

การตรวจหา ดี เอ็น เอ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ บี ในกลุ่มผู้ป่วย
โรคตับอักเสบ บี ชนิดเรื้อรัง และกลุ่มผู้ไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน
ไวรัสตับอักเสบ บี โดยวิธีการเพิ่มจำนวน ดี เอ็น เอ ในหลอดทดลอง



นาย บรรยง คันธวะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-633-8

ลิขสิทธิ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕1๖๙1๖๓๙5

DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS IN HBs Ag - NEGATIVE
EX - CHRONIC CARRIERS AND NON - RESPONDERS TO
HEPATITIS B VACCINE BY NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION

MR BANYONG FHANTAWA

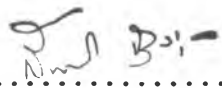
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
INTER - DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1995

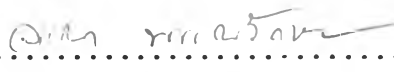
ISBN 974-631-633-8


หัวข้อวิทยานิพนธ์ การตรวจหา ดี เอ็น เอ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในกลุ่มผู้ป่วย
โรคตับอักเสบบี ชนิดเรื้อรัง และกลุ่มผู้ไม่ตอบสนองต่อการฉีดวัคซีน
ไวรัสตับอักเสบบี โดยวิธีการเพิ่มจำนวน ดี เอ็น เอ ในหลอดทดลอง
โดย นาย บรรยง คันธวะ
ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ประพันธ์ ภาณุภาค

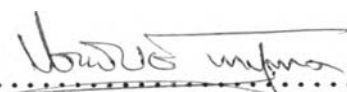
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
การศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วรณา นรรณรักษา)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ประพันธ์ ภาณุภาค)

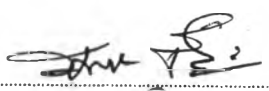
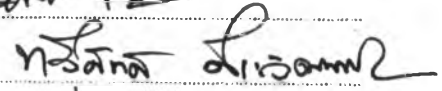
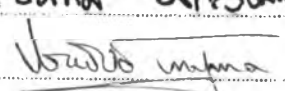

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง กุ้ววรรณ)

C346715 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION / HEPATITIS B VIRUS

BANYONG KHANTAWA : DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS IN HBs Ag-NEGATIVE EX-CHRONIC CARRIERS AND NON-RESPONDERS TO HEPATITIS B VACCINE BY NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR : THAWEESAK TIRAWATNAPONG, Ph.D. 68 pp. ISBN 974-631-633-8

In this study, we have developed a new rapid procedure for the detection of serum hepatitis B virus (HBV) DNA by using the One-step Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Because of the important problem of conventional PCR is the contamination of the PCR product due to the opening of the reaction tube. This problem can be overcome by using one-step nested PCR. The outer primers and the inner primers are all present in the same initial reaction tube, but physically separated by placing the inner primers inside the of the reaction tube. After completion of the first step PCR, the inner primers are forced down to the reaction mixture by centrifugation. The second step PCR is performed with the same thermal profile without opening the reaction tube. One-step nested PCR can be used to obtain semiquantitative information of target DNA

We have used the one - step nested PCR for the detection of HBV DNA in sera of persons who failed to produce antibodies to hepatitis b surface antigen after receiving the hepatitis B vaccine (non - responders). The non-responders were divided into two groups. The first group is the healthy persons and the second group is the ex - chronic carriers. 3 of 9 subjects (33.3%) of the first group and 6 of 12 subjects (50%) of the second group were positive for HBV DNA in their sera. Since all of the HBV DNA - positive non - responders were negative for HBs Ag, thus, these results may suggest that the nonresponsiveness to hepatitis B vaccine is due to low dose immunotolerance.

| | | |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| ภาควิชา..... | ลายมือชื่อนิสิต..... |  |
| สาขาวิชา..... | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... |  |
| ปีการศึกษา..... 2537 | ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... |  |



กิตติกรรมประกาศ

งานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณและขอบคุณทุกท่านผู้มีรายนามต่อไปนี้

อาจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแนวทางในการศึกษาวิจัยตลอดจนช่วยแก้ไขอุปสรรคและปัญหาต่างๆ ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความเมตตากรุณาเป็นอย่างยิ่ง

ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. ประพันธ์ ภาณุภาค ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สมใจ เจริญประยูร หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสำคัญกับงานวิทยานิพนธ์ และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมหญิง ธัมวาสร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุญาตให้ใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการอันทำให้การศึกษาวิจัย สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นักวิทยาศาสตร์ และ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่าง ๆ

คุณ ชวนพิศ อธิธรรมะ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์การแพทย์ งานปฏิบัติการกลาง และชั้นสูตรโรค โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการพิมพ์วิทยานิพนธ์ ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ และเป็นกำลัง ให้ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

| | |
|--------------------------------------------------|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ข |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ค |
| รายการตารางประกอบ..... | ง |
| รายการรูปประกอบ..... | จ |
| คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์..... | ฉ |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ..... | 1 |
| วัตถุประสงค์..... | 3 |
| 2. การสำรวจเอกสาร | |
| ประวัติและความเป็นมาของโรคไวรัสตับอักเสบ บี..... | 4 |
| ชีววิทยาของไวรัสตับอักเสบ บี..... | 5 |
| วงจรชีวิต..... | 8 |
| ระบาดวิทยา..... | 9 |
| การป้องกันและการรักษา..... | 9 |
| การติดต่อ..... | 12 |
| การตรวจทางห้องปฏิบัติการ..... | 12 |
| 3. วัสดุและวิธีการ | |
| การคัดเลือกกลุ่มตัวอย่าง..... | 16 |
| วิธีการเก็บตัวอย่าง..... | 17 |

