คณะแพทยศาสตร์
ทุนวิจัยทางแพทยศาสตร์

รายงานผลการวิจัย

การตรวจหาดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบบีในซีรัมหญิงตั้งครรภ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

โดย

สัตถาพร สิโรตมรัตน์ และคณะ

318/2

สิงหาคม 2544

คณะเภสัชศาสตร์

ทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์

รายงานผลการวิจัย

การตรวจหาดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบบีในซีรัมหญิงตั้งครรภ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

สัตถาพร สิโรตมรัตน์ และคณะ

สิงหาคม 2544

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคณะกรรมการฝ่ายวิจัยที่ได้สนับสนุนเงินทุนวิจัยทางเภสัชศาสตร์ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณหัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัย และที่จะลืมไม่ได้คือ ขอขอบคุณฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี ที่ได้ให้ความรู้ เอื้อเฟื้อสถานที่ อนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง และ test kits สำหรับทดสอบไวรัสตับอักเสบบี จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การตรวจหาดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบบีในซีรัมหญิงตั้งครรภ์ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

ชื่อผู้วิจัย สัตถาพร สิโรตมรัตน์
เครือวัลย์ พลจันทร
อัมพร ตันประเสริฐ

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ สิงหาคม 2544

บทคัดย่อ

นำตัวอย่างซีรัมหญิงตั้งครรภ์ทั้งหมด 512 ตัวอย่าง มาตรวจหาดีเอ็นเอส่วน S gene ของไวรัสตับอักเสบบี (HBV-DNA) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 431 คู่เบส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ศึกษาควบคู่กับการตรวจหาดัชนีในซีรัม (seromarkers) อื่นๆด้วยวิธีทางอิมมูโนแอสเสย์ ได้แก่ แอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg) ภูมิต้านทานต่อแอนติเจนชนิดผิวของไวรัส (Anti-HBs) และ ภูมิต้านทานต่อส่วนแกน (core) ของอนุภาคไวรัส (Anti- HBc) การตรวจหา HBsAg ใช้ 2 วิธี คือ Chemiluminescent immunoassay : Abbott prism HBsAg ประเทศเยอรมัน และ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองวิธี PCR กับ Chemiluminescence สามารถตรวจพบ HBV-DNA ในกลุ่มตัวอย่างซีรัมที่ให้ผล HBsAg เป็นลบซึ่งถือว่าเป็นกลุ่มปกติ 4 ตัวอย่าง จาก 482 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.83) และในกลุ่มที่ให้ผล HBsAg เป็นบวกกลุ่มพาหะ 10 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.33 อีกทางหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบวิธี PCR กับวิธี ELISA สามารถตรวจพบ HBV-DNA 1 ตัวอย่างในกลุ่มที่ให้ผล HBsAg เป็นลบ จากตัวอย่างทั้งหมด 478 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.21) และตรวจพบ HBV-DNA ในกลุ่มที่ให้ผล HBsAg เป็นบวก 13 ตัวอย่าง จาก 34 ตัวอย่าง (ร้อยละ 38.24) อย่างไรก็ตามแม้วิธี PCRจะมีข้อจำกัดในการตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีในซีรัม แต่เป็นวิธีที่ให้ประโยชน์มากหากใช้ควบคู่ไปกับวิธีทางอิมมิวโนแอสเสย์ในการตรวจหาผู้ที่เป็นพาหะของโรค เพื่อป้องกันการตรวจได้ผลลบลวงเนื่องจากวิธี PCR สามารถตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีได้ แม้ว่าผลการตรวจ HBsAg เป็นลบ

Project Title Detection of hepatitis B virus DNA in pregnant woman sera by Polymerase Chain Reaction.

Name of Investigators Sattaporn sirotamarat
Kruavon Balachandra
Amporn Tanprasert

Year August 2001

Abstract

Five hundred and twelve sera from pregnant women at King Chulalongkorn Memorial Hospital were screened for hepatitis B viral DNA (HBV- DNA) by Polymerase Chain Reaction (PCR). The PCR product of DNA samples were investigated for DNA band 431 base pairs size, using specific primers from S gene conserved region of HBV. This study was compared with the detection of other seromarkers such as HBsAg , anti-HBs and anti-HBc. There were two methods to investigate for HBsAg, namely Chemiluminescent immunoassay : Abbott prism HBsAg of Abbott Laboratories Diagnostics Division , USA and Enzyme-Linked Immmunosorbent Assay (ELISA) developed by the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nontaburi. HBV-DNA was detected in 14 out of 512 samples (2.73%) of total pregnancy. Comparing the PCR technique with Chemiluminescence, HBV-DNA were detectd in 4 out of 482 samples (0.83%) of $HBsAg^-$ (normal) group and 10 out of 30 samples (33.33%) of $HBsAg^+$ (active carrier) group. Comparing the PCR technique with ELISA, the PCR technique could detect HBV-DNA in 1 out of 478 samples of $HBsAg^-$ group (0.21%) and 13 out of 34 samples (38.24%) of $HBsAg^+$ group. Although PCR technique has limited in effectiveness for HBV detection but HBV-DNA was useful marker for additional screening HBV in pregnant woman sera since it could be directly detected of HBV active carriers even in the case of $HBsAg^-$. It is conclude that PCR is a reliable method if it is used in conjunction with HBsAg immunoassay to eliminate the false negative.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการวิจัย	3
วัสดุ	3
วิธีการ	3
ผลการวิจัย	15
การอภิปรายผล	35
ข้อสรุป	39
ข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	แสดง seromarkers ของตัวอย่างซีรัมหญิงตั้งครรภ์	15
2	เปรียบเทียบการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR กับการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์	32
3	เปรียบเทียบการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR กับการตรวจหา HBsAg โดยวิธี ELISA ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์	32
4	ผลการตรวจ seromarkers 4 ชนิด (HBV/PCR, HBsAG/ Chemiluminescence , anti-HBs and anti-HBc/ELISA) ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์	32
5	แสดงผลบวกของการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR และ HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence และ ELISA	33
6	จำนวนตัวอย่างซีรัมหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบี จากทั้งหมด 512 ตัวอย่าง	33
7	แสดงราคาค่าตรวจหาการติดเชื้อหรือเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธีอิมมิวโนแอสเสย์ และ PCR	40

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	PCR products แสดง DNA band ขนาด 431 base pairs ที่ตรวจพบ HBV-DNA ในซีรัมผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี	34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ตับอักเสบบีเป็นโรคติดเชื้อชนิดหนึ่งที่พบมากในโลก เป็นปัญหาสำคัญด้านสาธารณสุขกับประเทศทั่วโลก WHO รายงานว่ามีผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ประมาณปีละ 1 ล้านคน จัดเป็นอันดับที่เก้าของการเสียชีวิตด้วยโรคต่างๆ คาดว่าประชากรประมาณ 350 ล้านคนทั่วโลกเป็นโรคติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรังหรือเป็นพาหะของโรค มีการกระจายตัวของผู้ป่วยทั่วโลกแปรผันจากสูงไปต่ำ ระดับสูงพบในอาฟริกา เอเชีย และ แปซิฟิกตะวันตกมีมากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ ระดับกลางพบในยุโรปตอนใต้ และตะวันออกมีประมาณ 2-7 เปอร์เซ็นต์ และระดับต่ำพบในยุโรป อเมริกาตอนเหนือ และออสเตรเลียมีน้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ (1)

ผู้ป่วยตับอักเสบแบบเฉียบพลันในประเทศไทย หนึ่งในสามมีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบบี ในจำนวนนี้เป็นไวรัสตับอักเสบบีชนิดเรื้อรัง มีอัตราสูงถึงร้อยละ 60-90 (2) และเกิดจากไวรัสตับอักเสบซี และอี ร้อยละ 12 ตามปกติในผู้ใหญ่ร้อยละ 90 ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถกำจัดเชื้อได้หมดภายในเวลา 4-12 สัปดาห์ อาการตับอักเสบจะหายเป็นปกติ แต่มีผู้ที่หายป่วยหรือผู้ที่ติดเชื้อแต่ไม่ปรากฏอาการร้อยละ 5-10 กลายเป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบี และอีกร้อยละ 1 อาการของโรคพัฒนาถึงขั้นรุนแรงแบบเฉียบพลัน เรียกว่า fulminant hepatitis นำไปสู่การตายเนื่องจากตับวาย หรือ liver failure คนไทยที่เป็นพาหะของโรค คือ ตรวจพบแอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg) ประมาณร้อยละ 6-10 หรือประมาณ 6 ล้านคน อาจมีการพัฒนาไปเป็นโรคตับ เช่น ตับแข็ง หรือมะเร็งตับได้ (3) นอกจากนั้นอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งตับในผู้ที่เป็นพาหะของโรคมีมากกว่าผู้ที่ไม่ได้เป็นพาหะประมาณ 100-200 เท่า (4)

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีติดต่อได้หลายทางขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส ถ้าเป็นแหล่งที่มีการระบาดสูง การติดต่อส่วนใหญ่จะเป็นจากแม่ไปสู่ลูก เรียกว่า perinatal หรือ vertical transmission ส่วนในแหล่งที่มีการระบาดต่ำ คือ horizontal transmission มักติดต่อทางเพศสัมพันธ์ และทางเลือด มักพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ในเลือด น้ำลาย น้ำตา น้ำนม น้ำอสุจิ ปัสสาวะ เหงื่อ เลือดประจำเดือน และน้ำหล่อลื่นในช่องคลอดสตรีที่ป่วยเป็นโรค หรือเป็นพาหะ (5,6) เชื้อไวรัสตับอักเสบบีเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง เช่น ทางบาดแผล การให้เลือด การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน การฝังเข็ม การสัก การทำฟัน เพศสัมพันธ์ การสัมผัสอย่างใกล้ชิด และการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก นอกจากนั้นพบว่าหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีโอกาสเป็นโรคตับแข็ง มีความเสี่ยงสูงในการแท้งบุตรในขณะตั้งครรภ์ (7) และอาจแพร่เชื้อไวรัสไปยังสามี บุตร หรือสมาชิกอื่นๆภายในครอบครัว (8)

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 8000 คน มีอัตราการเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบีประมาณร้อยละ 6.3 (9) และสามารถถ่ายทอดไวรัสชนิดนี้ให้ลูกทางสายสะดือ หรือขณะคลอด หรือหลังคลอดใหม่ๆ โดยสัมผัสกับเลือดและสารคัดหลั่งในตอนคลอด ทารกที่ได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเมื่อแรกเกิดร้อยละ 90 –95 (6) กลายเป็นพาหะนำโรคไปตลอดชีวิต ในอดีตร้อยละ 70-90 ของผู้ป่วยมักได้รับเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาจากมารดาขณะคลอด ข้อมูลในประเทศไทยพบว่า ทารกมีโอกาสติดเชื้อชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 40-50 โดยทารกไม่มีอาการตับอักเสบในระยะแรก แต่จะแสดงอาการเมื่อโตเป็นผู้ใหญ่ เด็กที่เป็นพาหะของโรคร้อยละ 25 เมื่อโตขึ้นเขาจะเสียชีวิตจากโรคแทรกซ้อนในตับ ปัจจุบันสามารถป้องกันได้ด้วยการให้อิมมูโนโกลบูลินต่อไวรัสตับอักเสบบี (HBIG) และวัคซีนป้องกันโรคแก่ทารกในทันทีหลังคลอดหรือไม่เกิน 12 ชั่วโมงต่อมา และให้วัคซีนอีก 2 ครั้งเมื่อทารกมีอายุ 1 และ 6 เดือน เชื่อว่าสามารถป้องกันโรคได้ร้อยละ 95 (10)

การตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี การตรวจหาแอนติเจน คือ แอนติเจนชนิดผิวของไวรัส (HBsAg) ถ้าพบแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรืออาจตรวจหาแอนติเจนอีกชนิดหนึ่ง คือ แอนติเจนส่วนแกนกลางของไวรัส (HBcAg) ถ้าพบแสดงว่าไวรัสมีการแบ่งตัวและมีจำนวนมาก ส่วนการตรวจหาภูมิต้านทานหรือแอนติบอดีต่อไวรัสเป็นแอนติบอดีต่อส่วนผิวของไวรัสตับอักเสบบี (Anti- HBs) ถ้ามีแสดงว่าร่างกายสร้างภูมิต้านทานต่อไวรัสตับอักเสบบี อาจเคยติดเชื้อมาก่อนแต่หายเป็นปกติแล้ว หรือได้รับการฉีดวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบี ส่วนการตรวจแอนติบอดีต่อส่วนแกนกลางของไวรัส (Anti – HBc) ถ้าให้ผลบวกแสดงว่ามีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ อาจกำลังติดเชื้ออยู่หรืออาจหายจากโรคแล้วก็ได้ ไม่ใช่ภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัส การตรวจด้วยวิธีอิมมิวโนแอสเสย์เพื่อหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบีส่วนใหญ่ทดสอบด้วยวิธี ELISA เนื่องจากมีความไวที่ดี มีความจำเพาะสูง ตรวจง่ายและทราบผลเร็วเพราะใช้ test kit สำเร็จรูป แต่ test kit สำเร็จรูปมีราคาแพง และต้องซื้อจากต่างประเทศ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี จึงได้มีการพัฒนา test kit ขึ้นใช้ภายในประเทศ มีทั้งชนิดที่ตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบี มีราคาถูกกว่าของต่างประเทศมาก นอกจากนั้นมีรายงานว่าให้ผลการตรวจที่ดี และ มีความไวสูง มีความจำเพาะกับ subtype ซึ่งมีการระบาดค่อนข้างสูงในประเทศไทย คือ subtype ad (adr และ adw) (11) ส่วนวิธี Chemiluminescence : Abbott prism HBsAg (ของ Abbott) มีรายงานว่าวิธีนี้ให้ผลการทดสอบที่แม่นยำมีความไวและความจำเพาะสูง ตรวจง่ายโดยใช้เครื่องอัตโนมัติ วิธีนี้สามารถตรวจหาได้ทั้ง

แอนติเจนและแอนติบอดี (12) โดยทั่วๆไปการตรวจหาเชื้อในหญิงตั้งครรภ์ขั้นต้น มักตรวจหาเฉพาะแอนติเจนชนิดผิวของไวรัส (HBsAg) เท่านั้น จึงอาจมีการผิดพลาดได้ เพราะมีรายงานว่าในผู้ที่รับเลือดบริจาคมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้สูงถึงร้อยละ 7 ถึง 13 แม้มีการตรวจกรองหา HBsAg ด้วยวิธี ELISA แล้วก็ตาม (13,14) ดังนั้นควรมีการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีชนิดอื่นของไวรัสตับอักเสบบีประกอบกัน

มีรายงานว่าการตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี (HBV-DNA) โดยเทคนิค PCR เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความไวสูง ตรวจได้แม่นยำแม้มีปริมาณ HBV-DNA น้อยมากเพียง 3 จีโนม และผลผิดพลาดเป็นผลลบลวงไม่เกินร้อยละ 0.1 เมื่อเทียบกับการตรวจหา HBsAg นอกจากนั้นยังตรวจพบ HBV-DNA ในซีรัมผู้ป่วยได้เร็วกว่าตรวจพบ HBsAg เป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์ (15)

งานวิจัยที่ทำในครั้งนี้เป็นการตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีในซีรัมหญิงตั้งครรภ์ด้วยวิธี PCR เปรียบเทียบกับการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence และ ELISA รวมทั้งการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบีหลายชนิด เพื่อศึกษาความแม่นยำของวิธีดังกล่าวในการตรวจกรองการเป็นพาหะของโรคตับอักเสบบีในมารดา ป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดไปยังบุตร ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นประโยชน์ในการแก้ปัญหาด้านสาธารณสุขของประเทศได้อีกทางหนึ่ง

วิธีการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างทดสอบ

เก็บตัวอย่างเลือดหญิงตั้งครรภ์จากตึก ภปร. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 512 รายที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสเอดส์ (HIV) ตัวอย่างละ 4 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เลือดตกตะกอน (clot) แยกซีรัมโดยเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 2000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนน้ำใสใส่ microcentrifuge tube บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 °ซ 30 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ - 40 °ซ

2. วัสดุอุปกรณ์สำหรับ PCR amplification

2.1 Oligonucleotide primers ใช้ oligonucleotide primers ที่จำเพาะกับ HBV surface gene (S gene) sequence ซึ่งสังเคราะห์ด้วยเครื่อง DNA synthesizer ของ Applied Biosystems

primers มี 2 ชุด คือ

primer 262 5' GGACTTCTCTCAATTTTCTAGGG 3' เริ่มจาก map position 262

primer 693 R 5' CAAATGGCACTAGTAAACTGAGC 3' จาก complementary หรือ reverse (R) DNA strand เริ่มจาก map position 693 ของ HBV genome

2.2 HBV surface gene (S gene) sequence ซึ่งเป็นส่วน conserved region ทำหน้าที่เป็นแม่แบบ (DNA template)

2.3 DNA markers ใช้ DNA Ladder ขนาด 100 bp ของ Promega

2.4 Taq polymerase ของ Promega

2.5 Deoxyribonucleotide (dNTPs) ของ Promega

2.6 เอนไซม์ Proteinase K ของ Promega และ Sigma

2.7 DNA Thermal cycler รุ่น 480 ของ Perkin - Elmer Cetus

3. test kits สำหรับทดสอบทางอิมมูโนวิทยา

3.1 Abbott prism HBsAg automate assay kit ด้วยวิธี Chemiluminescent immunoassay เพื่อตรวจหา HBsAg

3.2 One – step ELISA test kit ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี เพื่อตรวจหา HBsAg (11)

3.3 MONOLISA anti – HBc PLUS kit ของบริษัท Sanofi Pasteur เพื่อตรวจหา anti – HBc ทดสอบเฉพาะตัวอย่างซีรัมที่ให้ผลบวกกับการตรวจหา HBV-DNA หรือ HBsAg เนื่องจาก test kit มีราคาแพง (ประมาณ 8000-10000 บาท / kit)

3.4 One - step ELISA kit ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี เพื่อตรวจหา anti – HBs (16)

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

1.1 สารเคมี

- 2.5 x premix buffer ประกอบด้วย

20 mg/ml glycogen	20	µl
20% SDS	500	µl
0.5 M EDTA	100	µl
3 M CH_3COONa pH 6.5	170	µl
distilled water	7.2	ml

- Phenol / chloroform อัตราส่วน 1:1

- Chloroform / isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1
- 3 M sodium acetate pH 5
- 70% ethanol
- TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5 , 0.1 mM EDTA pH 8.3)

1.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

- ใช้ซีรัม 200 µl ผสมกับ 200 µl premix proteinase K solution (160 µl 2.5x premix buffer , 40 µl 20 mg /ml proteinase K)
- บ่มที่ 55 °ซ 2 ชม. หรือ 37 °ซ 24 ชม.
- เติม 400 µl phenol (1 vol.) ลงในสารละลายของซีรัม ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 15000 รอบ 10 นาที
- ดูดส่วนน้ำใสด้านบนใส่ลงในหลอดใหม่ เติม 40 µl 3M sodium acetate (0.1 vol.) pH 5 ผสมให้เข้ากัน
- เติม 800 µl absolute ethanol (2 vol.) ที่เย็นผสมให้เข้ากัน บ่มที่ – 80 °ซ 30 นาที หรือ –20 °ซ 24 ชม.
- ปั่นที่ 4 °ซ 15000 รอบ 10 นาที
- ดูดส่วนน้ำทิ้งไป เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้แล้วล้างด้วย 70% ethanol 800 µl (2 vol.) นำไปปั่นที่ 15000 รอบ 5 นาที
- นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 10 µl TE buffer เก็บสารละลายที่ –20 °ซ

2. การขยายยีนด้วยวิธี PCR

2.1 เตรียม PCR reaction mixtures ปริมาตร 50 µl

สาร	ปริมาณสาร (µl)
H_2O	36.15
10x PCR reaction buffer	5.0
25 mM $MgCl_2$	3
25 mM dNTP mixtures	0.5
primer 262 (250 ng)	0.6

สาร	ปริมาณสาร (µl)
primer 693 (250 ng)	0.75
DNA sample	3
Taq DNA polymerase (1 unit)	1
รวม	50

วิธีทำ

- เตรียม reaction mixtures ในหลอดทดลองทำ PCR เติมเอนไซม์ Taq DNA polymerase หลังสุด
- ปั่นให้ส่วนผสมเข้ากัน หยด mineral oil ลงไป 1 หยด เพื่อป้องกันการระเหยของ reaction mixture
- นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA คือ Automate Thermal cycler (Perkin – Elmer Cetus) โดยตั้งโปรแกรม PCR cycles ดังนี้ คือ

  96 ° ซ 30 วินาที (5 นาที สำหรับรอบแรก) เพื่อ denature DNA

  55 ° ซ 30 วินาที เพื่อ annealling DNA

  74 ° ซ 1 นาที (40 รอบ) เพื่อ amplify DNA

3. ศึกษา DNA โดยใช้ gel electrophoresis

   วิธีทำ

   - เตรียม agarose gel 2% ใน 1x TAE buffer
   - นำ PCR products มา 10 µl ผสมกับ loading buffer 2 µl
   - หยอดลงในช่องของ agarose gel แล้ว run gel โดยใช้ไฟ 100 volts ประมาณ 1 ซม.
   - นำมาย้อมสีด้วย ethidium bromide solution 15 -30 นาที
   - ส่อง ดู DNA band ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 260 nm

4. ตรวจหา HBsAg ด้วย Abbott prism HBsAg วิธี Chemiluminescent immunoassay ชนิด two – step sandwich ChLIA ของ Abbott laboratories diagnostics division ประเทศอเมริกา

เตรียมสาร

Abbott prism HBsAg assay kit (no. 3A47-48)

