

การตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วย  
เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบครอบเลทิจิตตอล



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาชีวเคมี  
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE DETECTION OF BASAL CORE PROMOTER MUTATION IN PATIENTS WITH HEPATITIS  
B VIRUS INFECTION USING DROPLET DIGITAL PCR (DDPCR)



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

Department of Biochemistry

FACULTY OF MEDICINE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบครอบเลทิจิตอล
โดย	นายชวิศ พลพงษ์
สาขาวิชา	ชีวเคมีทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉันทชาย สิทธิพันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิศักดิ์ ทรราชเวก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ชัยบุตร อริยะเชษฐ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์วัชรศักดิ์ โชติยะบุตร)

ชวิศ พลพงษ์ : การตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบครอบเลทดิจิทัล. ( THE DETECTION OF BASAL CORE PROMOTER MUTATION IN PATIENTS WITH HEPATITIS B VIRUS INFECTION USING DROPLET DIGITAL PCR (DDPCR)) อ.ที่ปรึกษาหลัก : อ. ดร.ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์

การกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter (BCP) ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของไวรัสตับอักเสบบี มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง(chronic hepatitis B; CHB) อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่เป็นการศึกษาด้วย Sanger sequencing ที่ให้ผลเชิงคุณภาพ แต่การศึกษาด้วยเทคนิคอื่นเช่น เทคนิค droplet digital PCR(ddPCR) ที่สามารถบ่งบอกปริมาณร้อยละการกลายพันธุ์ (mutation percentage) ได้ยังคงมีจำกัด การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP โดยใช้ ddPCR เปรียบเทียบกับ Sanger sequencing และ Real- Time PCR และหาความสัมพันธ์ของ mutation percentage กับปัจจัยทางไวรัสและคลินิก ในผู้ป่วย CHB จำนวน 185 คน ผลการศึกษาพบว่าจากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมดมีผู้ป่วย 78 รายที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกันได้ทั้ง 3 วิธี โดยพบว่า ddPCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้มากกว่า Sanger sequence(84.6%vs.43.6%, $P<0.001$ ) และ Real-time PCR(84.6%vs.60.3%, $P<0.001$ ) และพบการกลายพันธุ์ได้(limit of detection(LOD)ตั้งแต่ร้อยละ 0.25 การศึกษาด้วย ddPCR พบว่าผู้ป่วย HBeAg-positive มีร้อยละการกลายพันธุ์ต่ำกว่าผู้ป่วย HBeAg-negative ( $31.36\pm 33.56$ vs. $46.86\pm 27.88$ , $P<0.001$ ) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับ HBcrAg ในเลือดของผู้ป่วย HBeAg-positive( $r=-0.286$ , $P=0.070$ ) และพบว่าผู้ป่วยกลุ่ม wild type มีระดับของ HBcrAg สูงสุด และพบระดับ HBcrAg ลดลงเมื่อมีการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น ส่วนในผู้ป่วย HBeAg-negative พบว่าการกลายพันธุ์มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ HBcrAg( $r=0.273$ , $P=0.008$ ) ผลการศึกษาสรุปได้ว่า ddPCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีความไวในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP ได้ดีที่สุดในขณะนี้ยังพบความสัมพันธ์กับระดับของ HBcrAg ในเลือดซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ใหม่ที่ใช้ในทางคลินิก ดังนั้นเทคนิค ddPCR จึงอาจจะสามารถเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีได้

สาขาวิชา ชีวเคมีทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6370010630 : MAJOR MEDICAL BIOCHEMISTRY

KEYWORD: Droplet Digital PCR (ddPCR) Chronic hepatitis B hepatitis B virus mutation A1762T/G1764A  
 Chavis Pholpong : THE DETECTION OF BASAL CORE PROMOTER MUTATION IN PATIENTS WITH  
 HEPATITIS B VIRUS INFECTION USING DROPLET DIGITAL PCR (DDPCR). Advisor: NATTHAYA CHUAYPEN,  
 Ph.D. Co-advisor: Prof. Pisit Tangkijvanich, M.D.

Double mutation in basal core promoter (BCP) region (A1762T/G1764A) of hepatitis B virus is associated with the progression of chronic hepatitis B (CHB) virus infection. Several studies showed BCP mutations based on conventional qualitative method such as Sanger Sequencing. However, BCP mutation identified by quantitative techniques such as droplet digital PCR (ddPCR) are limited. First, this study was aimed at evaluating the efficiency of ddPCR in detecting BCP double mutations compared with Sanger sequencing and Real time PCR. Second, to investigate the correlation between the percentage of mutation and clinical parameters. We identified the BCP mutation in 185 patients with CHB. Our results demonstrated that only 78 patients were included to investigate head-to-head comparisons between Sanger, Real-time PCR and ddPCR techniques. ddPCR showed a significantly higher detection rate of BCP mutation than Sanger sequencing (84.6%vs.43.6%, $P<0.001$ ) and Real-time PCR (84.6%vs.60.3%, $P<0.001$ ). In addition, the reliable limit of detection (LOD) of ddPCR showed at 0.25%. Based on ddPCR, the percentage of BCP mutations in patients with HBeAg-positive was significantly lower than patients with HBeAg-negative ( $31.36 \pm 33.56$  vs.  $46.86 \pm 27.88$ ,  $P<0.001$ ). Moreover, BCP mutations was correlated with HBcrAg level in patient with HBeAg-positive, but it did not reach statistical significance ( $r=-0.286$ ,  $P=0.070$ ). In subgroup analysis, patients who had wildtype showed higher level of HBcrAg when compared with patients who had BCP mutation. In HBeAg-negative group, the positive correlation between BCP mutation and HBcrAg lever was observed ( $r=0.273$ ,  $P=0.008$ ). In conclusion, ddPCR had high sensitivity and was superior to Sanger sequencing and Real time PCR in detecting BCP double mutations. These mutations were correlated with HBcrAg level in serum of patients. Thus, ddPCR might be used as an alternative method for detection of BCP mutation in patients with CHB and it might be useful for monitoring and prognosis in patients with chronic hepatitis B virus infection.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medical Biochemistry  
 Academic Year: 2021

Student's Signature .....  
 Advisor's Signature .....  
 Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก

อาจารย์ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือด้านองค์ความรู้ ทั้งยังสนับสนุนและให้โอกาสในการทำวิทยานิพนธ์อย่างเต็มที่ อีกทั้งยังช่วยแก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำ ตลอดจนสนับสนุนเงินทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณความทุ่มเทของอาจารย์ทั้งสองท่านมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ซึ่งได้แก่ ศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์ สิริธศักดิ์ ธรรมชาติพร ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ชัยบุตร อริยะเชษฐ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายในมหาวิทยาลัย และรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ วัชรศักดิ์ โชติยะบุตร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่ให้เกียรติมาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้ออกมาเป็นอย่างดีที่สุด ผู้วิจัยขอขอบพระคุณความกรุณาของอาจารย์ทั้งสามท่านมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณกลุ่มประชากรที่ให้ตัวอย่างเลือดมาใช้ศึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ทุกท่าน เพื่อพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ๆ แก่สังคมโลกต่อไป ขอขอบพระคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคตับอักเสบและมะเร็งตับ (Center of Excellence in Hepatitis and Liver Cancer) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และให้ทุนการศึกษา รวมถึงสมาชิกห้องปฏิบัติการ 724 และ 725 ทุกท่านที่กรุณาสอนเทคนิคและการใช้เครื่องมืออุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ในทุกด้าน รวมถึงให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาชีวเคมีทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทักษะความรู้ มาประยุกต์ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณฝ่ายบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนสนับสนุนค่าเรียน ในการศึกษาาระดับปริญญาโทมาบัณฑิตในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณความกรุณา มา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนทางการศึกษาตลอดมาเป็นอย่างดี และขอบคุณเพื่อนทุกคน โดยเฉพาะนางสาววรัญญา วิรัชกุล, นายนันธวรรณ เสฎฐวิวรรณ, นางสาวธมนวรรณ มีสกุล ที่เป็นกำลังใจ คอยปรับทุกข์และสุข และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ อยากจะขอบคุณตัวเองที่พยายาม อดทน และเชื่อมั่นในตัวเองว่าจะผ่านมันไปได้ ถือเป็นความภูมิใจครั้งหนึ่งเคยได้ทำวิทยานิพนธ์นี้ และหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานชิ้นนี้จะมีประโยชน์ต่อสังคมภายนอกหน้าไม่มากนักน้อย ขอขอบคุณครับ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	3
สมมติฐาน (Hypothesis).....	3
กรอบแนวคิดในการวิจัย (Research workflow).....	4
คำสำคัญ (Key words).....	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (Expected Benefits and applications).....	5
บทที่ 2.....	6
ไวรัสตับอักเสบบี.....	6
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี.....	8
พยาธิกำเนิดและการดำเนินโรค.....	9
การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีมีผลต่อการดำเนินโรค.....	11
การตรวจการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับ Basal core promoter.....	14
ความสัมพันธ์การกลายพันธุ์ Basal core promoter กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆ.....	20
การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation).....	24

บทที่ 3..... 26

    รูปแบบการวิจัย (Research design)..... 26

    กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)..... 26

    การคำนวณขนาดตัวอย่าง ..... 27

    วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย ..... 28

    อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ..... 28

    สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ..... 28

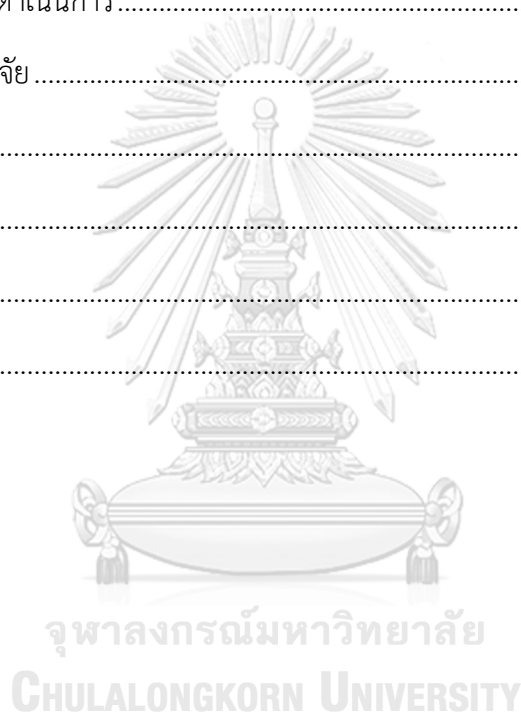
    วิธีการดำเนินการวิจัย ..... 30

บทที่ 4..... 44

บทที่ 5..... 69

    บรรณานุกรม..... 74

    ประวัติผู้เขียน ..... 83





## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ส่วนผสมการทำ PCR master mix.....	31
ตารางที่ 2 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	32
ตารางที่ 3 ส่วนผสมการทำ colony PCR master mix.....	33
ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา colony PCR.....	34
ตารางที่ 5 ส่วนผสมการทำ PCR master mix.....	35
ตารางที่ 6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	35
ตารางที่ 7 ส่วนผสมการทำ Real time PCR.....	37
ตารางที่ 8 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR.....	37
ตารางที่ 9 ส่วนผสมการทำ ddPCR master mix.....	40
ตารางที่ 10 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ddPCR.....	40
ตารางที่ 11 ข้อมูลประชากรของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำแนกตามกลุ่มศึกษา .....	44
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบ Intra-assay repeatability ของเทคนิค Real Time PCR .....	51
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ Inter-assay repeatability ของเทคนิค Real Time PCR.....	51
ตารางที่ 14 การทดสอบ Intra-assay repeatability ของเทคนิค ddPCR.....	56
ตารางที่ 15 การทดสอบ Inter-assay repeatability ของเทคนิค ddPCR.....	56
ตารางที่ 16 การหาค่า limit of blank.....	58
ตารางที่ 17 การร้อยละการกลายพันธุ์ ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพลาสมิดควบคุม wildtype จำนวน 7 ตัวอย่าง .....	58
ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่าง Sanger sequencing กับ Real Time PCR.....	60
ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่าง Sanger sequencing กับ ddPCR.....	61

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่าง Real time PCR กับ ddPCR ..... 61

ตารางที่ 21 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่างสามเทคนิค ..... 62

ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutationsของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive..... 63

ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutationsของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg negative..... 66



## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 Genotype ต่างๆของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ A ถึง J.....	6
รูปที่ 2 open reading frames (ORFs) ของไวรัสตับอักเสบบี .....	8
รูปที่ 3 ระยะการดำเนินโรคในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง.....	11
รูปที่ 4 การกลายพันธุ์บริเวณ Precore และ Basal core promoter ของไวรัสตับอักเสบบี.....	12
รูปที่ 5 ตำแหน่ง Basal core promoter และ Precore ในจีโนมไวรัสตับอักเสบบี.....	12
รูปที่ 6 การศึกษาความสัมพันธ์ของกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับการเกิดโรคตับอักเสบบี ตับแข็ง และมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี .....	13
รูปที่ 7 การตรวจการกลายพันธุ์ Basal core promoter โดยวิธี Direct sequencing .....	14
รูปที่ 8 การตรวจการกลายพันธุ์ Basal core promoter โดยวิธี nested PCR-RFLP.....	15
รูปที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค ddPCR (57).....	18
รูปที่ 10 การเปรียบเทียบการใช้เทคนิคระหว่าง ddPCR กับเทคนิค Sanger sequencing ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ .....	18
รูปที่ 11 ddPCR Partition (ลิสลิทซ์ Biorad).....	19
รูปที่ 12 ขั้นตอนการทำ ddPCR.....	19
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับค่า HBeAg titer .....	22
รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับค่า HBV DNA.....	22
รูปที่ 15 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามการดำเนินโรค	23
รูปที่ 16 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มตัวอย่างแบ่งตาม HBeAg .....	23

รูปที่ 17 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามอายุ.....	23
รูปที่ 18 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับ HBcrAg ระหว่างผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายกับผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter.....	24
รูปที่ 19 การคำนวณขนาดตัวอย่างโดยโปรแกรม G*Power .....	27
รูปที่ 20 ขั้นตอนการทำ ddPCR.....	41
รูปที่ 21 ผลการทำ PCR ของยีน <i>HBV</i> ตำแหน่ง basal core promoter.....	45
รูปที่ 22 ผลการทำ colony PCR ของยีน <i>HBV</i> ตำแหน่ง basal core promoter.....	46
รูปที่ 23 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน <i>HBV</i> ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 และ 1764.....	47
รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gblock สั่งสังเคราะห์มาจากบริษัท.....	48
รูปที่ 25 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน <i>HBV</i> ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 และ 1764.....	48
รูปที่ 26 กราฟแสดงผลการตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutations จากเทคนิค Sanger sequencing .....	49
รูปที่ 27 กราฟ amplification plot ของ ผลการทำ gradient ของเทคนิค Real time PCR.....	50
รูปที่ 28 กราฟ Allelic discrimination plot ของ ผลการทำ gradient ของเทคนิค Real time PCR .....	50
รูปที่ 29 กราฟผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutation ด้วยเทคนิค Real Time PCR.....	52
รูปที่ 30 ผลการทำ gradient ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 45-60°C. 53	
รูปที่ 31 Cut off ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 47.8°C.....	53
รูปที่ 32 ผลการทำ gradient ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 45-60°C .....	54
รูปที่ 33 Cut off ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 47.8°C .....	54
รูปที่ 34 ค่า coefficient of correlation ( $R^2$ ) ของพลาสมิดควบคุมบวก.....	55

รูปที่ 35 กราฟ Levey–Jennings ของเทคนิค ddPCR..... 57

รูปที่ 36 กราฟแสดงผลร้อยละการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี BCP double mutations โดยเทคนิค Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR) ..... 59

รูปที่ 37 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ..... 63

รูปที่ 38 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไวรัส HBV DNA และตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg positive..... 64

รูปที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับ HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg positive ..... 65

รูปที่ 40 การวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่มของค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ในแต่ละกลุ่มในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg positive..... 66

รูปที่ 41 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HBV DNA กับค่า HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg negative ..... 67

รูปที่ 42 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation กับค่า HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg negative ..... 68

รูปที่ 43 การวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่มของค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ในแต่ละกลุ่มในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative ..... 68

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก โดยมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมากกว่า 250 ล้านคน (1) โดยประมาณร้อยละ 75 ของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั่วโลกมาจากทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asia) และทวีปตะวันตก (Western Pacific) ซึ่งพบความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมากในประเทศไต้หวัน, จีน, มองโกเลีย, เกาหลีใต้, เวียดนาม, ฟิลิปปินส์ รวมถึงประเทศไทย (2) (3) มีการรายงานการติดเชื้อเมื่อปี 2016 พบว่า ประเทศไทยมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ร้อยละ 3.48 หรือประมาณ 2.2 ล้านคนทั่วประเทศ (4) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (chronic hepatitis B; CHB) เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma; HCC) นอกจากนี้ยังพบว่ามะเร็งตับเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งเป็นอันดับ 1 ในประเทศไทย (5)

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นดีเอ็นเอ (DNA) ไวรัสแบบสายคู่วงกลมที่ไม่สมบูรณ์ (partially double-stranded DNA) ที่มีความยาวทั้งจีโนมขนาดประมาณ 3,200 นิวคลีโอไทด์ (6) และมีการเพิ่มจำนวนผ่านกระบวนการ reverse transcription ผ่าน RNA intermediate ด้วย RNA polymerase II จึงไม่มีกระบวนการ proofreading ในการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ไวรัสตับอักเสบบีมีอัตราการกลายพันธุ์สูง (7) โดยมักพบการกลายพันธุ์ในส่วนของบริเวณ basal core promoter (BCP) และ precore (PC) ซึ่งส่งผลต่อการผลิตโปรตีน Hepatitis B e antigen (HBeAg) ลดลง (8) HBeAg เป็นโปรตีนของไวรัสตับอักเสบบีที่ยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามรายงานก่อนหน้านี้พบว่า HBeAg ทำหน้าที่ควบคุมการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulator) โดยทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อการติดเชื้อไวรัสลดลง เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับ HBcAg (core protein) ที่เป็นเป้าหมายของระบบภูมิคุ้มกัน (9) ดังนั้นการลดลงหรือการที่ไม่สามารถสร้างโปรตีน HBeAg อาจส่งผลให้ไวรัสหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำให้ไวรัสมีความสามารถในการติดเชื้อและการคงอยู่มากขึ้น

การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์บริเวณ BCP และ PC มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของไวรัส ความรุนแรงและการดำเนินของโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (10) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการกลายพันธุ์สองตำแหน่ง (double mutation) บน

ยีน BCP ที่ตำแหน่ง A1762T และ G1764A ที่ส่งผลให้การตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านไวรัส nucleos(t)ide analogues (NAs) และ pegylated interferon- $\alpha$  (PEG IFN- $\alpha$ ) ลดน้อยลงทั้งในผู้ป่วยที่มี HBeAg-positive และ HBeAg-negative (11) (12) (13) และการกลายพันธุ์บริเวณนี้ยังเพิ่มความเสี่ยงของการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับในอนาคตอีกด้วย (14) อย่างไรก็ตามการศึกษาหาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations และตัวบ่งชี้ทางชีวภาพใหม่ (Biomarker) อาทิ hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) เพื่อช่วยในการวินิจฉัย ทำนายการรักษา และติดตามการรักษายังมีจำกัด (15) นอกจากนี้การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนโดยทั่วไปด้วยวิธีมาตรฐานมักเป็นวิธีการตรวจหาเชิงคุณภาพ (qualitative) ด้วยเทคนิค direct sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่มีระดับต่ำกว่าร้อยละ 20 ได้ (16) ส่งผลให้เทคนิคนี้อาจจะไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ที่มีระดับต่ำ และอาจทำให้เกิดผลลบ (false-negative) ได้ ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจวัดการกลายพันธุ์ที่มีความไวมากขึ้นและเป็นวิธีการตรวจหาเชิงปริมาณ (quantitative) เช่น เทคนิค Next-generation sequencing (NGS), Real time PCR และ droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) เป็นต้น

Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real time PCR (17) (18) อันเนื่องมาจาก Real time PCR มีข้อจำกัดในการหาปริมาณดีเอ็นเอได้โดยตรง ต้องใช้ดีเอ็นเอที่ทราบจำนวนมาเป็นตัวอ้างอิง หรือเรียกว่าการทำ Standard reference curve ต่างจาก ddPCR ซึ่งเป็นเทคนิค absolute quantification ที่สามารถหาปริมาณดีเอ็นเอได้โดยตรง นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิค ddPCR มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ดีเทียบเท่ากับการใช้เทคนิค NGS อย่างไรก็ตามเทคนิค NGS ต้องอาศัยความชำนาญและการวิเคราะห์ทาง bioinformatics ที่ค่อนข้างซับซ้อน และมีราคาแพง (16) (19)

ในปัจจุบันเทคนิค ddPCR จึงนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบปริมาณและการกลายพันธุ์อย่างแพร่หลาย โดยเทคนิคนี้ใช้หลักการ water-in-oil emulsion แทนหลุมปฏิกิริยา หรืออาจเรียกว่า droplet-based digital PCR (ddPCR) เพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวของสารพันธุกรรมในแต่ละ partition อย่างเหมาะสม โดยอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมนี้จะส่งผลให้มีดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 copy ต่อ 1 partition เท่านั้น หลังจากนั้น เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณรอบสุดท้ายในเครื่อง PCR (end point PCR) เครื่องจะตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแต่ละ partition ที่เป็นบวกหรือลบ ซึ่งจะสามารถหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายสุทธิได้โดยตรง (20) มีการศึกษาท่อนหน้าพบว่า เทคนิค ddPCR สามารถ

ตรวจสอบการกลายพันธุ์ในยีน *KRAS* โดยสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ระดับต่ำได้ถึงร้อยละ 0.1 ของระดับการกลายพันธุ์ และสามารถบอกจำนวน copies ของสารพันธุกรรมที่สนใจได้โดยตรง (21) และการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วย Real time PCR ให้ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่มีระดับการกลายพันธุ์ของไวรัสตั้งแต่ร้อยละ 0.1 แต่ไม่สามารถหาจำนวน copies ของสายพันธุกรรมที่สนใจได้โดยตรง จำเป็นต้องเทียบกับ Standard reference curve เพื่อหาจำนวน copies ของสายพันธุกรรมที่สนใจ (22) ดังนั้นเทคนิค ddPCR จึงเป็นเทคโนโลยีทางเลือกที่มีความทันสมัยละเอียดและแม่นยำสูงที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ และยังสามารถหาจำนวน copies ของสายพันธุกรรมที่สนใจได้โดยตรง ซึ่งมีวิธีการไม่ซับซ้อน สะดวก รวดเร็ว และแปลผลง่าย

ดังนั้นการศึกษานี้ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A (BCP double mutation) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยเทคนิค ddPCR ในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิค ddPCR กับวิธีมาตรฐาน Sanger sequencing และ Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้การตรวจการกลายพันธุ์ของยีนในปัจจุบัน และหาความสัมพันธ์ของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง เพื่ออาจจะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในการช่วยวินิจฉัย และติดตามการดำเนินโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของ droplet digital PCR (ddPCR) ในการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ double mutation บริเวณ Basal core promoter (A1762T/G1764A) ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง
2. เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์แบบ double mutation บริเวณ Basal core promoter (A1762T/G1764A) กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง

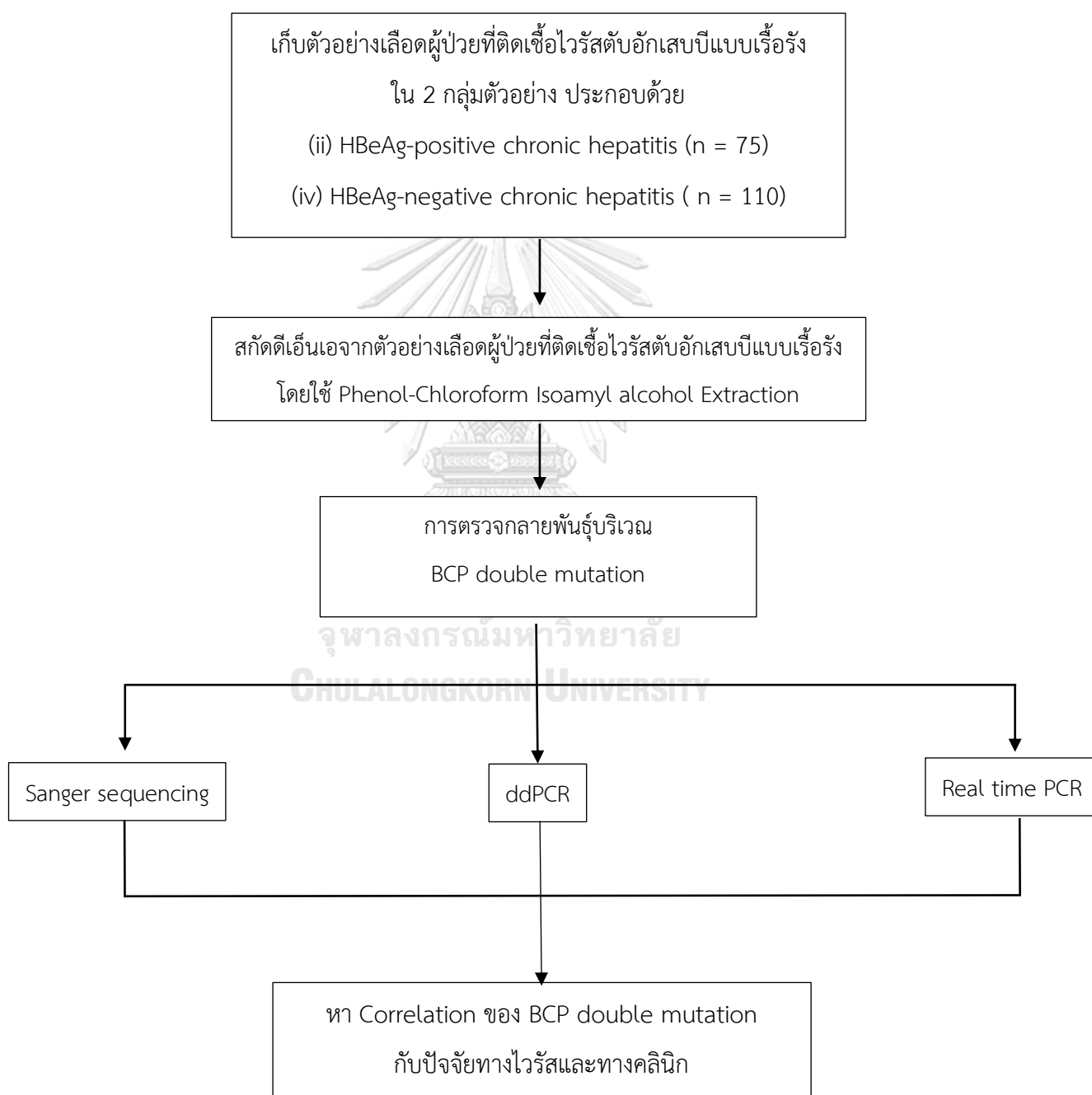
### สมมติฐาน (Hypothesis)

1. Droplet digital PCR (ddPCR) สามารถเป็นวิธีการทางเลือกในการตรวจหาการกลายพันธุ์ double mutation บริเวณ Basal core promoter ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง



2. การกลายพันธุ์ double mutation บริเวณ Basal core promoter มีความสัมพันธ์กับ ปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง

### กรอบแนวคิดในการวิจัย (Research workflow)



**คำสำคัญ (Key words)**

Hepatitis B virus (HBV)

