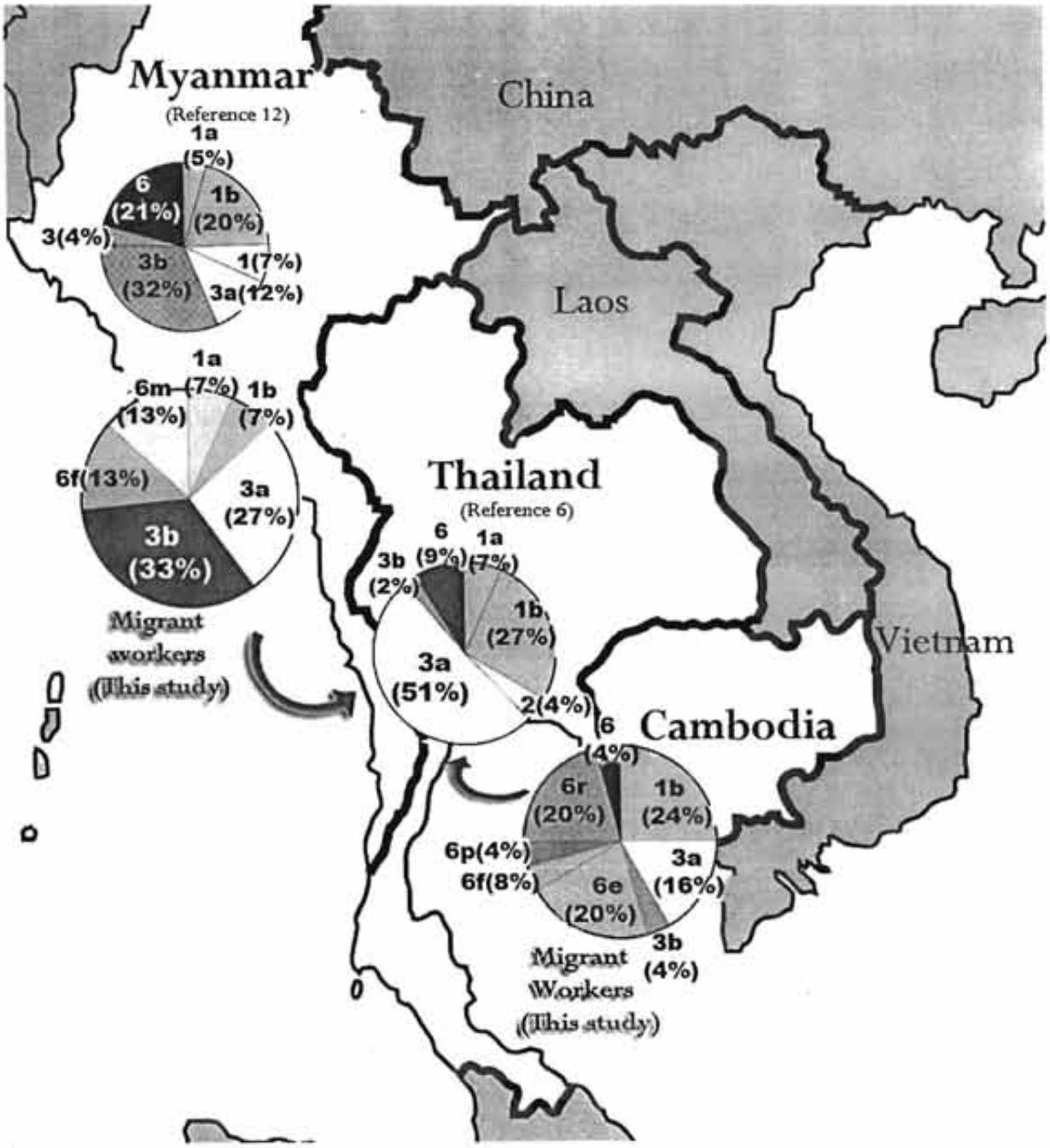


Table 1. Prevalence of hepatitis C virus infection with age and sex among immigrant workers in Thailand (ND: no data).

	Cambodia	Myanmar
	(n =1431)	(n = 1594)
Sex: Male	959 (67.02%)	631 (39.59%)
Female	469 (32.77%)	865 (54.27%)
ND	3 (0.21%)	98 (6.15%)
Mean age (SD)	27.77 (8.14)	27.13 (6.19)
Anti-HCV positive	33 (2.31%)	27 (1.69%)
RT-PCR positive	25 (75.76%)	15 (55.56%)

Table 2. Distribution of anti-HCV positive samples and genotypes among different age groups of Cambodian and Myanmar immigrant workers.

Age group	Anti-HCV			Genotype										
(Years)	Male	Female	Total(%[#])	1a	1b	3a	3b	6e	6f	6m	6p	6r	6	Total
Cambodia (n=1431)														
21-25	5	0	5(15.2)	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	3
26-30	3	3	6(18.2)	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	4
31-35	5	2	7(21.2)	0	2	1	1	0	1	0	0	0	0	5
36-40	2	2	4(12.1)	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	3
41-45	1	3	4(12.1)	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	4
46-50	3	1	4(12.1)	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	3
>50	3	0	3(9.1)	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	4
Total(%)	22(2.3[*])	11(2.3[*])	33(2.3[*])	0 (0[$])	6(24[$])	4(16[$])	1(4[$])	5(20[$])	2(8[$])	0(0[$])	1(4[$])	5(20[$])	1(4[$])	25(75.8[#])
Myanmar (n=1594)														
15-20	0	1	1(3.7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21-25	4	4	8(29.6)	0	0	1	4	0	0	1	0	0	0	6
26-30	2	3	5(18.5)	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	3
31-35	2	5	7(25.9)	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
36-40	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41-45	1	3	4(14.8)	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3
46-50	0	1	1(3.7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
>50	0	1	1(3.7)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total(%)	9(33.3[*])	18(66.7[*])	27(1.7[*])	1(6.7[$])	1(6.7[$])	4(26.7[$])	5(33.3[$])	0(0[$])	2(13.3[$])	2(13.3[$])	0(0[$])	0(0[$])	0(0[$])	15(55.6%[#])

≠ Percent calculated with respect to total anti-HCV positive samples

• Percent calculated with respect to all samples of each country

± Percent calculated with respect to total RNA positive samples

Molecular Epidemiological Study of Hepatitis B Virus among Migrant Workers from Cambodia, Laos and Myanmar to Thailand

Pattaratida Sa-nguanmoo[1, 2], Pisit Tangkijvanich[3], Nutchanart Thawornsuk[1], Preeyaporn Vichaiwattana[1], Kesmanee Prianantathavorn[1], Apiradee Theamboonlers[1], Yasuhito Tanaka[4], Yong Poovorawan[1*]

[1]Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[2]Inter-Department of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[3]Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

[3]Department of Virology & Liver unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Kawasumi, Mizuho, Nagoya, Japan

*** Correspondence**

Prof. Yong Poovorawan, MD.,

Center of Excellence in Clinical Virology, Department of Pediatrics,

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330 Thailand

E-mail: Yong.P@chula.ac.th. Telephone: +662-256-4090, Fax:+662-256-4929

Running head: Hepatitis B virus in migrant workers in Thailand

Abstract:	240	**words**
Text:	2,669	**words**
Table:	3	**tables**
Figure:	5	**figures (Fig.1, 2, 3, 4, 5, 5 (Continued))**
Reference:	41	**references**
Page:	30	**pages**

ABSTRACT

Although hepatitis B virus (HBV) infection is endemic in Southeast Asia, molecular epidemiological data on HBV circulating in some countries are currently limited. The aims of this study were to evaluate HBV seroprevalence and its genetic variability present among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar in Thailand.