- anti-HBs (mouse monoclonal Ig M) 1 ขวด (333 ml) ประกอบด้วย microparticles ซึ่งถูก coat ด้วย bovine serum albumin, Tween 20 และ protein stabilizer ใน phosphate buffered saline เติม sodium azide เป็นสารกันบูด
- anti-HBs (goat polyclonal antibody) 1 ขวด (328 ml) acridinium conjugate ใน phosphate buffered saline กับ calf serum และ พลาสมาของคนเสริมเกลือแคลเซียมถูก inactivate ด้วยความร้อน ความเข้มข้น HBsAg ต่ำสุด 0.025 µg /ml สารกันบูด คือ sodium azide
- negative calibrator (human) 3 ขวด (10.4 ml) พลาสมาของคนเสริมเกลือแคลเซียมถูก inactivate ด้วยความร้อน และให้ผลลบกับ HBsAg, HIV_1Ag, anti-HBs, anti-HCV และ anti-HIV_1 / HIV_2 สารกันบูด คือ sodium azide
- positive calibrator (human) 3 ขวด (10.4 ml) พลาสมาของคนเสริมเกลือแคลเซียมถูก inactivate ด้วยความร้อน และให้ผลบวกกับ HBsAg, HIV_1Ag, anti-HBs, anti-HCV และ anti-HIV_1 / HIV_2 ความเข้มข้น HBsAg 0.25 – 0.65 ng/ml (0.03 – 0.07 PEI units/ml) สารกันบูด คือ sodium azide

Abbott prism HBsAg wash kit (no. 3A47-38)

- transfer wash 1 ขวด (3393 ml) มี phosphate buffered saline เติม sodium azide เป็นสารกันบูด
- conjugate wash 1 ขวด (2811 ml) มี borate buffered saline เติม sodium azide เป็นสารกันบูด

สารที่ต้องการใช้แต่ไม่ต้องเตรียม เช่น

Abbott prism activator concentration (no. 1A75-02)

Abbott prism activator diluent (no. 1A75-01)

Abbott prism reaction trays (no. 5A07-01)

Abbott prism pipette tips (no. 5A07-10)

Abbott prism accessory kit (no. 6A36-60)

นอกจากนั้นมีสารอื่นๆที่ใช้ เช่น

Abbott prism run control kit (no. 4B48-10)

Abbott prism positive control kit (no. 4B48-11)

Abbott prism sample cups (no. 7B36-01)

Abbott prism run control kit (no. 5E22-10)

Abbott prism positive run control kit (no. 5E22-11)

Abbott prism run control adaptors (no. 6A36-31)

Abbott prism HBsAg confirmatory kit (no. 6D16-88)

หลักการของวิธี Chemiluminescence

- microparticles ถูก coat ด้วย monoclonal antibody (anti-HBs ของหนู) แล้วนำมาบ่มกับซีรัมหรือทำใน microplate well ในขณะที่บ่ม HBsAg ในซีรัมจะเชื่อมกับแอนติบอดีบน microparticles
- เมื่อบ่มครั้งแรกเสร็จ ถ่าย reaction mixture ลงใน glass fiber matrix ด้วย transfer wash ทำให้ microparticles ถูกจับโดย matrix ในขณะที่ reaction mixture เคลื่อนที่ผ่าน absorbent blotter
- label acridinium ด้วย polyclonal anti-HBs ของแกะ เติม conjugate รวมกับ microparticles บน matrix แล้วบ่มไว้ หลังจากบ่มครั้งที่สองล้างเอา conjugate ที่ไม่ได้เข้าจับออกด้วย conjugate wash แล้วซับให้แห้ง
- ตรวจวัด photon ที่ปล่อยออกมาด้วยวิธี Chemiluminescence โดยเติม alkaline hydrogen peroxide solution ลงใน well ปริมาณของแสงที่ออกมาแปรผันโดยตรงกับปริมาณ HBsAg ในซีรัม

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1

- ใส่ plan workload
- ใส่ reagents ที่ต้องการ
- ตรวจดูว่าการเขียนสัญลักษณ์ที่หลอดทดลองตรงกันกับสัญลักษณ์ของ reagents
- ตรวจดูให้หลอดทดลองวางพอดีกับขวดสารที่ใช้ล้างและขวด reagents

ขั้นตอนที่ 2

- ตรวจภาชนะที่บรรจุของเสีย เททิ้งและทำความสะอาด

ขั้นตอนที่ 3

- เตรียม activator solution

ขั้นตอนที่ 4

- ตรวจดูจำนวนถาดที่ใส่สารสำหรับทำปฏิกริยาให้อยู่ประจำที่ และบรรจุสารให้เพียงพอ

ขั้นตอนที่ 5

- ตรวจดูจำนวน pipette tips ให้มีจำนวนเพียงพอใน pipette racks

ขั้นตอนที่ 6

- ดูวิธีการใช้เครื่องจากคู่มือ

ขั้นตอนที่ 7

- เริ่มใส่ตัวอย่างซีรัมที่จะทดสอบ เปิดขวดใน calibrator pack และนำมาวางใน calibrator rack กับ sample racks รวมทั้งทำ control ด้วย

ขั้นตอนที่ 8

- หลังจากใช้ pipette ดูดสารจาก calibrator แล้วนำ calibrator rack ออกไป ปิดขวด calibrator เก็บที่อุณหภูมิ 2 - 8 °ซ

ขั้นตอนที่ 9

- เริ่มทดสอบซีรัมแต่ละตัวอย่าง หลังจากใช้ pipette ดูดตัวอย่างแล้วนำ sample racks ออกไป

ขั้นตอนที่ 10

- ตัวอย่างอื่นๆ ถ้ามีปฏิกริยาเริ่มต้นแล้วต้อง centrifuge ตามตาราง Specimen Collection and Preparation for Analysis จากคู่มือ แล้วทดสอบซ้ำ 2 ซ้ำ (duplicate)

ขั้นตอนที่ 11

- หลังจากนั้นทำการวัดจนเสร็จ ล้างเครื่องมือตามคู่มือการใช้เครื่อง

การคำนวณผล

คำนวณค่า cutoff และ S/CO values

cutoff = Negative calibrator mean net counts (NCC) + (0.2 x Positive calibrator mean net counts, PCC)

ตัวอย่าง ถ้า NCC = 100 และ PCC = 1000

= 100 + (0.2 x 1000) = 300

cutoff = 300

S/CO = sample net counts / cutoff

ตัวอย่าง sample net counts = 600 และ cutoff = 300

S/CO = 600/300 = 2.00

การแปลผล

สำหรับ Abbott prism HBsAg assay ถ้าค่าของตัวอย่าง sample net counts มีค่าน้อยกว่าค่า cutoff ถือว่า ไม่มีปฏิกริยา (non reactive) ไม่ต้องทำการทดลองต่อ ถ้าค่าของตัวอย่าง (sample net counts) มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับค่า cutoff ให้ถือว่าเริ่มมีปฏิกริยา ดังนั้นทุกตัวอย่างที่มีปฏิกริยาให้ทดสอบซ้ำสองครั้ง (duplicate) ถ้าทดสอบตัวอย่างซ้ำภายใน 24 ชั่วโมง ไม่ต้อง centrifuge อีก

เมื่อทดลองซ้ำค่า net counts ที่ได้ทั้ง 2 ครั้ง มีค่าน้อยกว่าค่า cutoff ให้ถือว่าได้ผลลบ แต่ถ้าการทดสอบซ้ำ ค่าที่ได้ทั้งสองครั้งมีค่ามากกว่า หรือเท่ากับค่า cutoff ตัวอย่างนั้นต้องทดสอบอีกครั้งด้วยวิธี neutralizing confirmatory test ตัวอย่างซีรัมที่ตรวจ confirmatory test แล้วถ้าทำปฏิกริยา neutralization กับ anti-HBs ได้ ให้สรุปว่าเป็นผลบวก

5. การตรวจหา HBsAg ด้วยการใช้ One - step ELISA test kit พัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี (13) ประกอบด้วย microplate 96 tests

การเตรียมสาร

เตรียม working substrate solution โดยผสมสับสเตรท 1 : สับสเตรท 2 ในอัตราส่วน 1:1 ทันทีก่อนใช้

เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับล้างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 ผสมให้เข้ากันก่อนใช้ เมื่อผสมแล้วเก็บไว้ใช้ที่อุณหภูมิห้องได้ 7 วัน

วิธีทำ

1. นำ microplate ออกจากถุง ล้างด้วยน้ำกลั่นหลุมละ 400 µl คว่ำให้แห้ง

2. ตัวอย่างซีรัม และสารละลาย control ต้องเขย่าขวดก่อนใช้
3. หลุม A1 และ B1 ใช้เป็น blank
4. เติม negative control ในหลุม C1 และ D1 หลุมละ 50 µl
5. เติม positive control ในหลุม F1 และ G1 หลุมละ 50 µl
6. เติมตัวอย่างซีรัม จำนวน 50 µl ในหลุมเริ่มตั้งแต่ H1
7. เติม conjugate จำนวน 50 µl ลงในแต่ละหลุมยกเว้น blank
8. ใช้แผ่นพลาสติก (plate cover) ปิด microplate หลังจากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยวิธีเคาะ microplate เบาๆ
9. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
10. ล้าง microplate ด้วยบัฟเฟอร์ จำนวน 5 ครั้ง
11. คว่ำ microplate ลงบนกระดาษ ซับให้แห้ง
12. เติม working substrate solution ลงทุกหลุมๆละ 100 µl
13. นำไปบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
14. เติม stop solution ทุกหลุม ๆละ 100 µl
15. อ่านค่า absorbance ที่ความยาวช่วงคลื่น 450 nm และควรอ่านผลภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากเติม stop solution

การคำนวณผล

1. การคำนวณค่า Negative control mean absorbance (NCx) นำค่าที่ได้จากการวัดมาหาเฉลี่ย เช่น C1 0.052, D1 0.023, E1 0.025 ผลรวม = 0.100

   ค่าเฉลี่ย = 0.100/3 = 0.033 (NCx)

2. การคำนวณค่า cutoff

   ค่า cutoff = 0.050 + NCx

   = 0.050 + 0.033 = 0.083

การแปลผล

1. ตัวอย่างตรวจมีค่าabsorbanceน้อยกว่าค่า cutoff แปลผลว่าตรวจไม่พบ HBsAg
2. ตัวอย่างตรวจมีค่า absorbance มากกว่า หรือเท่ากับค่า cutoff แปลผลว่าตรวจพบ HBsAg

6. ตรวจหา anti- HBc ด้วยวิธี ELISA ใช้ MONOLISA anti – HBc PLUS kit ของบริษัท Sanofi Diagnostics Pasteur ประเทศอเมริกา ประกอบด้วย microplate 96 tests

การเตรียมสาร

HBcAg microplate (R1) เก็บที่ 4 °ซ

washing solution (R2)

negative control serum (R3)

positive control serum (R4)

sample diluent (R6)

conjugate solution (R7)

working diluted substrate solution (R8 + R9)

stop solution (R10)