| | |
|------------------------------------------------------|----|
| วิธีการตรวจทางน้ำเหลือง..... | 17 |
| การสกัด DNA..... | 17 |
| Oligonucleotide primers..... | 18 |
| Amplification of HBV DNA..... | 19 |
| Agarose gel electrophoresis..... | 21 |
| 4. ผลการทดลอง | |
| ผลการตรวจหา HBV DNA ด้วยขบวนการ PCR โดยใช้ | |
| Outer primer..... | 23 |
| ผลการตรวจหา HBV DNA ด้วยขบวนการ PCR โดยใช้ | |
| inner primer..... | 26 |
| ผลการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี Two-step nested PCR..... | 28 |
| ผลการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One-step nested PCR..... | 31 |
| ผลการเปรียบเทียบ sensitivity ระหว่างวิธี One-step | |
| nested PCR และวิธี Two-step nested PCR..... | 32 |
| ผลของ DNA fragment ขนาดต่างๆ ที่เกิดจากขบวนการ PCR | |
| โดยการสลับคู่ของ primer..... | 35 |
| ผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่มบุคคล HBsAg negative | |
| control และ HBsAg positive control โดยวิธี | |
| One-step nested PCR..... | 38 |
| ผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม HBs Ag-negative | |
| ex-chronic carrier โดยวิธี One-step nested PCR..... | 39 |
| ผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่ม hepatitis B vaccine | |
| non-responder โดยวิธี One-step nested PCR..... | 39 |
| 5. วิจารณ์ และ สรุปผลการทดลอง..... | 40 |

| | |
|----------------------|----|
| เอกสารอ้างอิง..... | 45 |
| ภาคผนวก ก..... | 60 |
| ข..... | 64 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 68 |

รายการตารางประกอบ

ตารางที่

หน้า

ตารางแสดงผลการตรวจหา HBV DNA ในกลุ่มบุคคล HBsAg

negative control และ HBsAg positive control

โดยวิธี One-step nested PCR.....38



รายการรูปประกอบ

รูปที่


หน้า

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 แสดง Hepatitis B virus genome..... | 7 |
| 2.2 แสดงวงจรชีวิตของไวรัสตับอักเสบบี..... | 10 |
| 3.1 วิธีการทำ One-step nested PCR..... | 22 |
| 4.1 แสดง HBV genome และตำแหน่งของ external primer และ internal primer..... | 24 |
| 4.2 แสดง DNA fragment ขนาด 541 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน HBV DNA โดยใช้ outer primer..... | 25 |
| 4.3 แสดง DNA fragment ขนาด 256 bp ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน HBV DNA โดยใช้ inner primer..... | 27 |
| 4.4 First step PCR แสดง DNA fragment ขนาด 541 bp..... | 29 |
| 4.5 Nested PCR แสดง DNA fragment ขนาด 265 bp..... | 30 |
| 4.6 แสดง DNA fragment ที่ได้จากขบวนการ One-step nested PCR...31 | |
| 4.7 แสดงการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี Two-step nested PCR..... | 33 |
| 4.8 แสดงการตรวจหา HBV DNA โดยวิธี One-step nested PCR..... | 34 |
| 4.9 ภาพแสดง DNA fragment ขนาดต่างๆ ที่เกิดจาก ขบวนการ PCR โดยการสลับลูกของ primer..... | 36 |
| 4.10 แสดง DNA fragment ขนาดต่างๆ ที่เกิดจาก ขบวนการ PCR โดยการสลับลูกของ primer..... | 37 |



คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

| | | |
|------------|---|----------------------------------|
| ช. | = | องศาเซลเซียส |
| มก. | = | มิลลิกรัม |
| มล. | = | มิลลิลิตร |
| anti - HBc | = | Hepatitis B core antibodies |
| anti - HBe | = | Hepatitis B e antibodies |
| anti - HBs | = | Hepatitis B surface antibodies |
| bp | = | base pair |
| DNA | = | Deoxyribonucleic acid |
| dATP | = | Deoxyadenosine 5 - triphosphate |
| dCTP | = | Deoxycytidine 5 - triphosphate |
| dGTP | = | Deoxyguanosine 5 - triphosphate |
| dTTP | = | Deoxythymidine 5 - triphosphate |
| dNTP | = | Deixynucleotide 5 - triphosphate |
| EDTA | = | Ethylenediamine tetraacetic acid |
| g | = | gram |
| HBe Ag | = | Hepatitis B e antigen |
| HBs Ag | = | Hepatitis B surface antigen |
| HBV | = | Hepatitis B virus |
| HLA | = | Human leucocyte antigen |
| Kb | = | Kilobase |
| L | = | Liter |
| M | = | Morarity |
| mg | = | Milligram |



| | | |
|-------------------|---|----------------------------------------|
| MgCl ₂ | = | Magnesium chloride |
| ml | = | millilitre |
| mM | = | Millimolar |
| MW | = | Molecular weight |
| NaCl | = | Sodium chloride |
| NaOH | = | Sodium hydroxide |
| ng | = | Nanogram |
| nm | = | Nanometer |
| NSS | = | Normal saline solution |
| O.D. | = | Optical density |
| PCR | = | Polymerase chain reaction |
| pmole | = | Picomole |
| RNA | = | Ribonucleic acid |
| RPM | = | Revolutions per minute |
| SDS | = | Sodium dodecyl sulfate |
| Tris | = | Tris - (hydroxymethyl) - aminoethane |
| U | = | Unit |
| uM | = | Micromolar |
| UV | = | Ultraviolet |
| V | = | Voltage |
| vol | = | volume |
| wt | = | weight |