Chronic HBV infection

Basal core promoter mutation

A1762T/G1764A

Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits and applications)**

เทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR) สามารถเป็นเทคนิคทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของไวรัสตับอักเสบบีได้ เพื่อจะช่วยวินิจฉัยผู้ป่วยให้ได้รับผลการตรวจรวดเร็ว และได้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น และอาจบอกได้ถึงความสัมพันธ์ร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบี เชื่อมั่นว่าปัจจัยใดบ้างที่มีความสัมพันธ์กับร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของไวรัสตับอักเสบบี

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### ไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอแบบสายคู่ไม่สมบูรณ์ (partially double-stranded DNA) ที่มีความยาวตลอดจีโนมประมาณ 3200 นิวคลีโอไทด์ ที่อยู่ใน Family Hepadnaviridae และ genus orthohepadanarivirus ในปัจจุบันมีการจัดกลุ่มเป็นอย่างน้อย 10 สายพันธุ์ (genotypes A ถึง J) รูปที่ 1 (9) โดย genotype A, E พบมากที่ทวีปแอฟริกาได้ genotype B, C, I และ J พบมากในทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศไทย, ลาว, เวียดนาม, จีน และญี่ปุ่น เป็นต้น genotype D พบมากที่ประเทศทางเมดิเตอร์เรเนียน ยุโรปตะวันออกและอินเดีย genotype G พบมากที่ทวีปยุโรปและอเมริกา ส่วน genotype H พบได้ทุกทวีป พบบ่อยในประเทศอเมริกา ญี่ปุ่น เม็กซิโก และสเปน เป็นต้น ซึ่งไวรัสตับอักเสบบีจะมีการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ 2 แบบ คือสร้างดีเอ็นเอแบบสายลบ (minus strand) ที่มีความยาวตลอดจีโนมและสร้างดีเอ็นเอแบบสายบวก (plus strand) ที่มีขนาดความยาวไม่แน่นอนโดยมีความยาวขนาดร้อยละ 20-80 ของดีเอ็นเอสายลบ โดยสายทั้งสองเชื่อมติดกันทางปลาย 5'un-translated region (5'UTR) ของสายดีเอ็นเอในตำแหน่ง direct repeat (DR) ที่เรียกว่า DR1 และ DR2 ซึ่งอยู่ห่างกันประมาณ 225 นิวคลีโอไทด์ แต่ละตัวมีขนาดประมาณ 11-12 นิวคลีโอไทด์ (6)

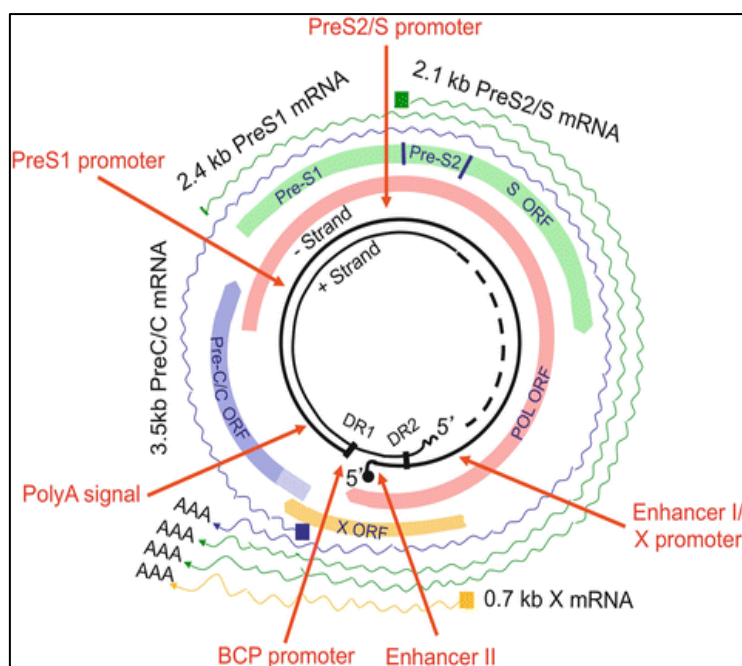
Geno-type	Length	Differentiating features	Subgenotypes	Geographic distribution	Serological subtype	Predominant transmission route
A	3,221	6-nucleotide insert at carboxyl end of core gene	A1 A2 quasi-subgenotype A3(A3, A4, A5) <sup>b</sup> A4(A6) <sup>b</sup>	Africa <sup>a</sup> Europe/North America  Africa, Haiti	<i>adw2/ayw2</i> <i>adw2</i>  <i>ayw1</i> <i>ayw1</i> <i>adw4<sup>c</sup></i>	Horizontal: parenteral or sexual
B	3,215		B1 B2 quasi-subgenotype B3(B3, B5, B7-B9, B6 China) <sup>b</sup> B4 B5(B6) <sup>b</sup>	Japan China  Indonesia/Philippines/China Vietnam/Cambodia/France Eskimos/Inuits	<i>adw2</i> <i>adw2</i>  <i>adw2</i> <i>ayw1/adw2</i> <i>adw2</i> <i>adr<sup>d</sup></i>	Perinatal
C	3,215		C1 quasi-subgenotype C2(C2, C14, undefined sequences) <sup>b</sup> C3 C4 C5 C6-C12 C13-C15 C16	Thailand/Myanmar/Vietnam  Japan/China/Korea New Caledonia/Polynesia Australian Aborigines Philippines/Indonesia Indonesia/Philippines Indonesia Indonesia	<i>adr</i> <i>adr</i> <i>ayw2/ayw3</i> <i>adw2</i> <i>adr</i> <i>adr</i> <i>ayw<sup>e</sup></i>	Perinatal
D	3,182	33-nucleotide deletion at the amino terminus of the preS1 region	D1 D2 D3 D4 D5 D6	Middle East, Central Asia Europe/Japan/Lebanon Worldwide Australian aborigines, Micronesians, Papua New Guineans, Arctic Denes India Tunisia/Nigeria	<i>ayw2</i> <i>ayw3</i> <i>ayw2/ayw3</i> <i>ayw2</i> <i>ayw3/ayw2</i> <i>ayw2</i> <i>ayw2/adw3<sup>f</sup></i>	Horizontal: parenteral with intravenous drug use being a risk factor
E	3,212	3-nucleotide deletion at the amino terminus of the preS1 region	-	Western/Central Africa	<i>ayw4</i>	Horizontal
F	3,215		F1 F2 F3 F4	Argentina/Costa Rica/El Salvador, Alaska Nicaragua/Venezuela/Brazil Venezuela/Columbia Argentina	<i>adw4</i> <i>adw4</i> <i>adw4</i> <i>adw4</i> <i>adw2/ayw4<sup>f</sup></i>	Horizontal
G	3,248	36-nucleotide insert, 3' of position 1905; 3-nucleotide-deletion at the amino terminus of the preS1 region; stop codons at positions 2 and 28 of the precore region	-	USA/Mexico/ Germany/Italy/ UK/France	<i>adw2</i>	Horizontal: sexual transmission mainly in men-who-have-sex-with-men
H	3,215		-	Mexico/Japan/Nicaragua/USA	<i>adw4</i>	
I	3,215		I1 I2	Laos/Vietnam/China Laos/India/Vietnam <sup>d</sup>	<i>adw2</i> <i>ayw2</i>	Perinatal
J	3,182	33-nucleotide deletion at the amino terminus of the preS1 region	-	Japan (possible origin Borneo)	<i>ayw3</i>	

รูปที่ 1 Genotype ต่างๆของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ A ถึง J

<sup>a</sup> Summarizes data compiled from [10, 11, 13, 14, 19, 25, 28] and references cited therein. <sup>b</sup> Earlier subgenotype designation. <sup>c</sup> And in regions outside Africa where there was historically forced migration as a result of the slave trade [18].

<sup>d</sup> Vietnamese residing in Canada [43]. <sup>e</sup> Rare serological subtype for that genotype.

สายลบของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี จะประกอบไปด้วย 4 open reading frames (ORFs) ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณของรหัสพันธุกรรมในการสร้างโปรตีนต่างๆของไวรัส ได้แก่ S ORFs, P ORF, C ORF และ X ORF (ดังรูปที่ 2) (23) เนื่องจากจีโนมของไวรัสมีขนาดค่อนข้างเล็ก ทั้ง 4 ส่วนจึงมีลักษณะที่ซ้อนทับกัน (overlapping ORFs) โดย S ORFs จะสร้างโปรตีนที่ผิวของไวรัส หรือ HBsAg โดยกระตุ้นการทำงานของ PreS1 และ PreS2 promoter ให้สร้าง *PreS1* , *PreS2* และ S gene ซึ่งจะสร้างเป็นโปรตีนได้ 3 ชนิด คือ small protein, middle protein, และ large protein โปรตีนทั้งสามชนิดนี้เรียกรวมกันว่า Surface protein หรือ HBsAg ทำหน้าที่เป็นโปรตีนเซลล์ผิวของไวรัสตับอักเสบบี ช่วยให้เชื้อไวรัสใช้โปรตีนนี้ในการผ่านเข้าสู่เซลล์ตับซึ่งเป็นขั้นตอนการเริ่มการติดเชื้อไวรัสในเซลล์ตับ ในส่วน P และ C ORF จะถูกกระตุ้นการสร้างรหัสพันธุกรรมที่ Basal core promoter ซึ่งจะสร้างเป็นโปรตีนได้ 3 ชนิด คือ Polymerase, Core protein และ HBeAg โดย Polymerase จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication) ส่วน Core protein ทำหน้าที่ป้องกันสารพันธุกรรมของไวรัสจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ exogenous nuclease และ HBeAg เป็นโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการพยากรณ์โรคตับที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ HBeAg เป็นตัวบ่งชี้ระยะของผู้ป่วยที่กำลังมีปริมาณเชื้อไวรัสจำนวนมากในเลือด (high levels of viral replication) และ X ORF จะถูกกระตุ้นการสร้างรหัสพันธุกรรมที่ X promoter ซึ่งจะได้เป็น X protein มีความสำคัญเกี่ยวกับการควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ตับ และควบคุมการเหนี่ยวนำสัญญาณเซลล์ของไวรัส (signal transduction) ควบคุมการถอดรหัสของยีน (transcription activation) และยังมีบทบาทเกี่ยวกับกลไกการเกิดมะเร็ง (oncogenesis) เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) (24)



รูปที่ 2 open reading frames (ORFs) ของไวรัสตับอักเสบบี

### การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

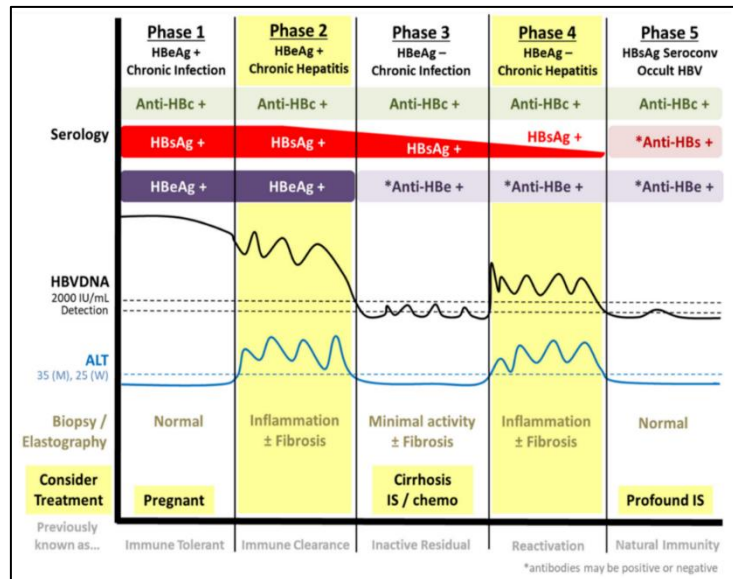
การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นปัญหาทางสาธารณสุขทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดของการเกิดโรคตับอักเสบริ้รัง ดับแข็งและมะเร็งตับ (25) โดยในปี 2019 องค์กร WHO รายงานว่า มีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมากกว่า 290 ล้านคน และมีอัตราการติดเชื้อไวรัสสายใหม่เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 1.5 ล้านคนต่อปี นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีส่งผลต่อการเสียชีวิตจากโรคตับอักเสบบีและมะเร็งตับในปี 2019 มากกว่า 800,000 คน (26) และมีการศึกษาในปี 2016 พบว่ามีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทยสูงถึงร้อยละ 5.1 หรือมากกว่า 3 ล้านคน (27) และยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตจากโรคมะเร็งตับเป็นอันดับ 1 ในประเทศไทย (28) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีสาเหตุมาจากการติดต่อทางเลือดและสารคัดหลั่งเป็นหลัก (blood borne) โดยช่องทางการแพร่เชื้อที่สำคัญ (29) ได้แก่ 1.การติดเชื้อจากแม่สู่ลูก (perinatal หรือ vertical transmission) โดยเฉพาะในช่วงที่เกิดการคลอดจากการที่ทารกสัมผัสเลือดมารดาระหว่างคลอด 2.การติดเชื้อจากการได้รับเลือดและส่วนประกอบของเลือด (transfusion of blood and blood component) 3.การติดเชื้อผ่านทางผิวหนังมักจะ เป็นบริเวณที่เป็นบาดแผล เมื่อมีการสัมผัสกับเลือดหรือสารคัดหลั่งของผู้ป่วย (percutaneous transmission) เช่นจากการใช้เข็มฉีดยาสารเสพติดร่วมกัน หรือใช้เข็มสำหรับการสัก การเจาะร่างกายร่วมกับผู้ที่ติดเชื้อ รวมถึง needlestick injury ในบุคลากรทางการแพทย์ 4. การมีเพศสัมพันธ์กับผู้ติดเชื้อ (sexual transmission) ซึ่งการติดเชื้อแบบที่ 2, 3 และ 4 อาจรวม

เรียกว่าเป็นการติดเชื้อแบบ “horizontal transmission” (30) ซึ่งไวรัสตับอักเสบบีไม่ติดต่อทางการรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัส และปริมาณของไวรัสตับอักเสบบีในสารคัดหลั่งของร่างกายมีน้อยกว่าในเลือดมาก เช่น ไวรัสในน้ำอสุจิ (Semen) และน้ำลายมีน้อยกว่าในเลือด 1,000 - 10,000 เท่า และโดยทั่วไปจะตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีไม่พบในน้ำปัสสาวะและอุจจาระ (31) การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบ่งเป็น 2 แบบ (32) คือ 1.การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเฉียบพลัน ไวรัสตับอักเสบบีมีระยะฟักตัวโดยทั่วไปประมาณ 45-90 วัน ผู้ป่วยจะมีอาการเช่นเดียวกับตับอักเสบบีเฉียบพลันโดยทั่วไป เช่น อ่อนเพลีย ปวดเมื่อยตามตัว บางรายอาจมีไข้ร่วมด้วย บางรายอาจมีอาการตัวเหลือง ตาเหลือง ตับและม้ามโต เป็นต้น อาการดังกล่าวจะหายไปภายในระยะเวลา 1-3 เดือน และเมื่อผู้ป่วยกลุ่มนี้ตรวจค่า HBsAg จะกลายเป็นลบภายหลังมีอาการแล้วประมาณ 12 สัปดาห์ และหากหลังจากผู้ป่วยแสดงอาการแล้วเกิน 6 เดือน ยังตรวจพบค่า HBsAg ค่าเป็นบวกอยู่ หมายถึง ผู้ป่วยได้กลายเป็นไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ผู้ป่วยส่วนน้อยมากที่มีอาการรุนแรงถึงภาวะตับวายและอาจเสียชีวิตได้ (5) 2. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง ผู้ป่วยกลุ่มนี้สามารถที่จะมีหรือไม่มีอาการของโรคได้ หรืออาจตรวจพบเฉพาะความผิดปกติจากการตรวจเลือดเท่านั้น ผู้ป่วยจำนวนหนึ่งที่มีการอักเสบของตับรุนแรงอาจมีภาวะดีซ่าน ผู้ป่วยบางรายมีตับอักเสบเรื้อรังเป็นเวลานานจนกลายเป็นตับแข็ง หรือผู้ป่วยจำนวนหนึ่งมาพบแพทย์ด้วยอาการปวดท้อง น้ำหนักลด หรือมีภาวะเลือดออกในช่องท้อง (hemoperitoneum) นั้นแปลว่า ผู้ป่วยแสดงอาการจากตับแข็งกลายเป็นภาวะมะเร็งตับ อันเป็นภาวะแทรกซ้อนที่อันตรายของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (33)

### พยาธิกำเนิดและการดำเนินโรค

การดำเนินโรคของไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังแบ่งได้เป็น 5 ระยะตาม EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection (ดังรูปที่3) (34) คือ 1. Immune tolerance phase ระยะนี้จะมีปริมาณเชื้อไวรัสทั้งในเลือดและในตับเป็นปริมาณมากตรวจพบ HBeAg ค่าเป็นบวก ซึ่งบ่งชี้ว่าไวรัสกำลังมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสอยู่เป็นจำนวนมาก (high levels of viral replication) แต่ผลตรวจค่าเอนไซม์การทำงานของตับจะปกติ และหากมีการตรวจชิ้นเนื้อตับก็มักไม่พบการอักเสบและพังผืดตับ เนื่องจากเพราะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยยังไม่ถูกกระตุ้นให้เกิดการทำลายเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (35) 2. Immune clearance phase (Immune active phase) ระยะนี้ภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยเริ่มถูกกระตุ้นให้พยายามกำจัดหรือควบคุมไวรัสตับอักเสบบี ส่งผลให้เกิดตับอักเสบ และระยะนี้ปริมาณเชื้อไวรัสในเลือดของผู้ป่วยจะยังอยู่ในระดับสูง (แต่ต่ำกว่าระยะ immune tolerance phase) ผลตรวจค่าเอนไซม์

การทำงานของตับจะสูงขึ้น ลักษณะของเนื้อตับจะพบมีการอักเสบภายใน ในระยะ immune clearance ผู้ป่วยบางรายอาจใช้ระยะเวลาไม่กี่เดือน ก็สามารถควบคุมไวรัสได้ เกิด HBeAg seroconversion ได้เองคือ การตรวจพบ HBeAg เปลี่ยนค่าเป็นลบ และค่า anti-HBe เป็นบวก แทน และโรคเข้าสู่ระยะสงบ (low replicative phase) ต่อไป แต่ในผู้ป่วยบางรายการอักเสบ อาจเกิดต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานหลายเดือนหรือหลายปี ทำให้เกิดการอักเสบของตับอย่างต่อเนื่องจนเกิดพังผืดในตับ ซึ่งอาจทำให้เกิดภาวะตับแข็งเวลาต่อมาได้ (36) 3. Inactive phase (low replicative phase) ระยะนี้เมื่อผู้ป่วยตรวจค่า HBeAg ผลเป็นลบและ anti-HBe เป็นบวก ปริมาณไวรัสในเลือดจะลดลงเป็นอย่างมาก หรือในผู้ป่วยบางรายอาจตรวจไม่พบไวรัสในเลือดเลย ผลตรวจค่าเอนไซม์การทำงานของตับอยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่ผลตรวจชิ้นเนื้อตับอาจพบว่ามี พังผืดหรือ ตับแข็งเกิดขึ้นได้แล้วเช่นเดียวกัน (37) 4. Reactivation phase หรือระยะ HBeAg negative chronic hepatitis ระยะนี้ผลตรวจ HBeAg จะเป็นลบ และ anti-HBe ให้ผลบวก หรือลบก็ได้ แต่ไวรัสจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นจากที่เคยสงบ และพบการอักเสบรวมทั้งพังผืดของตับ เพิ่มขึ้นจากการตรวจชิ้นเนื้อ ผลตรวจค่าเอนไซม์ของตับมักสูงเป็นช่วงๆ สลับกับปกติหรืออาจสูง ตลอดก็ได้ (38) มักเกิดในผู้ป่วยวัยกลางคนขึ้นไป ผู้ป่วยไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังไม่จำเป็นต้องเข้าสู่ ระยะนี้ทุกรายโดยมาก มีเพียงร้อยละ 15-30 ของผู้ป่วยในระยะ low replicative phase เท่านั้นที่เกิดการกำเริบขึ้นเข้าสู่ในระยะ Reactivation phase ซึ่งผู้ป่วยในระยะนี้ก็มีความเสี่ยง ต่อการเกิดตับแข็งและมะเร็งตับเช่นเดียวกัน ระยะนี้จึงอาจเรียกว่าเป็น “ระยะกำเริบ” ก็ได้ ผู้ป่วย ที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังมีความเสี่ยงต่อการเกิดตับแข็งและภาวะแทรกซ้อนของตับแข็ง รวมทั้งมะเร็ง ตับ นำไปสู่การเสียชีวิตก่อนวัยอันควรได้ จากการศึกษาพบว่า เมื่อติดตามผู้ป่วยตับอักเสบบี เรื้อรังไป 5 ปี ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 13-38 จะเกิดภาวะตับแข็ง และร้อยละ 17 จะเกิดมะเร็ง ตับภายในระยะเวลา 5 ปี (33) 5. Natural immunity หรือ HBsAg negative phase ระยะนี้ ผู้ป่วยจะตรวจ HBsAg ผลเป็นลบและ Anti-HBs อาจจะเป็นบวกหรือลบก็ได้ ตรวจไม่พบ HBV DNA แต่อาจจะตรวจพบ cccDNA ในตับ ระดับเอนไซม์ของตับปกติ ตับอาจจะปกติหรือเกิดตับ แข็งจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมาเป็นเวลานาน (39)



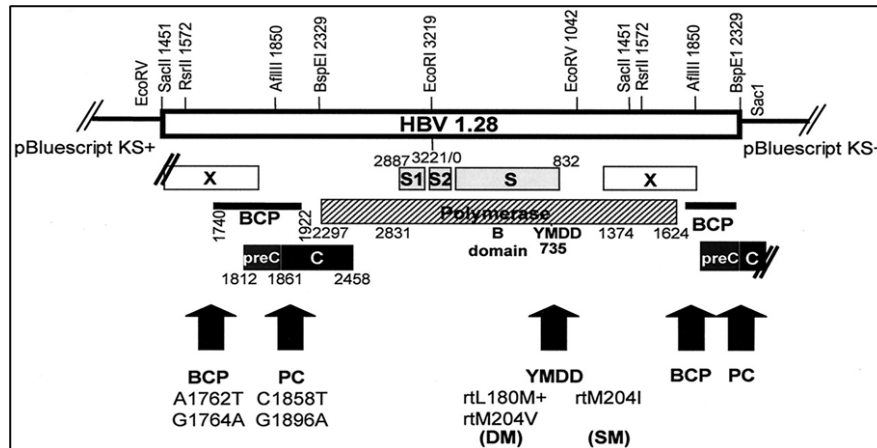
รูปที่ 3 ระยะเวลาการดำเนินโรคในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

### การกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีมีผลต่อการดำเนินโรค

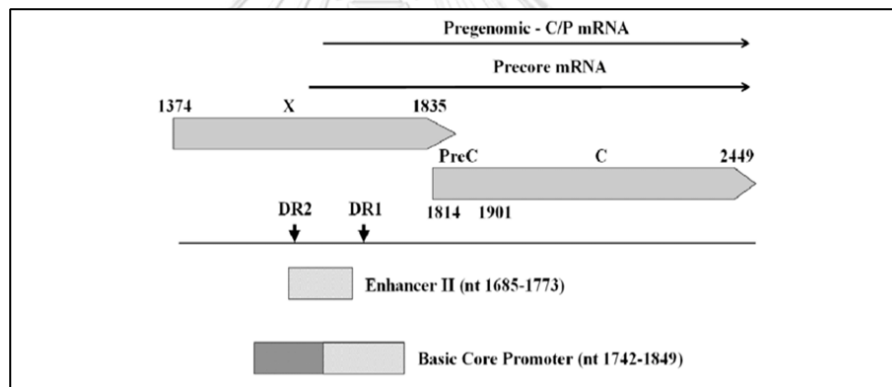
ไวรัสตับอักเสบบีเป็นเชื้อไวรัสที่มีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (rate of spontaneous mutations) ที่สูงโดยไวรัสตับอักเสบบีมีอัตราการกลายพันธุ์ประมาณ 1 นิวคลีโอไทด์ต่อ 10,000 เบสต่อจำนวนปีที่ติดเชื้อ (7) การกลายพันธุ์ที่พบบ่อยตามธรรมชาติในระยะต่างๆ ของการดำเนินโรคตับอักเสบบีแบบเรื้อรังและมีความสำคัญทางคลินิก ได้แก่การกลายพันธุ์บริเวณ Basal core Promoter ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1762 เปลี่ยนจาก A เป็น T (A1762T) และที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1764 เปลี่ยนจาก G เป็น A (G1764A) และการกลายพันธุ์บริเวณ Precore ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 1896 เปลี่ยนจาก A เป็น G (A1896G) (ดังรูปที่ 4) (40) ในจีโนมของไวรัสตับอักเสบบีทั่วไป Basal core promoter และ Precore จะอยู่บริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ 1685 – 1733 และ 1814 – 1901 ตามลำดับ ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกระตุ้นขบวนการถอดรหัส(transcription)และแปลรหัส(translation) ในการสังเคราะห์โปรตีนของ HBeAg ทำให้ HBeAg มีการแสดงออก (ดังรูปที่ 5) (41) แต่เมื่อมีกลายพันธุ์บริเวณดังกล่าว การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบริเวณ Basal core promoter ซึ่งเป็นตำแหน่งควบคุมการ Transcription โดยการกลายพันธุ์ตำแหน่ง A1762T ทำให้กรดอะมิโนจาก Lysine เปลี่ยนเป็น Methionine และการกลายพันธุ์ตำแหน่ง G1764A ทำให้กรดอะมิโนจาก Valine เปลี่ยนเป็น Isoleucine จะทำให้การสร้าง HBeAg ลดลงกว่าปกติ ส่วนการกลายพันธุ์บริเวณ Precore ซึ่งเป็นตำแหน่งควบคุมการ Translation ของโปรตีน โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ A1896G ทำให้กรดอะมิโนจาก Tryptophan เป็น Stop



codon จะส่งผลทำให้ HBeAg ไม่มีการแสดงออกเลย (abolishes HBeAg production) (42) (43) (10)



รูปที่ 4 การกลายพันธุ์บริเวณ Precore และ Basal core promoter ของไวรัสตับอักเสบบี



รูปที่ 5 ตำแหน่ง Basal core promoter และ Precore ในจีโนมไวรัสตับอักเสบบี

การศึกษาการกลายพันธุ์ของไวรัสในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ยังไม่ได้รับวัคซีนต้านไวรัสตับอักเสบบีในประเทศอิหร่าน 120 คนพบว่ามีการกลายพันธุ์บริเวณ Precore และ Basal core promoter อยู่ 99.66% และเมื่อตรวจค่า HBeAg ผลเป็นลบถึง 100 คน คิดเป็น 83.3% การศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า มีอัตราการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีบริเวณ Precore และ Basal core promoter ที่ค่อนข้างสูงในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง (44) นอกจากนี้มีการศึกษา การกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A เป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับในผู้ป่วยที่ติดไวรัสตับอักเสบบีได้ โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบคนที่ไม่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 60 คน กับผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (มีทั้ง genotype B และ C) คนที่เป็นโรคตับแข็ง และคนที่เป็นมะเร็งตับจำนวน 190 คน พบการ

กลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype C สูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี genotype B (odds ratio, 5.18; 95% CI, 2.59-10.37;  $P < 0.001$ ) และการกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A สามารถเพิ่มความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับจากร้อยละ 3 ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเป็นร้อยละ 64 ในผู้ป่วยมะเร็งตับ (odds ratio, 20.04; 95% CI, 7.25-55.41;  $P < 0.001$ ) จากการศึกษาจึงสรุปได้ว่า ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ Basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญ (ดังรูปที่6) (45)

**Table 2.** Association Between the Likelihood of T1762/A1764 Basal Core Promoter Mutation and Clinical Stages of Liver Disease in Patients With Chronic Hepatitis Viral Genotype B or C Infection

Genotype	Inactive carrier	Adjusted odds ratio (95% CI)		
		Chronic hepatitis	Cirrhosis	Hepatocellular carcinoma
B <sup>a</sup>	1	0.86 (0.70–10.5) $P = 0.906$	1.34 (0.11–16.3) $P = 0.817$	17.79 (3.81–82.98) $P < 0.001$
C <sup>a</sup>	1	1.15 (0.21–6.15) $P = 0.873$	4.91 (1.13–21.33) $P = 0.034$	18.70 (4.77–73.33) $P < 0.001$
Total <sup>b</sup>	1	0.99 (0.25–3.94) $P = 0.987$	3.44 (1.04–11.33) $P = 0.043$	20.04 (7.25–55.41) $P < 0.001$

<sup>a</sup>Adjusted for age and sex.  
<sup>b</sup>Adjusted for age, sex, and genotype.