Sera collected from 1,119 Cambodian, 787 Laotian and 1,103 Myanmarese workers were tested for HBsAg. HBV DNA was amplified and the *preS/S* region was sequenced for genotyping and genetic mutation analysis. HBsAg was detected in 282 (9.4%). The prevalence of HBsAg among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar was 10.8%, 6.9% and 9.7%, respectively. Of 224 subjects positive for HBV DNA, 86% were classified as genotype C (99% were sub-genotype C1) and 11.6% were genotype B (30.8%, 34.6% and 30.8% were sub-genotypes B2, B3 and B4, respectively). Various point mutations in the 'a' determinant region were detected in approximately 18% of these samples, of which Ile126Ser/Asn was the most frequent variant. Sequencing analysis showed that 19.1% of samples had *pre-S* mutations, with *pre-S2* deletion as the most common mutant (7.7%) followed by *pre-S2* start codon mutation (3.8%) and both *pre-S2* deletion and start codon mutation (3.3%). High prevalence of HBV infection (approximately 7-11%) was found among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar, which may reflect the current seroprevalence in their respective countries. Our data also demonstrated that HBV sub-genotype C1 was the predominant strain and various naturally occurring mutations of HBV were not uncommon among these populations.

Key words: Hepatitis B virus, seroprevalence, genotype, mutation, Southeast Asia

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major causes of chronic liver diseases ranging from chronic hepatitis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) [Ganem and Prince, 2004]. HBV, a member of the family *Hepadnaviridae*, is a relaxed-circular double stranded DNA virus of approximately 3,200 base pairs in length, with four overlapping open reading frames encoding the polymerase (P), precore (PC)/core (C), envelope (pre-S1/pre-S2/S), and X proteins [Ganem and Prince, 2004]. HBV shows remarkable genetic variability and is currently classified into at least eight genotypes, designated A to H and four major serotypes, including *ayw*, *ayr*, *adw* and *adr* [Kramvis et al., 2005; Norder et al., 1992]. Each genotype can be further divided into sub-genotypes based on 4-8 % divergence of the viral genome. HBV genotype and sub-genotype distribution appears to show varying geographic patterns [Allain, 2006; McMahon, 2009]. For instance, genotypes A and D are predominant in Western countries and India, whereas genotypes B and C are common in Southeast Asia, China and Japan. Genotype E is restricted to Africa, while genotypes F and H are found in indigenous populations in Alaska and Central and South America. In Asia, sub-genotype B1 is predominant in Japan, while sub-genotypes B2–5 prevail in other countries. Sub-genotype C1 is prevalent mainly in Southeast Asia, whereas sub-genotype C2 is commonly found throughout the Far East as for example, in Japan, China and Korea [Allain, 2006; McMahon, 2009].

Chronic HBV infection and its related hepatic complications are particularly important in Southeast Asian countries where the prevalence of the infection is relatively high, varying from 3-6% in Singapore, Malaysia and Brunei to approximately 6-12% in Indonesia, Philippines, Myanmar, Laos, Cambodia and

Vietnam [James, 2001; Merican et al., 2000; Sebastian et al., 1990; Alexander et al., 1990; Budihusodo et al., 1991; Amirudin et al., 1991; Utama et al., 2009; Lingao et al., 1989; Lansang, 1996; Nakai et al., 2001; Caruana et al., 2005; Jutavijittum et al., 2007; Thüring et al., 1993; Duong et al., 2009; Thuy et al., 2005]. In Thailand, the prevalence of HBV infection has declined upon implementation of the national HBV vaccination program, with present prevalence of approximately 4% [Luksamijarulkul et al., 2002; Suwannakarn et al., 2008; Theamboonlers et al., 1999]. The predominant HBV genotypes in this region are genoytypes C and B (Figure 1). Despite the high prevalence of HBV infection in Southeast Asia, data on its molecular epidemiology in this region are scarce, particularly in some countries such as Cambodia, Laos and Myanmar. At present, a large number of migrant workers, originating from these countries, are employed in various sectors of Thai industries located in Bangkok and neighboring provinces. In 2006, registered and non-registered foreign workers in Thailand were approximately 1,800,000 migrants [Martin, 2007]. In 2007, the distribution of working-age migrant workers of Cambodia, Laos and Myanmar was 111,391 (13.4%), 106,706 (12.9%) and 611,476 (73.7%), respectively [Pholphirul and Rukumnuyakit, 2007]. Growing influx of migrant populations may influence the prevalence of HBV infection and the resulting disease burden in Thailand. The present study has been aimed at evaluating the HBV seroprevalence and its genetic variability, including genotypes, antigenic subtypes and mutations present among these migrant workers. In addition, the phylogenetic relatedness of HBV strains isolated from these subjects was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Study populations

The serum samples of migrant workers collected for a routine health check-up were stored at -70°C until further analysis. In this study, 3,009 serum samples collected from 1,119 Cambodians (353 females; 763 males and 3 unidentified), 787 Laotians (413 females, 364 males and 10 unidentified) and 1,103 Myanmarese (582 females, 423 males and 98 unidentified) were tested for Hepatitis B s antigen (HBsAg) by using commercially available automated ELISA assays (Murex, Biotech Limited, Dartford, Kent, England). Samples positive for HBsAg were subjected to further analysis aimed at molecular characterization of HBV. The project had been approved by the ethical committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

HBV DNA extraction, amplification and sequencing

HBV DNA was extracted from 100 microliters each of HBsAg-positive sera. The respective serum samples were incubated in lysis buffer (10 mM Tris-HCl ph 8.0, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.5% SDS and 20 mg/ml proteinase K) at 50°C for 60 minutes followed by phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction and ethanol precipitation. The *Pre-S1/Pre-S2/S* region was amplified using primers Pre-S1F+ (5'-GGG TCA CCA TAT TCT TGG GAA C-3': position 2814-2835) and R5 (5'-AGC CCA AAA GAC CCA CAA TTC-3': position 1015-995) The total 25- µl reaction volume consisted of 10 µl of 2.5X 5 PRIME MasterMix solution (5 PRIME GmbH, Hamburg, Germany), 0.5 µl of 25 µM forward and reverse primers, 2 µl of DNA template and sterile distilled water. The thermocycler was programmed for HBV DNA

amplification as follows: initial denaturation at 94°C for 3 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 55°C for 30s, extension at 72°C for 1.30 minutes and a final extension step at 72°C for 7 minutes. The HBV DNA amplicons were isolated by 2% agarose gel electrophoresis at 100 volt for 60 minutes and stained with ethidium bromide. PCR product size was estimated in comparison with a 100-bp DNA ladder under UV light. The expected products were excised from the gel and purified using the Perfectprep® Gel Cleanup kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). The purified samples were sent to a commercial DNA sequencing company (First BASE Laboratories Sdn Bhd, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) for sequencing. Nucleotide sequences were edited by Chromas Lite program version 2.01 (Technelysium Pty Ltd., Queensland, Australia) and assembled by SeqMan (DNASTAR Lasergene software, Madison, WT).