วิธีทดสอบ

- ก่อนใช้นำ microplate test kit (R1) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที
- เติม diluent (R6) ลงในหลุม
- เติม negative control serum (R3) 20 µl ลงในหลุม A1 และ B1
- เติม positive control serum (R4) 20 µl ลงในหลุม C1, D1 และ E1
- เติมตัวอย่างซีรัม 20 µl ตั้งแต่หลุม F1 , G1.....
- ปิดฝา microplate ด้วยแผ่นฟิล์มบาง
- บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ 30 นาที
- เปิดแผ่นฟิล์มออกดูดสารละลายออก แล้วเติม washing solution (R2) 370 µl ลงทุกหลุมแล้วดูดสารละลายออก ล้างซ้ำอีก 3 ครั้ง สุดท้ายสารละลายที่เหลืออยู่ในหลุมไม่ควรเกิน 5 µl
- เติม conjugate solution (R7) 200 µl ลงในทุกหลุม
- ปิดฝา microplate ด้วยแผ่นฟิล์มใหม่ แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °ซ 60 นาที
- เปิดแผ่นฟิล์มออก แล้วล้าง 4 ครั้งเหมือนครั้งก่อน
- เติม working diluted substrate solution (R8 + R9) 100 µl ลงในทุกหลุม บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที โดยไม่ต้องปิดแผ่นฟิล์ม
- เติม stop solution (R10) 100 µl ลงในทุกหลุม

- นำไปอ่านค่า OD 450/620 nm ด้วยเครื่อง microplate reader ภายในเวลา 30 นาทีหลังเติม stop solution

การคำนวณผล

1. คำนวณค่าเฉลี่ย OD ของ positive control (OD R4)
2. คำนวณค่า cutoff

$$\text{cutoff value} = \frac{\text{OD R4}}{5}$$

การแปลผล

1. ค่าเฉลี่ย negative control ควรมีค่าน้อยกว่า 0.100
2. ค่าเฉลี่ย positive control ต้อง ≥ 1.000 และ ≤ 2.4
   ถ้าค่า control ทั้งสองตัวไม่ได้ตามที่กำหนดต้องทำซ้ำ
3. ค่า OD ของตัวอย่างตรวจ ถ้ามากกว่าค่า cutoff value ถือว่าให้ผลบวก
   ถ้าน้อยกว่าค่า cutoff value ถือว่าให้ผลลบ

7. ตรวจหา anti- HBs ด้วยวิธี ELISA ใช้ One - step ELISA kit ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี (16) ประกอบด้วย microplate 96 tests

การเตรียมสาร

เตรียม diluted wash buffer โดยเจือจาง plate wash concentrate 1:20 ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันก่อนใช้ เมื่อเจือจางแล้วเก็บไว้ใช้ได้ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียม working substrate โดยผสม substrate A : substrate B ในอัตราส่วน 1:1 ทันทีก่อนใช้

วิธีทดสอบ

- ล้าง plate 1 ครั้งด้วย diluted wash buffer หลุมละไม่น้อยกว่า 350 µl
- ซับ plate ให้แห้งโดยการคว่ำ plate ลงบนกระดาษซับ
- หลุม A1 และ B1 เป็น Blanks ไม่ต้องใส่อะไรลงไป
- หลุม C1, D1 และ E1 เติม negative control หลุมละ 50 µl
- หลุม F1, G1 เติม positive control หลุมละ 50 µl
- ใส่ตัวอย่างซีรัมลงไปตั้งแต่หลุม H1 เป็นต้นไป

- เติม conjugate solution ลงไปทุกหลุม หลุมละ 50 µl ยกเว้น Blanks
- ปิด plate ด้วยแผ่นฟิล์ม เคาะเบาๆที่ข้าง plate เพื่อให้สารละลายผสมกัน นำไปบ่มที่ 37° ซ นาน 2 ชั่วโมง
- ดึงแผ่นฟิล์มออกทิ้ง แล้วล้าง 5 ครั้งด้วย diluted wash buffer หลุมละไม่น้อยกว่า 350 µl ซับให้แห้ง
- เติม working substrate 100 µl ลงไปทุกหลุม วางไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
- เติม stop solution 100 µl ลงไปในทุกหลุม
- วัดค่า OD ที่ 450 nm ภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังเติม stop solution

การคำนวณผล

1. ค่า OD ของ Blank ต้อง ≤ 0.100
2. หาค่าเฉลี่ย ค่า OD ของ negative control (NCx) จะต้องมีค่า ≥ 0 และ ≤ 0.10 หลังจากหักค่า OD ของ Blank ถ้าค่าที่ได้ ≥ 0.10 ต้องทำซ้ำ
3. หาค่าเฉลี่ยของ ค่า OD ของ positive control (PCx) จะต้องมีค่า $\geq$ 0.40 หลังจากหักค่า OD ของ Blank
4. หาผลต่างของค่า positive control และ negative control ควรต่างกันอย่างน้อย 0.30 จึงเชื่อถือได้ มิฉะนั้นต้องทำซ้ำ
5. หาค่า cutoff

$$\text{cutoff value} = 0.040 + \text{NCx}$$

การแปลผล

1. ตัวอย่างตรวจมีค่า OD น้อยกว่า cutoff value ถือว่าให้ผลลบ
2. ตัวอย่างตรวจมีค่า OD มากกว่า cutoff value ถือว่าให้ผลบวก
3. ตัวอย่างตรวจมีค่า OD เท่ากับ cutoff value ถือว่าเป็น initially reactive ควรทดสอบซ้ำ ด้วยการทำ duplicate ก่อนนำมาแปลผล

ผลการวิจัย

ตารางที่ 1 แสดง seromarkers ของตัวอย่างซีรัมหญิงตั้งครรภ์

HBsAg เป็นค่าที่ได้จาก kits ของ Abbott

HBsAg* เป็นค่าที่ได้จาก kits ของกรมวิทย์ฯ

Anti-HBs ภูมิต้านทานน้อย (OD +1), ภูมิต้านทานปานกลาง (OD + 2), ภูมิต้านทานสูง (OD + 3), ภูมิต้านทานสูงมาก (OD + 4), และ v = ฉีดวัคซีน (vaccination)

anti-HBc NT(not test) ไม่ได้ทดสอบ ทดสอบเฉพาะตัวอย่างที่ผลทดสอบดีเอ็นเอ หรือ HBsAg ให้ผลบวก (anti-HBc test kit มีราคาแพง)