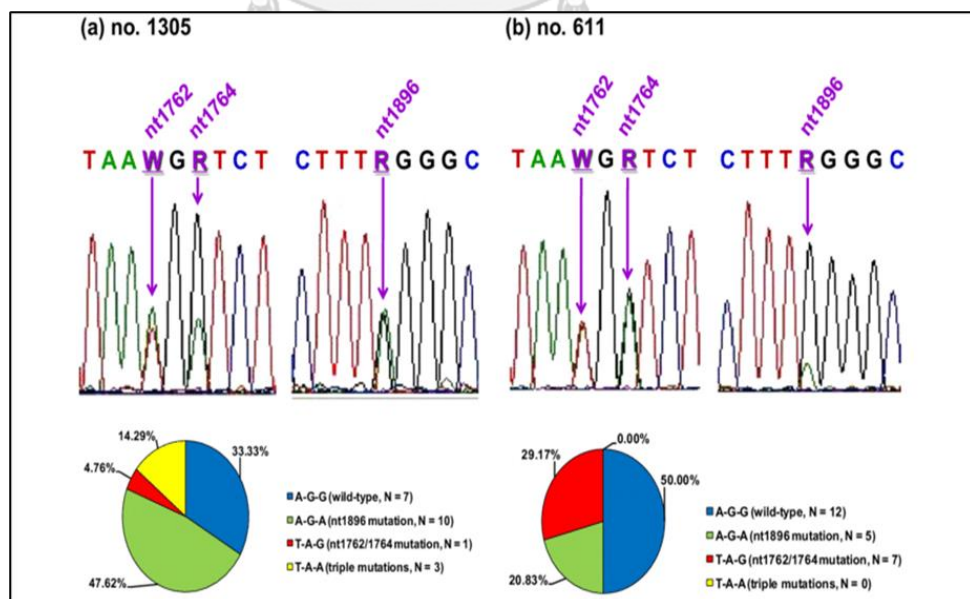
รูปที่ 6 การศึกษาความสัมพันธ์ของกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับการเกิดโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง และมะเร็งตับจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

นอกจากนี้ยังมีการกลายพันธุ์บริเวณ Pre-S ที่มีการศึกษาพบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเกิดมะเร็งตับ โดยมีการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมในผู้ป่วยตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่ไม่มีอาการ 202 คนกับผู้ป่วยมะเร็งตับ 64 คน พบว่า Pre-S deletion เป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งตับ อย่างมีนัยสำคัญ (odds ratio=3.77, 95% CI= 1.44-9.65) (46) ซึ่งการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์บริเวณ Pre-S จะส่งผลทำให้ surface protein มีการสะสมบริเวณเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมเพิ่มมากขึ้น ทำให้ภายในตับต้องมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น จนทำลายเซลล์ตับอย่างต่อเนื่องจนนำไปสู่การเป็นมะเร็งตับในที่สุด (47)

## การตรวจการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับ Basal core promoter

การตรวจวินิจฉัยไวรัสตับอักเสบบีด้วยเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ (Molecular Diagnostics) มีบทบาทสำคัญในการดูแลรักษาผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง เนื่องจากมีประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัยผู้ป่วย ถึงการดำเนินของโรคในผู้ป่วย การพยากรณ์โรค การให้วิธีการรักษาที่เหมาะสม และการติดตามผลการรักษาเพื่อช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดี บรรเทาอาการเจ็บปวดและทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาว(48) ดังนั้นวิธีการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำสูง (high accuracy & high precision) มีความสามารถตรวจจับจำเพาะและไวสูง (high sensitivity & high specificity) และตรวจได้รวดเร็ว (fast turnaround-time) จึงเป็นเทคนิคที่ห้องปฏิบัติการควรเลือกที่จะนำมาใช้ในการช่วยวินิจฉัยผู้ป่วย

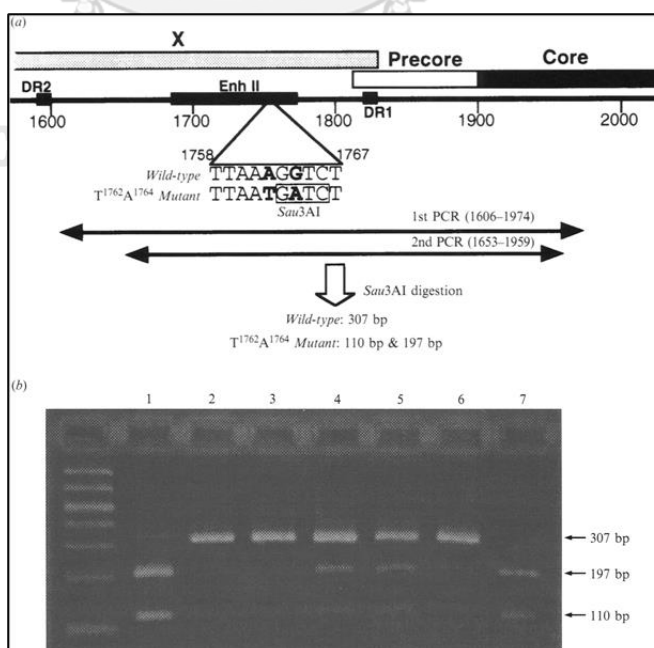
การตรวจการกลายพันธุ์ของ Basal core promoter ในปัจจุบันหลายวิธีที่นักวิจัยพัฒนาขึ้นมา ได้แก่ 1. Direct sequencing เป็นเทคนิคการตรวจทางด้านอณูพันธุศาสตร์ที่เป็นมาตรฐานสากลที่ทั่วโลกยอมรับ ( gold standard Molecular Diagnostics) โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Basal core promoter และใช้ Sanger sequencing ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Basal core promoter ได้โดยตรง (ดังรูปที่7) (49) ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจได้เลย ข้อเสียของเทคนิคนี้คือ มีความไวต่ำ (low specificity) เนื่องจากไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่มีระดับการกลายพันธุ์ของไวรัสต่ำกว่าร้อยละ 20 ได้ (16)



รูปที่ 7 การตรวจการกลายพันธุ์ Basal core promoter โดยวิธี Direct sequencing

2. PCR-RFLP เป็นเทคนิคการตรวจโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Basal core promoter และใช้การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นทำการดูขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel electrophoresis ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ง่าย สะดวก ไม่ต้องมีเครื่อง Sequencing ก็สามารถทำการตรวจสอบได้ (50) ข้อเสียคือ เป็นเทคนิคที่บ่นเปื้อนง่าย ความไวต่ำ (low specificity) ไม่สามารถวัดปริมาณไวรัสในตัวอย่างได้

3. nested PCR-RFLP เป็นเทคนิคที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจอย่างจำเพาะ (specificity) เทคนิคนี้เหมาะกับการตรวจในกรณีที่ดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มจำนวนยากหรือเพิ่มได้ปริมาณน้อย โดยใช้หลักการแบ่งการทำ PCR 2 รอบด้วยไพรเมอร์สองคู่ที่จำเพาะกับยีนเดียวกัน แต่ไพรเมอร์แต่ละตัวจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่แตกต่างกัน การทำ PCR รอบแรก (first round PCR) ใช้ไพรเมอร์คู่ที่จับบริเวณรอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่มีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ภายในของผลผลิตของดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบก่อน หลังจากนั้นนำผลผลิตของ PCR รอบแรกไปทำ PCR รอบที่สอง (second round PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่สอง ซึ่งออกแบบให้เพิ่มได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย หลังจากใช้การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ จากนั้นทำการดูขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี Gel electrophoresis ดังรูปที่ 8 (51) ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ง่าย สะดวก มีต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ราคาถูก ข้อเสียคือ เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากต้องทำ PCR ถึงสองรอบ จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางคลินิก



รูปที่ 8 การตรวจการกลายพันธุ์ Basal core promoter โดยวิธี nested PCR-RFLP

4. INNO-LiPA HBV PreCore assay® เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการ reverse hybridization ที่สามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้ทั้งการกลายพันธุ์ในตำแหน่งบริเวณ basal core promoter และ precore โดยที่ปริมาณการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบมีความสัมพันธ์กับการสร้าง HBeAg ของเชื้อไวรัส ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่สะดวกรวดเร็ว ข้อเสียคือ ผู้ป่วยเข้าไม่ถึงการรักษาเนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูง และไม่สามารถบอกปริมาณการกลายพันธุ์ที่ตรวจพบได้ จึงเกิดการพัฒนามาใช้เทคนิคการตรวจที่บอกการกลายพันธุ์เชิงปริมาณได้ (quantitative method)

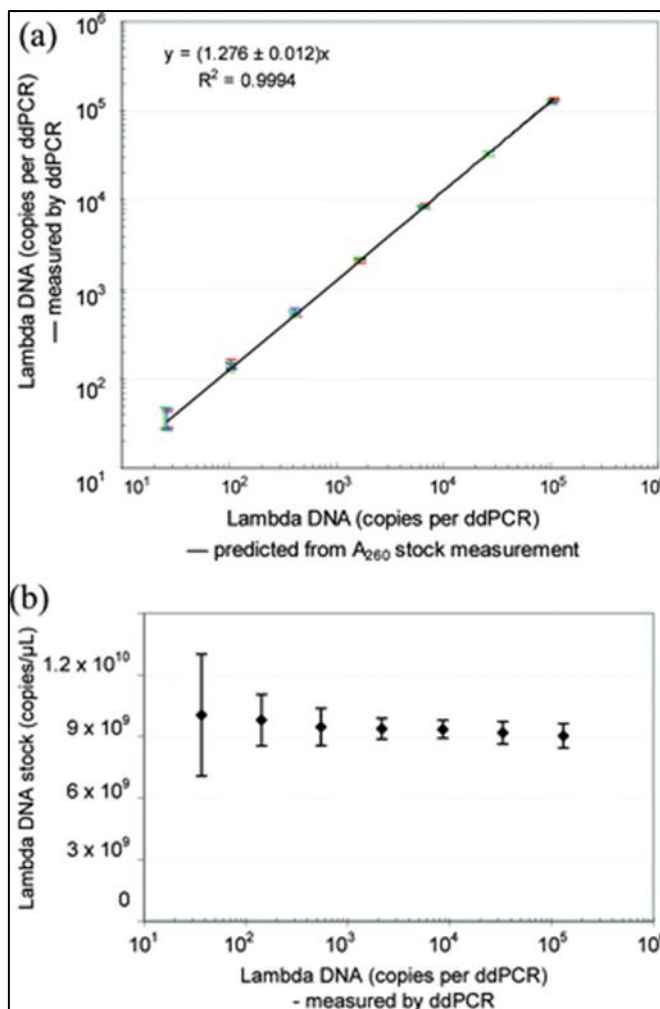
5. Real-time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจอย่างจำเพาะและสามารถติดตามการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุก ๆ รอบของการเพิ่มจำนวน ตั้งแต่เริ่มต้นปฏิกิริยาจนกระทั่งสิ้นสุดปฏิกิริยา (real-time detection) เทคนิคนี้อาศัยการตรวจวัดสัญญาณสารเรืองแสงที่ถูกปล่อยออกมาโดยจะติดเข้าไปใน Probe เรียกว่า “fluorescent hybridization probes” ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วน (Proportion) โดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละรอบ โดยทั่วไปดีเอ็นเอที่เพิ่มจากการทำปฏิกิริยา PCR เป็นลักษณะกราฟ exponential โดยแกน Y แสดงสัญญาณการเรืองแสง และแกน X แสดงจำนวนรอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ การตรวจสอบการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิค real-time PCR จะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำ และบอกการกลายพันธุ์ในเชิงปริมาณได้ว่า ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีการกลายพันธุ์ของไวรัสบริเวณนี้ไปร้อยละเท่าไร การตรวจวัดผลผลิต PCR ในเวลาที่เกิดขึ้นในช่วงระยะ exponential ซึ่งเป็นช่วงที่ระดับสัญญาณสารเรืองแสงสูงเหนือระดับ threshold และเป็นช่วงที่ยังมีแนวโน้มการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายแบบทวีคูณ (52) (53) ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์เชิงปริมาณ (quantitative method) มีความไวสูง (high specificity) ข้อเสียคือ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์เมื่อมีจำนวนเชื้อไวรัสต่ำกว่าร้อยละ 10-15 และสามารถตรวจได้แค่การกลายพันธุ์ที่รู้ตำแหน่งแล้วเท่านั้น (54)

6. SYBR Green I qPCR with Melting Curve Analysis เป็นเทคนิคที่พัฒนาโดยนักวิจัยชาวไทย โดยใช้หลักการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจด้วย Real-time PCR และนำไปทำ Melting Curve ผลการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความแปรปรวน melting temperature ของการกลายพันธุ์ A1762T/G1764A และ wild type เท่ากับ  $77.19 \pm 0.32$  องศาเซลเซียสและ  $80.70 \pm 0.37$  องศาเซลเซียสตามลำดับ และสามารถตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสได้ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 6,460 copies/ml ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นการตรวจสอบการกลายพันธุ์เชิงปริมาณ (quantitative method) ให้ค่า coefficient of correlation ( $R^2$ ) มากกว่า 0.99 แปลว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง มีความสะดวกรวดเร็วในการตรวจโดยใช้เวลาเพียง

3 ชั่วโมงในการทดสอบจนถึงการอ่านผล (55) ข้อเสียคือ เป็นข้อจำกัดของเทคนิค Real-time PCR นั่นคือ ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์เมื่อมีจำนวนเชื้อไวรัสต่ำกว่าร้อยละ 10-15 นอกจากนี้ยังต้องใช้หลายเทคนิคกว่าจะได้ผลลัพธ์ จึงไม่เหมาะกับห้องปฏิบัติการที่มีความรีบเร่งและต้องการความสะดวกในการตรวจ (54)

7. Next generation sequencing โดยใช้ Miseq Illumina platform เป็นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ whole HBV genome sequencing สามารถหาการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีได้ทั้งจีโนมในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง และสามารถบอกการกลายพันธุ์เชิงปริมาณได้ (quantitative assay) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่มีระดับการกลายพันธุ์ของไวรัสตั้งแต่ร้อยละ 1 ได้ (16) ข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายที่แพงเกินไป สำหรับการตรวจการกลายพันธุ์แบบจุดแค่ point mutation อย่างเช่นถ้าจะดูแค่การกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter เพียงตำแหน่งเดียว อาจจะไม่เหมาะกับการใช้งาน NGS

นอกจากเทคนิคที่กล่าวมาข้างต้น ในปัจจุบันยังมีเทคนิคที่น่าสนใจ ที่จะสามารถนำมาใช้ในการตรวจการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีได้ ได้แก่ **Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)** ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทันสมัย สามารถบอกผลการตรวจการกลายพันธุ์เชิงปริมาณ(quantitative method) ได้ว่าผู้ป่วยมีการกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter ไปร้อยละเท่าไร ddPCR ยังเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาให้เหมาะสมสำหรับการตรวจการกลายพันธุ์ โดยเฉพาะ (56) เนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำสูง (high accuracy & high precision) (ดังรูปที่ 9) (57) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ทำการเปรียบเทียบการใช้เทคนิคระหว่าง ddPCR กับเทคนิค standard method อย่าง Sanger sequencing พบว่า ddPCR ใช้เวลาตรวจเพียง 6 ชั่วโมง สามารถบอกผลการตรวจได้ ในขณะที่ Sanger sequencing ต้องใช้เวลาตรวจถึง 24 ชั่วโมงถึงจะสามารถบอกผลการตรวจได้ นอกจากนี้เทคนิค ddPCR ยังสามารถบอกปริมาณไวรัสเป็นจำนวนนับได้จริง (copies/uL) เป็นเทคนิคที่ใช้งานง่าย และสามารถตรวจในตัวอย่างผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ในระดับต่ำได้ (ดังรูปที่ 10) (58)



รูปที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค ddPCR (57)

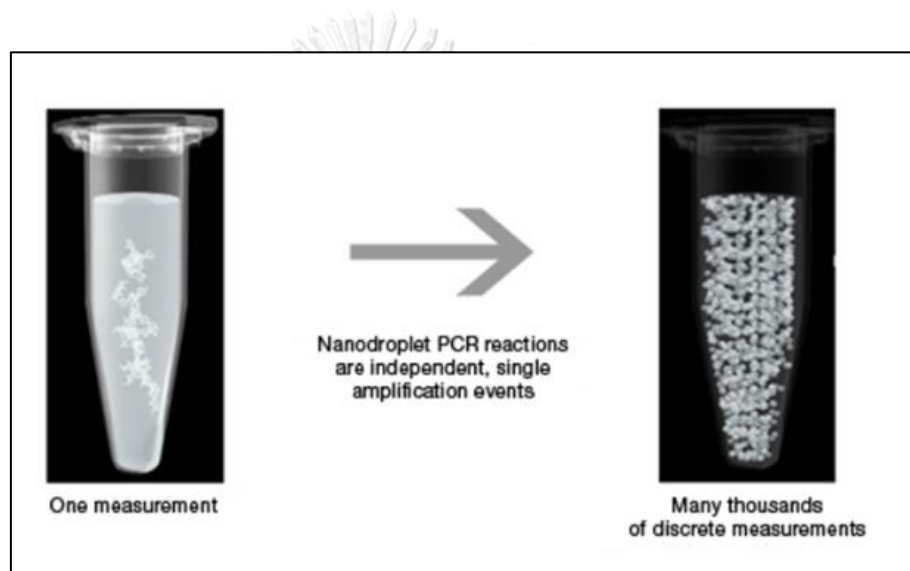
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2. Comparison of two methods in low-frequency mutation detection

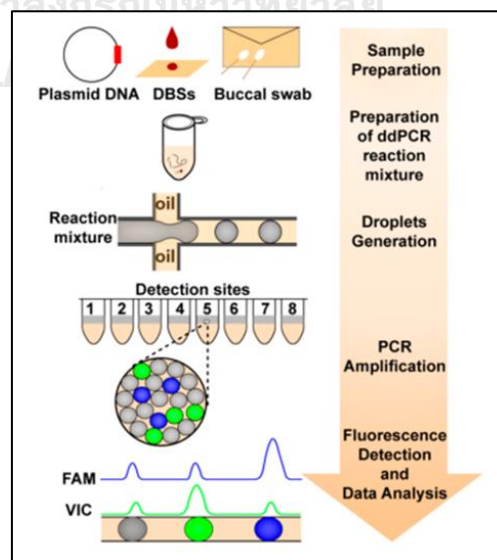
	ddPCR	Sanger sequencing
Sample capacity	Several copy number	>0.5 μg
Detection range	>1%	>25%
Reproducibility	Stable	Unstable
Period	~6 h	~24 h
Platform	Easy	Complexed
Amplification preference	No	Yes
Cost for per sample	>5 \$	~2 \$
Detection throughput	8	96
Mutation site	Known	Known and unknown

รูปที่ 10 การเปรียบเทียบการใช้เทคนิคระหว่าง ddPCR กับเทคนิค Sanger sequencing ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์

ddPCR เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นในทศวรรษที่ 1990 (Sykes, Neoh et al. 1992) โดยใช้หลักการเจือจางสารพันธุกรรมแล้วหุ้มสารพันธุกรรมด้วย oil ด้วยเทคนิค water-in-oil emulsion เพื่อทำให้เกิดการกระจายตัวของสารพันธุกรรมในแต่ละปฏิกิริยา PCR (partition) โดยอัตราส่วนการเจือจางที่เหมาะสมจะมีดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 copy ต่อ 1 partition ซึ่งจะแบ่งออกเป็นจำนวนหลายพันปฏิกิริยาในปริมาตรขนาดเล็กระดับนาโนลิตร (ดังรูปที่ 11) หลังจากสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณรอบสุดท้ายในเครื่อง PCR แล้วจึงตรวจวัดสัญญาณการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ในแต่ละ partition ที่เป็นบวกหรือลบ (end point PCR) ซึ่งจะสามารถหาปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายสุทธิได้โดยตรง (ดังรูปที่ 12) (17)



รูปที่ 11 ddPCR Partition (ลิขสิทธิ์ Biorad)



รูปที่ 12 ขั้นตอนการทำ ddPCR



มีการศึกษาใช้เทคนิค Droplet digital polymerase chain reaction ตรวจสอบการกลายพันธุ์ในยีน *KRAS* โดยสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ระดับต่ำได้ถึงร้อยละ 0.1 ของระดับการกลายพันธุ์ (Dong, Wang et al. 2018) และมีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้เทคนิคระหว่าง ddPCR กับเทคนิค standard method อย่าง Sanger sequencing ในการใช้ตรวจสอบการกลายพันธุ์ในยีน *BRAF<sup>V600E</sup>* ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนนี้มีความสำคัญต่อการพยากรณ์โรค papillary thyroid carcinoma โดยผลการศึกษาพบว่า ในกลุ่มตัวอย่าง 150 คน เทคนิค ddPCR สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF<sup>V600E</sup>* ได้ 92 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 61.33 ส่วนเทคนิค Sanger sequencing สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF<sup>V600E</sup>* ได้ 67 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 44.67 และค่า sensitivity และค่า specificity ของเทคนิค ddPCR ในการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF<sup>V600E</sup>* อยู่ที่ 100% และ 69.88% ตามลำดับ โดยเทคนิค ddPCR สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF<sup>V600E</sup>* ที่การกลายพันธุ์ระดับต่ำได้ถึงร้อยละ 5 (25 samples, 27.17%) ได้ แต่เทคนิค Sanger sequencing ไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF<sup>V600E</sup>* ที่การกลายพันธุ์ระดับต่ำกว่าร้อยละ 5 ได้ (59) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาใช้เทคนิค ddPCR สำหรับการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella spp.* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *Salmonella spp.* ในผู้ป่วยที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียตั้งแต่ 0.5 copies/ul ขึ้นไป และความแม่นยำตั้งแต่ 5 ถึง 10% โดยวัดเป็นค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยการทำซ้ำ (60)

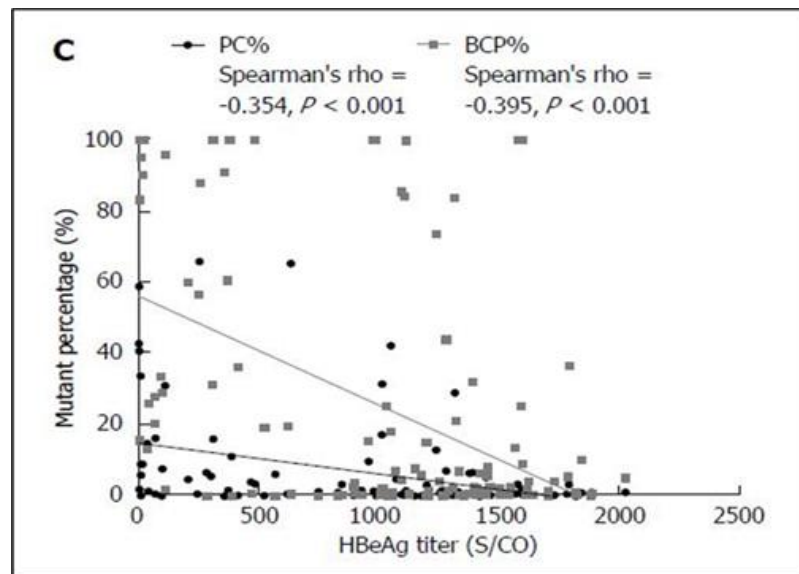
ดังนั้นเทคนิค Droplet digital polymerase chain reaction จึงเป็นเทคนิคที่มีความละเอียดและแม่นยำสูงที่จะสามารถใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีได้และช่วยวินิจฉัยผู้ป่วย ทำให้ผู้ป่วยได้ผลการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำ และเข้าถึงการรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันเวลาที่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

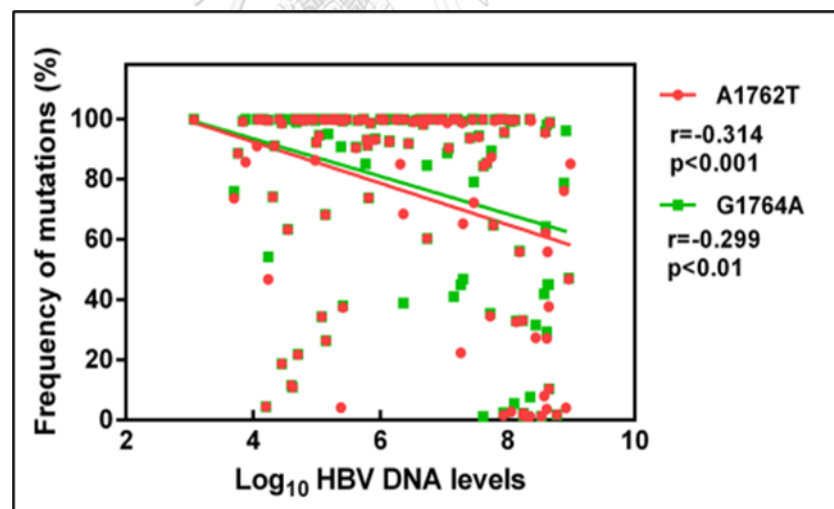
### ความสัมพันธ์การกลายพันธุ์ Basal core promoter กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆ

มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ HBV DNA และค่า HBeAg titer (S/CO) กล่าวคือ เมื่อมีระดับการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ที่เพิ่มมากขึ้นระดับ HBV DNA, HBeAg titer(S/CO) จะน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ spearman's rho = -0.395, -0.314, -0.299 และ P<0.001, P<0.001, P<0.01 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 13 และ 14) (61) และมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับอายุพบว่า ร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ Basal core promoter มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอายุ กล่าวคือ ในช่วงอายุมากกว่า 40 ปีขึ้นไปจะมีการสะสมระดับการกลาย

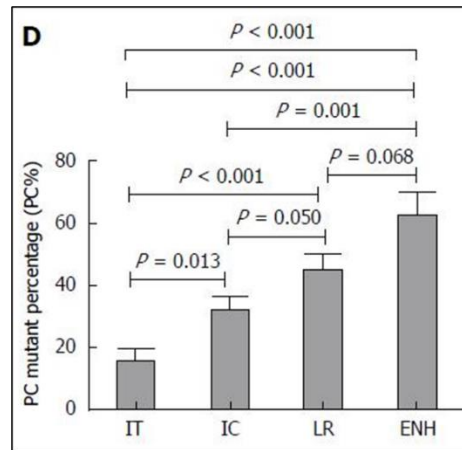
พันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ spearman's rho = 0.31 และ  $P < 0.001$  นอกจากนี้ยังมี การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบร้อยละการกลายพันธุ์ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ในแต่ละกลุ่ม ของการดำเนินโรค โดยมีค่า  $P = 0.013$ ,  $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$  ตามลำดับ โดยกลุ่ม HBeAg negative มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A สูงสุด (ดังรูปที่ 15) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบร้อยละการ กลายพันธุ์ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ระหว่างกลุ่ม HBeAg-Positive กับ HBeAg-Negative ที่ค่า  $P < 0.001$  โดยกลุ่ม HBeAg Negative มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์ บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A มากกว่ากลุ่ม HBeAg-Positive (ดังรูป ที่ 16) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบร้อยละการกลายพันธุ์ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ระหว่างกลุ่ม อายุน้อยกว่า 40 ปี กับ อายุมากกว่า 40 ปี ที่ ค่า  $P=0.005$  โดยกลุ่ม อายุมากกว่า 40 ปี มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A มากกว่ากลุ่มอายุน้อยกว่า 40 ปี (ดังรูปที่ 17) (53) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาพบว่า ระดับ HBcrAg มีค่าเฉลี่ยลดลงในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg positive ที่มีการกลายพันธุ์ basal core promoter ( $n=33$ ) เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ( $n=15$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $P = 0.020$  และพบว่า ระดับ HBcrAg มีค่าเฉลี่ยลดลงอย่างชัดเจน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg positive ที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter และ Precore ร่วมด้วย ( $n=9$ ) เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ ( $n=15$ ) ที่  $P = 0.001$  และการศึกษาพบว่า ระดับ HBcrAg ในกลุ่ม Anti-HBe positive ค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ในกลุ่มที่ไม่มีการกลายพันธุ์ BCP double mutation ( $n=11$ ) เทียบกับกลุ่มที่มีการกลายพันธุ์ BCP double mutation ( $n=22$ ) มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 18 (62)