Genotyping, subtyping and phylogenetic analysis

Each sample's sequences were aligned with each available human genotype stored at the GenBank database (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) by Clustal X program version 2.0.10 (European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK). Based on these alignments phylogenetic trees were constructed for genotyping using Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (The Biodesign Institute, Tempe, AZ) for genotyping. The neighbor-joining method by Tamura-3 parameter was used for constructing phylogenetic trees. Some sequences were genotyped by the Viral Genotyping Tool (National Center for Biotechnology Information, Besthesda, MD). Genetic recombinants were further determined by SimPlot program and bootscanning analysis (Simplot version 3.5.1, Baltimore, MD). HBV nucleotides were translated into amino

acid sequences using the translation tool in ExPASy Proteomics Server (available on: http://www.expasy.ch/tools/dna.html). Subsequently, subtypes were identified based on the amino acids at positions 122 and 160 of the S protein.

HBV mutation analysis

HBV sequences were evaluated for mutations and deletions in the *pre-S1/pre-S2* regions. The amino acids at positions 120 and 160 of the S protein were indicative for 'a' determinant mutations.

Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard deviation (SD), and percentages as appropriate. Comparisons among groups were analyzed by the Pearson $\chi 2$ or Fisher's exact test for categorical variables and by One-Way ANOVA Bonferroni adjustment for quantitative variables. *P*-values below 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using the SPSS software for Windows 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

HBsAg detection

HBsAg was detected in 282 of 3009 (9.4%) samples. This group comprised 121 Cambodians (10.8%), 54 Laotians (6.9%) and 107 Myanmarese (9.7%). Among these subjects, HBV DNA was detected in 102 Cambodians (84.3%), 42 Laotians (77.8%) and 80 Myanmarese (74.8%) (Table 1).

Distribution of HBV genotypes and serotypes

All sequences obtained from this study were submitted to the GenBank database (accession nos. GQ855313-GQ85570 and GQ856585). Phylogenetic analysis was performed based on the *pre-S1/pre-S2/S* genes (Figure 2). Of those positive for HBV DNA, 194 of 224 (86.6%) cases were determined as genotype C (99% and 1% were sub-genotypes C1 and C5, respectively), 25 (11.2%) cases were identified as genotype B (32%, 36% and 32% were sub-genotypes B2, B3 and B4, respectively), 1 (0.44%) case as genotype A (sub-genotype A2) and 1 (0.44%) case as genotype D. As for antigenic subtype distribution, *adr* was the most common (68.3%), followed by *ayw* (8.9%), *adw* (6.7%) and *ayr* (0.9%). The prevalence of HBV genotype and subtype with respect to geographic location is shown in Table 1. There were significant differences in genotype and serotype distribution among groups. Briefly, Cambodians and Laotians had significantly higher prevalence of genotype B but had significantly lower prevalence of genotype C than those of Myanmarese (p <0.05). In addition, Laotians had significantly higher prevalence of serotype *ayw* but had significantly lower prevalence of serotype *adr* than those of Cambodians and Myanmarese (p <0.05).

Although we did not sequence the entire genome in this study, three isolates with suspected inter-genotype recombinants were identified (isolate 31 with genotype B2/C1, accession no. GQ855407; isolate 612 with genotype B3/C1, accession no. GQ855454 and GQ855560; and isolate 3794 with genotype G/C1, accession no. GQ856585). Isolate 31 proved to be a recombinant of sub-genotypes B2 and C1, with its recombination breakpoint estimated at nucleotide 573 (Figure 3A). Isolate 3794 represented a recombinant of genotypes G/C1 with its recombination breakpoints between nucleotides 2006 and 157 (Figure 3B). Isolate 612 was classified as sub-

genotype B3 in the *pre-S/S* gene but showed sub-genotype C1 between nucleotides 1554 and 1974 (figure not shown).

Prevalence and characterization of the 'a' determinant mutations

In this study, various point mutations in the 'a' determinant region were detected in 35 out of 194 (18.0%) HBV isolates. Mutations were found in 19/94 (20.2%) of Cambodian samples, 6/38 (15.8%) of Laotian samples and 10/62 (16.1%) of Myanmarese samples. The most frequent mutation in Cambodian, Laotian and Myanmarese isolates was Ile126Ser/Asn. In addition, multiple point mutations in the 'a' determinant region were detected in 6 isolates (Table II). Amino acid sequence alignment of the partial S region of these 35 isolates is shown in Figure 4.

Prevalence and characterization of pre-S/S mutations

Upon direct sequencing, *pre-S* mutations were detected in 40 of 209 cases (19.1%). In this study, the prevalence of *pre-S* mutations/deletions among Cambodian, Laotian and Myanmarese migrant workers was 18.4%, 15.0% and 22.5%, respectively. As for the prevalence of site-specific *pre-S/S* mutations, *pre-S2* deletion was the most common (7.7%), followed by *pre-S2* start codon mutation (3.8%) and both *pre-S2* deletion and start codon mutation (3.3%) (Table III). Amino acid sequence alignment of the entire pre-S1/pre-S2 region of the 40 samples is shown in Figure 5.

DISCUSSION

Although chronic HBV infection prevails in Southeast Asia, the data on its molecular epidemiology in some countries in this part of the world are still limited. To our knowledge, this has been the first comparative study on molecular characterization of HBV circulating in Cambodia, Laos and Myanmar. Our study, which included identification of both viral genotypes and subtypes in a significant number of HBV carriers from these countries, demonstrated that the predominant HBV strains belong to categories C1/*adr*, which accounted for more than 85% of cases. These data were in agreement with previous reports that HBV genotype C was prevalent in Myanmar [Nakai et al., 2001], and sub-genotypes C1 and B4 were dominant strains in Cambodia [Huy et al., 2008]. These findings are not surprising but reflect the typical genotypes and subtypes circulating in Southeast Asia. The seroprevalence of HBsAg in these migrant workers was approximately 7-11%, similar to previous reports on seroprevalence in these countries but higher than a recent nationwide survey in Thailand (4%) [Luksamijarulkul et al., 2002; Theamboonlers et al., 1999]. This difference in seroprevalence among populations reflects a steady and remarkable decrease in chronic HBV carrier rate among Thai populations after the 1992 implementation of universal HBV vaccination.

HBV strains resulting from genomic recombination between different genotypes have been increasingly recognized in various parts of the world. In Asia, recombination of genotypes B/C has been reported in China, Hong Kong, Indonesia, Taiwan, Thailand and Vietnam [Sugauchi et al., 2002], whereas recombination of genotypes C/D has been detected in Tibet and China [Cui et al., 2002; Wang et al., 2005]. In addition, recombinants between genotypes A/C and genotypes A/D have

been documented in Vietnam [Hannoun et al., 2000] and India [Chauhan et al., 2008], respectively. Recently, a novel genotype I, with a complex recombination involving genotypes C, A and G has been reported in Vietnam and Laos [Huy et al., 2008; Olinger et al., 2008]. Although the entire genome sequence was not determined in this study, we identified three HBV isolates with suspected inter-genotype recombinants. It is of note that a hybrid of genotypes B3/C1 in this study displayed recombination breakpoints in the vicinity of the *preC/C* region, which is the most common site of inter-genotype recombination as previously described [Sugauchi et al., 2002]. Another recombinant of genotypes G/C with its recombination breakpoints between nucleotides 2006 and 157 was also demonstrated in this study. Interestingly, the site of breakpoints in this recombinant was different from that found in a hybrid of genotypes G/C previously identified by our group in a Thai patient with HCC [Suwannakarn et al., 2008].