No. of samples	Seromarkers				
	HBV- DNA	HBsAg	anti-HBs	anti- HBc	HBsAg*
1	-	-	-	NT	+
2	-	-	-	NT	-
3	-	-	-	NT	-
4	-	-	+4	NT	-
5	-	-	-	NT	-
6	-	-	-	NT	-
7	-	-	-	NT	-
8	-	-	-	NT	-
9	-	-	-	NT	-
10	+	-	-	+	+
11	-	-	-	NT	-
12	-	-	+1	NT	-
13	-	-	-	NT	-
14	-	+	-	+	+
15	-	-	+4	NT	-
16	-	-	-	NT	-
17	-	-	+1	NT	-
18	-	-	+4	NT	-
19	-	-	-	NT	-
20	-	-	+4	NT	-
21	-	-	-	NT	-
22	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV- DNA	HBsAg	anti-HBs	anti- HBc	HBsAg*
23	-	-	+4	NT	-
24	-	-	-	NT	-
25	-	-	-	NT	+
26	-	-	-	NT	+
27	-	-	-	NT	-
28	-	-	-	NT	-
29	-	-	-	NT	-
30	-	-	-	NT	-
31	-	-	+1	+	-
32	-	-	-	NT	-
33	-	-	+3 (v)	NT	-
34	-	-	-	NT	-
35	-	-	+4	NT	-
36	-	-	-	NT	-
37				NT	-
38	-	-	-	NT	-
39	-	-	+4 (v)	+	-
40	-	-	-	NT	-
41	-	-	-	NT	-
42	-	-	- (v)	NT	-
43	-	-	+1	NT	-
44	-	-	+1	NT	-
45	-	-	-	NT	-
46	-	-	-	+	-
47	-	-	-	NT	-
48	-	-	+4	NT	-
49	-	-	+1	NT	+
50	-	-	-	NT	+
51	-	-	-	NT	-
52	-	-	-	NT	-
53	-	-	+2	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV- DNA	HBsAg	anti-HBs	anti- HBc	HBsAg*
54	-	-	+1	NT	-
55	-	-	+1	NT	-
56	-	-	+3	NT	-
57	+	+	-	+	+
58	-	-	-	NT	-
59	-	-	- (v)	NT	-
60	-	-	-	NT	-
61	-	-	+4	NT	-
62	-	-	-	NT	-
63	-	-	+4	NT	-
64	-	-	-	NT	-
65	-	-	-	NT	-
66	-	-	+4	NT	-
67	-	-	+2	NT	-
68	-	-	-	NT	-
69	-	-	-	NT	-
70	-	-	-	NT	-
71	-	-	-	NT	-
72	-	-	+4 (v)	NT	-
73	-	-	-	NT	-
74	+	+	- (v)	+	+
75	+	+	-	+	-
76	-	-	+1	NT	-
77	-	-	-	-	-
78	-	-	-	NT	-
79	-	-	-	NT	-
80	-	-	+4	NT	-
81		-	-	NT	-
82	-	-	-	NT	-
83	-	-	-	NT	-
84	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
85	-	-	-	NT	-
86	-	-	-	NT	-
87	-	-	-	NT	-
88	-	-	-	NT	-
89	-	-	-	NT	-
90	-	-	-	NT	-
91	-	-	-	NT	-
92	-	-	+3	NT	-
93	-	-	-	NT	-
94	-	-	-	NT	-
95	-	-	-	NT	-
96	-	-	-	NT	-
97	-	-	-	NT	-
98	-	-	-	NT	-
99	-	-	+1	NT	-
100	-	-	-	NT	-
101	-	-	-	NT	-
102	-	-	-	NT	-
103	-	-	-	NT	-
104	-	-	+3	NT	-
105	-	-	+4	NT	-
106	-	-	+1	NT	-
107	-	-	-	NT	-
108	-	+	-	+	+
109	-	-	+3	NT	-
110	-	-	-	NT	-
111	-	+	-	+	-
112	-	-	-	NT	-
113	-	-	+2	NT	-
114	-	-	-	NT	-
115	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
116	-	-	+1	NT	-
117	-	-	-	NT	-
118	-	-	-	NT	+
119	-	-	-	NT	-
120	-	-	-	NT	-
121	-	-	+1	NT	-
122	-	-	-	NT	-
123	-	-	+3	NT	-
124	-	-	+1	NT	-
125	-	-	-	NT	-
126	-	-	-	NT	-
127	-	-	-	NT	-
128	-	-	-	NT	-
129	-	-	-	NT	-
130	-	-	-	NT	-
131	-	-	-	NT	-
132	-	-	+2	NT	-
133	-	-	+4	NT	-
134	-	-	-	NT	-
135	-	-	-	NT	-
136	-	-	-	NT	-
137	-	-	+4	NT	-
138	-	-	-	NT	-
139	-	-	-	NT	-
140	-	+	-	-	+
141	-	-	-	NT	-
142	-	-	+2	NT	-
143	-	-	-	NT	+
144	-	-	-	NT	-
145	-	-	+1	NT	-
146	-	-	+4	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
147	-	-	-	NT	-
148	-	-	-	NT	-
149	-	-	+4	NT	-
150	-	-	+1	NT	-
151	-	-	-	NT	-
152	-	-	+1	NT	-
153	-	-	-	NT	-
154	-	-	-	NT	-
155	-	-	+2	NT	-
156	-	-	-	NT	-
157	-	-	-	NT	-
158	-	-	+3	NT	-
159	-	-	+4	NT	-
160	-	-	-	NT	-
161	-	-	+4	NT	-
162	-	-	+4	NT	-
163	-	-	-	NT	-
164	-	-	+2	NT	-
165	-	-	+1	NT	-
166	-	-	+3	NT	+
167	-	-	+4	NT	-
168	-	-	-	NT	-
169	-	-	+1	NT	-
170	-	-	+4	NT	-
171	-	-	-	NT	-
172	-	-	+2	NT	-
173	-	-	-	NT	-
174	-	-	-	NT	-
175	-	-	+3	NT	-
176	-	-	-	NT	-
177	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
178	-	-	+1	NT	-
179	-	-	-	NT	-
180	-	-	-	NT	-
181	-	-	-	NT	-
182	-	-	+3	NT	-
183	-	-	-	NT	-
184	-	-	+4	NT	-
185	-	-	+2	NT	-
186	-	-	-	NT	-
187	-	-	-	NT	-
188	-	-	-	NT	-
189	-	-	+1	NT	-
190	-	-	-	NT	-
191	-	-	-	NT	-
192	-	-	-	NT	-
193	-	-	-	NT	-
194	-	-	-	NT	-
195	-	-	-	NT	-
196	-	-	-	NT	-
197	-	+	-	+	-
198	-	-	-	NT	-
199	-	-	-	NT	-
200	-	-	-	NT	-
201	-	-	+4	NT	-
202	-	-	-	NT	-
203	-	-	-	NT	-
204	-	-	-	NT	-
205	-	-	-	NT	-
206	+	+	-	+	+
207	-	-	+2	NT	-
208	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
209	-	-	+4	NT	+
210	-	-	+1	NT	-
211	-	-	+4	NT	-
212	-	-	-	NT	-
213	-	-	-	NT	-
214	-	-	+1	NT	-
215	-	-	-	NT	-
216	-	-	-	NT	-
217	-	-	+4	NT	-
218	-	-	+3	NT	-
219	-	-	-	NT	-
220	-	-	+3	NT	-
221	-	-	-	NT	-
222	-	-	-	NT	-
223	-	-	-	NT	-
224	-	-	-	NT	-
225	-	-	-	NT	-
226	-	-	+4	NT	-
227	-	-	+3	NT	-
228	-	-	+1	NT	-
229	-	-	+4	NT	-
230	-	-	-	NT	-
231	-	+	-	-	-
232	-	-	-	NT	-
233	-	-	-	NT	-
234	-	-	-	NT	-
235	-	-	+4	NT	-
236	-	-	+4	NT	-
237	-	-	+3 (v)	NT	-
238	-	-	-	NT	-
239	-	+	-	-	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
240	-	+	-	-	-
241	-	-	-	NT	-
242	-	+	-	-	-
243	-	+	-	-	+
244	-	-	+1	NT	-
245	-	-	-	NT	-
246	-	-	-	NT	-
247	-	-	+3	NT	-
248	-	-	-	NT	-
249	-	-	+1	NT	-
250	-	-	+2	NT	-
251	-	-	-	NT	-
252	-	-	-	NT	-
253	-	-	-	NT	-
254	-	-	+1	NT	-
255	-	-	+2	NT	-
256	-	-	-	NT	-
257	-	-	-	NT	-
258	-	-	+4	NT	-
259	-	-	+1	NT	-
260	-	-	-	NT	-
261	-	-	+4	NT	-
262	-	-	+2	NT	-
263	-	-	+1	NT	-
264	-	-	-	NT	-
265	-	-	-	NT	-
266	-	-	+3	NT	-
267	-	-	+4	NT	-
268	-	-	-	NT	-
269	-	-	-	NT	+
270	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
271	-	-	+2	NT	-
272	-	-	+1	NT	-
273	-	+	+1	+	-
274	-	-	-	NT	-
275	-	-	-	NT	-
276	-	-	+1	NT	-
277	-	-	+3	NT	-
278	-	-	-	NT	-
279	-	-	-	NT	-
280	-	-	-	NT	-
281	-	-	-	NT	-
282	-	-	+4	NT	-
283	-	-	-	NT	-
284	-	-	+2	NT	-
285	-	-	+1	NT	-
286	-	-	-	NT	-
287	-	-	+4	NT	-
288	-	-	+1	NT	-
289	-	-	+1	NT	-
290	-	-	-	NT	-
291	-	-	+1	NT	-
292	-	-	-	NT	-
293	-	-	+1	NT	-
294	-	-	-	NT	-
295	-	-	-	NT	-
296	-	-	+4	NT	-
297	+	+	-	+	+
298	-	-	+1	NT	-
299	-	-	+1	NT	-
300	-	-	-	NT	-
301	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
302	-	-	-	NT	-
303	-	-	+3	NT	-
304	-	-	-	NT	-
305	+	-	-	+	+
306	-	-	-	NT	-
307	+	-	-	+	+
308	-	-	+1	NT	-
309	-	-	+3 (v)	NT	-
310	-	-	+4	NT	-
311	-	-	-	NT	-
312	+	+	-	+	+
313	-	-	-	NT	-
314	-	-	-	NT	-
315	-	-	+4	NT	-
316	-	-	-	NT	-
317	-	-	-	NT	-
318	-	-	+4	NT	-
319	-	-	-	NT	-
320	-	-	-	NT	-
321	-	-	-	NT	-
322	-	-	-	NT	-
323	-	-	-	NT	-
324	-	-	-	NT	-
325	-	-	+4	NT	-
326	-	-	+4	NT	-
327	-	-	+4	NT	-
328	-	-	+1	NT	-
329	-	-	-	NT	-
330	-	-	-	NT	-
331	-	-	-	NT	-
332	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
333	-	-	-	NT	-
334	-	-	+4	NT	-
335	-	-	-	NT	-
336	-	-	-	NT	-
337	-	-	-	NT	-
338	-	-	-	NT	-
339	-	-	+2	NT	-
340	-	-	-	NT	-
341	-	-	-	NT	-
342	-	-	-	NT	-
343	-	-	-	NT	-
344	-	-	+1	NT	-
345	-	-	-	NT	-
346	-	-	-	NT	-
347	-	-	-	NT	-
348	-	-	+1	NT	-
349	-	-	+1	NT	-
350	-	-	-	NT	-
351	-	-	+3	NT	-
352	-	-	-	NT	-
353	-	-	+2	NT	-
354	-	-	+4	NT	-
355	-	-	-	NT	-
355	-	-	-	NT	-
356	-	-	-	NT	-
357	-	-	-	NT	-
358	-	-	+3	NT	-
359	-	-	+4	NT	-
360	-	-	-	NT	-
361	-	-	+1	NT	-
362	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
363	-	-	+4	NT	-
364	-	-	-	NT	-
366	-	-	-	NT	-
367	-	-	+4	NT	-
368	-	-	+2	NT	-
369	-	-	-	NT	-
370	-	+	-	+	+
371	-	-	-	NT	-
372	-	-	+4	NT	-
373	-	-	-	NT	-
374	-	-	-	NT	-
375	-	-	-	NT	-
376	-	-	-	NT	-
377	-	-	-	NT	-
378	-	-	-	NT	-
379	-	-	+4	NT	-
380	-	-	+3	NT	-
381	-	-	-	NT	-
382	-	-	-	NT	-
383	-	-	+2	NT	-
384	-	-	-	NT	-
385	-	-	-	NT	-
386	-	-	-	NT	-
387	-	-	-	NT	-
388	-	-	-	NT	-
389	-	-	+1	NT	-
390	-	-	-	NT	-
391	-	-	-	NT	-
392	+	+	-	+	+
393	+	+	-	+	+
394	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
395	-	-	-	NT	-
396	-	-	-	NT	-
397	-	-	-	NT	-
398	-	-	-	NT	-
399	-	-	-	NT	-
400	-	-	-	NT	-
401	-	-	-	NT	-
402	-	+	-	+	+
403	-	-	-	NT	-
404	-	-	-	NT	-
405	-	-	-	NT	-
406	-	-	-	NT	-
407	-	-	+2	NT	-
408	-	+	-	-	+
409	-	-	-	NT	-
410	-	-	+4	NT	-
411	-	-	-	NT	-
412	-	-	-	NT	-
413	-	-	-	NT	-
414	-	-	-	NT	-
415	-	-	+4	NT	-
416	-	-	-	NT	-
417	-	-	-	NT	-
418	-	-	-	NT	-
419	-	-	+4	NT	-
420	-	-	-	NT	-
421	-	-	-	NT	+
422	+	+	-	NT	+
423	-	-	-	NT	-
424	-	-	-	NT	-
425	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
426	-	-	-	NT	-
427	-	-	-	NT	-
428	-	-	-	NT	-
429	-	-	+2	NT	-
430	-	-	+2	NT	-
431	-	-	-	NT	-
432	-	-	+3	NT	-
433	-	-	-	NT	-
434	-	-	-	NT	-
435	-	-	-	NT	-
436	-	-	-	NT	-
437	-	-	-	NT	-
438	-	-	-	NT	-
439	-	-	+4	NT	-
440			-	NT	-
441	-	-	+4	NT	-
442	+	-	-	+	+
443	-	-	-	NT	-
444	-	+	-	+	+
445	-	-	-	NT	-
446	-	-	+4	NT	-
447	-	-	-	NT	-
448	-	-	-	NT	-
449	-	-	-	NT	-
450	-	-	-	NT	-
451	-	-	-	NT	-
452	-	-	-	NT	-
453	-	-	-	NT	-
454	-	-	+4	NT	-
455	-	-	-	NT	-
456	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
457	-	+	-	+	+
458	+	+	-	+	+
459	-	-	-	NT	-
460	-	-	+4	NT	-
461	-	-	-	NT	-
462	-	-	-	NT	-
463	-	-	+2	NT	-
464	-	+	-	+	+
465	-	-	-	NT	-
466	-	-	-	NT	-
467	-	-	+3	NT	-
468	-	-	+1	NT	-
469	-	-	+1	NT	-
470	-	-	-	NT	-
471	-	-	+4	NT	-
472	-	-	-	NT	-
473	-	-	+1	NT	-
474	-	-	-	NT	-
475	-	-	-	NT	-
476	-	-	+4	NT	-
477	-	-	+4	NT	-
478	-	-	-	NT	-
479	-	-	-	NT	-
480	-	-	-	NT	-
481	-	-	+4	NT	-
482	-	-	-	NT	-
483	-	-	+2	NT	-
484	-	-	-	NT	-
485	-	-	-	NT	-
486	-	-	-	NT	-
487	-	-	-	NT	-