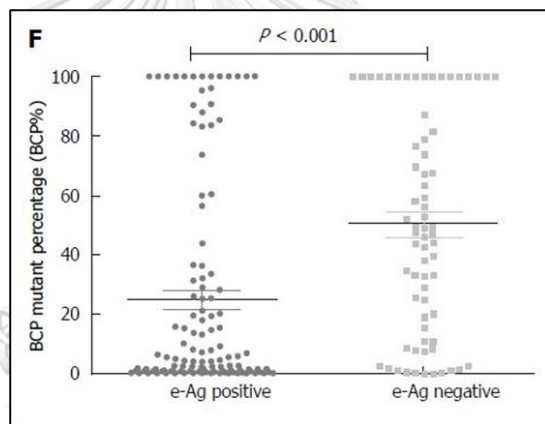
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับค่า HBeAg titer



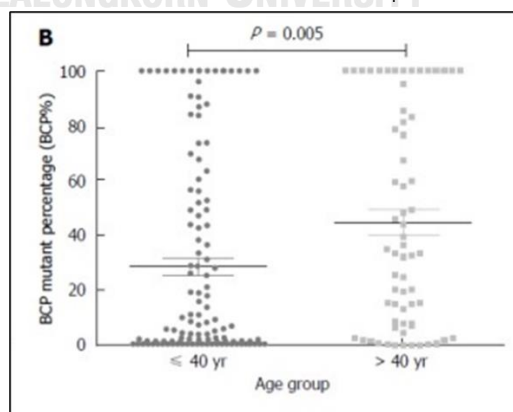
รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A กับค่า HBV DNA



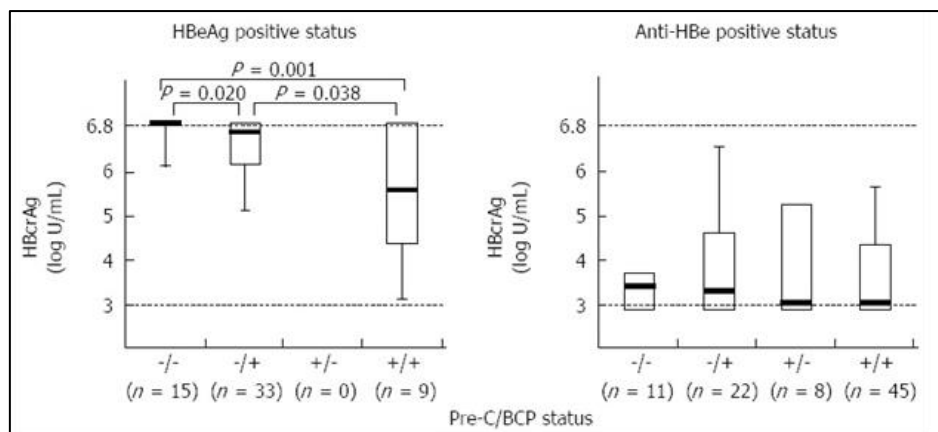
รูปที่ 15 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามการดำเนินโรค



รูปที่ 16 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่มตัวอย่างแบ่งตาม HBeAg



รูปที่ 17 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่างแบ่งตามอายุ



รูปที่ 18 การศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระดับ HBcrAg ระหว่างผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายกับผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter

### การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation)

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ(method validation) คือกระบวนการยืนยันความถูกต้อง ความเหมาะสมของวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ศึกษา เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ช่วยให้ทราบถึงคุณสมบัติ และข้อจำกัดของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ (63) (64) (83) โดยมีคุณสมบัติของการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์หลายวิธี ยกตัวอย่างที่ใช้สำหรับงานทางด้านการตรวจการกลายพันธุ์ด้วย 3 วิธีทดสอบ คือ

#### 1. การทำซ้ำอย่างแม่นยำ (precision) ของเทคนิค

Precision หมายถึง ความแม่นยำของการวิเคราะห์ซ้ำๆ หลายๆ ครั้ง ความแตกต่างของผลวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ มักจะแสดงเป็นค่า SD หรือ สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation, CV) (80) ซึ่ง precision ของวิธีการวิเคราะห์มี 2 ลักษณะคือ

1.1) Intra-assay repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในสภาวะเดียวกัน โดยใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการเดียวกัน เครื่องมือชุดเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียว ใช้เวลาทดลองภายใน 1-3 วันเป็นต้น

1.2) Inter-assay repeatability หมายถึง ความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ โดยใช้วิธีเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการต่างกัน เครื่องมือชุดต่างกัน ผู้วิเคราะห์ต่างกัน มักจะวิเคราะห์โดยใช้เวลาพอสมควร 3-5 วันเป็นต้น (65)

#### 2. การหาค่า LOB, LOD และ LOQ (limit of blank, limit of detection and limit of quantitation) ของเทคนิค

-LOB (limit of blank) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถแยกความแตกต่างจาก blank ได้

-LOD (limit of detection) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้

-LOQ (limit of quantitation) หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่าง ที่สามารถหาปริมาณ หรือรายงานผลโดยมี accuracy และ precision ที่ยอมรับได้ (65)

LOD และ LOQ หาได้โดยการวัด blank ของตัวอย่าง (sample blank) อย่างน้อย 7 ซ้ำ และนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่า SD จากสูตร (66)

$$\text{LOB} = \text{ค่าเฉลี่ยของ (copy number blank)} + 1.645 \times \text{SD (copy number blank)}$$

$$\text{LOD} = \text{ค่าเฉลี่ยของ sample blank} + 3 \text{ SD}$$

$$\text{LOQ} = \text{ค่าเฉลี่ยของ sample blank} + 10 \text{ SD}$$

### 3. Linearity

Linearity หมายถึง ความสามารถของวิธีการวิเคราะห์นั้นๆ ที่จะทำให้วิเคราะห์แล้วได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็น สัดสวนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด (67)

linearity ทำโดยการวิเคราะห์ sample blank ที่เดิมสารมาตรฐานใหม่มีความเข้มข้น อย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้นตั้งแต่น้อยไปจนมากที่สุด และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เกณฑ์การยอมรับได้โดยทั่วไปค่า r จะต้องมีความอยู่ระหว่าง 0.995 – 1.000 (65) (83)

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินการวิจัย

##### รูปแบบการวิจัย (Research design)

รูปแบบการวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลเชิงวิเคราะห์ย้อนหลัง (Retrospective analytic study) ซึ่งได้รับการพิจารณาและผ่านการอนุมัติจริยธรรมจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Institutional Review Board, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University) โครงการวิจัยหมายเลข IRB no. 73/65

##### กลุ่มประชากรเป้าหมาย (Target Population)

ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง ที่มาเข้ารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยการศึกษาสนใจผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังใน 2 กลุ่มคือ กลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มี HBeAg Positive หรือกลุ่ม (ii) HBeAg-positive chronic hepatitis และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มี HBeAg Negative หรือกลุ่ม (iv) HBeAg-negative chronic hepatitis เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ต้องได้รับการรักษาเป็นอันดับแรก เนื่องจากมีความรุนแรงของโรคมามาก

- เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษา (Inclusion criteria) ดังนี้
  - ผู้ป่วยมีเชื้อชาติไทยได้รับการตรวจว่ามีสารติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg positive)
  - ผู้ป่วยที่ได้รับการตรวจวินิจฉัยระยะของการดำเนินโรคจัดอยู่ในกลุ่ม HBeAg positive หรือกลุ่ม HBeAg negative
  - ผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษามาก่อน (treatment-naive CHB patients)
  - มีการประเมินผลปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิก เช่น ค่าเอนไซม์ของตับ ALT, HBV DNA, Fibroscan
- เกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมการศึกษานอกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria) ดังนี้
  - ผู้ป่วยที่มีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus) แล้วได้รับการรักษา หรือให้ยาแล้ว
  - ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HCV) หรือการติดเชื้อไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่อง (HIV) ร่วมด้วย
  - ผู้ป่วยที่มีสาเหตุอื่นๆ ของโรคที่เกี่ยวข้องกับตับ (เช่น autoimmune liver disease หรือ alcoholic liver disease)
  - ผู้ป่วยที่มีประวัติการเป็นโรคมะเร็งตับ หรือมะเร็งชนิดอื่น

### การคำนวณขนาดตัวอย่าง

การทดลองครั้งนี้ แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม

สำเร็จรูป G\*Power version 3.1.9.2 กำหนด Test family = t-tests, Statistical test = Means: Difference between two independent means (two groups) A priori: Compute required sample size

Input: Tail(s) = Two

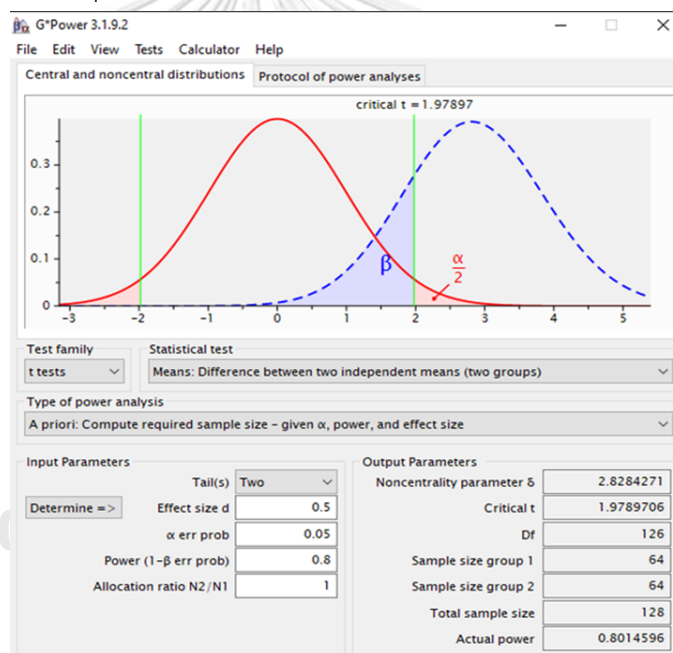
Effect size  $d = 0.5$  (Medium size)

$\alpha$  err prob = 0.05

Power ( $1-\beta$  err prob) = 0.80

Allocation ration  $N_2/N_1 = 1$

กลุ่มตัวอย่างควรมีอย่างน้อย กลุ่มละ 64 รายขึ้นไป



รูปที่ 19 การคำนวณขนาดตัวอย่างโดยโปรแกรม G\*Power

ดังนั้นกลุ่มตัวอย่างที่ต้องการศึกษาต้องมีจำนวนอย่างน้อยกลุ่มละ 64 ราย ทั้งนี้เพื่อให้ข้อมูลของงานวิจัยมีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ดังนั้นจึงทำการเลือกตัวอย่างให้ได้มากที่สุด โดยจะใช้ตัวอย่างทั้งหมด 185 รายในการศึกษาครั้งนี้ โดยแบ่งเป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มี HBeAg Positive หรือกลุ่ม (ii) HBeAg-positive chronic hepatitis จำนวน 75 รายและในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มี HBeAg Negative หรือกลุ่ม (iv) HBeAg-negative chronic hepatitis จำนวน 110 ราย



## วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Centrifuge (Eppendorf, Germany)
2. Automatic adjustable micropipette (Eppendorf, Germany)
3. Flow cabinet (Gelman sciences, Singapore)
4. DeNovix DS11 FX+ spectrophotometer (DeNovix Inc., USA)
5. Vortex (Scientific Industries, USA)
6. Microcentrifuge tube 0.5 ul, 1.5ul, 2ul (Axygen, USA)
7. Freezer 4 C (misubishi, Japan)
8. Freezer -20 C (sanyo, Japan)
9. Electrophoresis chambers (Biorad, USA)
10. Parafilm (American naton, USA)
11. PCR Mastercycler (Eppendorf, Germany)
12. Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)
13. Incubator shaker (Zhicheng, China)
14. Autoclave (Hirayama, Japan)
15. Gel Doc (Biorad, USA)
16. QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)
17. QX200 AutoDG Droplet Digital PCR (Biorad, USA)
18. Reagent Bottle (Duran, USA)

### สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ

1. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)
  1. Proteinase K (5PRIME, Germany)
  2. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Merck, Japan)
  3. Proteinase K (USB, USA)
  4. Disodium ethylenediamine tetraacetic acid: EDTA (UB, Hong Kong)
  5. Chloroform (Sigma, Mo, USA)
  6. Phenol (Amresco, OH, USA)
  7. Isoamyl alcohol (BDH, UK)
  8. Glycogen (US, Ohio, USA)
  9. Sodium acetate (Sigma, Singapore)

10. Absolute ethanol (Merck, Germany)
11. Nuclease free water
2. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR
  1. 10X PCR buffer (KOD-Plus-Neo, Japan)
  2. 25mM Magnesium chloride (KOD-Plus-Neo, Japan)
  3. 0.2mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (KOD-Plus-Neo, Japan)
  4. Oligonucleotide primers (Macrogen, Korea)
  5. *Taq* DNA polymerase (KOD-Plus-Neo, Japan)
3. สารเคมีที่ใช้ในการทำ gel electrophoresis
  1. Agarose molecular grade (Research Organics, OH, USA)
  2. Boric acid (USB, Hongkong)
  3. EDTA Tetrasodium Dihydrate (USB, Hongkong)
  4. Tris base biotechnology grade (USB, Hongkong)
  5. Ethidium bromide (Sigma, singapore)
  6. 100 bp ladder (Fermentas, MD, USA)
  7. 6X DNA loading dye (Fermentas, MD, USA)
4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล (Gel extraction)
 

-Hiyield™ Gel/PCR DNA fragment extraction kit  
(RBC Bioscience, Taiwan)
5. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR เข้าสู่ cloning vector
  1. 10X Ligation buffer (Thermo scientific, USA)
  2. pGEM T Easy vector (Promega, USA)
  3. T4 DNA ligase (Thermo scientific, USA)
6. สารเคมีที่ใช้ในการทำกระบวนการ Transformation
  1. Agar (Becton, Dickinson and company (BD), USA)
  2. *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) (Thermo scientific, USA)
  3. Potassium chloride (VWR international, USA)
  4. Sodium chloride (Merck, Germany)
  5. Glucose (Ajax Finechem, New Zealand)
  6. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) (Promega, USA)

7. Isopropyl  $\beta$ - d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Eppendorf, Germany)
8. Tryptone (Becton, Dickinson and company (BD), USA)
9. Yeast extract (Becton, Dickinson and company (BD), USA)
6. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดควบคุมบวก  
-Hiyield™ Plasmid mini kit (RBC Bioscience, Taiwan)
7. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค ddPCR
  1. 2x supermix for probe (No dUTP) (Biorad, USA)
  2. Oligonucleotide primers (Macrogen, Korea)
  3. 5uM fluorescent probes (Integrated DNA Technologies, USA)
8. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Sanger sequencing
  1. Oligonucleotide primers (Macrogen, Korea)
  2. 5X Platinum II PCR buffer (Thermo Scientific, USA)
  3. 10mM dNTPs mix (Thermo Scientific, USA)
  4. Platinum GC Enhancer (Thermo Scientific, USA)
  5. Hot star *Taq* polymerase (Thermo Scientific, USA)
9. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real Time PCR
  1. TaqMan® Genotyping Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA)
  2. Oligonucleotide primers (Macrogen, Korea)
  3. 5uM fluorescent probes (Integrated DNA Technologies, USA)
10. โปรแกรมสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
  1. GraphPad Prism version 9.1.0(<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>)
  2. IBM SPSS statistics version 22 (SPSS, Chicago, IL)

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1.) การสกัด DNA จากซีรัมหรือพลาสมาของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังด้วย

##### Phenol-Chloroform Isoamyl alcohol Extraction

- 1.1 ใส่ 400 ul Lysis buffer และ 10 ul Proteinase K ลงไปใน Serum หรือ Plasma 100 ul
- 1.2 นำ 2.1 ไป Vortex และ บ่ม 50 °C 1 ชั่วโมง
- 1.3 เติม 250 ul สารละลาย Phenol (ดูดสารละลายชั้นล่าง) ที่ผสม 250 ul CHCl<sub>3</sub>:IAA โดยมีอัตราส่วน 49 : 1 ตามลำดับ
- 1.4 นำ 2.3 ไป Vortex และ ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที 4°C

- 1.5 ดูดสารละลายส่วนบนใส่ tube อันใหม่ และใส่ 4 ul 20mg/ml glycogen, 800 ul 100% EtOH และ 40 ul 2M NaOAC
- 1.6 แช่ -70 °C 30 นาที
- 1.7 นำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที 4°C และเทส่วนใสทิ้ง
- 1.8 นำตะกอนใส 1, มิลลิลิตร 70% EtOH และผสมเข้าด้วยกันอย่างเบามือ
- 1.9 ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที
- 2.0 เทส่วนใสทิ้ง วางทิ้งไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 5 นาที
- 2.1 ใส่ 30 ul dH<sub>2</sub>O

## 2.) การวัดคุณภาพของ DNA ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer

ตรวจสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้ ทำการหยด DNA ตัวอย่าง ปริมาตร 1 µl ลงบนของแท่นวาง DNA จากนั้นกดให้เครื่องวัดคุณภาพของ DNA โดยใช้ในการดูดกลืนแสงของ DNA ตามสูตรดังนี้

$$\text{- ความเข้มข้น DNA (ng/ul) = OD}_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

$$\text{- คุณภาพ DNA} = (\text{OD}_{260}) / (\text{OD}_{280})$$

โดยตัวอย่างที่เหมาะสมจะมีคุณภาพ DNA ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 ng/µL ขึ้นไปและมีความบริสุทธิ์ (OD<sub>260</sub>/280) อยู่ระหว่าง 1.8-2.2

## 3.) การโคลนยีนของไวรัส BCP wildtype เพื่อทำเป็น positive wildtype control

### 3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัส HBV บริเวณ BCP ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอจากเลือดที่ได้รับการตรวจว่าเป็น BCP wildtype มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน HBV บริเวณที่ครอบคลุม basal core promoter ซึ่งมีลำดับดังนี้

Forward primer: 5'-ACTTCGCTTCACCTCTGCACG-3' (HBV\_1583F) และ

Reverse primer: 5'-CDGGWGGAGTGCGRATCCACA-3' (HBV\_C2291R)

โดยการเตรียม Master mix (KOD-Plus-Neo, Japan) ใน 1 ปฏิกิริยามีรายละเอียด ดังตารางที่ 1 ตารางที่ 1 ส่วนผสมการทำ PCR master mix

รายละเอียดของ Master mix (1 reaction)	
10 mM Forward primer	0.75 ul
10 mM Reverse primer	0.75 ul
10X PCR buffer	2.5 ul
0.2mM dNTP	2.5 ul

25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 ul
Taq polymerase (KOD-Plus-Neo)	0.5 ul
dH <sub>2</sub> O	15.5 ul
Total	24 ul

ดูด master mix ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดพีซีอาร์ หลอดละ 24 ul จากนั้นดูดดีเอ็นเอต้นแบบลงไปหลอดละ 1 ul แล้วนำไปเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 2 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR			
1	Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 2 นาที
2	Denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
3	Annealing	ที่อุณหภูมิ 58 °C	เป็นเวลา 1 นาที
4	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 °C	เป็นเวลา 1 นาที
	ทำ 2 - 4 เป็นจำนวน 30 รอบ		
5	Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °C	เป็นเวลา 10 นาที
	hold	ที่อุณหภูมิ 4 °C	

### 3.2 Agarose gel electrophoresis

เตรียม 2% agarose gel โดยชั่ง agarose 2 g ละลายใน 1X TBE buffer 100 ml หลอม agarose gel จนละลายแล้วใส่ RedSafe 5 µl เทลงในภาตขณะที่ยังอุ่น เตรียมดีเอ็นเอที่จะนำมาตรวจสอบ โดยใช้ 6X loading dye 5 µl : DNA 25 µl จากนั้นหยอดดีเอ็นเอลงใน agarose gel ทำ Electrophoresis ใน 1X TBE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ไปส่องภายใต้แสง Bluelight จากนั้นบันทึกภาพเพื่อนำมาวิเคราะห์ผล

### 3.3 การทำ Hiyield™ Gel/PCR DNA fragment extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan)

ตัดเจลที่มี PCR product ของ HBV BCP wildtype DNA มาใส่ tube แล้วใส่ 500 ul DF buffer จากนั้นนำไป Vortex และ บ่ม 55 °C เป็นเวลา 10-15 นาทีและกลับ tube ไปมาทุกๆ 3 นาที จนได้เป็นสารละลายแล้วดูดสารออกมา 800 ul ใส่ใน DF column ที่อยู่ใน collection tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งส่วนใสใน collection tube แล้วใส่ 600 ul wash buffer จากนั้นนำไป ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว

13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ที่มีส่วนใสใน collection tube แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงอีกรอบ ด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วใส่ DF column ใน tube อันใหม่ จากนั้นใส่ 20-50 ul Elution buffer และวางทิ้งไว้ 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm 2 นาที

#### 3.4 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ pGEM T Easy vector

นำ HBV BCP wildtype DNA มาเชื่อมต่อกับ pGEM T Easy vector (Promega, USA) โดยใส่ HBV BCP wildtype DNA 5 ul กับ pGEM T Easy vector 1 ul จากนั้นใส่ 2X buffer 5 ul และใส่ T4 DNA ligase 2 ul ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 25 °C นาน 3 ชั่วโมง

#### 3.5 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียโดยกระบวนการ Transformation

นำ ligation reaction ของชิ้นดีเอ็นเอ กับ vector 10 ul ใส่กับ 50 ul ของเชื้อ *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) ผสมให้เข้ากัน แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไป Heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C 1 นาที แล้วนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันที 2 นาที เติมน้ำ 980 ul SOC medium กับ 10 ul glucose และ Mg<sup>2+</sup> แล้วนำไปเขย่าที่ อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 4,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสที่บางส่วน และเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียใน tube ปริมาตร 100 ul มา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 100 ug/ul สารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน กับ 15 ul 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -Dgalactopyranoside (X-gal) และ 5 ul Isopropyl  $\beta$ -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) จากนั้นนำไป บ่ม 37 °C 16 ชั่วโมง

#### 3.6 การคัดเลือกและตรวจสอบโคลนของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม ด้วย Colony PCR

คัดเลือกโคลนของเซลล์แบคทีเรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม โดยคัดเลือกโคลนสีขาวที่สามารถเจริญบนอาหาร LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน X-gal และ IPTG (Blue/White Screening) ซึ่งใช้เป็น selective medium ใช้ที่บ่มผ่านการอบฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วและโคลนสีขาว จากนั้นนำโคลนสีขาวบางส่วนไปทำ PCR และอีกส่วนนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 ml ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ug/ul จำนวน 3 ul นำไปบ่ม 37 °C 16 ชั่วโมง นำโคลนสีขาวมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13 ซึ่งมีลำดับดังนี้

Forward primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (M13F) และ

Reverse primer: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (M13R)

โดยการเตรียม Master mix ใน 1 ปฏิกิริยามีรายละเอียด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนผสมการทำ colony PCR master mix

รายละเอียดของ Master mix (1 reaction)	
10 mM Forward primer	0.75 ul

10 mM Reverse primer	0.75 ul
10X PCR buffer	2.5 ul
0.2mM dNTP	2.5 ul
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 ul
Taq polymerase (KOD-Plus-Neo)	0.5 ul
dH <sub>2</sub> O	16.5 ul
<b>Total</b>	<b>25 ul</b>

ดูด master mix ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดพีซีอาร์ หลอดละ 25 ul จากนั้นโคลนีสีขาวลงไป หลอด แล้วนำไปเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 4 ตารางที่ 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา colony PCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR			
1	Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 2 นาที
2	Denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
3	Annealing	ที่อุณหภูมิ 58 °C	เป็นเวลา 1 นาที
4	Extension	ที่อุณหภูมิ 72 °C	เป็นเวลา 1 นาที
ทำ 2 - 4 เป็นจำนวน 30 รอบ			
5	Final extension	ที่อุณหภูมิ 72 °C	เป็นเวลา 10 นาที
6	hold	ที่อุณหภูมิ 4 °C	

### 3.7 Agarose gel electrophoresis

นำ colony PCR มารันเจลตามข้อ 3.2

### 3.8 การสกัดพลาสมิดด้วยชุด Hiyield™ Plasmid mini kit (RBC Bioscience, Taiwan)

นำเชื้อแบคทีเรียจากโคลนีสีขาว ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ml ที่เต็มสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน 3 ul แล้วนำไป บ่ม 37 °C 16 ชั่วโมง มา ปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยบัฟเฟอร์ PD1 200 ul ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD2 200 ul กลับหลอดไปมาเบาๆ 4 – 6 ครั้ง วางทิ้งไว้ 5 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ PD3 300 ul กลับ หลอดไปมาเบาๆ 4 – 6 ครั้งนำไป ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลาย ส่วนใสใส่ลงใน PD column ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ล้างโปรตีนที่ เหลืออยู่ด้วย W1 buffer 400 ul ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วเท่าเดิม เทสารละลายใส่ทิ้ง เติม บัฟเฟอร์ Wash buffer 600 ul ปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็วเท่าเดิม เทส่วนใสทิ้ง ปั่นเหวี่ยง อีกครั้ง ด้วยความเร็วเท่าเดิม เพื่อเอาบัฟเฟอร์ออกให้หมด ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดใหม่ ล้างดีเอ็นเอ

ออกจากคอลัมน์ โดยเติม Elution buffer 30 ul ปั่นเหวี่ยง ความเร็วเท่าเดิม วัดความเข้มข้น นำดีเอ็นเอมาเจือจางให้ได้ปริมาณ 100 ng/ul แล้วส่ง sequencing เพื่อตรวจสอบการมีถิ่นของไวรัส HBV ในตัวอย่างที่ทรานฟอร์มและเก็บไว้ที่ -20 °C สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### 4.) การออกแบบ gblock เพื่อมาเป็น positive control

สั่งสังเคราะห์ HBV DNA BCP mutation (gblock) สำหรับมาเป็น Positive HBV mutant control จากบริษัท Bio-Rad Laboratories

#### 5.การตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutation จากเทคนิค Sanger sequencing

##### 5.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ HBV BCP ด้วยปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอจากเลือดผู้ป่วยที่ มาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน HBV บริเวณที่ครอบคลุม basal core promoter ซึ่งมีลำดับดังนี้

Forward primer: 5'-ACTTCGCTTCACCTCTGCACG-3' (HBV\_1583F) และ

Reverse primer: 5'-CDGGWGGAGTGCGRATCCACA-3' (HBV\_C2291R)

โดยการเตรียม Master mix ใน 1 ปฏิกิริยามีรายละเอียด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ส่วนผสมการทำ PCR master mix