Amino acid substitutions within the 'a' determinant domain could lead to conformational changes which may interfere with active and passive immunization against HBV infection [Carman et al., 1990]. The most common vaccine escape mutant results from the mutation at position 145 (Gly145Arg), which is located in the second loop of the 'a' determinant [Carman et al., 1990]. In this study, however, the most common amino-acid substitution found in Cambodian, Laotian and Myanmarese samples was located at position 126. In addition, the prevalence of 'a' determinant mutants among chronic carriers from these countries was approximately 15-20%, which was slightly higher than the prevalence among random chronic carriers recently reported (6-12%) [Echevarria and Avellon, 2006]. It has been proposed that vaccination might have increased a selection pressure on the emergence of surface mutants in relation to wild-type HBV, as has been observed in several regions of the

world [Carman et al., 1990; Coleman, 2006; Cooreman et al., 2001]. For example, a previous study in Taiwan demonstrated an increase in the prevalence of 'a' determinant mutants in children from 7.8% before to 23.1% 15 years after the introduction of universal vaccination against HBV [Hsu et al.,2004]. High prevalence of the variants among migrant workers in this study, however, might not be associated with previous vaccination because the coverage rates of HBV vaccine administration in their countries are generally low [Caruana et al., 2005; Soeung et al., 2009]. Thus, it is speculated that these mutants within the 'a' determinant region might have emerged in response to natural immunoselective pressure of the host. These infectious mutants have been circulating among individuals chronically infected with the virus.

Naturally occurring HBV *pre-S* mutations/deletions have been frequently reported in chronic HBV carriers. It has been shown that *pre-S* deletion mutants tend to accumulate during a later stage of persistent HBV infection, including cirrhosis and HCC [Chen et al., 2006]. In fact, the prevalence of these mutations/deletions is rather variable and considerably different, ranging from 0% to 36%, between diverse geographic areas [Huy et al., 2003]. In this study, the prevalence of *pre-S* mutations/deletions among Cambodian, Laotian and Myanmarese migrant workers amounted to 18.4%, 15.0% and 22.5%, respectively, which was higher than that determined by our previous study conducted on Thai populations (9.5%) [Suwannakarn et al., 2008]. As for the site of mutations, this study showed that *pre-S2* deletion was the most common mutation type, followed by *pre-S2* start codon mutation and the combined *pre-S2* deletion and start codon mutation. These results were in agreement with those recently reported from Japan, Korea and Thailand, according to which deletion in *pre-S2* regions and *pre-S2* start codon mutations were

among the most prevailing [Suwannakarn et al., 2008; Huy et al., 2003; Choi et al., 2007].

In conclusion, high seroprevalence of HBsAg (approximately 7-11%) was found among migrant workers from Cambodia, Laos and Myanmar, which may reflect the present prevalence of HBV infection in their respective countries. We also demonstrated that HBV sub-genotype/subtype C1/*adr* was the predominant strain circulating in these migrant workers. In addition, the 'a' determinant variants were frequently found in these populations, and might not be attributed to vaccine-induced mutation. Finally, *pre-S* mutations, especially *pre-S2* deletions and *pre-S2* start codon mutations were not uncommon among these populations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the National Research Fund, the Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72nd Aniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej, the Commission on Higer Education, the Thailand Research Fund, the King Chulalongkorn Memorial Hospital and the Center of Excellence in Clinical Virology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

REFERENCES

Alexander MJ, Sinnatamby AS, Rohaimah MJ, Harun AH, Ng JS. 1990. Incidence of hepatitis B infection in Brunei Darussalam-- analysis of racial distribution. Ann Acad Med Singapore 19: 344-346.

Allain JP. 2006. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. J Clin Virol 36 Suppl 1:S12-17.

Amirudin R, Akil H, Akahane Y, Suzuki H. 1991. Hepatitis B and C virus infection in Ujung Pandang, Indonesia. Gastroenterol Jpn 26 Suppl 3: 184-188.

Budihusodo U, Sulaiman HA, Akbar HN, Lesmana LA, Waspodo AS, Noer HM, Akahane Y, Suzuki H. 1991. Seroepidemiology of HBV and HCV infection in Jakarta, Indonesia. Gastroenterol Jpn 26 Suppl 3: 196-201.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. Lancet 336:325-329.

Caruana SR, Kelly HA, De Silva SL, Chea L, Nuon S, Saykao P, Bak N, Biggs BA. 2005. Knowledge about hepatitis and previous exposure to hepatitis viruses in immigrants and refugees from the Mekong Region. Aust N Z J Public Health 29: 64-68.

Chauhan R, Kazim SN, Kumar M, Bhattacharjee J, Krishnamoorthy N, Sarin SK. 2008. Identification and characterization of genotype A and D recombinant hepatitis B virus from Indian chronic HBV isolates. World J Gastroenterol 14:6228-6236.

Chen BF, Liu CJ, Jow GM, Chen PJ, Kao JH, Chen DS. 2006. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. Gastroenterology 130:1153-1168.

Choi MS, Kim DY, Lee DH, Lee JH, Koh KC, Paik SW, Rhee JC, Yoo BC. 2007. Clinical significance of pre-S mutations in patients with genotype C hepatitis B virus infection. J Viral Hepat 14:161-168.

Coleman PF. 2006. Detecting hepatitis B surface antigen mutants. Emerg infect Dis 12:198-203.

Cooreman MP, Leroux-Roels G, Paulij WP. 2001.Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. J Biomed Sci 8:237-247.

Cui C, Shi J, Hui L, Xi H, Zhuoma, Quni, Tsedan, Hu G. 2002.The dominant hepatitis B virus genotype identified in Tibet is a C/D hybrid. J Gen Virol 83:2773-2777.

Duong TH, Nguyen PH, Henley K, Peters M. 2009. Risk factors for hepatitis B infection in rural Vietnam. Asian Pac J Cancer Prev 10: 97-102.

Echevarria JM, Avellón A. 2006. Hepatitis B virus genetic diversity. J Med Virol 78 Suppl 1:S36-42.

Ganem D, Prince AM. 2004. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. N Engl J Med 350:1118-1129.

Hannoun C, Norder H, Lindh M. 2000. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. J Gen Virol 81:2267-2272.

Hsu HY, Chang MH, Ni YH, Chen HL. 2004. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. Gut 53:1499-1503.

Huy TT, Sall AA, Reynes JM, Abe K. 2008. Complete genomic sequence and phylogenetic relatedness of hepatitis B virus isolates in Cambodia. Virus Genes 36:299-305.

Huy TT, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong ZH, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. 2003. High prevalence of hepatitis B virus pre-s mutant in countries where it is endemic and its relationship with genotype and chronicity. J Clin Microbiol 41:5449-5455.

James L, Fong CW, Foong BH, Wee MK, Chow A, Shum E, Chew SK. 2001. Hepatitis B Seroprevalence Study 1999. Singapore Med J 42: 420-424.