No. of samples	Seromarkers				
	HBV-DNA	HBs-Ag	anti-HBs	anti-HBc	HBsAg*
488	-	+	+1	+	-
489	-	-	-	NT	-
490	-	-	-	NT	-
491	-	-	-	NT	-
492	-	-	+4	NT	-
493	-	-	-	NT	-
494	-	+	-	-	+
495	-	-	+4	NT	-
496	-	-	-	NT	-
497	-	-	+4	NT	-
498	-	-	+1	NT	-
499	-	-	-	NT	-
500	-	-	-	NT	-
501	-	-	-	NT	-
502	-	-	-	NT	-
503	-	-	-	NT	-
504	-	-	-	NT	-
505	-	-	-	NT	-
506	-	-	-	NT	-
507	-	-	-	NT	-
508	-	-	-	NT	-
509	-	-	-	NT	-
510	-	-	-	NT	-
511	-	-	-	NT	-
512	-	-	-	NT	-

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR กับการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescent immunoassay ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์

HBV-DNA detection	HBsAg detection		Total
	+	-	
+	10	4	14
-	20	478	498
Total	30	482	512

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR กับการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี ELISA ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์

HBV-DNA detection	HBsAg detection		Total
	+	-	
+	13	1	14
-	21	477	498
Total	34	478	512

ตารางที่ 4 ผลของการตรวจหา markers 4 ชนิด (HBV-DNA/PCR, HBsAg/ Chemiluminescence, anti-HBs and anti- HBc/ELISA) ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์

Group	Seromarkers	No. of samples	%
1	DNA^+ $HBsAg^+$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^+$	10	1.95
2	DNA^+ $HBsAg^-$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^+$	4	0.78
3	DNA^- $HBsAg^+$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^+$	10	1.95
4	DNA^- $HBsAg^+$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^-$	10	1.95
5	DNA^- $HBsAg^-$ $Anti\text{-}HBs^+$	161	31.45
6	DNA^- $HBsAg^-$ $Anti\text{-}HBs^-$	317	61.91
Total		512	100

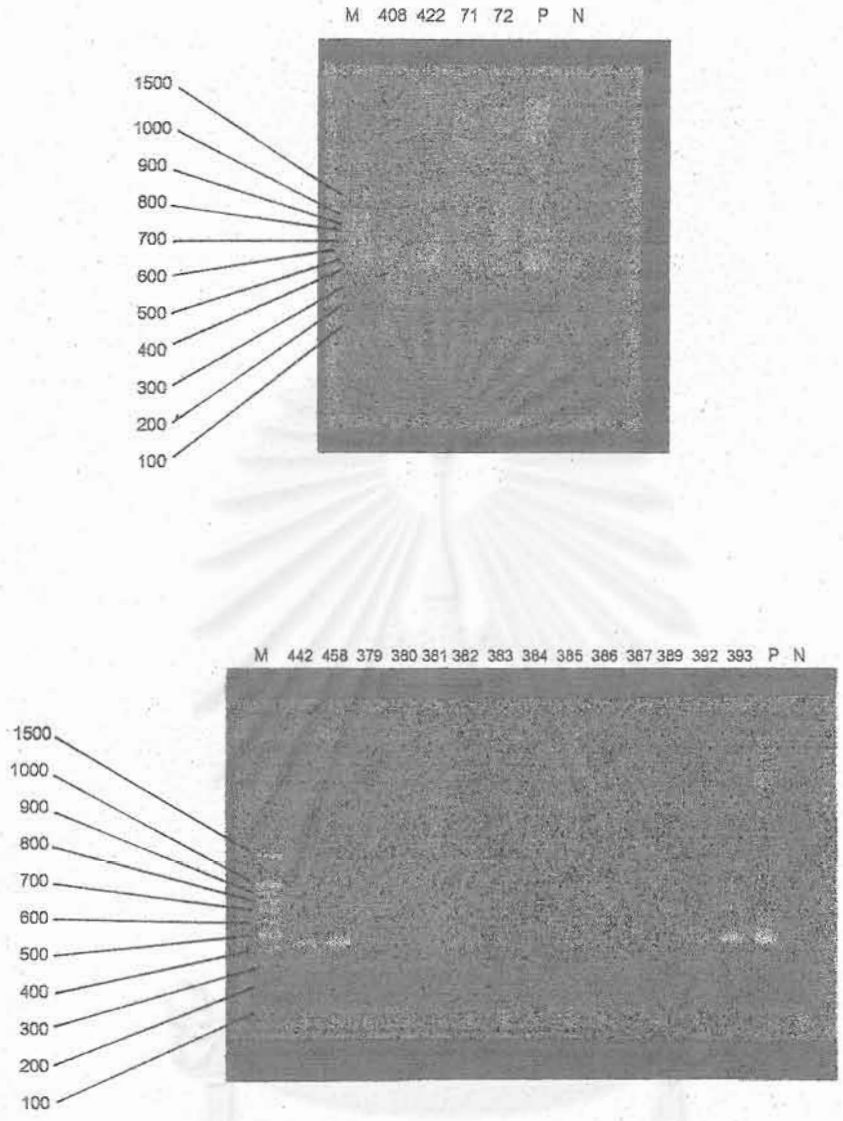
ตารางที่ 5 แสดงผลบวกของการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR และ HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence และ ELISA

HBsAg	HBV-DNA		Total
	+	-	
Chemiluminescence^{+}, ELISA^{+}	9	10	19
Chemiluminescence^{+}, ELISA^{-}	1	8	9
Chemiluminescence^{-}, ELISA^{+}	4	10	14
Total	14	28	42

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างซีรัมหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบี จากจำนวนซีรัมทั้งหมด 512 ตัวอย่าง

Method	Active carrier (samples)	Percent (%)
PCR (HBV-DNA)	14	2.73
Chemiluminescence (HBsAg)	30	5.86
ELISA (HBsAg)	34	6.64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 PCR products แสดง DNA band ขนาด 431 base pairs ที่ตรวจพบ HBV- DNA ในซีรัมหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (M = marker , P = positive control , N = negative control)

การอภิปรายผล

ผลการทดลองการตรวจดีเอ็นเอ (HBV-DNA) ในรูปที่ 1 ภาพบน lane ที่ 1 คือ M เป็น DNA marker ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 100 ถึง 1500 base pairs ใน lane ที่ 2 ถึง lane ที่ 5 เป็นตัวอย่างซีรัมหมายเลข 408, 422, 71 และ 72 ที่นำมาทดสอบหาการติดเชื้อและการเป็นพาหะไวรัสตับอักเสบบีในหญิงตั้งครรภ์ ผลที่ได้ คือ ซีรัมหมายเลข 422 ใน lane ที่ 5 ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เนื่องจาก primer ที่ใช้สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีในซีรัมทำให้มองเห็น DNA band ขนาด 431 base pairs เมื่อย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และส่องดูด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (ความยาวคลื่น 260 nm) ได้ผลตรงกับตำแหน่งของ DNA band ที่เป็น positive control (P) ใน lane ที่ 6 ส่วนซีรัมหมายเลข 408, 71 และ 72 ใน lane ที่ 2, 4 และ 5 ตรวจไม่พบ DNA band ขนาด 431 base pairs เช่นเดียวกับ negative control (N) ใน lane ที่ 7 ในทำนองเดียวกัน ภาพล่างของรูปที่ 1 ตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีในตัวอย่างซีรัมหมายเลข 442, 458, 392 และ 393 ใน lane ที่ 2, 3, 14 และ 15 ซึ่งตรงกับ positive control (P) ใน lane ที่ 16 และตรวจไม่พบดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีในตัวอย่างซีรัมหมายเลข 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387 และ 389 ใน lane ที่ 4 ถึง 13 ซึ่งตรงกับ negative control (N) ใน lane ที่ 17 ตามลำดับ

จากตารางที่ 2 ตัวอย่างซีรัมทั้งหมดที่นำมาทดสอบ 512 ตัวอย่าง แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ตรวจหาแอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบี ด้วยวิธี Chemiluminescence ของ Abbott พบกลุ่มที่เป็นพาหะของโรค ($HBsAg^+$) ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสชนิดนี้ (HBV-DNA) ด้วยวิธี PCR 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.33 สอดคล้องกับการตรวจ HBV-DNA ในเลือดบริจาคด้วยวิธี PCR พบว่ากลุ่มที่มี $HBsAg^+$ ตรวจพบ HBV-DNA เพียงร้อยละ 22 (17) ส่วนในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มี $HBsAg^-$ ซึ่งจากการตรวจของทางโรงพยาบาล ถือว่าเป็นกลุ่มปกติ 482 ตัวอย่าง ตรวจพบ HBV-DNA 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.83

จากตารางที่ 4 แสดงผลการทดลองในการตรวจหา markers 4 ชนิด เพื่อยืนยันผลการทดลองในตารางที่ 2 คือ ตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR, HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence, Anti-HBs และ Anti-HBc ด้วยวิธี ELISA พบว่ากลุ่มที่ 1 (DNA^+ $HBsAg^+$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^+$) มี 10 ตัวอย่างที่ตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี และ HBsAg รวมทั้งตรวจพบ Anti-HBc (ผู้ป่วยกำลังมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หรืออาจหายจากโรคแล้ว ไม่ใช่ภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อ) แต่ตรวจไม่พบ Anti-HBs (ไม่มีภูมิต้านทานต่อไวรัสตับอักเสบบี) แสดงว่าหญิงตั้งครรภ์ทั้ง 10 ราย มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสยังคงแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และอาจมี