รายละเอียดของ Master mix (1 reaction)	
10 uM Forward primer	0.5 ul
10 uM Reverse primer	0.5 ul
5X Platinum II PCR buffer (Thermo Scientific, USA)	5 ul
10 mM dNTP mix	0.5 ul
Platinum GC Enhancer (Thermo Scientific, USA)	5 ul
Taq polymerase (Thermo Scientific, USA)	0.2 ul
dH <sub>2</sub> O	11.8 ul
Total	24 ul

จุด master mix ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดพีซีอาร์ หลอดละ 24 ul จากนั้นจุดดีเอ็นเอต้นแบบลงไปหลอดละ 1 ul แล้วนำไปเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 6 ดังนี้

ตารางที่ 6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR
-------------------------------------------



1	Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 94 °C	เป็นเวลา 2 นาที
2	Denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 1 นาที
3	Annealing	ที่อุณหภูมิ 58 °C	เป็นเวลา 1 นาที
4	Extension	ที่อุณหภูมิ 68 °C	เป็นเวลา 1 นาที
	ทำ 2 - 4 เป็นจำนวน 40 รอบ		
	hold	ที่อุณหภูมิ 4 °C	

## 5.2 Agarose gel electrophoresis

นำ PCR มารันเจลตามข้อ 3.2 แล้วแบ่งส่ง sequencing ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ (Macrogen, South Korea) เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutations และยืนยันผลการกลายพันธุ์ว่าสอดคล้องกับตรวจการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real time PCR และ ddPCR

## 6.การตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutation จากเทคนิค Real time PCR

### 6.1 การออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์เพื่อทำ Real time PCR

ใช้ไพรเมอร์และไพรเมอร์ตามข้อ 7.1

### 6.2 การทำ gradient ของ positive control ในการลง Real time PCR แต่ละรอบ

นำ positive control ตามข้อ 7.2 โดยเลือกค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำ Real time PCR ในแต่ละรอบ โดยลงที่อุณหภูมิที่ 48°C, 50°C และ 52°C

### 6.3 การศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Real time PCR ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A

ทำการศึกษาการความแม่นยำ (precision) โดยนำพลาสมิดควบคุมที่ทราบความเข้มข้น มาเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วยวิธี 10-fold dilutions ตามข้อ 7.2.1 เพื่อทำปฏิกิริยาทดสอบเทคนิค Real Time PCR โดยทำการศึกษา Intra-assay repeatability คือการทำซ้ำในรอบเดียวกัน วันเดียวกัน การศึกษานี้จะทดสอบ 3 ซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ ของพลาสมิดควบคุม และการศึกษา Inter-assay repeatability คือการทำซ้ำในแต่ละวัน โดยการศึกษานี้จะทดสอบเทคนิค ddPCR เป็นจำนวน 5 วัน เพื่อบอกความแม่นยำของเทคนิค Real time PCR

### 6.4 การศึกษาการตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutation จากเทคนิค Real Time PCR

การตรวจสอบการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real time PCR ใช้ primers และ fluorescent probe และส่วนผสมน้ำยา TaqMan® Genotyping Master Mix (Thermo scientific, USA) ให้จำเพาะต่อการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งไพรเมอร์และไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ตามข้อ 7.1 โดยการเตรียม Master mix ใน 1 ปฏิกิริยามีรายละเอียด ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ส่วนผสมการทำ Real time PCR

รายละเอียดของ Master mix (1 reaction)	
10mM Forward primer	2 ul
10mM Reverse primer	2 ul
Wildtype/Mutant Probe	2 ul
TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)	10 ul
Nuclease free water	2 ul
Total	18 ul

ดูด master mix ที่เตรียมไว้ใส่ใน 96 well plates หลุมละ 18 ul จากนั้นดูดตีเอ็นเอต้นแบบลงไป หลุมละ 2 ul แล้วนำไปเข้าเครื่อง Thermo cycler โดยตั้งอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังแสดงใน ตารางที่ 8 ดังนี้

ตารางที่ 8 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR			
1	Pre-denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 10 นาที
2	Denature	ที่อุณหภูมิ 95 °C	เป็นเวลา 15 วินาที
3	Annealing	ที่อุณหภูมิ 48 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
4	Extension	ที่อุณหภูมิ 60 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
ทำ 2 - 4 เป็นจำนวน 40 รอบ			

#### 6.5 วิเคราะห์ผลการกลายพันธุ์

การอ่านผล genotyping ในรูปแบบของจุดบนกราฟ (cluster plot) โดยอาศัย cluster analysis viewing software ของเครื่อง real time PCR ที่ใช้ในการอ่านค่าเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ โดยให้

- mutant DNA รายงานผลโดยสารเรืองแสง FAM
- wildtype DNA รายงานผลโดยสารเรืองแสง HEX

จากนั้นนำผลการทดลองการหาการกลายพันธุ์ BCP double mutation มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเทคนิคกับวิธีมาตรฐานอย่าง Sanger sequencing และ ddPCR

#### 7.) การตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutation จากเทคนิค ddPCR

7.1 การออกแบบโปรบและไพรเมอร์เพื่อทำ Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

ออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *HBV* บริเวณที่ครอบคลุม basal core promoter โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาจากฐานข้อมูล NCBI (NC\_003977.1) : Hepatitis B virus, complete genome โดยไพรเมอร์สำหรับตรวจการกลายพันธุ์ มี 2 คู่ ได้แก่ คู่แรก ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 เป็น A และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1764 เป็น G และติดสีเรืองแสง HEK ส่วนคู่ที่สอง เปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 จาก A เป็น T และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1764 จาก G เป็น A และติดสีเรืองแสงสี FAM โดยออกแบบให้มีขนาด PCR product ประมาณ 500-1000 คู่เบส คู่ไพรเมอร์ควรมีขนาดประมาณ 18-25 คู่เบส มี % GC content ประมาณ 40-60% และมี annealing temperature ที่ห่างกันไม่เกิน 4°C โดยใช้โปรแกรม Oligo Calculator version 3.27 ในการคำนวณ จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์และไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะกับบริษัท integrated DNA technologies

## 7.2 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation)

### 7.2.1 การเจือจางการเจือจางความเข้มข้นของพลาสมิดควบคุม ด้วยวิธี 10-fold dilutions

นำ positive control DNA ทั้ง *HBV* wildtype และ *HBV* mutant มาวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์เจอได้ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{หาความเข้มข้น DNA (copies/ul) ตั้งต้น จากสูตร} \quad \frac{m}{M.W.} = \frac{N}{6.02 \times 10^{23}}$$

หมายเหตุ

$m$  คือ มวล (g)

$N$  = จำนวน copies ของพลาสมิด

$M.W.$  = (ความยาวของพลาสมิด 3015bp + PCR product ของยีน *HBV* 708 bp)  $\times 660$  (M.W.เฉลี่ยของเบส)

เมื่อได้ความเข้มข้น DNA ตัวอย่าง DNA ตั้งต้นมาแล้ว นำมาเจือจางด้วยวิธี 10-fold dilutions จนถึงระดับความเข้มข้นที่  $10^0$  copies/ul (limit of detection:  $10^0 - 10^9$ )

$$\text{โดยใช้สูตร } C_1V_1 = C_2V_2$$

โดย  $C_1$  คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดที่ยังไม่ได้เจือจาง

$V_1$  คือ ปริมาตรของพลาสมิดที่ยังไม่ได้เจือจาง

$C_2$  คือ ความเข้มข้นของพลาสมิดภายหลังการเจือจาง

$V_2$  คือ ปริมาตรของพลาสมิดภายหลังการเจือจาง

เพื่อเลือกกระดပ်ที่เหมาะสมในการใช้เป็น positive control ในแต่ละรอบของการทำ ddPCR

### 7.2.2 การทำ gradient ของ positive control

นำ positive control ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำ ddPCR ในแต่ละรอบ โดยลงที่อุณหภูมิที่ 45 ถึง 60°C

### 7.3 การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค ddPCR

นำพลาสมิดควบคุมที่ทราบความเข้มข้น มาเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วยวิธี 10-fold dilutions ตามข้อ 7.2.1 เพื่อทำปฏิกิริยาทดสอบเทคนิค ddPCR แล้วนำมาหาค่า coefficient of correlation ( $R^2$ ) โดยใช้ linearity assay เพื่อดูความสามารถของ ddPCR ที่จะทำให้การวิเคราะห์แล้ว ได้ผลการวิเคราะห์ที่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของสารที่วิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด จากนั้นทำการศึกษาการความแม่นยำ (precision) โดยนำพลาสมิดควบคุมที่ทราบความเข้มข้น มาเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วยวิธี 10-fold dilutions ตามข้อ 7.2.1 เพื่อทำปฏิกิริยาทดสอบเทคนิค ddPCR โดยแบ่งเป็นการศึกษา Intra-assay repeatability คือการทำซ้ำในรอบเดียวกัน วันเดียวกัน การศึกษานี้จะทดสอบ 3 ซ้ำโดยใช้ความเข้มข้นต่างๆ ของพลาสมิดควบคุม และการศึกษา Inter-assay repeatability คือการทำซ้ำในแต่ละวัน โดยการศึกษาจะทดสอบเทคนิค ddPCR เป็นจำนวน 5 วัน และทำกราฟ Levey-Jennings เพื่อบอกความแม่นยำของเทคนิค ddPCR และความแตกต่างของผลการวิเคราะห์ที่ได้จากการวิเคราะห์ซ้ำๆ นี้จะแสดงเป็นค่า SD หรือร้อยละสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of Variation, %CV)

### 7.4 การหาค่า LOB, LOD และ LOQ (limit of blank, limit of detection and limit of quantitation)

นำพลาสมิดควบคุม wildtype ที่ทราบความเข้มข้น มาเจือจางครั้งละ 10 เท่าด้วยวิธี 10-fold dilutions ตามข้อ 7.2.1 เพื่อทำปฏิกิริยาทดสอบเทคนิค ddPCR แล้วนำมาหา LOB, LOD และ LOQ หาได้โดยการวัด blank ของตัวอย่าง (sample blank) อย่างน้อย 7 ซ้ำและนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และค่า SD โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{LOB} = \text{ค่าเฉลี่ยของ (copy number blank)} + 1.645 \times \text{SD (copy number blank)}$$

$$\text{LOD} = \text{ค่าเฉลี่ยของ sample blank} + 3 \text{ SD}$$

$$\text{LOQ} = \text{ค่าเฉลี่ยของ sample blank} + 10 \text{ SD}$$

เพื่อบอกการร้อยละการกลายพันธุ์ที่ต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับด้วยเทคนิค ddPCR

### 7.5 การศึกษาการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutation ด้วยเทคนิค ddPCR

ใช้ primers, fluorescent probes (*TaqMan* probes คือ FAM และ HEX ) (Integrated DNA Technologies, USA) และส่วนผสมน้ำยาของ บริษัท Bio-Rad ให้จำเพาะต่อการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบดังนี้

โดยใช้ Wildtype\_probe 5'-HEX/AGGTTAAAG/ZEN/GTCTTTGACTAG/31ABkFQ/3'  
 Mutant\_probe 5'-/56FAM/AGGTTAATG/ZEN/ATCTTTGACTAGG/31ABkFQ/-3'  
 Forward\_primer 5'-GGAGGAGTTGGGGGA-3'  
 Reverse\_primer 5'-AGACCAATTTATGCCTACAG-3'

โดยการเตรียม Master mix ใน 1 ปฏิกริยามีรายละเอียด ดังตารางที่ 9  
 ตารางที่ 9 ส่วนผสมการทำ ddPCR master mix

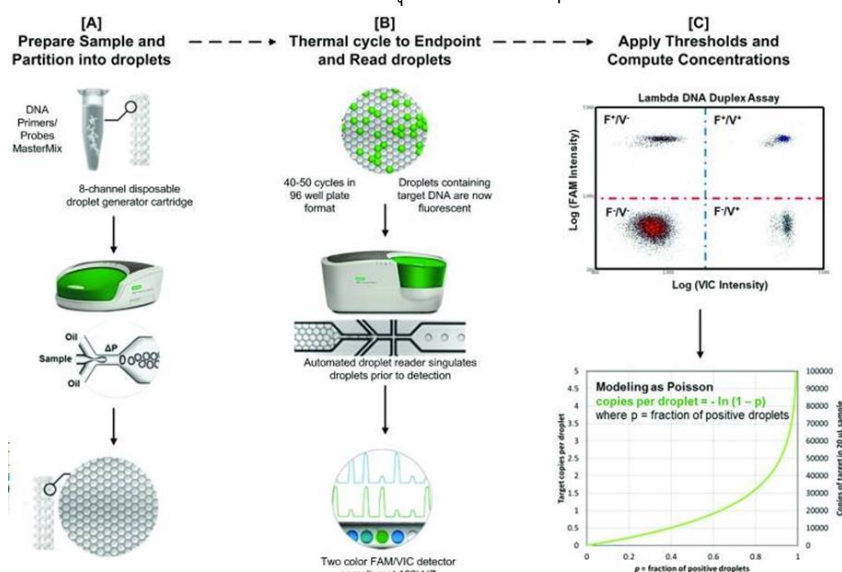
รายละเอียดของ Master mix	
2x supermix for probe (No dUTP)	10 ul
10uM target forward primer	1.8 ul
10uM target reverse primer	1.8 ul
5uM Wildtype_probe	1 ul
5uM Mutant_probe	1 ul
RNase-/DNase-free water	3.4 ul
DNA	1 ul
Total volume = 20 ul	

จุด master mix ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดพีซีอาร์ หลอดละ 19 ul จากนั้นรวมตัวอย่าง DNA ของผู้ป่วยติดเชื้อ HBV 1 ul ลงไปในหลอด โดยเจือจางดีเอ็นเอตัวอย่างกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์ อัตราส่วน 1:100 จากนั้นทำการเติมตัวอย่างที่เตรียมไว้ปริมาตร 20 ul เข้าไปในแต่ละ wells ของ droplet generator cartridge ที่มี 8 ช่อง และใช้น้ำมันที่มากับชุดอุปกรณ์ ปริมาตร 70 ul ปิดตัวอย่างด้วยยาง (Gasket) จากนั้นนำตัวอย่างเข้าไปในเครื่องสร้างหยดอิมัลชันที่เรียกว่า QX200 Droplet Generator จากนั้นใช้ปิเปตดูดหยดอิมัลชันที่ถูกสร้างขึ้นออกมาจาก cartridge ใส่ลงไปใน 96-well plate ปิดปาก well ด้วย PX1™ PCR plate sealer ดำเนินการทำ PCR โดยการใช้อุปกรณ์ Thermal cycler โดยตั้งอุณหภูมิในการทำปฏิกริยาดังแสดงในตารางที่ 10 ดังนี้  
 ตารางที่ 10 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยา ddPCR

อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยา PCR			
Cycling steps	Temperature °C	Time (min)	Number of cycles
Hold (QX ONE ddPCR system only)	25	3	1
Enzyme activation	95	10	1
Denaturation	94	0.5	40

Annealing/extension	47.8	1	40
Enzyme deactivation	98	10	1
QX200 ddPCR system (optional)	4	Infinite	1

จากนั้นนำตัวอย่างไปอ่านค่าหดยดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง QX200 Droplet Reader ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ QuantaSoft™ ซึ่งจะนับจำนวนหดยดปฏิกิริยาที่ให้ผลลบและหดยดปฏิกิริยาที่ให้ผลลบถือเป็นการเสร็จสิ้นขั้นตอนการหากลายพันธุ์ basal core promoter ด้วยเทคนิค ddPCR



รูปที่ 20 ขั้นตอนการทำ ddPCR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## 7.6 วิเคราะห์ผลการกลายพันธุ์

นำผลการทดลองการหากลายพันธุ์ BCP double mutations ด้วยเทคนิค ddPCR มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานอย่าง Sanger sequencing และ Real Time PCR

## 8. การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทำวิจัยในครั้งนี้ จะเก็บรวบรวมโดยการจดลงสมุดบันทึกผลการทดลองและบันทึกในคอมพิวเตอร์ โดยจะบันทึกข้อมูลทั้งหมด รวมถึงถ่ายภาพการทดลองเพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

## 9. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

### 9.1 การวิเคราะห์การหายของกลายพันธุ์ BCP double mutation

$$\text{คิดร้อยละการกลายพันธุ์ โดยดูจากสูตร} = \frac{\text{Mutant (copies/ul)} \times 100}{(\text{Wildtype} + \text{Mutant}) (\text{copies/ul})}$$

โดยให้

- Mutant คือ ดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีที่มีการกลายพันธุ์ BCP double mutations
- Wildtype คือ ดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีที่ไม่มีการกลายพันธุ์ BCP double mutation

(ในการศึกษาครั้งนี้ เชื้อก่อการกลายพันธุ์ที่ LOB ขึ้นไปเท่านั้น)

### 9.2 ใช้โปรแกรม IBM SPSS statistics version 22 เป็นตัววิเคราะห์สถิติดังนี้

- วิเคราะห์ระหว่างเพศในแต่ละกลุ่มมีความเป็นอิสระต่อกันหรือไม่ และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างผลตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของไวรัสตับอักเสบบีโดยวิธี Real time PCR กับวิธี ddPCR โดยการใช้การทดสอบทางสถิติ chi-squared test และวิเคราะห์ระหว่างอายุกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังในแต่ละกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ศึกษาว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้สถิติ independent t test ถ้าข้อมูลเป็น parametric หรือใช้ Mann-Whitney U test (Wilcoxon rank-sum test) ถ้าข้อมูลเป็น nonparametric ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

- วิเคราะห์ผลตรวจการกลายพันธุ์ที่ได้จากเทคนิค Sanger sequencing เปรียบเทียบกับ Real time PCR, ผลตรวจการกลายพันธุ์จากเทคนิค Sanger sequencing เปรียบเทียบกับ ddPCR และผลตรวจการกลายพันธุ์จากเทคนิค Real time PCR เปรียบเทียบกับ ddPCR ว่าแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้สถิติ chi-squared test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

- วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้สถิติ independent t test ถ้าข้อมูลเป็น parametric หรือใช้ Mann-Whitney U test (Wilcoxon rank-sum test) ถ้าข้อมูลเป็น nonparametric ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

- วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรังที่ใช้ศึกษาว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ Pearson's correlation ถ้าข้อมูลเป็น parametric หรือใช้ spearman's correlation ถ้าข้อมูลเป็น nonparametric ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

- วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg Positive โดยแบ่งเป็น กลุ่มไม่มีการกลายพันธุ์ กลุ่มมีการกลายพันธุ์น้อยกว่าร้อยละ 50 และกลุ่มมีการกลายพันธุ์มากกว่าร้อยละ 50 ที่ใช้ศึกษาว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ one-way ANOVAs ถ้าข้อมูลเป็น parametric หรือใช้ Kruskal-Wallis ถ้าข้อมูลเป็น nonparametric ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

-วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg Negative โดยแบ่งเป็นกลุ่มมีการกลายพันธุ์น้อยกว่าร้อยละ 50 และกลุ่มมีการกลายพันธุ์มากกว่าร้อยละ 50 ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยใช้สถิติ independent t test ถ้าข้อมูลเป็น parametric หรือใช้ Mann-Whitney U test (Wilcoxon rank-sum test) ถ้าข้อมูลเป็น nonparametric ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

9.4 ใช้โปรแกรม GraphPad Prism version 9.1.0 ทำกราฟแสดงผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

9.5 ใช้โปรแกรม Microsoft Excel ทำกราฟแสดงผลหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง



#### บทที่ 4

##### ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทั้งหมด 185 คน และแบ่งตามระยะของการดำเนินโรคซึ่งจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มี HBeAg Positive หรือกลุ่ม (ii) HBeAg-positive chronic hepatitis จำนวน 75 คน และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังที่มี HBeAg Negative หรือกลุ่ม (iv) HBeAg-negative chronic hepatitis จำนวน 110 คน ทั้งนี้เพื่อตัดปัจจัย เช่น เพศ หรือ อายุ ที่อาจจะรบกวนการวิเคราะห์ได้ จึงเลือกกลุ่มตัวอย่างที่มีทั้งเพศชายและหญิง และมีอายุใกล้เคียงกัน พบว่า กลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแบบ HBeAg positive จำนวน 75 คน แบ่งเป็นเพศชาย 45 คนและเพศหญิง 30 คน ค่าอายุเฉลี่ยของกลุ่ม เท่ากับ  $34.72 \pm 9.84$  ปี (มีช่วงอายุตั้งแต่ 19 – 69 ปี) ส่วนกลุ่มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแบบ HBeAg negative จำนวน 110 คน แบ่งเป็นเพศชาย 73 คนและเพศหญิง 37 คน ค่าอายุเฉลี่ยของกลุ่ม เท่ากับ  $44.25 \pm 10.31$  ปี (มีช่วงอายุตั้งแต่ 25 – 69 ปี) โดยใช้สถิติ Pearson's chi-squared เป็นตัววิเคราะห์ระหว่างเพศในแต่ละกลุ่มมีความความเป็นอิสระต่อกันหรือไม่ พบว่า เพศในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P=0.377$ ) และใช้สถิติ independent t test เป็นตัวการวิเคราะห์ระหว่างอายุ(ปี) ปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง ทั้งค่าเอนไซม์ ALT (Alanine transaminase), ค่า HBV DNA (log IU/ml), ค่า HBsAg (Log IU/ml) และตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ ค่า HBcrAg (Log U/ml) ในแต่ละกลุ่มที่ใช้ศึกษามีความแตกต่างกันหรือไม่ พบว่า อายุ, ค่าเอนไซม์ ALT, HBV DNA, HBsAg และ HBcrAg ในแต่ละกลุ่มที่ใช้ศึกษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $P < 0.001$  ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ข้อมูลประชากรของผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำแนกตามกลุ่มศึกษา

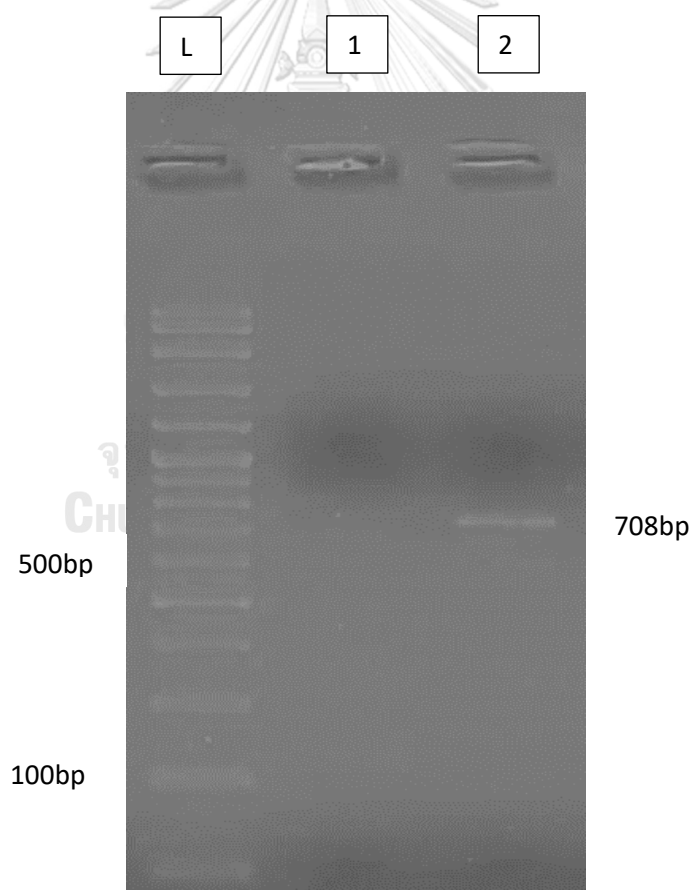
Clinical parameters	HBeAg Positive (n=75)	HBeAg Negative (n=110)	P-value
GENDER, N, M/F	45/30	73/37	0.377
Age(year), mean±SD (range)	$34.72 \pm 9.84$ (19-69)	$44.25 \pm 10.31$ (25-69)	<0.001*
ALT, mean±SD	$94.59 \pm 64.9$	$52.51 \pm 37.90$	<0.001*
HBV DNA, mean±SD (Log IU/ML)	$7.33 \pm 1.39$	$5.42 \pm 1.18$	<0.001*

HBcrAg, mean±SD (Log U/ml)	7.55 ± 1.06	4.01 ± 1.23	<0.001*
HBsAg, mean±SD (Log IU/ml)	4.01 ± 0.68	3.34 ± 0.55	<0.001*

### 1.ผลการโคลนยีนของไวรัสบริเวณ BCP แบบ wildtype DNA เพื่อทำเป็นพลาสมิดตัวควบคุม บวกแบบ BCP wildtype

#### 1.1 ผลการทำ PCR โดยใช้ BCP wildtype DNA

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 708 bp ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ผลการทำ PCR ของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter

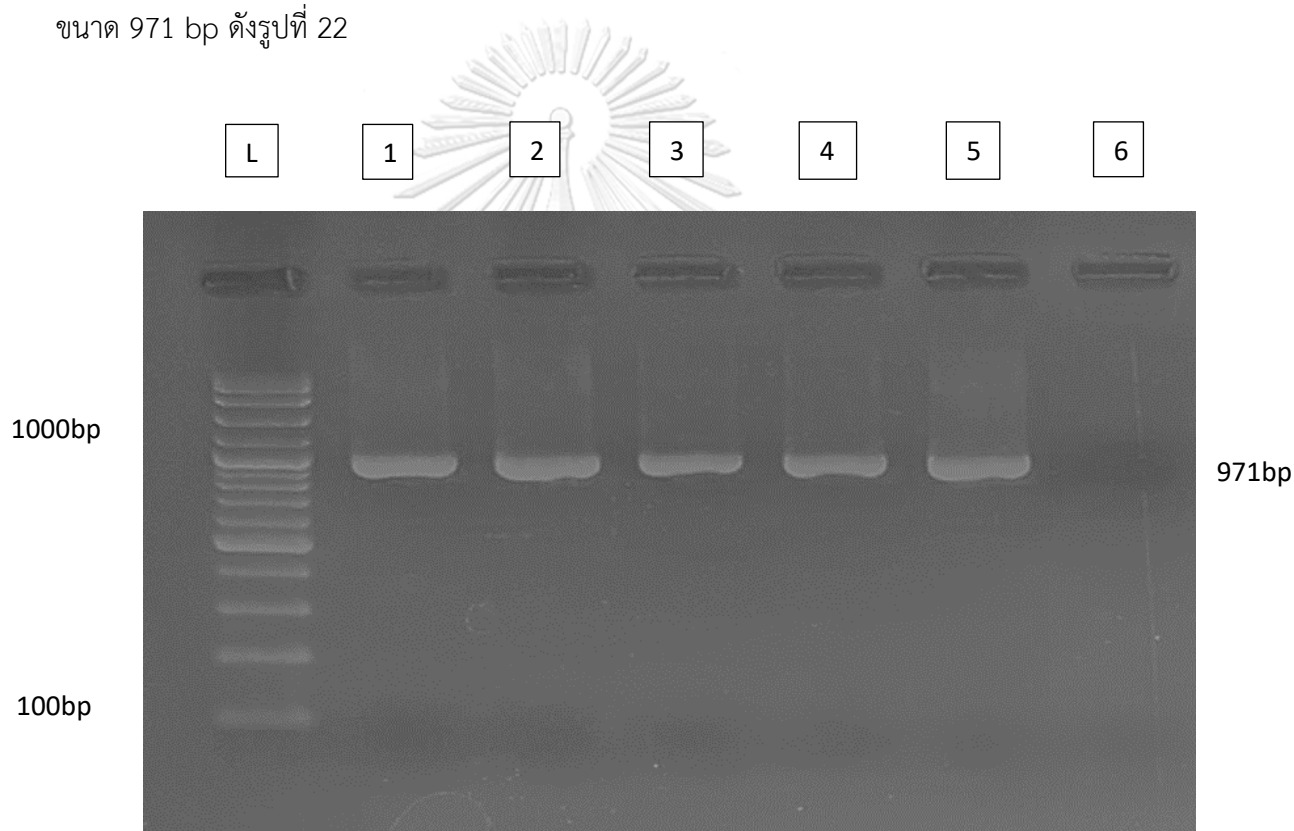
หมายเหตุ แถว L คือ 100 bp DNA Ladder

แถว 1 คือ Negative control

แถว 2 คือ ขนาด PCR product ของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter จากนั้นจึงทำการตัดแถบแบน PCR ของยีน *HBV* บริเวณดังกล่าว ไปสกัด DNA ออกจากเจล เชื่อมเข้าสู่ pGEM T Easy vector และ transformation ใน *E.coli* จากนั้นทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบการแทรกของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter ใน pGEM T Easy vector