Jutavijittum P, Yousukh A, Samountry B, Samountry K, Ounavong A, Thammavong T, Keokhamphue J, Toriyama K. 2007. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors. Southeast Asian J Trop Med Public Health 38: 647-649.

Kramvis A, Kew M, François G. 2005. Hepatitis B virus genotypes. Vaccine 23:2409-2423.

Lansang MA. 1996. Epidemiology and control of hepatitis B infection: a perspective from the Philippines, Asia. Gut 38 Suppl 2: S43-7.

Lingao AL, Torres NT, Muñoz N, Lansang MA, West SK, Bosch FX, Domingo EO. 1989. Mother to child transmission of hepatitis B virus in the Philippines. Infection 17: 275-279.

Luksamijarulkul P, Thammata N, Tiloklurs M. 2002. Seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus among blood donors, Phitsanulok Regional Blood Center, Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 33: 272-279.

Martin P. 2007. Introduction: Foreign workers in Thailand. In: Martin P, editor. The economic contribution of migrant workers to Thailand: Towards policy development. Bangkok: International Labour office. p 1-6.

McMahon BJ. 2009. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B. Hepatol Int 3:334-342.

Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, Hasnian SS, Leung N, Lesmana L, Phiet PH, Sjalfoellah Noer HM, Sollano J, Sun HS, Xu DZ. 2000. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. J Gastroenterol Hepatol 15: 1356-1361.

Nakai K, Win KM, Oo SS, Arakawa Y, Abe K. 2001. Molecular characteristic-based epidemiology of hepatitis B, C, and E viruses and GB virus C/hepatitis G virus in Myanmar. J Clin Microbiol 39: 1536-1539.

Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Couroucé AM, Magnius LO. 1992. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. J Gen Virol 73:1201-1208.

Olinger CM, Jutavijittum P, Hübschen JM, Yousukh A, Samountry B, Thammavong T, Toriyama K, Muller CP. 2008. Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia. Emerg Infect Dis 14:1777-1780.

Pholphirul P, Rukumnuyakit P. 2007. Economic contribution of migrant workers to Thailand [dissertation]. Bangkok: National Institute of Development Administration.

Sebastian VJ, Bhattacharya S, Ray S, Daud JH. 1990. Prevalence of hepatitis B-surface antigen in the pregnant women of Brunei Darussalam. Southeast Asian J Trop Med Public Health 21: 123-127.

Soeung SC, Rani M, Huong V, Sarath S, Kimly C, Kohei T. 2009. Results from nationwide hepatitis B serosurvey in Cambodia using simple and rapid laboratory test: implications for National Immunization Program. Am J Trop Med Hyg 81: 252-257.

Sugauchi F, Orito E, Ichida T, Kato H, Sakugawa H, Kakumu S, Ishida T, Chutaputti A, Lai CL, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. 2002. Hepatitis B virus of genotype B with or without recombination with genotype C over the precore region plus the core gene. J Virol 76:5985-5992.

Suwannakarn K, Tangkijvanich P, Thawornsuk N, Theamboonlers A, Tharmaphornpilas P, Yoocharoen P, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. 2008. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in Thailand based on the analysis of *pre-S* and *S* genes. Hepatol Res 38:244-251

Theamboonlers A, Jantaradsamee P, Kaew-In N, Tangkijvanich P, Hirsch P, Poovorawan Y. 1999. The predominant genotypes of hepatitis B virus in Thailand. Ann Trop Med Parasitol 93: 737-743.

Thüring EG, Joller-Jemelka HI, Sareth H, Sokhan U, Reth C, Grob P. 1993. Prevalence of markers of hepatitis viruses A, B, C and of HIV in healthy individuals and patients of a Cambodian province. Southeast Asian J Trop Med Public Health 24: 239-249.

Thuy le TT, Ryo H, Van Phung L, Furitsu K, Nomura T. 2005. Distribution of genotype/subtype and mutational spectra of the surface gene of hepatitis B virus circulating in Hanoi, Vietnam. J Med Virol 76: 161-169.

Utama A, Octavia TI, Dhenni R, Miskad UA, Yusuf I, Tai S. 2009. Hepatitis B virus genotypes/subgenotypes in voluntary blood donors in Makassar, South Sulawesi, Indonesia. Virol J 6: 128.

Wang Z, Liu Z, Zeng G, Wen S, Qi Y, Ma S, Naoumov NV, Hou J. 2005. A new intertype recombinant between genotypes C and D of hepatitis B virus identified in China. J Gen Virol 86:985-990.

LEGENDS

Table I Prevalence of HBV genotypes and subtypes in migrant workers

Table II Prevalence of 'a' determinant mutations in migrant workers

Table III Prevalence of pre-S mutations in migrant workers

Figure 1 The prevalence and genotypes of HBV infection in Southeast Asia countries derived from previous reports. Charts in the left corner demonstrate the prevalence and subgenotypes among migrant workers from Cambodia, Myanmar and Laos in this study

Figure 2 Phylogenetic relationship of the sequence obtained in the present study and representative sequences of human HBV, orangutan and gibbon strains from GenBank. Region included in the comparison was the large S gene including *preS1*, *preS2* and HBsAg gene. Percentage bootstrap values (>75%) are shown at the respective nodes. The scale bar at the bottom indicates the genetic distance. The country of origin of migrant workers is indicated by a symbol (● - Cambodia, ▲- Laos and ■ - Myanmar)

Figure 3 Bootscanning analysis of suspected recombinant isolates. (A) complete *S* gene of isolate 31 was compared with HBV-B2 (AF121249) and HBV-C1 (AB112348); (B) Isolate 3794, nucleotide positions 2006 – 157, was compared with HBV-C1 (AB112348) and HBV-G (AB064310). Dashed line(s) indicate(s) the breaking point (s) of recombination. The number above the dashed line indicates the nucleotide position of each isolate compared with the reference strain (NC_003977)

Figure 4 Amino acid sequence alignment of the 'a' determinant region of 35 samples.

Figure 5 Amino acid sequence alignment of the entire pre-S1/pre-S2 region of 40 samples.

Table I Prevalence of HBV genotypes and subtypes in migrant workers

	Cambodia (n = 1,119)	Laos (n = 787)	Myanmar (n = 1,103)	Total (n = 3,009)	*P*-value
No. HBsAg positive	121 (10.8)	54 (6.9)	107 (9.7)	282 (9.4)	0.013*
No. HBV DNA positive	102 (84.3)	42 (77.8)	80 (74.8)	224 (79.4)	0.008*
Gender (M : F: ND[a])	81:20:1	31:11:0	46:28:6	158:59:7	0.030*
Age (yr; mean ± SD)	29.2±8.6	26.2±7.4	28.3±6.1	28.3±7.6	NS
Genotype					
A2[b]	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.44)	NS
B	13 (12.7)	11 (26.2)	1 (1.25)	25 (11.2)	0.000*
B2	7 (6.9)	1 (2.4)	0 (0)	8 (3.6)	
B3	1 (1.0)	7 (16.7)	1 (1.3)	9 (4.0)	
B4	5 (4.9)	3 (7.1)	0 (0)	8 (3.6)	
C	86 (84.3)	30 (71.4)	78 (97.5)	194 (86.6)	0.000*
C1	86 (84.3)	29 (69.0)	77 (96.3)	192 (85.7)	
C5	0 (0)	1 (2.4)	1 (1.25)	2 (0.9)	
D[b]	0 (0)	0 (0)	1 (1.25)	1 (0.44)	NS
Suspected recombination					NS
B2/C1	1(1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.44)	
B3/C1	0 (0)	1(2.4)	0 (0)	1 (0.44)	
G/C1	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.44)	
Subtype					
adr	76 (74.5)	20 (47.6)	57 (71.25)	153 (68.3)	0.000*
adw	9 (8.8)	5 (11.9)	1 (1.25)	15 (6.7)	NS
ayr	1 (1.0)	1 (2.4)	0 (0)	2 (0.9)	NS
ayw	6 (5.9)	12 (28.6)	2 (2.5)	20 (8.9)	0.000*
Could not be identified	10 (9.8)	4 (9.5)	20 (25.0)	34 (15.2)	