การแพร่ระบาดของไวรัสไปยังผู้อื่นได้ กลุ่มที่ 2 (DNA^+ $HBsAg^-$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^+$) เป็นกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มี $HBsAg^-$ ซึ่งจากการตรวจของทางโรงพยาบาล ถือว่าเป็นกลุ่มปกติ ตรวจพบ HBV-DNA 4 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นผลผิดพลาด (false negative) ของการตรวจหา HBsAg เนื่องจากตรวจไม่พบ Anti-HBs แต่พบ Anti-HBc ในซีรัมทั้ง 4 ตัวอย่าง แสดงว่าหญิงตั้งครรภ์ทั้ง 4 ราย ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง อาจเป็นพาหะของโรคและถ่ายทอดไวรัสตับอักเสบบีไปยังบุตรได้ในตอนคลอดหรือในช่วงต้นของการเลี้ยงดูบุตร มีรายงานวิจัยที่พบว่าการระบาดของไวรัสตับอักเสบบีจากมารดาไปสู่บุตรมีอัตราที่สูงประมาณร้อยละ 65-90 โดยเฉพาะในรายที่มารดาเป็นพาหะโดยไม่แสดงอาการแต่ตรวจพบทั้ง HBsAg และ HBeAg ในซีรัม (18) กลุ่มที่ 3 (DNA^- $HBsAg^+$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^+$) และ กลุ่มที่ 4 (DNA^- $HBsAg^+$ $Anti\text{-}HBs^-$ $Anti\text{-}HBc^-$) รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบ $HBsAg^+$ แต่ไม่พบ HBV-DNA ทั้ง 20 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบ Anti-HBs แต่พบ Anti-HBc เพียง 10 ตัวอย่าง แสดงว่าหญิงตั้งครรภ์ทั้ง 20 ราย มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่ที่ตรวจไม่พบ HBV-DNA เนื่องจากไวรัสอาจ integrate เข้าไปรวมอยู่กับ DNA ของเซลล์ตับทำให้ไม่พบ HBV-DNA ในซีรัม (19) และ 10 ตัวอย่างในกลุ่มที่ 4 ที่ตรวจไม่พบ Anti-HBc อาจเนื่องจากผู้ป่วยเพิ่งได้รับเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงยังไม่สร้างแอนติบอดีต่อส่วน core ของอนุภาคไวรัส กลุ่มที่ 5 (DNA^- $HBsAg^-$ $Anti\text{-}HBs^+$) จำนวน 161 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบทั้ง HBV-DNA และ HBsAg แต่พบ Anti-HBs แสดงว่าไม่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี แต่มีภูมิต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ หญิงตั้งครรภ์เหล่านี้อาจเคยเป็นโรคนี้โดยอาจแสดงอาการหรือไม่แสดงอาการและหายป่วยแล้วจึงมีภูมิต้านทานเกิดขึ้น หรือเป็นภูมิต้านทานที่เกิดขึ้นเนื่องจากการฉีดวัคซีนป้องกัน กลุ่มที่ 6 (DNA^- $HBsAg^-$ $Anti\text{-}HBs^-$) จำนวน 317 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบทั้ง HBV-DNA , HBsAg และ Anti-HBs แสดงว่าไม่ได้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไม่มีภูมิต้านทานต่อโรค หญิงตั้งครรภ์ทั้ง 317 รายมีความเสี่ยงในการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ดังนั้นควรฉีดวัคซีนป้องกัน อย่างไรก็ตามซีรัมในกลุ่มที่ 5 และ 6 ไม่ได้ตรวจ Anti-HBc เนื่องจากวัตถุประสงค์ของการตรวจ marker ชนิดนี้ใช้ตรวจยืนยันเฉพาะตัวอย่างซีรัมที่ตรวจพบ HBV-DNA หรือ HBsAg เท่านั้นว่าให้ผลถูกต้องหรือไม่ และเพื่อดูว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อชนิดนี้มาเป็นเวลานานจนอาจกลายเป็นชนิดเรื้อรัง และอีกเหตุผลหนึ่งเนื่องมาจาก test kits มีราคาแพง

ดังนั้นการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR เป็น marker ที่สำคัญอันหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ตรวจไม่พบ HBsAg การตรวจซีรัมทางอิมมิวโนแอสเสย์ด้วยวิธี Chemiluminescence ของ Abbott วิธีนี้มีรายงานว่าสามารถตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี ตัวอย่างเช่น HBsAg, anti – HBc, hepatitis C virus , HIV และไวรัส

อื่นๆ อีกหลายชนิด (12,20) ความไวของ test kits ในการตรวจหา HBsAg มีรายงานกล่าวว่าสามารถตรวจหา subtype ad ได้ 0.1 ng/ml subtype ay ได้ 0.08 ng/ml และ มีความจำเพาะร้อยละ 99.96 แต่การระบาดของไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย มีรายงานว่าพบเฉพาะ subtype ad (adw กับ adr) และไม่พบ subtype ay (21) ซึ่งอาจมีผลต่อการตรวจด้วยวิธี Chemiluminescence และการตรวจหา HBsAg เพียงวิธีเดียวทำให้ไม่สามารถตรวจการติดเชื้อและเป็นพาหะของโรคได้ครบทุกตัวอย่าง หรืออาจมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่ามีความคลาดเคลื่อนของการตรวจซีรัมด้วยวิธีทางอิมมิวโนแอสเสย์ จึงได้มีการทดสอบเปรียบเทียบการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR กับการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี ELISA กับตัวอย่างซีรัมทั้งหมด 512 ตัวอย่าง โดยใช้ test kit ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แสดงผลในตารางที่ 3 พบว่ากลุ่มที่เป็นพาหะของโรค ($HBsAg^+$) ทั้งหมด 34 ตัวอย่าง ตรวจพบ HBV-DNA ได้ 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 38.24 ส่วนอีก 21 ตัวอย่างตรวจไม่พบ HBV-DNA คิดเป็นร้อยละ 61.76 ส่วนในกลุ่มปกติ ($HBsAg^-$) ตรวจพบ HBV-DNA 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.21 แสดงว่า test kits ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์มีความไวค่อนข้างสูง ทำให้ตรวจพบ HBV-DNA ในตัวอย่างซีรัมหญิงตั้งครรภ์ที่เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบีได้เกือบทุกตัวอย่าง แม้ยังมีความผิดพลาดเป็นผลลบลวง (false negative) อยู่บ้าง มีรายงานว่า test kit ชนิดนี้มีความไวร้อยละ 95.1 ความจำเพาะร้อยละ100 ความถูกต้องร้อยละ 97.3 และค่าคาดคะเนบวกร้อยละ 100 (11)

จากตารางที่ 5 ผลการทดลองแสดงการตรวจพบ HBV-DNA ในซีรัมด้วยวิธี PCR กลุ่มแรกให้ผลบวกตรงกับการตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence และวิธี ELISA ($HBV\text{-}DNA^+$, $Chemiluminescence^+$, $ELISA^+$) มีจำนวน 9 ตัวอย่าง และ ตรวจไม่พบ HBV-DNA แต่ตรวจพบ HBsAg ในซีรัมทั้งสองวิธี ($HBV\text{-}DNA^-$, $Chemiluminescence^+$, $ELISA^+$) มีจำนวน 10 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 2 ตรวจพบ HBV-DNA และ HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence ($HBV\text{-}DNA^+$, $Chemiluminescence^+$, $ELISA^-$) จำนวน 1 ตัวอย่าง กลุ่มที่ 3 ตรวจพบ HBV-DNA และ HBsAg ด้วยวิธี ELISA ($HBV\text{-}DNA^+$, $Chemiluminescence^-$, $ELISA^+$) จำนวน 4 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าความไวของการตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีของแต่ละวิธีมีความแตกต่างกัน และความถูกต้องแตกต่างกันด้วย ดังนั้นการตรวจกรองหาไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเพียงวิธีเดียว จึงอาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 ทำให้ทราบว่าหญิงตั้งครรภ์ที่ฝากครรภ์กับโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เป็นพาหะของไวรัสตับอักเสบบีเมื่อตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR พบ 14 ราย คิดเป็น

ร้อยละ 2.73 เมื่อตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence และ ELISA พบ 30 ราย และ 34 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.86 และ 6.64 ตามลำดับ แสดงว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการระบาดของไวรัสตับอักเสบบีอยู่ในระดับค่อนข้างสูง (9,18) สอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่าการแพร่กระจายของไวรัสตับอักเสบบีจากมารดาไปสู่บุตรพบได้ในอัตราที่สูง โดยเฉพาะมารดาที่เป็นพาหะของโรคแต่ไม่แสดงอาการ และตรวจพบ HBsAg ในเลือด อัตราการติดเชื้อในทารกจะเพิ่มสูงถึงร้อยละ 65-90 ถ้ามารดาตรวจพบ HBeAg ในเลือดด้วย (18) นอกจากนั้นมารดาที่ตรวจพบ HBV-DNA มากกว่า 0.05 µl ในซีรัม 150 µl จะมีการถ่ายทอดไวรัสไปยังบุตรได้มากขึ้น ดังนั้น HBV-DNA สามารถใช้เป็น marker ที่สำคัญนอกเหนือจาก HBeAg (22) ดังนั้นถ้าเราสามารถตรวจกรองพบการติดเชื้อและการเป็นพาหะของโรคได้ถูกต้องแม่นยำแต่เนิ่นๆในหญิงตั้งครรภ์ จะช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของโรคจากมารดาไปสู่บุตร หรือสมาชิกคนอื่นๆในครอบครัวได้

จากการทำแบบสอบถามหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ส่วนใหญ่ไม่เคยตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีมาก่อนตั้งครรภ์ มีเพียง 8 รายจาก 512 ราย ที่เคยฉีดวัคซีนป้องกันโรคตับอักเสบบี คิดเป็นร้อยละ 1.56 และตรวจพบว่ามีภูมิต้านทาน (Anti-HBs) เกิดขึ้นเพียง 5 ราย และไม่มีภูมิต้านทาน 3 ราย ใน 3 รายนี้ 1 รายฉีดวัคซีนมานานกว่า 5 ปี ส่วน 2 ราย ฉีดวัคซีนในปี 2541 และ 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อสรุป

จากการทดสอบตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี Chemiluminescence ของ Abbott ทั้งหมด 512 ตัวอย่าง พบกลุ่มที่เป็นพาหะของโรคมี $HBsAg^+$ ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ในกลุ่มนี้ตรวจพบ HBV-DNA 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.33 และทั้ง 10 ตัวอย่างนี้ตรวจพบ Anti-HBc และตรวจไม่พบ Anti-HBs ทุกตัวอย่าง ส่วนอีก 20 ตัวอย่างซึ่งตรวจพบ HBsAg แต่ไม่พบ HBV-DNA คิดเป็นร้อยละ 65.52 และทั้ง 20 ตัวอย่างตรวจไม่พบ Anti-HBs แต่พบ Anti-HBc 10 ตัวอย่าง ส่วนอีก 10 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบ Anti-HBc ส่วนในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่มี $HBsAg^-$ ซึ่งเป็นกลุ่มปกติ 482 ตัวอย่าง ตรวจพบ HBV-DNA 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.83 ทั้งสี่ตัวอย่างตรวจพบ Anti-HBc และไม่พบ Anti-HBs แสดงว่าทั้งสี่ตัวอย่างนี้อาจติดเชื้อแบบเรื้อรังและอาจเป็นพาหะของโรค และถ่ายทอดไปยังบุตรได้ นอกจากนั้นได้มีการตรวจเปรียบเทียบวิธี PCR กับวิธี ELISA พบกลุ่มที่เป็นพาหะของโรค ($HBsAg^+$) ทั้งหมด 34 ตัวอย่าง ตรวจพบ HBV-DNA 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 38.24 ส่วนอีก 21 ตัวอย่างตรวจพบ HBsAg แต่ตรวจไม่พบ HBV-DNA คิดเป็นร้อยละ 61.76 ในกลุ่มปกติ ($HBsAg^-$) ตรวจพบ HBV-DNA 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.21 แสดงว่า test kits ที่ใช้ตรวจหา HBsAg โดยวิธี ELISA ซึ่งพัฒนาโดยกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีความไวในการตรวจค่อนข้างดี อย่างไรก็ตามแม้ว่าวิธี PCR ไม่สามารถทดแทนวิธีตรวจแบบดั้งเดิมคือวิธีทางอิมมิวโนแอสเสย์ได้ เนื่องจากเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ดีเอ็นเอของไวรัสอาจเข้าไปรวมกับดีเอ็นเอของเซลล์ตับทำให้ไม่สามารถตรวจพบดีเอ็นเอในซีรัมได้ แต่พอสรุปได้ว่าการตรวจหา HBV-DNA ด้วยวิธี PCR เป็น marker ที่สำคัญอีกทางหนึ่งที่มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่ดี โดยเฉพาะในกรณีที่ตรวจไม่พบ HBsAg ด้วยวิธีอิมมิวโนแอสเสย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นได้ว่า การตรวจสอบหาไวรัสตับอักเสบบีทั้งสามวิธีมีความไว, ความจำเพาะ, ความถูกต้อง และข้อจำกัดของแต่ละวิธีที่แตกต่างกัน เช่น การตรวจหา HBsAg ด้วยวิธี Chemiluminescence แม้ค่าตรวจมีราคาถูก ประมาณ 30 บาทต่อตัวอย่าง แต่การตรวจต้องตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติที่มีราคาแพง และควรมีตัวอย่างตรวจปริมาณมากพอสมควร (1500 ตัวอย่างขึ้นไปต่อวัน) จึงคุ้มค่ากับการใช้ชุดน้ำยาทดสอบ (reagents) ในแต่ละครั้ง เพราะน้ำยาส่วนที่เหลือใช้ต้องทิ้งไปไม่สามารถเก็บไว้ได้ ถ้าตัวอย่างตรวจมีไม่มากการตรวจด้วยวิธี ELISA ก็เหมาะสม เพราะสามารถทดสอบได้คุ้มทุนไม่ว่าจะมีตัวอย่างทดสอบมากหรือน้อย (test kit 1 อัน มี 96 หลุม ทดสอบได้ประมาณ 90 ตัวอย่าง) สามารถแบ่งทดสอบได้ตามจำนวนตัวอย่าง และเก็บส่วนที่เหลือไว้ในตู้เย็นได้ประมาณ 1 ถึง 2 วัน โดยผลทดสอบยังคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 7 แสดงราคาค่าตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีหรือการเป็นพาหะของโรค ด้วยการตรวจ HBsAg ด้วยวิธีอิมมิวโนแอสเสย์ และ PCR