### 1.2 ผลการทำ colony PCR โดยใช้ Primer คือ M13F และ M13R

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ colony PCR ของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter เมื่อตรวจสอบด้วย 2% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เป็นเวลา 40 นาที ปรากฏแถบ DNA ขนาด 971 bp ดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 ผลการทำ colony PCR ของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter

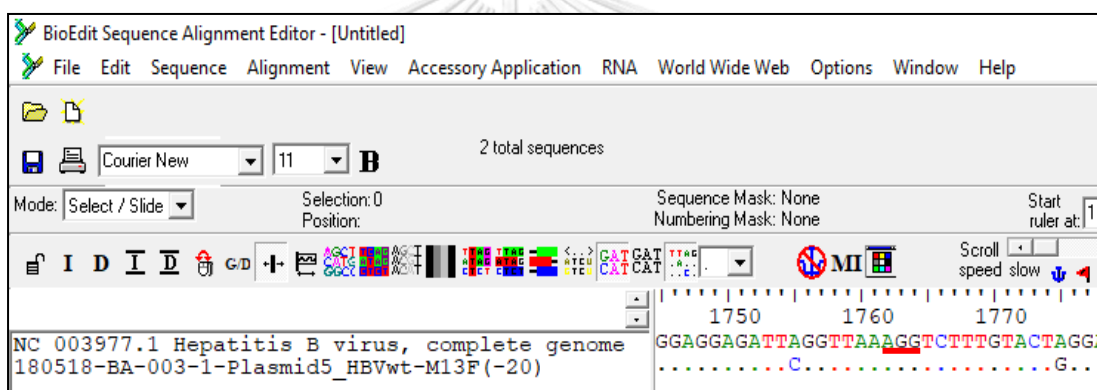
หมายเหตุ แถว L คือ 100 bp DNA Ladder  
 แถว 1-5 คือ ขนาด colony PCR product ของยีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter ที่การแทรกใน pGEM T Easy Vector  
 แถว 6 คือ Negative control

จากนั้นนำ BCP wildtype DNA ที่เชื่อมกับ pGEM T Easy vector มาสกัดพลาสมิดแล้วนำส่ง sequencing เพื่อตรวจสอบการมียีน *HBV* ตำแหน่ง basal core promoter ในตัวอย่างที่

transformation โดย sequence ใน basal core promoter ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1762 และ 1764 จะต้องเป็นเบส A และ G ตามลำดับ

### 1.3 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน HBV ตำแหน่ง basal core promoter

ผลการวิเคราะห์ลำดับ nucleotide ด้วยวิธี sequencing เมื่อทำการ alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าพลาสมิดสายผสมมีลำดับ nucleotide เป็น HBV wildtype เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนจีโนมของไวรัส HBV โดยใช้ข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนมาจากฐานข้อมูล NCBI (NC\_003977.1) Hepatitis B virus, complete genome เป็น reference sequence และตรวจสอบลำดับ nucleotide ในตำแหน่งบริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง nucleotide ที่ 1762 และ 1764 พบว่ามีลำดับ nucleotide เป็นเบส A และ G ตามลำดับ ดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน HBV ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1762

จุดพาลงกรณ์ และ 1764 ยาลัย

ในการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า สามารถสร้างพลาสมิดตัวควบคุมบวกแบบ BCP wildtype ของการศึกษการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ได้ จากนั้นจึงนำพลาสมิดสายผสมนี้มาเจือจางความเข้มข้นด้วยวิธี 10-fold dilutions เพื่อเตรียมพลาสมิดสำหรับทดสอบประสิทธิภาพในเทคนิคการตรวจการกลายพันธุ์และลงเป็นตัวควบคุมบวกการตรวจการกลายพันธุ์ในแต่ละรอบต่อไป

## 2.การสร้าง HBV BCP mutation DNA (gBlock) เพื่อทำเป็นพลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant

### 2.1 ผลการสังเคราะห์ HBV DNA mutation จากบริษัท Bio-Rad Laboratories

การสังเคราะห์ HBV DNA แบบ mutant (gblock) ได้ลำดับ nucleotide ทั้งหมด 917 bp เมื่อทำการ alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่า gblock มีลำดับ nucleotide เป็น HBV mutant ของบริเวณ basal core promoter โดยตำแหน่ง nucleotide ที่ 1762 และ 1764 พบว่า

มีลำดับ nucleotide เปลี่ยนจากเบส A เป็น T และ G เป็น A ตามลำดับ โดยใช้ข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนมาจากฐานข้อมูล NCBI (NC\_003977.1) Hepatitis B virus, complete genome เป็น reference sequence ดังรูปที่ 24 และ 25

Name - gBlock	gBlocks® Gene Fragments	917 base pairs
5'-	CAT GCG TGG AAC CTT TGT GGC TCC TCT GCC GAT CCA TAC TGC GGA ACT CCT AGC AGC TTG TTT TGC TCG	
CAG	COG GTC TGG AGC GAA ACT TAT CGG AAC CGA CAA CTC AGT TGT CCT CTC TCG GAA ATA CAC CTC CTT TCC	
ATG	GCT GCT AGG CTG TGC TGC CAA CTG GAT CCT GCG CGG GAC GTC CTT TGT CTA CGT CCC GTC GGC GCT GAA	
TCC	CGC GGA CGA CCC GTC TCG GGG CCG TTT GGG CCT CTA CCG TCC CCT TCT TCA TCT GCC GTT CCG GCC GAC	
CAC	GGG GCG CAC CTC TCT TTA CGC GGT CTC CCC GTC TGT GCC TTC TCA TCT GCC GGA CCG TGT GCA CTT CGC	
TTC	ACC TCT GCA CGT AGC ATG GAG ACC ACC GTG AAC GCC CAC CAG GTC TTG CCC AAG GTC TTA CAC AAG AGG	
ACT	CTT GGA CTC TCA GCA ATG TCA ACG ACC GAC CTT GAG GCA TAC TTC AAA GAC TGT TTG TTT AAA GAC TGG	
GAG	GAG TTG GGG GAG GAG ATT AGG TTA ATG ATC TTT GTA CTA GGA GGC TGT AGG CAT AAA TTG GTC TGT TCA	
CCA	GCA CCA TGC AAC TTT TTC CCC TCT GCC TAA TCA TCT CAT GTT CAT GTC CTA CTG TTC AAG CCT CCA AGC	
TGT	GCC TTG GGT GGC TTT GGG GCA TGG ACA TTG ACC CGT ATA AAG AAT TTG GAG CTT CTG TGG AGT TAC TCT	
CTT	TTT TGC CTT CTG ACT TCT TTC CTT CTA TTC GAG ATC TCC TCG ACA CCG CCT CTG CTC TGT ATC GGG AGG	
CCT	TAG AGT CTC CGG AAC ATT GTT CAC CTC ACC ATA CAG CAC TCA GGC AAG CTA TTC TGT GTT GGG GTG AGT	
TGA	TGA ATC TGG CCA CCT GGG TGG GAA GTA ATT TGG AAG ACC CAG CAT CCA GGG AA -3'	

รูปที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gblock สั่งสังเคราะห์มาจากบริษัท

BioEdit Sequence Alignment Editor - [Untitled1]

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

2 total sequences

Mode: Select / Slide Selection: 0 Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

NC 003977.1 Hepatitis B virus, complete genome  
HBV-BCP-gBlocks seq\_917bp from Biorad

1750 1760 1770

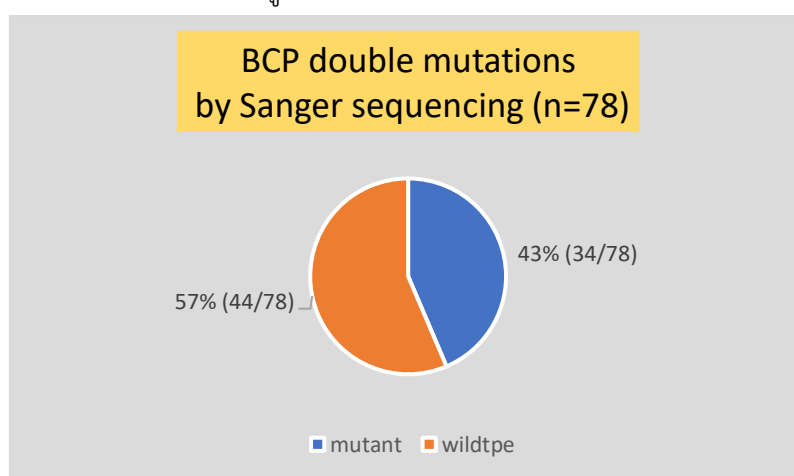
TGGGGGAGGAGATTAGGTTAAAGGTCTTTGTACTT  
.....T.A.....

รูปที่ 25 ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดที่มียีน HBV ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1762 และ 1764

ในการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า สามารถสร้างพลาสมิดตัวควบคุมแบบ BCP mutant ของการศึกษา การตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ได้ จากนั้นจึงนำพลาสมิดสายผสมนี้มาเจือจางความเข้มข้นด้วยวิธี 10-fold dilutions เพื่อเตรียมพลาสมิดสำหรับทดสอบประสิทธิภาพในเทคนิคการตรวจการกลายพันธุ์และลงเป็นตัวควบคุมบวกการตรวจ การกลายพันธุ์ในแต่ละรอบต่อไป

### 3. ผลการศึกษาการตรวจวัดการกลายพันธุ์ บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A (BCP double mutations) จากเทคนิค Sanger sequencing

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากผู้ป่วยมาตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations โดย Sanger sequencing พบว่า ในจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอ 185 คน สามารถ amplify PCR เพื่อส่ง Sanger sequencing ได้ 78 ตัวอย่าง คิดเป็น 42.2% ใน 78 ตัวอย่างสามารถระบุการกลายพันธุ์ (mutant) ได้ 34 ตัวอย่าง และระบุไม่มีการกลายพันธุ์ (wildtype) ได้ 44 ตัวอย่าง คิดเป็น 43.6% และ 56.4 ตามลำดับ ดังรูปที่ 26

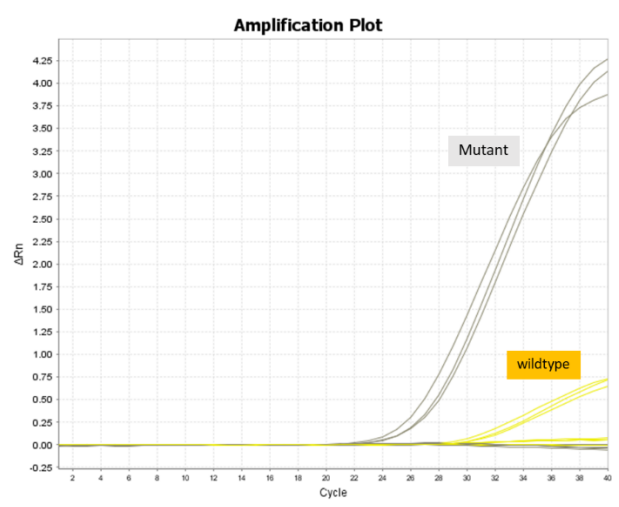


รูปที่ 26 กราฟแสดงผลการตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutations จากเทคนิค Sanger sequencing

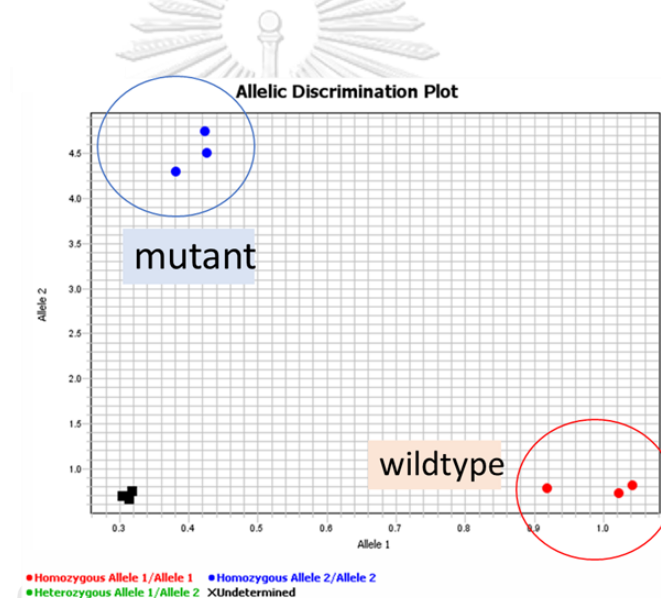
### 4. ผลการศึกษาการตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutations จากเทคนิค RealTime PCR

#### 4.1 ผลการทำ gradient Real Time PCR ด้วยพลาสมิดตัวควบคุมบวก

นำพลาสมิดตัวควบคุมบวกทั้ง BCP wildtype และ BCP mutant ที่มีความเข้มข้น  $10^4$  copies/ul มาทำ Real Time PCR ที่โดยเลือกอุณหภูมิขึ้น annealing ให้ใช้ที่ 48, 50 และ 52 °C ผลการทดลองพบว่าการตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutations จากเทคนิค Real Time PCR สามารถใช้ annealing ได้ทั้ง 3 อุณหภูมิในการลง Real Time PCR เนื่องจากพลาสมิดตัวควบคุมบวกทั้ง wildtype และ mutant สามารถให้ผลการตรวจสอบได้อย่างชัดเจน โดยพลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ได้ผลการตรวจสอบเป็นพบการกลายพันธุ์ และพลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ได้ผลการตรวจสอบเป็นไม่พบการกลายพันธุ์ ดังรูปที่ 27-28 จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 48 ในการตรวจวัดการกลายพันธุ์ BCP double mutations จากเทคนิค Real Time PCR



รูปที่ 27 กราฟ amplification plot ของ ผลการทำ gradient ของเทคนิค Real time PCR



รูปที่ 28 กราฟ Allelic discrimination plot ของ ผลการทำ gradient ของเทคนิค Real time PCR

#### 4.2 ผลการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Real Time PCR

การทดสอบประสิทธิภาพ เทคนิค Real Time PCR โดยใช้เทคนิค Intra-assay repeatability คือการวิเคราะห์ 3 ซ้ำในรอบเดียวกัน พบว่า เทคนิค Real Time PCR มีความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ผลซ้ำๆ แล้วให้ผลตรวจเหมือนกัน ดังตารางที่ 12 ส่วนผลการทดสอบโดยเทคนิค Inter-assay repeatability คือการวิเคราะห์ซ้ำๆในแต่ละวัน ทำการตรวจการกลายพันธุ์เป็นจำนวน 5 วัน พบว่า เทคนิค Real Time PCR มีความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในแต่ละวัน โดยแต่ละวันให้ผลการตรวจในแบบเดียวกันในทุกวัน ตารางที่ 13

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบ Intra-assay repeatability ของเทคนิค Real Time PCR

Intra-repeatability	1	2	3	interpreted
Wildtype Control plasmid	Wildtype	Wildtype	Wildtype	Wildtype
Mutant Control Plasmid	Mutant	Mutant	Mutant	Mutant
Negative (water)	Negative	Negative	Negative	Negative

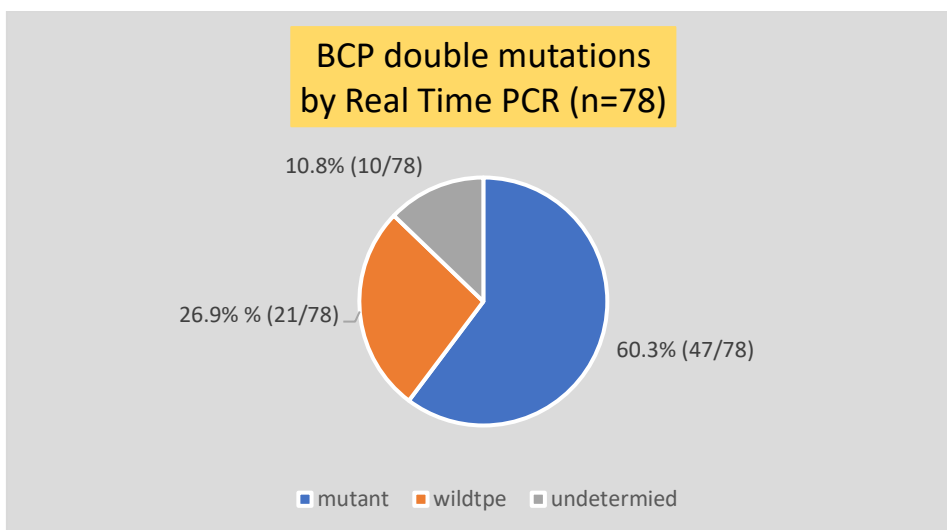
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ Inter-assay repeatability ของเทคนิค Real Time PCR

Inter-assay repeatability	BCP mutant control	BCP wildtype control
DAY1	Mutant	Wildtype
DAY2	Mutant	Wildtype
DAY3	Mutant	Wildtype
DAY4	Mutant	Wildtype
DAY5	Mutant	Wildtype

#### 4.3 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutations ด้วยเทคนิค Real Time PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอผู้ป่วยจากการตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ด้วยเทคนิค Sanger Sequencing ซึ่งมีจำนวนตัวอย่างดีเอ็นเอ 78 ตัวอย่าง มาทดสอบเปรียบเทียบการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real Time PCR พบว่ามี 68 ตัวอย่างที่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ คิดเป็น 87.2% โดยมี 21 ตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้วพบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ และมี 47 ตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้วพบการกลายพันธุ์ คิดเป็น 26.9% และ 60.3% ตามลำดับ แต่มีจำนวน 10 ตัวอย่าง ที่ไม่สามารถตรวจวัดการกลายพันธุ์บริเวณนี้ได้คิดเป็น 12.8% ดังรูปที่ 29 ตารางที่ 15



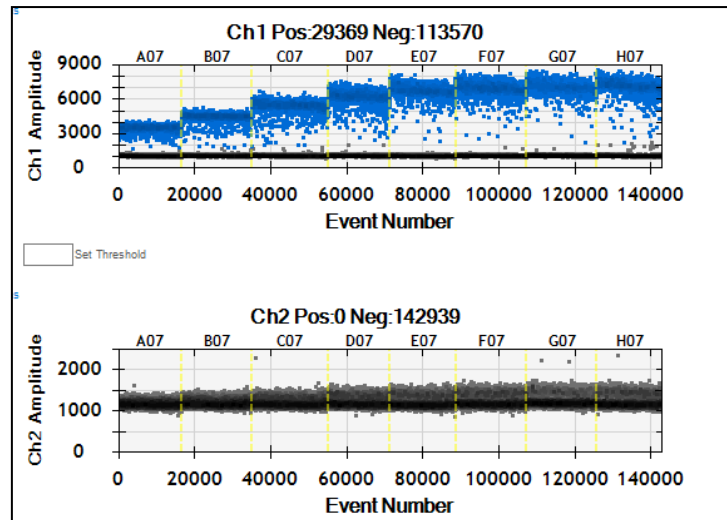


รูปที่ 29 กราฟผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutation ด้วยเทคนิค Real Time PCR

## 5.ผลการศึกษาการตรวจสอบการการกลายพันธุ์ BCP double mutation จากเทคนิค ddPCR

### 5.1 ผลการทำ gradient ddPCR ของ positive control โดย ddPCR

ก่อนจะนำพลาสมิดตัวควบคุมบวกไปใช้เป็นตัวควบคุมในงานวิจัย ต้องทำการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำ ddPCR ในแต่ละรอบ โดยวิธี 10-fold dilutions พบว่า พลาสมิดตัวควบคุมบวกทั้งสองมีความเข้มข้นเหมาะสมสามารถใช้ได้ที่  $10^4$  copies/ul โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ ddPCR คือ  $47.8$  °C เนื่องจาก positive HBV wildtype/mutant control สามารถแยกได้เป็นกลุ่มอย่างชัดเจน และ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype มีการเกิด noise signal น้อยที่สุด โดยในพลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant จะสามารถจับกับโพรบที่ติดสารเรืองแสง FAM ใน channel 1 อย่างเดียว แต่ไม่จำเพาะกับโพรบที่ติดสารเรืองแสง HEK ใน channel 2 และในพลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype จะสามารถจับกับโพรบที่ติดสารเรืองแสง HEK ใน channel 2 อย่างเดียว แต่ไม่จำเพาะกับโพรบที่ติดสารเรืองแสง FAM ใน channel 1 ดังรูปที่ 30-33



รูปที่ 30 ผลการทำ gradient ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 45-60°C  
 หมายถึง A07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 60°C

B07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 58.8°C

C07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 56.9°C

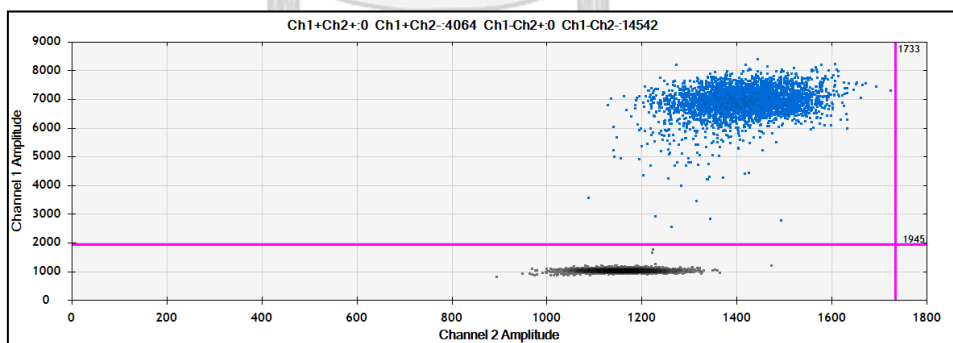
D07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 54.2°C

E07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 50.7°C

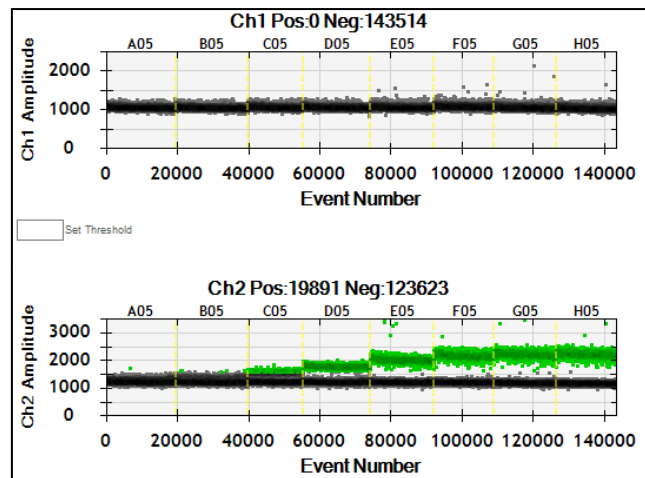
F07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 47.8°C

G07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 46°C

H07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 45°C



รูปที่ 31 Cut off ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant ที่อุณหภูมิ 47.8°C



รูปที่ 32 ผลการทำ gradient ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 45-60°C  
 หมายถึง A07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 60°C

B07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 58.8°C

C07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 56.9°C

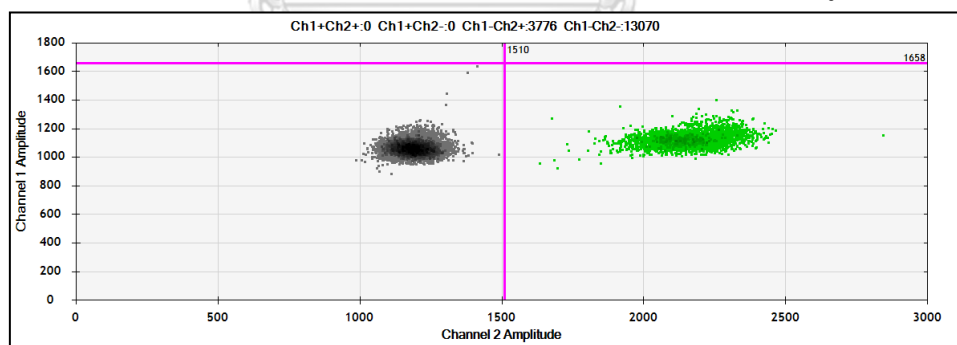
D07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 54.2°C

E07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 50.7°C

F07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 47.8°C

G07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 46°C

H07 = ddPCR ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 45°C

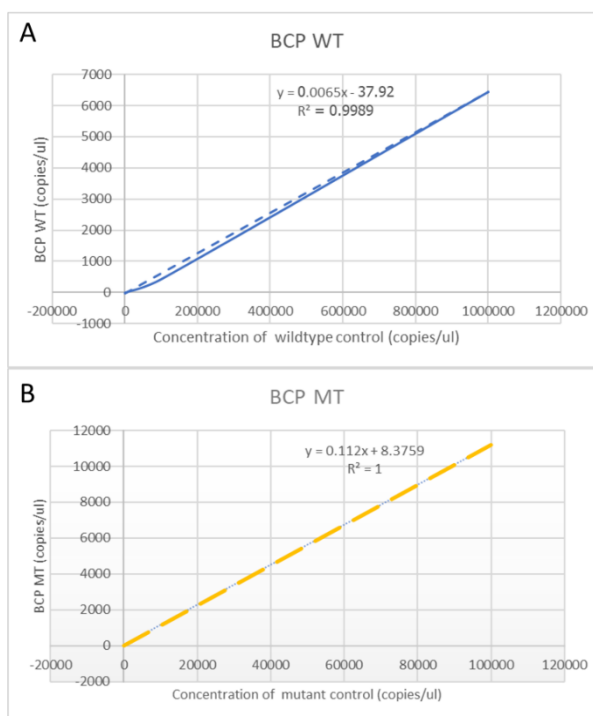


รูปที่ 33 Cut off ของ พลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype ที่อุณหภูมิ 47.8°C

## 5.2 ผลการศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค ddPCR

นำพลาสมิดควบคุม wildtype ที่ความเข้มข้น  $10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10^1$  และ  $10^0$  copies/ul จำนวน 7 ตัวอย่าง มาทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค ddPCR แล้วนำค่าปริมาณดีเอ็นเอ wildtype และปริมาณดีเอ็นเอ mutant มา plot เป็นกราฟกับความเข้มข้น เพื่อหาค่า coefficient of correlation ( $R^2$ ) พบว่า เทคนิค ddPCR เป็นเทคนิคที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นที่แม่นยำ เพียงตรง

ปริมาณดีเอ็นเอของ BCP wildtype และ BCP mutant เพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มข้นพลาสมิตที่มากขึ้น โดยพลาสมิตควบคุมแบบ BCP wildtype มีค่า  $R^2 = 0.9989$  (A) ส่วนพลาสมิตควบคุมแบบ BCP Mutant มีค่า  $R^2 = 1$  (B) ตามลำดับ ดังรูปที่ 34