Data were expressed as mean ± SD, no (%)

[a] Data not available; [b] *PreC* gene could not be amplified

* *P*-values □ 0.05; NS = no statistic significance

Table II Prevalence of 'a' determinant mutations in migrant workers

HBV DNA positive	Cambodia (n = 102)	Laos (n = 42)	Myanmar (n = 80)	Total (n = 224)
Amino acid substitution				
No. HBV sequencing available	94 (92.2)	38 (90.5)	62 (77.5)	194 (86.6)
Ile126Ser/Asn	6 (6.4)	2 (5.3)	4 (6.5)	12 (6.2)
Pro127Arg	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Gly130Arg	0	1 (2.6)	0	1(0.5)
Thr131Asn/Pro	0	1 (2.6)	2 (3.2)	3 (1.5)
Met133Thr	2 (2.1)	0	0	2 (1.0)
Phe134Leu	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Thr140Ile	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Pro142Leu	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Gly145Arg/Ala	3 (3.2)	1 (2.6)	0	4 (2.1)
Trp156Leu	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Ala157Gly	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Ala159Val	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Pro120Thr + Ala128Asp + Cys138Tyr + Phe158Leu	0	1 (2.6)	0	1(0.5)
Lys122Gln + Thr131Asn + Met133Thr	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Gly130Arg + Met133Thr	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Thr131Asn + Phe134Tyr	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Thr131Asn + Phe134Tyr + Asp144Glu	1 (1.1)	0	0	1(0.5)
Ala128Val + Phe134Tyr + Phe158Leu + Ala159Gly	0	0	1(1.6)	1(0.5)
Total no. of 'a'determinant mutations	19/94 (20.21)	6/38 (15.79)	10/62 (16.13)	35/194 (18.04)

Data were expressed as no (%)

Table III Prevalence of pre-S mutations in migrant workers

Mutation/deletions	Cambodia (n = 102)	Laos (n = 42)	Myanmar (n = 80)	Total (n = 224)
No. Sequencing available	98 (96.1)	40 (95.2)	71 (88.8)	209 (93.3)
Pre-S1 start codon mutaion + pre-S1 deletion	1 (1.0)	0	0	1 (0.5)
Pre-S1 start codon deletion + pre-S2 deletion	0	0	1 (1.4)	1 (0.5)
Pre-S1 deletion	2 (2.0)	0	1 (1.4)	3 (1.4)
Pre-S1 deletion + pre-S2 deletion	1 (1.0)	0	0	1 (0.5)
Pre-S2 start codon mutaion	3 (3.1)	3 (7.5)	2 (2.8)	8 (3.8)
Pre-S2 start codon mutation + pre-S2 deletion	2 (2.0)	0	5 (7.0)	7 (3.3)
Pre-S2 start codon deletion + pre-S2 deletion	1 (1.0)	0	1 (1.4)	2 (1.0)
Pre-S2 start codon mutation + pre-S1 deletion	1 (1.0)	0	0	1 (0.5)
Pre-S2 deletion	7 (7.1)	3 (7.5)	6 (8.5)	16 (7.7)
Total no. of pre-S mutations	18 (18.4)	6 (15.0)	16 (22.5)	40 (19.1)

Data were expressed as no (%)

Figure 1 The prevalence and genotypes of HBV infection in Southeast Asia countries derived from previous reports. Charts in the left corner demonstrate the prevalence and subgenotypes among migrant workers from Cambodia, Myanmar and Laos in this study