วิธีตรวจ	ราคา/ test kit	ราคา/ตัวอย่าง (บาท)
Chemiluminescence	-	30
commercial ELISA	4,500	50
developed ELISA	2,800	32
PCR	-	150

เนื่องจากราคา test kits ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศมีราคาแพง (ตัวอย่าง เช่น test kits ของ Sanofi Pasteur ค่าตรวจประมาณ 50 บาทต่อตัวอย่าง) ดังนั้นถ้าสามารถใช้ test kit ที่ผลิตขึ้นเองภายในประเทศที่มีราคาถูกกว่า (ประมาณ 32 บาทต่อตัวอย่าง) เพราะมีคุณภาพใกล้เคียงกันน่าจะคุ้มค่ากว่า และเงินไม่รั่วไหลออกนอกประเทศ กล่าวได้ว่าการตรวจกรองหาไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเพียงวิธีเดียวอาจมีข้อผิดพลาดได้ การตรวจด้วยวิธี PCR จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากมีความไวที่ดีแม้มีราคาค่าตรวจค่อนข้างสูงกว่าวิธีอื่น (ประมาณ 150 บาทต่อตัวอย่าง) และถ้าได้มีการปรับปรุงให้เทคนิคนี้มีความไวเพิ่มขึ้น จะเป็นผลดีกับการตรวจกรองไวรัส และสามารถใช้ควบคู่ไปกับการทดสอบทางอิมมูโนแอสเสย์ เพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจได้ผลลบลวง (false

negative) เป็นการลดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากมารดาไปยังบุตร อันจะเป็นผลดีต่อสุขภาพของประชาชนในระยะยาว

.....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

1. Meddrey WC. Hepatitis B : An important public health issue . J Med Virol. 2000, 61:362-366.
2. Pramoolsinsap C., Sumanop K., Busagorn N. and Kurathong S. Prevalence an outcomes of HBV and anti-HCV sero positive patients with chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. Southeast Asian J Trop Med Pub Hlth. 1992 , 23 : 6 –14.
3. พิไลพันธุ์ พุธวัฒนะ และ ชโลบล อยู่สุข. ไวรัสตับอักเสบ. มหาวิทยาลัยมหิดล. 2536 โรงพิมพ์อักษรสมัย กรุงเทพฯ.
4. Beasley RP. and Hwang LY. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In:Vyas GN. Dienstag JL, Hoofnagle JH,eds. Viral Hepatitis and Liver Disease. Orlando:Grune and Stratton 1984, p. 209.
5. Alter M. Epidemiology and disease burden of hepatitis B and C. Antiviral Ther (Suppl) 1996, 3 : 9-15.
6. Mast EE. And Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis : an overview. Semen Viral. 1993 ,4 : 273-283.
7. Hunt CM. and Sharara AI. Liver disease in pregnancy. Am Fam Physician. 1999 , 59 (4) : 823-836.
8. Balan A., Beldescu N. and Popa R. The prevalence of viral hepatitis B in pregnant women in area of southern Romania. Bacteriol Virusol Parazitol Epidermiol. 1998, 43 (4) : 254-260.
9. Anonymous. Hepatitis B. http://www.md.chula.ac.th/public/medinfo/hepatitis/hepatitis_B_virus.html.
10. Chang MH., Chen CT., Lai MS., Hsu HM., et al. For Taiwan childhood hepatoma study group. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellularcarcinoma in children. N Engl J Med. 1997 , 336 : 1855-1859.
11. นงลักษณ์ พุทธิรักษ์กุล ประยุทธ์ พุทธิรักษ์กุล เครือวัลย์ พลจันทร์ และ สุทธิโชค จงตระกูลศิริ. การพัฒนาวิธีเอนไซม์อิมมูโนแอสเสย์ขั้นตอนเดียวเพื่อตรวจหาแอนติเจนชนิด

ผิวของไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์. 2543. 14 (1) : 19-26.

12. Khalil OS., Zurek TF., Tryba J., Hanna CF., Holler R., and Pepe C. abbott prism : a multichannel heterogeneous chemiluminescence immunoassay analyzer. Clin Chem. 1991, 37 (9) : 1540-7.
13. Aach RD. and Kahn RA. Posttransfusion hepatitis : current perspectives. Ann. Intern. Med. 1980, 92 : 539-546.
14. Alter HJ., Holland PV. and Purcell RH. Current status of posttransfusion hepatitis. Pathobiol. Annu. 1980, 10 : 135-156.
15. Kekesi Z., Nika M. and Mikata J. Experience with the screening of pregnant women for hepatitis B virus .and .the .vertical .transmission of the virus. Orv Hetil. 1993 ,134 (28) : 1515-1520.
16. ปนัดดา เทพอัคศร เครือวัลย์ พลจันทร กษมา สุภนรานนท์ และ นรินทร์ หอยสังข์. การพัฒนาการตรวจหาแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดผิวของไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA). วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2540. 39 (3) :173-178.
17. เครือวัลย์ พลจันทร เดือนถนอม ถาวรนันท์ เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ และ คณะ. การตรวจดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีในเลือดบริจาคโดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2537. 36 (3) : 145-152.
18. ยง ภู่วรวรรณ. ไวรัสตับอักเสบและการป้องกัน. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์ กรุงเทพฯ 2533 : 19320.
19. Okada K., Kamiyama ., Inomata M., et al. e Antigen and anti – e in the serum of asymtomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. N Eng J Med 1976, 294 : 746-749.
20. Cheng Y., Dubovoy N., Hayes- Rogers ME., Stewart J. and Shah D. Detection of IgM to hepatitis B core antigen in a reductant containing chemiluminescence assay. J. Immunol – Methods. 1999, 230 (1-2) : 29-35.

21. Duanthanorm T., Kruavon B., Jittapom W., Chuenchit B., Paichit W., Jakkiss B., et al. Subtyping of hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction. J. Sci. Thailand . 1994 ,20 : 115-124.

22. นวลฉวี เวชประสิทธิ์ พิกุล ไหลศุภสิน เครือวัลย์ พลจันทร นงลักษณ์ พุทธิรักษ์ และจักรกฤษณ์ ภูมิสวัสดิ์. วารสารเทคนิคการแพทย์. 2539, 24(1) : 35-42.

23. Corranno JE. Perinatal hepatitis B : update & recommendations. MCN Am J Matem Child Nurs. 1998 , 23 (5) : 246 - 52 quiz 253.

24. Duarte G., Mussi - Pinhata MM., Martinez R., et al. Frequency of pregnant HBsAg carriers in a Brazilian community. Bol Ofina Sanit Panam. 1996,120(3) : 189-197.

25. Margolis HS., Alter JH., Hadler SC. Hepatitis B : evolving epidemiology and implications for control . Semin Liver Dis. 1991, 11 : 84-92.

26. Maynard JE. Hepatitis B : global importance and need for control. Vaccine 8 (Suppl) 1990 , S18-S20.

27. Michielsen PP. and Van Damme P. Viral hepatitis and pregnancy. Acta Gastroenteral Beig. 1999 , 62 (1) : 21-29.

28. Zuckerman AJ. More than third of world's population has been infected with hepatitis B virus (Letter). Br Med J. 1999 , 318 :1213.

29. Thawaranantha D., Balachandra K., Watanaseree J., Boonchird C., et al. Subtyping of Thai Hepatitis B virus DNA by polymerase chain reaction.J. Sci. Soc.Thailand, 1994 ; 20 : 115-124.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. การเตรียม Ethidium bromide solution

   ชั่ง Ethidium bromide 1 กรัม ละลายน้ำ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม Phenol solution

   2.1 เก็บ Phenol ที่ -20 °ซ ละลายที่อุณหภูมิห้องแล้วอุ่นที่ 68 °ซ hydroxyquinoline จนความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1% สารประกอบนี้เป็น antioxidant บางส่วนยับยั้ง Rnase และเป็น chelator ของอิออนโลหะอย่างอ่อน เมื่อรวมกับ Phenol จะเกิดสีเหลืองทำให้สะดวกที่จะจัดจำแนก organic phase

   2.2 เติมบัฟเฟอร์ (0.5 M Tris .Cl pH 8.0) ลงไปปริมาตรเท่ากันที่อุณหภูมิห้องใช้ magnetic stirrer คนตลอดเวลาให้ละลาย แยกเอาส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของ aqueous phase ออกโดยใช้ pipette ต่อกับ vacuum line

   2.3 เติม 0.1 M Tris .Cl pH 8.0 ลงในสารละลาย Phenol คนให้ผสมกันด้วย magnetic stirrer นาน 15 นาที หยุดปั่น แยกส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของ aqueous phase ออก ใช้วิธีเดียวกับข้อ 2.2 สกัดซ้ำจน pH > 7.8 วัดด้วย pH paper

   2.4. หลังจาก Phenol ถูก equilibrate แล้ว แยกเอาส่วน aqueous phase ออกจนหมด เติม 0.1 M Tris .Cl pH 8.0 ซึ่งมี mercaptoethanol 0.2 % ปริมาตร 0.1 เท่าลงไป เก็บสารละลาย Phenol ในขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นานกว่า 1 เดือน

3. การเตรียม TAE buffer (stock 10x)

Tris base	48.44	กรัม
EDTA	3.72	กรัม

   เติม H_2O จนครบ 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย glacial acetic acid

4. การเตรียม loading buffer

Bromphenol blue	0.25 %
Glycerol (ผ่านการ autoclave แล้ว)	30 %

   เก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