รูปที่ 34 ค่า coefficient of correlation ( $R^2$ ) ของพลาสมิตควบคุมบวก

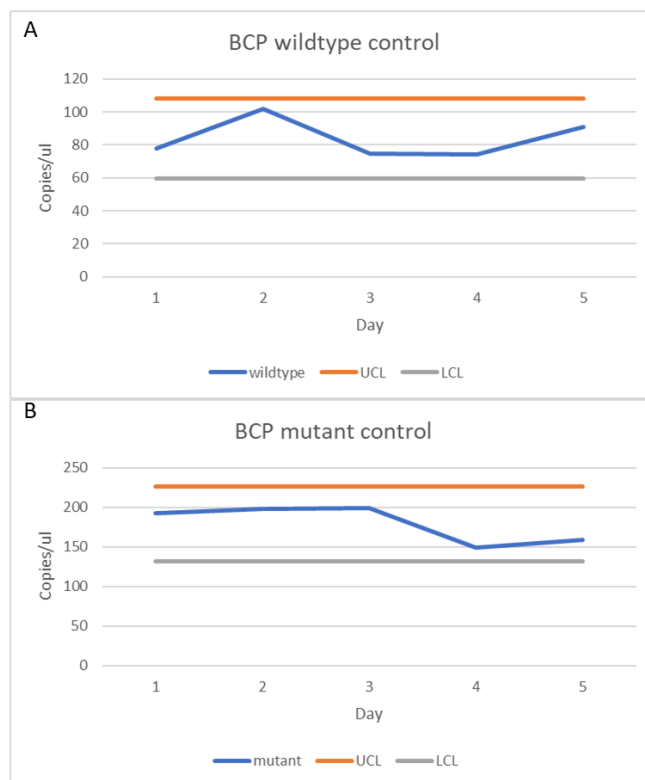
และนำพลาสมิตควบคุมบวกทั้ง wildtype และ mutant ที่ความเข้มข้น  $10^4, 10^3, 10^2, 10^1$  และ  $10^0$  copies/ul จำนวน 5 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบด้วยเทคนิค Intra-assay repeatability พบว่าเทคนิค ddPCR มีความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในรอบเดียวกัน แล้วให้ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายใกล้เคียงกัน โดยมีค่าร้อยละของสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน, %CV น้อยกว่า 25 แสดงว่ายอมรับได้ ดังตารางที่ 14 ส่วนผลการทดสอบความแม่นยำ โดยเทคนิค Inter-assay repeatability พบว่า เทคนิค ddPCR มีความแม่นยำที่เกิดจากการวิเคราะห์ซ้ำๆ ในแต่ละวันดัง ตารางที่ 15 โดยเมื่อนำค่าปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจวัดได้มา plot ในกราฟ Levey-Jennings พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอทั้ง wildtype และ mutant ที่ตรวจสอบได้อยู่ในช่วงระหว่าง upper Control Limit (mean+2SD) และ lower Control Limit (mean-2SD) ซึ่งแปลผลได้ว่า เทคนิค ddPCR สามารถทำซ้ำได้อย่างแม่นยำในแต่ละวัน ดังรูปที่ 35 ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค dddPCR ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutations สรุปได้ว่าเทคนิค ddPCR มีความถูกต้อง เพียงตรง และแม่นยำ

ตารางที่ 14 การทดสอบ Intra-assay repeatability ของเทคนิค ddPCR

Wildtype control (copie/ul)	BCP Wildtype DNA detected by ddPCR (copie/ul)	Mean±SD	%CV	Mutant control (copie/ul)	BCP mutant DNA detected by ddPCR (copie/ul)	Mean±SD	%CV
10 <sup>0</sup>	0.39	=0.42±0.04	=10.38%	10 <sup>0</sup>	0.07	=0.08±0.01	=14.40%
	0.47				0.07		
	0.40				0.09		
10 <sup>1</sup>	0.60	=0.56±0.04	=6.23%	10 <sup>1</sup>	0.76	=0.72±0.06	=8.17%
	0.53				0.65		
	0.56				0.74		
10 <sup>2</sup>	1.40	=1.45±0.05	=3.44%	10 <sup>2</sup>	14.5	=12.6±1.68	=13.35%
	1.50				12		
	1.45				11.3		
10 <sup>3</sup>	2.60	=2.9 ±0.26	=9.12%	10 <sup>3</sup>	125.9	=139.3±11.65	=8.36%
	3.00				145		
	3.10				147		
10 <sup>4</sup>	50.3	=50.37±4.10	=8.14%	10 <sup>4</sup>	1158	=1084.67±119.31	=10.99%
	46.3				1149		
	54.5				947		

ตารางที่ 15 การทดสอบ Inter-assay repeatability ของเทคนิค ddPCR

Inter-assay repeatability	BCP wildtype (copies/ul)	BCP mutant (copies/ul)
DAY1	77.9	192
DAY2	102	198
DAY3	74.7	199
DAY4	74.3	149
DAY5	91	159
Mean±SD	83.98±12.15	179±23.61



รูปที่ 35 กราฟ Levey-Jennings ของเทคนิค ddPCR

A คือ กราฟของพลาสมิดตัวควบคุมบวก wildtype

B คือ กราฟของพลาสมิดตัวควบคุมบวก mutant

### 5.3 ผลการศึกษาการหาค่า LOB, LOD และ LOQ (limit of blank, limit of detection and limit of quantitation)

การหาค่า LOB หรือ ร้อยละการกลายที่ต่ำที่สุดที่สามารถแยกความแตกต่างจาก noise ได้ เริ่มจากนำพลาสมิดควบคุม wildtype ที่ความเข้มข้น  $10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$  และ  $10^6$  copies/ul จำนวน 7 ตัวอย่าง มาทดสอบด้วยเทคนิค ddPCR พบว่าพลาสมิดควบคุม wildtype ที่ความเข้มข้น  $10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^5$  และ  $10^6$  copies/ul มีปริมาณดีเอ็นเอ wildtype ที่ 0.07, 0.17, 0.50, 3.60, 433 และ 6450 ตามลำดับ และไม่พบปริมาณดีเอ็นเอของ mutant แสดงว่าไม่มีสัญญาณรบกวน (noise) ของสารเรืองแสง แต่พลาสมิดควบคุม wildtype ความเข้มข้น  $10^4$  copies/ul พบสัญญาณรบกวนของสารเรืองแสง FAM จึงตรวจพบปริมาณ BCP mutant อยู่ที่ 0.07 copies/ul เนื่องจากการทดสอบนี้ใช้พลาสมิดควบคุม wildtype จึงไม่ควรมีการแสดงออกของจำนวน copies ของยีนกลายพันธุ์ ผลการทดสอบนี้ แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่จะมีสัญญาณรบกวนของสารเรืองแสง FAM ซึ่งคือ จำนวน copies ที่แสดงออกถึงการกลายพันธุ์ของยีน BCP อยู่ที่ 0.07 copie/ul ดังตารางที่ 16 จากนั้นนำแต่ละความเข้มข้นมาคิดเป็นร้อยละการกลายพันธุ์ และหา

ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพลาสมิตคววม wildtype จำนวน 7 ตัวอย่าง จะได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.03 และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.072 ดังตารางที่ 17 นำค่าเหล่านั้นไปหา LOB ต่อไป

ตารางที่ 16 การหาค่า limit of blank

ความเข้มข้นของพลาสมิตคววม wildtype (copies/ul)	Detection by ddPCR (copies/ul)	
	BCP wildtype	BCP mutant
$10^0$	0.07	0
$10^1$	0.17	0
$10^2$	0.5	0
$10^3$	3.6	0
$10^4$	36.6	0.07
$10^5$	433	0
$10^6$	6450	0

ตารางที่ 17 การร้อยละการกลายพันธุ์ ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของพลาสมิตคววม wildtype จำนวน 7 ตัวอย่าง

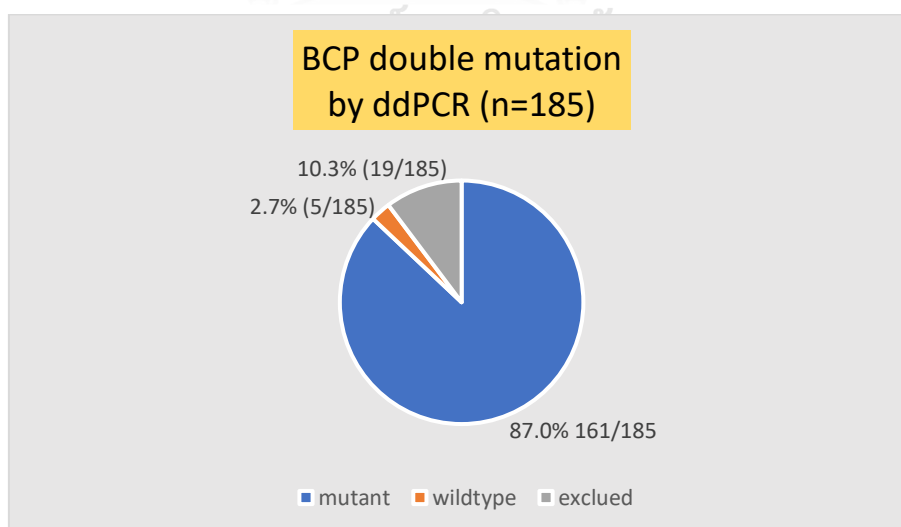
ความเข้มข้นของพลาสมิตคววม wildtype (copies/ul)	%Mutations
$10^0$	$(0/0+0.07)*100 = 0$
$10^1$	$(0/0+0.17)*100 = 0$
$10^2$	$(0/0+0.50)*100 = 0$
$10^3$	$(0/0+3.60)*100 = 0$
$10^4$	$(0.07/0.07+36.6)*100 = 0.19\%$
$10^5$	$(0/0+433)*100 = 0$
$10^6$	$(0/0+6450)*100 = 0$
Mean±SD	0.03 ± 0.072

คำนวณหาค่า LOB จากสูตร : ค่าเฉลี่ยของ (copy number blank) + 1.645 x SD (copy number blank) แทนค่า  $0.03 + 1.645*0.072 = 0.15\%$  ดังนั้น LOB เท่ากับ 0.15% แสดงว่าการตรวจสอบการกลายพันธุ์ BCP double mutations ด้วยเทคนิค ddPCR มีร้อยละการกลายพันธุ์ต่ำที่สุด

ที่สามารถแยกความแตกต่างจาก blank ได้อยู่ที่ร้อยละ 0.15 และนำค่าเฉลี่ยของ copy number blank และ SD ของ copy number blank มาคำนวณหาค่า LOD และ LOQ จากสูตร (66) : LOD = ค่าเฉลี่ยของ sample blank + 3 SD (0.03+(3\*0.072)), LOQ = ค่าเฉลี่ยของ sample blank +10 SD(0.03+(10\*0.072)) ตามลำดับ จะได้ค่า LOD เท่ากับ 0.25% และ LOQ เท่ากับ 0.75% การทดสอบนี้สรุปได้ว่าค่าร้อยละการกลายพันธุ์ที่ต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้ (LOD) ด้วยเทคนิค ddPCR คือร้อยละ 0.25 และว่าค่าร้อยละการกลายพันธุ์ที่ต่ำที่สุดที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างที่สามารถตรวจวัดได้อย่างน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับ (LOQ) ด้วยเทคนิค ddPCR คือร้อยละ 0.75

#### 5.4 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ด้วยเทคนิค ddPCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจำนวน 185 รายมาตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ด้วยเทคนิค ddPCR พบว่าสามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ได้ทั้งหมด 166 ตัวอย่างที่ คิดเป็น 89.7% โดยมี 161 ตัวอย่างพบการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (mutant, มีร้อยละการกลายพันธุ์มากกว่าค่า LOD = 0.25%) คิดเป็น 87.0% นอกจากนี้ พบ 5 ตัวอย่างที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี (wildtype, มีร้อยละการกลายพันธุ์มากกว่าค่า LOB = 0.15% แต่น้อยกว่าค่า LOD = 0.25%) คิดเป็น 2.7% ดังรูปที่ 36 และพบ 19 ตัวอย่างที่ไม่สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณนี้ได้ด้วยเทคนิค ddPCR (เนื่องมาจากมีร้อยละการกลายพันธุ์น้อยกว่าค่า LOB = 0.15%)



รูปที่ 36 กราฟแสดงผลร้อยละการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี BCP double mutations โดยเทคนิค Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)



เมื่อได้ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ทั้งสามเทคนิคแล้ว จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในแต่ละเทคนิคแบบ head-to-head comparisons

### 6.ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในแต่ละเทคนิคแบบ head-to-head comparisons

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Real Time PCR เมื่อเปรียบเทียบกับ Sanger sequencing ซึ่งเป็น Conventional method ของการตรวจการกลายพันธุ์ พบว่า เทคนิค Real Time PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้มากกว่า Sanger sequencing อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P < 0.001$  (60.3% : 43.6%) โดยใช้สถิติ chi-squared test โดยพบการกลายพันธุ์(mutant) 47 ตัวอย่าง ส่วน Sanger sequencing สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์(mutant) เพียง 34 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามเทคนิค Real Time PCR ไม่สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มมีการกลายพันธุ์ (mutant) หรือไม่มีการกลายพันธุ์(wildtype) ได้ 10 ตัวอย่าง คิดเป็น 12.8% ดังตารางที่ 18 ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่าง Sanger sequencing กับ Real Time PCR

BCP mutations	Sanger sequencing	Real Time PCR	<i>P</i> value
Mutant	34 (43.6%)	47 (60.3%)	$P < 0.001$
Wildtype	44 (56.4%)	21 (26.9%)	
Undetermined	0	10 (12.8%)	
Total	78	78	

และผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Sanger sequencing กับ ddPCR ในการตรวจการกลายพันธุ์ ในจำนวนตัวอย่างเดียวกัน เทคนิค ddPCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้มากกว่า Sanger sequencing อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P < 0.001$  (84.6% : 43.6%) โดยใช้สถิติ chi-squared test โดย ddPCR พบการกลายพันธุ์(mutant) 66 ตัวอย่าง ส่วน Sanger sequencing สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์(mutant) เพียง 34 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 19 อย่างไรก็ตามเทคนิค ddPCR ที่ไม่สามารถจัดจำแนกเป็นกลุ่มมีการกลายพันธุ์ (mutant)หรือไม่มีการกลายพันธุ์(wildtype)ได้ อันเนื่องมาจากมีค่าร้อยละการกลายพันธุ์ต่ำกว่า LOB คือ ต่ำกว่าร้อยละ 0.15 เป็นจำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.0%

ตารางที่ 19 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่าง Sanger sequencing กับ ddPCR

BCP mutations	Sanger sequencing	ddPCR	<i>P</i> value
Mutant	34 (43.6%)	66 (84.6%)	<i>P</i> <0.001
Wildtype	44 (56.4%)	5 (6.4%)	
Undetermined	0	7 (9.0%)	
Total	78	78	

และผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิค Real time PCR กับ ddPCR ในการตรวจการกลายในจำนวนตัวอย่างเดียวกัน เทคนิค ddPCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์(mutant) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P < 0.001$  (84.6% : 43.6%) โดยใช้สถิติ chi-squared test โดยพบการกลายพันธุ์ (mutant) 66 ตัวอย่าง ส่วน Real time PCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์(mutant)เพียง 47 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่าง Real time PCR กับ ddPCR

BCP mutations	Real Time PCR	ddPCR	<i>P</i> value
Mutant	47 (60.3%)	66 (84.6%)	<i>P</i> <0.001
Wildtype	21 (26.9%)	5 (6.4%)	
Undetermined	10 (12.8%)	7 (9.0%)	
Total	78	78	

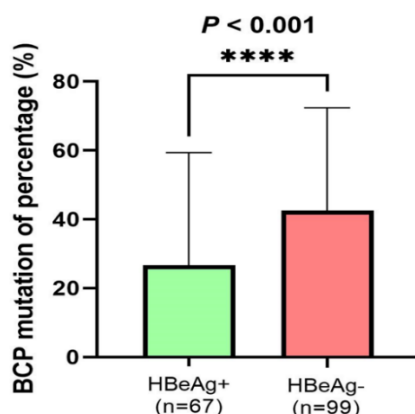
และเมื่อเปรียบเทียบทั้งสามเทคนิค พบว่าเทคนิค ddPCR มีประสิทธิภาพในตรวจพบการกลายพันธุ์(mutant) ดีที่สุด สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ถึง 66 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 84.6 รองลงมา คือ Real Time PCR 47 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60.3 และ Sanger sequencing 34 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.6 ตามลำดับ ดังตารางที่ 21 จึงสรุปได้ว่า ddPCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีความไวในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP ได้ดีที่สุดในเมื่อเปรียบเทียบกับ Sanger sequencing และ Real time PCR จึงนำร้อยละการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค ddPCR ไปหาความสัมพันธ์กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ตารางที่ 21 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจการกลายพันธุ์ BCP double mutation ระหว่างสามเทคนิค

head-to-head comparisons		Techniques		
		Sanger sequencing	Real Time PCR	ddPCR
mutant	count	34	47	66
	%	43.6	60.3	84.6
wildtype	count	44	21	5
	%	56.4	26.9	6.4
undetermined	count	0	10	7
	%	0.0	12.8	9.0
Total	count	78	78	78
	%	100	100	100

#### 7. ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

เมื่อนำร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations มาแบ่งกลุ่มตามระยะของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่ากลุ่ม HBeAg positive จะมีการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations อยู่ 67 ตัวอย่าง และพบกลุ่ม HBeAg negative จะมีการกลายพันธุ์บริเวณ บริเวณ BCP double mutation อยู่ 99 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่าร้อยละการกลายพันธุ์ระหว่างกลุ่ม พบว่า ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $P < 0.001$  โดยค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive อยู่ที่  $31.36 \pm 33.56$  และค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg negative อยู่ที่  $46.86 \pm 27.88$  โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test ดังรูปที่ 37



รูปที่ 37 ค่าเฉลี่ยของร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

#### 8. ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive

เมื่อนำร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive จำนวน 67 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทั้งอายุ ปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆ โดยใช้ spearman's correlation พบว่า ร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอายุที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = 0.351, P=0.004 และพบมีความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ที่เพิ่มมากขึ้นกับจำนวนไวรัส HBV DNA และ ค่า HBsAg ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = -0.420 และ -0.559 ตามลำดับ ที่ P<0.001 และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation กับค่าเอนไซม์ ALT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า Spearman's Rho = -0.054, P=0.666 ดังตารางที่ 22

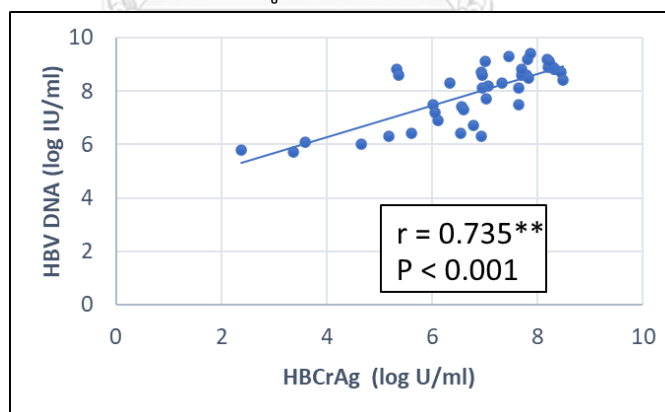
ตารางที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive

HBeAg+ (n=67)	r	P value
Age	0.351*	0.004
HBV DNA	-0.420**	<0.001

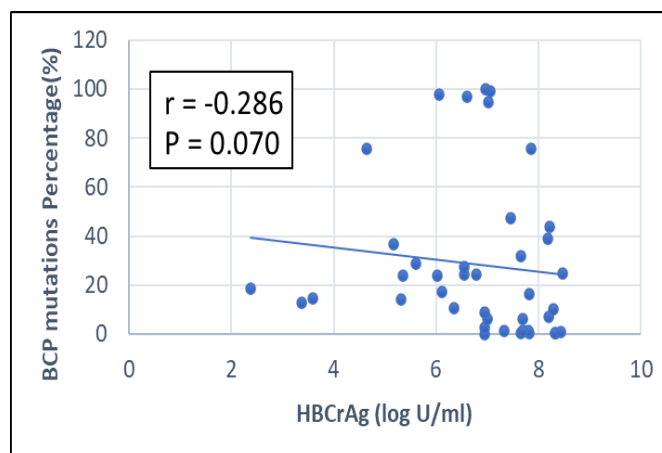
HBsAg	-0.559**	<0.001
ALT	-0.054	0.666

9. ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg กับจำนวนไวรัส HBV DNA และร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive

เมื่อนำค่า HBV DNA และร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive จำนวน 67 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่อย่าง HBcrAg ซึ่งมีข้อมูลคนไข้เพียง 42 ตัวอย่างที่สามารถบอกค่าจริงของ HBcrAg และอีก 25 ตัวอย่างพบว่าไม่สามารถบอกค่าจริง HBcrAg ได้ การศึกษานี้จึงต้องตัดค่าเหล่านั้นออกจากการหาความสัมพันธ์ในครั้งนี้ ซึ่งผลการศึกษาใช้สถิติ spearman's correlation พบว่า มีความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่าง HBcrAg กับจำนวนไวรัส HBV DNA ในกลุ่ม HBeAg positive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = 0.735, P<0.001 ดังรูปที่ 38 และพบความสัมพันธ์เชิงลบระหว่างค่า HBcrAg กับร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ในกลุ่ม HBeAg positive โดยค่า HBcrAg มีแนวโน้มลดลง เมื่อมีร้อยละการกลายพันธุ์มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบความสัมพันธ์ความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = -0.286, P=0.070 ดังรูปที่ 39



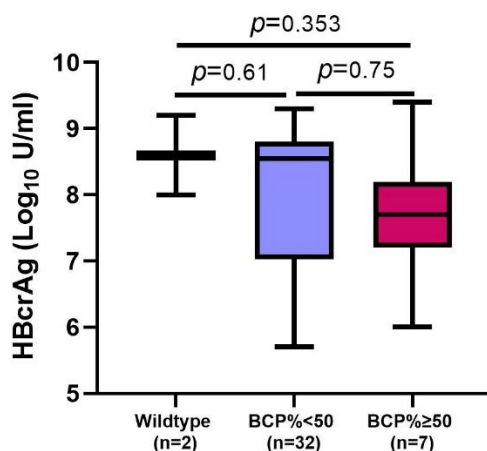
รูปที่ 38 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไวรัส HBV DNA และตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg positive



รูปที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับ HBCrAg ในกลุ่ม HBeAg positive

#### 10. ผลการศึกษาการวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่ม (subgroup analysis) ของร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBCrAg ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg positive

นำร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มาแบ่งกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มคือ 1. กลุ่มที่ไม่มีการตรวจพบการกลายพันธุ์ (wildtype), 2. กลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation น้อยกว่าร้อยละ 50 และ 3. กลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มากกว่าร้อยละ 50 และนำมาคิดแบ่งกลุ่ม (subgroup analysis) เพื่อดูค่าเฉลี่ยของ HBCrAg ระหว่างกลุ่ม โดยใช้ Independent-samples kruskal wallis test พบว่า ค่าเฉลี่ยของ HBCrAg มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อมีการกลายพันธุ์ที่มากขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $P=0.462$  และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มต่อกลุ่ม พบว่าค่าเฉลี่ย HBCrAg ในกลุ่มที่ไม่มีการตรวจพบการกลายพันธุ์เทียบกับกลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation น้อยกว่าร้อยละ 50 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P=0.61$  (8.60 vs 7.99 Log<sub>10</sub> U/ml), ค่าเฉลี่ย HBCrAg ในกลุ่มที่ไม่มีการตรวจพบการกลายพันธุ์เทียบกับกลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มากกว่าร้อยละ 50 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P=0.75$  (8.60 vs 7.70 Log<sub>10</sub> U/ml) และค่าเฉลี่ย HBCrAg ในกลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation น้อยกว่าร้อยละ 50 เทียบกับกลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มากกว่าร้อยละ 50 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $P=0.353$  (7.99 vs 7.70 Log<sub>10</sub> U/ml) ดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 การวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่มของค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ในแต่ละกลุ่มในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg positive

โดยให้ wildtype คือ ผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ wildtype

BCP<50% คือ ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ basal core promoter น้อยกว่าร้อยละ 50

BCP≥50% คือ ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ basal core promoter มากกว่าร้อยละ 50

#### 11. ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative

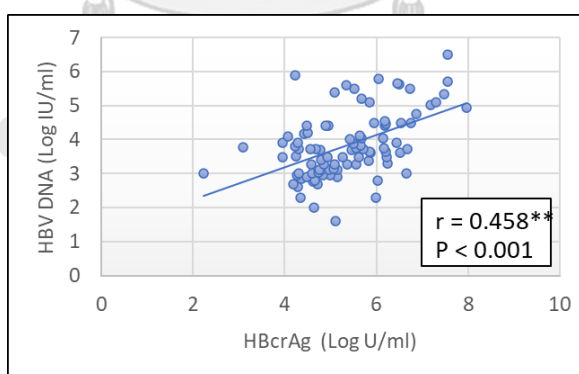
เมื่อนำร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg negative จำนวน 99 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ทั้งอายุ ปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆ โดยใช้สถิติ spearman's correlation พบร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ HBV DNA ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = 0.215, P=0.033 และไม่พบมีความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation กับอายุ, ค่า HBsAg, ค่า ALT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ P=0.077, 0.056 และ 0.694 ตามลำดับ โดยมีค่า Spearman's Rho = -0.178, 0.192 และ 0.040 ตามลำดับ ดังตารางที่ 23 ตารางที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg negative

HBeAg+ (n=99)	r	P value
Age	-0.178	0.077

HBV DNA	0.215*	0.033
HBsAg	0.192	0.056
ALT	0.040	0.694

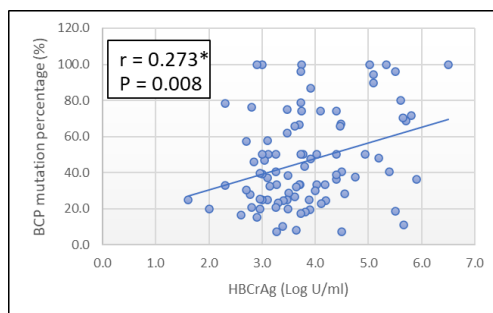
**12. ผลการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg กับจำนวนไวรัส HBV DNA และร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative**

เมื่อนำจำนวนไวรัส HBV DNA และร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ในกลุ่ม HBeAg negative จำนวน 99 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อหาความสัมพันธ์กับตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg และตัด Outlier ของค่า HBcrAg ที่มากกว่า 7.1 (log U/mL) จำนวน 6 ตัวอย่างออกจากการหาความสัมพันธ์ในครั้งนี้ โดยใช้สถิติ spearman's correlation ซึ่งผลการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างค่า HBcrAg กับ HBV DNA และพบความสัมพันธ์ระหว่างค่า HBcrAg กับร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ในกลุ่ม HBeAg negative พบว่าค่า HBV DNA มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่า HBcrAg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = 0.458,  $P < 0.001$  ดังรูปที่ 41 และพบร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่า HBcrAg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า Spearman's Rho = 0.273,  $P = 0.008$  ดังรูปที่ 42



รูปที่ 41 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า HBV DNA กับค่า HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg negative

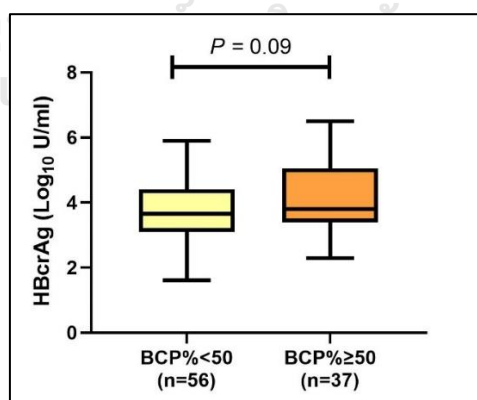




รูปที่ 42 ความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation กับค่า HBcrAg ในกลุ่ม HBeAg negative

### 13. ผลการศึกษาการวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่ม (subgroup analysis) ร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative