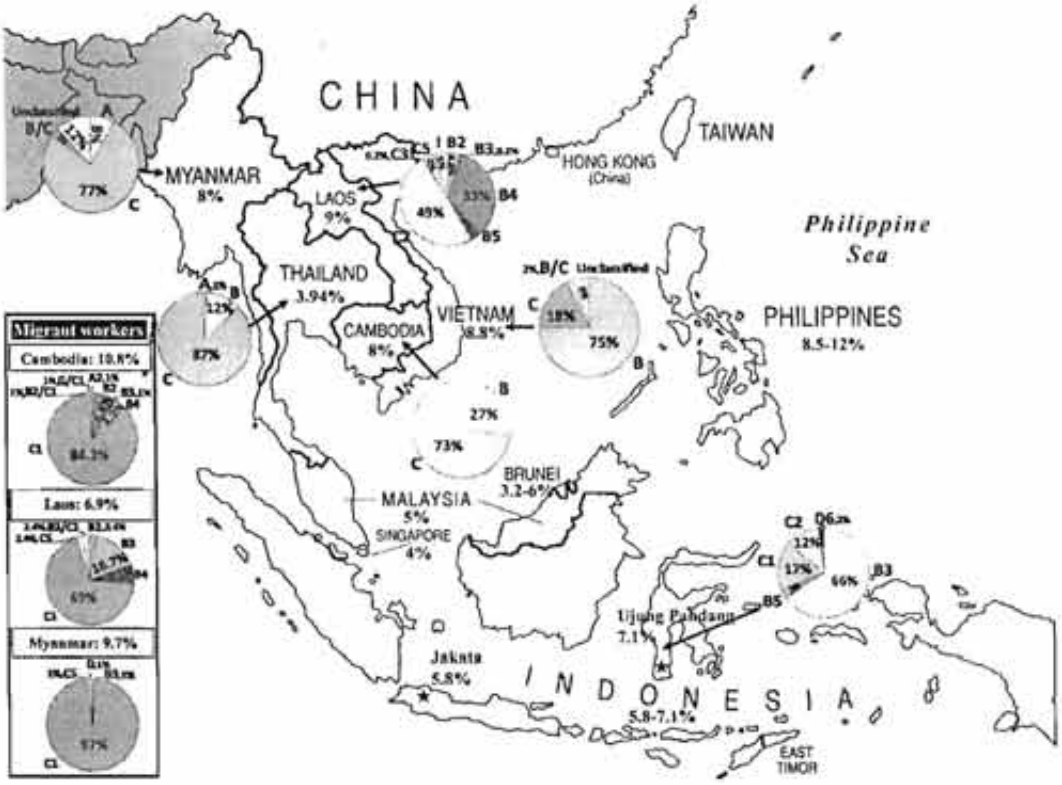
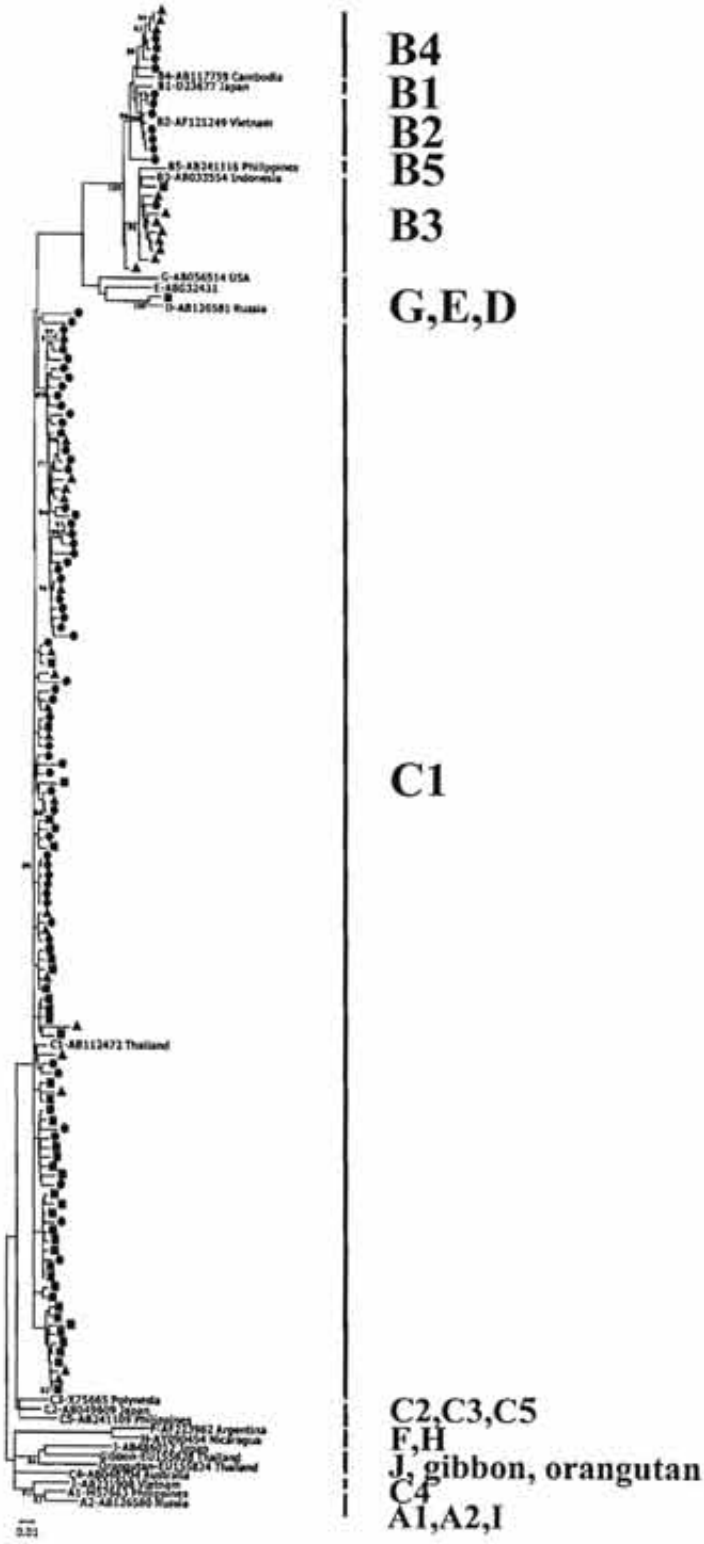


Figure 2 Phylogenetic relationship of the sequence obtained in the present study and representative sequences of human HBV, orangutan and gibbon strains from GenBank. Region included in the comparison was the large S gene including *preS1*, *preS2* and HBsAg gene. Percentage bootstrap values (>75%) are shown at the respective nodes. The scale bar at the bottom indicates the genetic distance. The country of origin of migrant workers is indicated by a symbol (● - Cambodia, ▲- Laos and ■ - Myanmar)



1

2

3

Figure 3 Bootscanning analysis of suspected recombinant isolates. (A) complete *S* gene of isolate 31 was compared with HBV-B2 (AF121249) and HBV-C1 (AB112348); (B) Isolate 3794, nucleotide positions 2006 – 157, was compared with HBV-C1 (AB112348) and HBV-G (AB064310). Dashed line(s) indicate(s) the breaking point (s) of recombination. The number above the dashed line indicates the nucleotide position of each isolate compared with the reference strain (NC_003977)

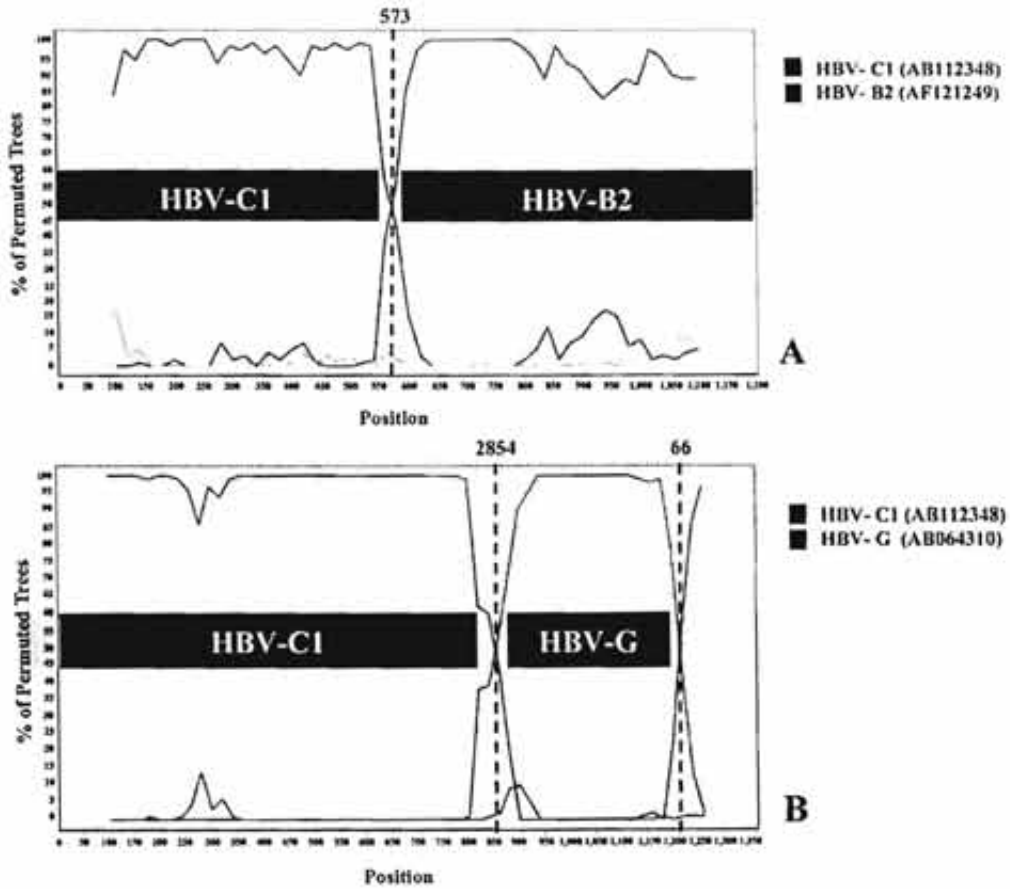


Figure 4 Amino acid sequence alignment of the 'a' determinant region of 35 samples.

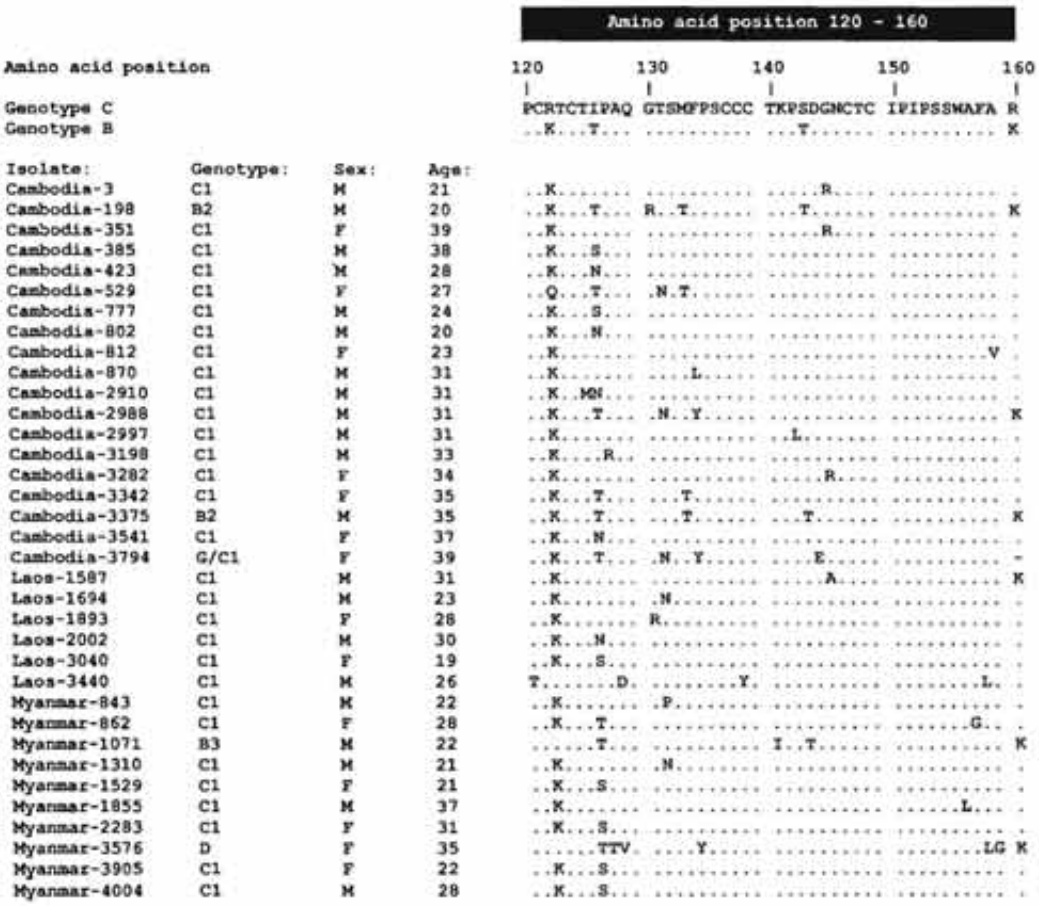


Figure 5 Amino acid sequence alignment of the entire pre-S1/pre-S2 region of 40 samples.

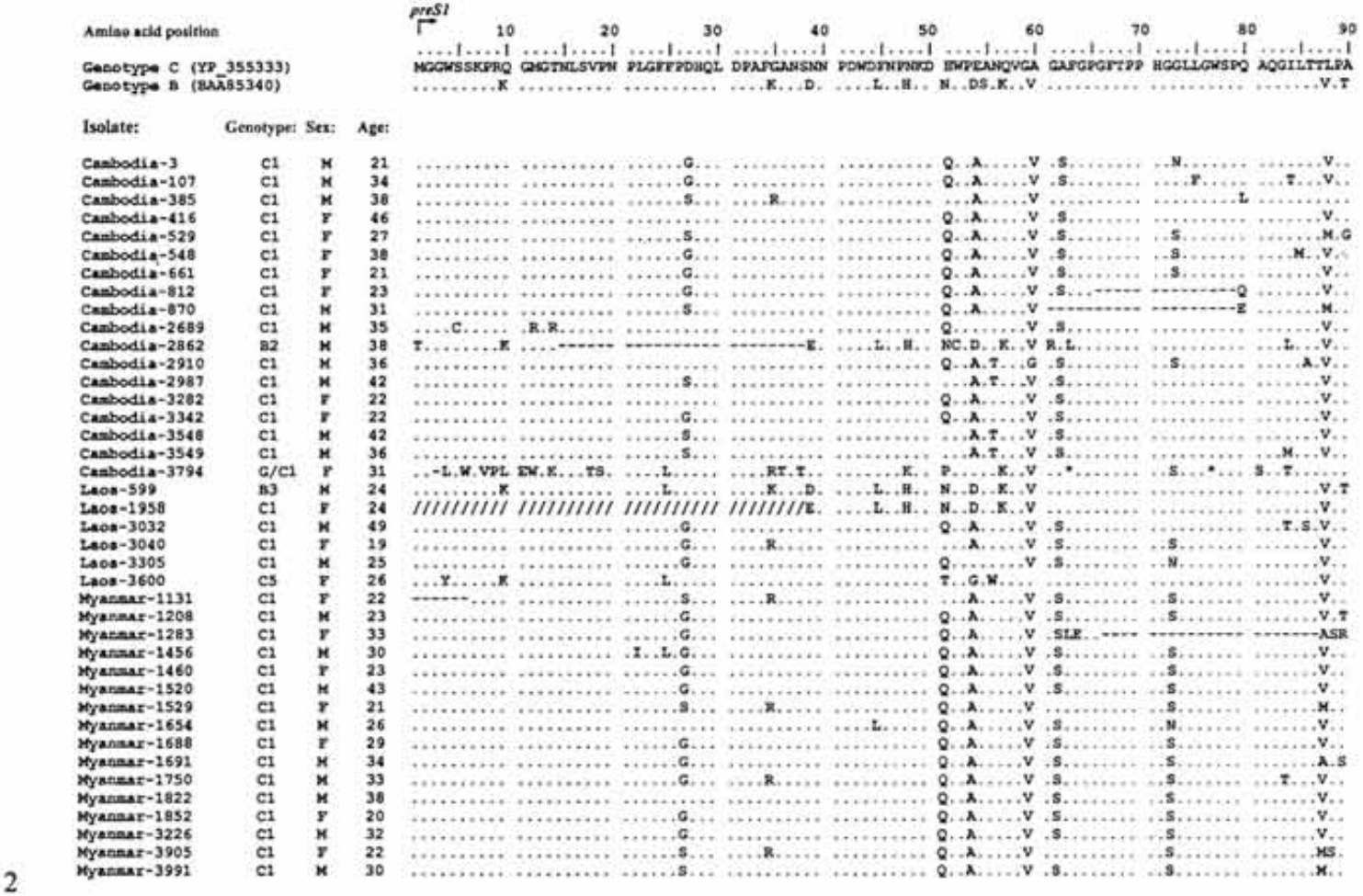


Figure 5 (Continued)