นำร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มาแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation น้อยกว่าร้อยละ 50 และ 2. กลุ่มที่มีร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation มากกว่าร้อยละ 50 และนำมาคิดแบ่งกลุ่ม (subgroup analysis) ของค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ระหว่างกลุ่ม โดยใช้ Mann-Whitney U test พบว่า ค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $P=0.09$  (3.78 vs 4.13  $\text{Log}_{10}$  U/ml) ดังรูปที่ 43



รูปที่ 43 การวิเคราะห์แบบแบ่งกลุ่มของค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ในแต่ละกลุ่มในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative

โดยให้ BCP<50% คือ ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ basal core promoter น้อยกว่าร้อยละ 50  
BCP≥50%คือ ผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ basal core promoter มากกว่าร้อยละ 50

## บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Real Time PCR เปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค Sanger sequencing ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าเทคนิค Real Time PCR เป็นเทคนิคที่มีถูกต้องเที่ยงตรง และสามารถให้ผลการตรวจประเมินการกลายพันธุ์ของยีน basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ได้อย่างแม่นยำ โดยผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค Sanger sequencing ที่เป็นเทคนิคมาตรฐาน (conventional method) ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน BCP พบว่า Real Time PCR ตรวจพบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยได้มากกว่าเทคนิค Sanger sequencing แสดงว่า เทคนิค Real Time PCR มีความไว (sensitive) กว่าเทคนิค Sanger sequencing อย่างไรก็ตามยังมีจำนวนตัวอย่าง 10 ตัวอย่างที่ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นการกลายพันธุ์ (mutant) หรือไม่พบการกลายพันธุ์ (wildtype) ได้ด้วยเทคนิค Real Time PCR ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าเทคนิค Real Time PCR ใช้การตรวจสอบด้วย Probe assay ซึ่งมีการเกิด error ระหว่างการจับกันของตัวโพรบกับดีเอ็นเอตัวอย่าง หรือคุณภาพดีเอ็นเอมี inhibitor มากเกินไป จึงอาจส่งผลให้การ amplification ไม่ดีพอ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์การตรวจการกลายพันธุ์นี้ได้ (68)

จากการทดลองเพื่อประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR) เปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค Sanger sequencing และ Real Time PCR ในการเป็นเทคนิคทางเลือกในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี พบว่าเทคนิค ddPCR เป็นเทคนิคที่สามารถที่บ่งบอกการกลายพันธุ์ได้ในเชิงปริมาณ (quantitative) มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความไว (high sensitivity) สูง (71) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนในระดับต่ำได้ (low-frequency mutation rate) (69) จึงสามารถตรวจสอบร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างต่ำได้ถึงร้อยละ 0.25 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าเทคนิค ddPCR มีความไวสูง และสามารถตรวจการกลายพันธุ์ของยีน *BRAF* ได้ในระดับการกลายพันธุ์ต่ำตั้งแต่ร้อยละการกลายพันธุ์ที่น้อยกว่า 0.1 (70) เทคนิค ddPCR จึงสามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยได้มีประสิทธิภาพกว่าเทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์ด้วยวิธีอื่น ตัวอย่างเช่นการใช้เทคนิค Sanger sequencing ที่จะตรวจพบร้อยละการกลายพันธุ์ได้อย่างต่ำที่ 7-20% ขึ้นไป (71) ซึ่งนับว่าเทคนิค ddPCR นี้เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย

เนื่องจากเทคนิคนี้จะทำให้ผู้ป่วยได้ผลการตรวจที่ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วมากขึ้น นอกจากนี้ เทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR) ทำให้ผู้ป่วยและแพทย์ทราบว่า มีการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยไปมากหรือน้อยเพียงใด สามารถติดตามการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจการกลายพันธุ์กับการใช้เทคนิคอื่นพบว่า ddPCR สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยได้มากกว่าเทคนิค Sanger sequencing และ Real Time PCR แสดงว่า เทคนิค ddPCR มีความไว กว่าเทคนิค Sanger sequencing และ Real Time PCR

อย่างไรก็ตามเทคนิค ddPCR ไม่สามารถจัดจำแนกตัวอย่าง 7 ตัวอย่างว่าเป็นกลุ่ม mutant หรือ wildtype ทั้งนี้เกิดจากตัวอย่างดังกล่าว ตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ต่ำกว่า (limit of blank หรือ LOB) ซึ่งในการศึกษานี้พบสัญญาณรบกวน (noise) จากน้ำยาในกลุ่ม negative control (blank) หรือที่เรียกว่า LOB อยู่ที่ร้อยละ 0.15 นั้นหมายความว่า cut-off ของการกำหนดการกลายพันธุ์ต้องพบมากกว่าร้อยละ 0.15 เท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการศึกษาแต่ละ cohort ว่าจะพบ LOB เท่าใด ซึ่งอาจจะเป็นข้อจำกัดของเทคนิค ddPCR ในการกำหนด cut-off ในแต่ละยีนที่แตกต่างกัน

ดังนั้นสรุปได้ว่า การใช้เทคนิค Droplet Digital PCR (ddPCR) ในการตรวจสอบการกลายพันธุ์นั้นมีความไวสูงกว่า conventional method อย่างเทคนิค Sanger sequencing และ Real time PCR ในแง่ของการตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีนในระดับต่ำ การให้ผลแบบ absolute quantitative ของตัวอย่างซึ่งบอกผลการตรวจในเชิงปริมาณของการกลายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ ddPCR และ Real Time PCR ยังเป็นเทคนิคที่ดีกว่า Sanger sequencing ในแง่ของเวลาในการจัดการ ความสามารถในการทำซ้ำ เช่นเดียวกับกับ Real time PCR ซึ่งให้ความไวในการตรวจสอบการกลายพันธุ์สูงกว่า Sanger sequencing อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกการกลายพันธุ์เป็นปริมาณได้ ทั้งนี้ ddPCR และ real time PCR ยังมีราคาการตรวจที่ค่อนข้างสูงในปัจจุบัน

เมื่อดูค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations ของผู้ป่วยในกลุ่ม HBeAg positive เปรียบเทียบกับในผู้ป่วยในกลุ่ม HBeAg negative ว่าจะมีความแตกต่างกันหรือไม่ พบว่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์ของของไวรัสตับอักเสบบีบริเวณ basal core promoter ของผู้ป่วยแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่ม HBeAg negative จะพบร้อยละการกลายพันธุ์ที่มากกว่ากลุ่ม HBeAg positive ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (53) พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter จะเพิ่มขึ้นในกลุ่ม HBeAg negative มากกว่ากลุ่ม HBeAg positive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆในกลุ่ม HBeAg positive พบว่าร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations กลุ่ม HBeAg positive มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอายุที่เพิ่มมากขึ้นของผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg positive ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุที่มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าของตำแหน่งการกลายพันธุ์ A1762T และ G1764A คือ Spearman's Rho = 0.261 และ Spearman's Rho = 0.316 ตามลำดับ (61)

ร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutations กลุ่ม HBeAg positive ที่เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า HBV DNA ที่ลดลงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (61) ที่พบว่า เมื่อมีระดับการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ที่เพิ่มมากขึ้น ระดับ HBV DNA จะน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าของตำแหน่งการกลายพันธุ์ A1762T และ G1764A คือ Spearman's Rho = 0.314 และ Spearman's Rho = 0.299 ตามลำดับ

ร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation กลุ่ม HBeAg positive ที่เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงลบกับ HBsAg ที่ลดลงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (72) พบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ตำแหน่ง A1762T/G1764A ระดับ HBsAg จะน้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มไม่มีการกลายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (49)

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไวรัส HBV DNA และตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg และความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกับ HBcrAg ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในกลุ่ม HBeAg positive พบว่าค่า HBV DNA มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่า HBcrAg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (73) (74) (75) ซึ่งพบว่า ค่า HBcrAg จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีจำนวนไวรัส HBV DNA มากขึ้นโดย Spearman's Rho = 0.602

การศึกษาก่อนหน้า (62) พบว่า ระดับ HBcrAg มีค่าเฉลี่ยลดลงในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg positive ที่มีการกลายพันธุ์ basal core promoter (n=33) เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (n=15) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่า ระดับ HBcrAg มีค่าเฉลี่ยลดลงอย่างชัดเจนในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg positive ที่มีการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter และ Precore ร่วมด้วย (n=9) เปรียบเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ (n=15) ซึ่งสรุปได้ว่าร้อยละการกลายพันธุ์ BCP double mutation ในผู้ป่วย HBeAg Positive จะส่งผลต่อการแสดงออกของระดับ HBcrAg ลดลง อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double

mutation กับ HBcrAg ในการศึกษานี้พบว่า ระดับ HBcrAg มีแนวโน้มลดลงเมื่อผู้ป่วยกลุ่ม HBeAg positive มีร้อยละการการกลายพันธุ์ที่เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจำนวนตัวอย่างที่ใช้หาความสัมพันธ์ร้อยละการการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations กับ HBcrAg มีเพียง 41 ตัวอย่างที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ในครั้งนี้ การศึกษาหน้าควรเพิ่มกลุ่มตัวอย่างที่มีค่า HBcrAg เพื่อให้เห็นความสัมพันธ์ร้อยละการการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation กับ HBcrAg ได้ดีมากยิ่งขึ้น

การศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการการกลายพันธุ์ BCP double mutations กับ ปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกต่างๆในกลุ่ม HBeAg negative พบว่าร้อยละการการกลายพันธุ์ BCP double mutations ในกลุ่ม HBeAg negative มีความสัมพันธ์กับ HBV DNA อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน โดยในบางการศึกษาพบว่า การการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ในกลุ่ม HBeAg negative ที่จะมีความสัมพันธ์กับค่าเฉลี่ย HBV DNA ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (76) บางการศึกษาพบว่า การการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations ในกลุ่ม HBeAg negative ไม่มีความสัมพันธ์กับ จำนวน HBV DNA (77) ดังนั้นการหาความสัมพันธ์นี้อาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไวรัส HBV DNA และตัวบ่งชี้คุณภาพใหม่ HBcrAg ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative โดยพบว่าจำนวน HBV DNA ในกลุ่ม HBeAg negative กับ HBcrAg มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ที่ค่า  $r = 0.458$  สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า พบว่าค่า HBV DNA ในกลุ่ม HBeAg negative ที่เพิ่มสูงขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับ HBcrAg ที่เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $r = 0.583$  (78)

และการหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations กับ HBcrAg ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีกลุ่ม HBeAg negative พบว่า ร้อยละการการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutation ที่เพิ่มขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับค่า HBcrAg ที่มากขึ้นตามไปด้วยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $r = 0.273$  แต่เมื่อทำการ subgroup analysis พบว่าค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ของกลุ่มที่มีการการการกลายพันธุ์ต่ำกว่าร้อยละ 50 กับกลุ่มที่มีการการการกลายพันธุ์มากกว่าร้อยละ 50 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ  $P = 0.09$  ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในการศึกษาระดับ HBcrAg ในกลุ่ม Anti-HBe positive พบว่าค่าเฉลี่ยของ HBcrAg ในกลุ่มที่ไม่มีมีการการการกลายพันธุ์ BCP double mutation ( $n = 11$ ) เทียบกับกลุ่มที่มีการการการกลายพันธุ์ BCP double mutation ( $n = 22$ ) มีค่าเฉลี่ย HBcrAg ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษานี้มีข้อจำกัด คือ การศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบการการกลายพันธุ์บริเวณ BCP double mutations เท่านั้น ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษการการการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง BCP อื่นๆ เช่น T1753V, T1754G, C1766T หรือ T1768A หรือ Precore (G1896A) ทั้งควรตรวจสอบการการการ

พันธุที่ส่งผลต่อการแสดงออกของ HBeAg ร่วมกัน เนื่องมาจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นบริเวณ Basal core promoter ซึ่งเป็นตำแหน่งควบคุมการ Transcription โดยการกลายพันธุ์ตำแหน่ง Basal core promoter จะทำให้การสร้างโปรตีน HBeAg ลดลงกว่าปกติ ส่วนการกลายพันธุ์บริเวณ Precore ซึ่งเป็นตำแหน่งควบคุมการ Translation ของโปรตีน โดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ จะส่งผลทำให้ HBeAg ไม่มีการแสดงออกเลย (abolishes HBeAg production) (48) (49) (9) ดังนั้น การเพิ่มการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP หรือ Precore อื่นๆ อาจจะช่วยทำให้อธิบายความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์กับปัจจัยทางไวรัสและทางคลินิกของผู้ป่วยได้ดีมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังมีกลุ่มตัวอย่างที่น้อยในการหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์ที่มากขึ้นกับ ค่า HBcrAg ที่ลดลงในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive จึงยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการกลายพันธุ์กับค่า HBcrAg ในกลุ่มผู้ป่วย HBeAg-positive ได้อย่างชัดเจน ควรเพิ่มกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าการตรวจ HBcrAg ให้มากขึ้น และคุณภาพของตัวอย่างไม่ดีพอ ในบางการตรวจการกลายพันธุ์ควรจะต้องคัดเลือกคุณภาพของตัวอย่างให้ดียิ่งขึ้น

กล่าวโดยสรุป การศึกษาครั้งนี้ ddPCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและมีความไวในการตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ BCP ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ Sanger sequencing และ Real time PCR นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของร้อยละการกลายพันธุ์และระดับของ HBcrAg ในเลือด ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ใหม่ที่ใช้ในทางคลินิก ดังนั้นเทคนิค ddPCR จึงอาจจะสามารถเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบการกลายพันธุ์และปริมาณการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี และสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับการติดตามและการทำนายการดำเนินโรคไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังได้ในอนาคต

## บรรณานุกรม

1. Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, Zumla A, Ippolito G. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infectious disease clinics of North America*. 2019;33(4):1045-62.
2. Sarin SK, Kumar M, Lau GK, Abbas Z, Chan HL, Chen CJ, et al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. *Hepatology international*. 2016;10(1):1-98.
3. Upala P, Apidechkul T, Tamornpark R, Chomchoei C, Yeemard F. Seroprevalence and factors associated with hepatitis B infection among the hill tribe adult population in Thailand: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):494.
4. Posuwan N, Wanlapakorn N, Sa-Nguanmoo P, Wasitthankasem R, Vichaiwattana P, Klinfueng S, et al. The Success of a Universal Hepatitis B Immunization Program as Part of Thailand's EPI after 22 Years' Implementation. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150499-e.
5. Kohreanudom S. Hepatitis B Virus and Hepatitis C Virus Diagnosis. *Thai AIDS Journal*. 2018;30:113.
6. Datta S, Chatterjee S, Veer V, Chakravarty R. Molecular biology of the hepatitis B virus for clinicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2012;2(4):353-65.
7. Hunt CM, McGill JM, Allen MI, Condreay LD. Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2000;31(5):1037-44.
8. Chauhan R, Kazim SN, Bhattacharjee J, Sakhuja P, Sarin SK. Basal core promoter, precore region mutations of HBV and their association with e antigen, genotype, and severity of liver disease in patients with chronic hepatitis B in India. *J Med Virol*. 2006;78(8):1047-54.
9. Kramvis A, Kostaki E-G, Hatzakis A, Paraskevis D. Immunomodulatory Function of HBeAg Related to Short-Sighted Evolution, Transmissibility, and Clinical Manifestation of Hepatitis B Virus. 2018;9(2521).
10. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal core promoter and precore mutations in the hepatitis B virus genome enhance replication efficacy of Lamivudine-resistant mutants. *Journal of virology*. 2004;78(16):8524-35.

11. Yang HC, Chen CL, Shen YC, Peng CY, Liu CJ, Tseng TC, et al. Distinct evolution and predictive value of hepatitis B virus precore and basal core promoter mutations in interferon-induced hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2013;57(3):934-43.
12. Homs M, Caballero A, Gregori J, Tabernero D, Quer J, Nieto L, et al. Clinical application of estimating hepatitis B virus quasispecies complexity by massive sequencing: correlation between natural evolution and on-treatment evolution. *PLoS One*. 2014;9(11):e112306.
13. Bayliss J, Yuen L, Rosenberg G, Wong D, Littlejohn M, Jackson K, et al. Deep sequencing shows that HBV basal core promoter and precore variants reduce the likelihood of HBsAg loss following tenofovir disoproxil fumarate therapy in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gut*. 2017;66(11):2013-23.
14. Ge Z, Tian T, Meng L, Song C, Yu C, Xu X, et al. HBV mutations in EnhII/BCP/PC region contribute to the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer medicine*. 2019;8(6):3086-93.
15. Baudi I, Inoue T, Tanaka Y. Novel Biomarkers of Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma: Clinical Significance of HBcrAg and M2BPGi. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3).
16. Chuaypen N, Payungporn S, Poovorawan K, Chotiyaputta W, Piratvisuth T, Tangkijvanich P. Next generation sequencing identifies baseline viral mutants associated with treatment response to pegylated interferon in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Virus Genes*. 2019;55(5):610-8.
17. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*. 1992;13(3):444-9.
18. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*. 2013;10(10):1003-5.
19. Ding PN, Becker T, Bray V, Chua W, Ma Y, Xu B, et al. Plasma next generation sequencing and droplet digital PCR-based detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in patients with advanced lung cancer treated with subsequent-line osimertinib. *Thoracic cancer*. 2019;10(10):1879-84.
20. Jarukamjorn NJaK. Droplet Digital Polymerase Chain Reaction: A Novel Method



for Absolute Quantification of the Target DNA. *Journal of Science and Technology Maharakham University*. 2014;Vol. 33 No. 5:518-25.

21. Dong L, Wang S, Fu B, Wang J. Evaluation of droplet digital PCR and next generation sequencing for characterizing DNA reference material for KRAS mutation detection. *Sci Rep*. 2018;8(1):9650-.

22. Fontanelli G, Baratè C, Ciabatti E, Guerrini F, Grassi S, Del Re M, et al. Real-Time PCR and Droplet Digital PCR: two techniques for detection of the JAK2V617F mutation in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. 2015;37(6):766-73.

23. Hu J. Hepatitis B Virus Virology and Replication. 2016. p. 1-34.

24. Quarleri J. Core promoter: a critical region where the hepatitis B virus makes decisions. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(2):425-35.

25. Nelson NP, Easterbrook PJ, McMahon BJ. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. *Clin Liver Dis*. 2016;20(4):607-28.

26. WHO. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021.

Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: actions for impact. 2021.

27. Lesmana LA, Leung NW-Y, Mahachai V, Phiet PH, Suh DJ, Yao G, et al. Hepatitis B: overview of the burden of disease in the Asia-Pacific region. *Liver International*. 2006;26(S2):3-10.

28. Leroi C, Adam P, Khamduang W, Kawilapat S, Ngo-Giang-Huong N, Ongwandee S, et al. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection in Thailand: a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2016;51:36-43.

29. Boyer TD, Wright TL, Manns MP. Preface. In: Boyer TD, Wright TL, Manns MP, Zakim D, editors. *Zakim and Boyer's Hepatology (Fifth Edition)*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2006. p. xiii.

30. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis B in Europe and worldwide. *Journal of Hepatology*. 2003;39:64-9.

31. HEPATITIS B [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2010. Available from:

<https://www.uwsuper.edu/ehs/hsprogram/upload/HepBGeneralFactSheet-BW.pdf>.

32. Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis.* 1991;11(2):73-83.
33. จิตแสง ล. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบ. *สรรพสิทธิเวชสาร.* 2019;ประจำเดือนมกราคม-ธันวาคม 2562 ปีที่ 40 ฉบับที่ 1-3.
34. Lau KCK, Burak KW, Coffin CS. Impact of Hepatitis B Virus Genetic Variation, Integration, and Lymphtropism in Antiviral Treatment and Oncogenesis. *Hepatology.* 2020;8(10):1470.
35. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2016;63(1):261-83.
36. Poortahmasebi V, Salarian A, Amiri M, Poorebrahim M, Jazayeri SM, Ataei A, et al. Integrated Analysis of Gene Expression Profiles Reveals Deregulation of the Immune Response Genes during Different Phases of Chronic Hepatitis B Infection. *Hepat Mon.* 2017;17(3):e42237.
37. Tran TT. Immune tolerant hepatitis B: a clinical dilemma. *Gastroenterology & hepatology.* 2011;7 8:511-6.
38. Yang H-C, Kao J-H. Revisiting the Natural History of Chronic HBV Infection. *Current Hepatology Reports.* 2016;15.
39. Pollicino T, Caminiti G. HBV-Integration Studies in the Clinic: Role in the Natural History of Infection. *Hepatology.* 2021;13(3):368.
40. Tacke F, Gehrke C, Luedde T, Heim A, Manns MP, Trautwein C. Basal Core Promoter and Precore Mutations in the Hepatitis B Virus Genome Enhance Replication Efficacy of Lamivudine-Resistant Mutants. *J Virol.* 2004;78(16):8524-35.
41. Alexopoulou A. Mutants in the precore, core promoter, and core regions of Hepatitis B virus, and their clinical relevance. *Annals of Gastroenterology.* 2009;22:13-23.
42. Utama A, Siburian M, Purwantomo S, Intan M, Kurniasih T, Gani R, et al. Association of core promoter mutations of hepatitis B virus and viral load is different in HBeAg(+) and HBeAg(-) patients. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2011;17:708-16.
43. Locarnini S, McMillan J, Bartholomeusz A. The hepatitis B virus and common

mutants. *Semin Liver Dis.* 2003;23(1):5-20.

44. Moradi A, Zhand S, Ghaemi A, Javid N, Bazouri M, Tabarraei A. Mutations in pre-core and basal-core promoter regions of hepatitis B virus in chronic HBV patients from Golestan, Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(5):370-7.

45. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology.* 2003;124(2):327-34.

46. Zhang Z-H, Wu C-C, Chen X-W, Li X, Li J, Lu M-J. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World journal of gastroenterology.* 2016;22(1):126-44.

47. Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 2006;97(8):683-8.

48. Lauri A, Mariani PO. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr.* 2009;4(1):1-12.

49. Yan C-H, Zhao C-Y, Ding H, Peng Y-Q, Jin P-Y, Yan L, et al. Hepatitis B virus basal core promoter mutations A1762T/G1764A are associated with genotype C and a low serum HBsAg level in chronically-infected HBeAg-positive Chinese patients. *Antiviral research.* 2012;96:108-14.

50. Ajay Kumar BKT, Ajay Kumar Chaudhary, Sanjay Pant, Sushil Narang. Identification of a Hepatitis B Virus Core Promoter Mutant by PCR- RFLP in Patients Suffering from Chronic Liver Disease, Uttar Pradesh, India. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2009;10(6):1173-5.

51. Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, et al. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *Journal of General Virology.* 1995;76(12):3159-64.

52. Song JE, Kim DY. Diagnosis of hepatitis B. *Ann Transl Med.* 2016;4(18):338-.

53. Tu W-H, Lv Y, Zhang Y-M, Hou W, Wang J-Y, Zhang Y-J, et al. Precore/basal core promoter mutants quantification throughout phases of hepatitis B virus infection by Simpleprobe. *World journal of gastroenterology.* 2015;21(21):6639-48.

54. Wang X, Xu L, Chen Y, Liu A, Wang L, Xu P, et al. Integrating nested PCR with high-throughput sequencing to characterize mutations of HBV genome in low viral load

samples. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(30):e7588.

55. Pornnapa Police TD, Chareeporn Akekawatchai, Waraphorn Fukpho and Khaimuk Changsri. Development of In-house SYBR Green I qPCR with Melting Curve Analysis for Detection of Basal Core Promoter A1762T/G1764A Mutation of Hepatitis B Virus. *Journal of the Medical Technologist Association of Thailand*. 2019;47.

56. Tong Y, Shen S, Jiang H, Chen Z. Application of Digital PCR in Detecting Human Diseases Associated Gene Mutation. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;43(4):1718-30.

57. Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, et al. Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry*. 2012;84(2):1003-11.

58. Zhao Y. A comparative study of ddPCR and Sanger sequencing for quantitative detection of low-frequency mutation rate. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019;332:032023.

59. Wang Z, Sun K, Jing C, Cao H, Ma R, Wu J. Comparison of droplet digital PCR and direct Sanger sequencing for the detection of the BRAFV600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019;33(6):e22902.

60. Villamil C, Calderon MN, Arias MM, Leguizamon JE. Validation of Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for Salmonella spp. Quantification. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11(1512).

61. Li H, She Q, Liu Y, Ding Y, Shi S, Li J, et al. Clinical implication and viral mutation in basal core promoter/pre-core of hepatitis B virus C/D recombinant. *Hepatology international*. 2018;12(5):447-55.

62. Kamijo N, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Ichikawa Y, Kimura T, et al. Mutations of pre-core and basal core promoter before and after hepatitis B e antigen seroconversion. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(2):541-8.

63. Ritter NM, Hayes T, Dougherty J. Analytical laboratory quality: Part II. Analytical method validation. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 2001;12(1):11-5.

64. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ [Internet]. © Copyright @ 2018, Dr.Woravith Chansuvarn. All right reserved. 2021. Available from:

[https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page\\_id=2#top](https://web.rmutp.ac.th/woravith/?page_id=2#top).

65. Strati A, Zavridou M, Economopoulou P, Gkolfinopoulos S, Psyri A, Lianidou E. Development and Analytical Validation of a Reverse Transcription Droplet Digital PCR (RT-ddPCR) Assay for PD-L1 Transcripts in Circulating Tumor Cells. *Clinical chemistry*. 2021;67(4):642-52.
66. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (method validation) [Internet]. 2009. Available from: <http://reo06.mnre.go.th/home/images/upload/file/report/Jurairut070509.pdf>.
67. Suwannarat K. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณแวนโคมัยซินในยาเตรียมเฉพาะคราว รูปแบบยาน้ำแขวนตะกอนด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง. *Thai Journals Online (ThaiJO)*. 2561;14(4) : 132-141.
68. Zhang H, Yan Z, Wang X, Gaňová M, Chang H, Laššáková S, et al. Determination of Advantages and Limitations of qPCR Duplexing in a Single Fluorescent Channel. *ACS omega*. 2021;6(34):22292-300.
69. Uchiyama Y, Nakashima M, Watanabe S, Miyajima M, Taguri M, Miyatake S, et al. Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. *Sci Rep*. 2016;6:22985.
70. Cheng LY, Haydu LE, Song P, Nie J, Tetzlaff MT, Kwong LN, et al. High sensitivity Sanger sequencing detection of BRAF mutations in metastatic melanoma FFPE tissue specimens. *Sci Rep*. 2021;11(1):9043.
71. Wang Z, Sun K, Jing C, Cao H, Ma R, Wu J. Comparison of droplet digital PCR and direct Sanger sequencing for the detection of the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(6):e22902.
72. Yan L, Zhang H, Ma H, Liu D, Li W, Kang Y, et al. Deep sequencing of hepatitis B virus basal core promoter and precore mutants in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. *Sci Rep*. 2015;5(1):17950.
73. Chuaypen N, Posuwan N, Payungporn S, Tanaka Y, Shinkai N, Poovorawan Y, et al. Serum hepatitis B core-related antigen as a treatment predictor of pegylated interferon in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2016;36(6):827-36.
74. Zhang ZQ, Zhang XN, Lu W, Wang YB, Weng QC, Feng YL. Distinct patterns of serum hepatitis B core-related antigen during the natural history of chronic hepatitis B.

BMC gastroenterology. 2017;17(1):140.

75. Xie Y, Li M, Ou X, Zheng S, Gao Y, Xu X, et al. HBeAg-positive patients with HBsAg < 100 IU/mL and negative HBV RNA have lower risk of virological relapse after nucleos(t)ide analogues cessation. *Journal of Gastroenterology*. 2021;56(9):856-67.

76. Kuhnhen L, Jiang B, Kubesch A, Vermehren J, Knop V, Susser S, et al. Impact of HBV genotype and mutations on HBV DNA and qHBsAg levels in patients with HBeAg-negative chronic HBV infection. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2018;47(11):1523-35.

77. Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, Wei SC, Chen QY, Fang KX, et al. The association of HBV core promoter double mutations (A1762T and G1764A) with viral load differs between HBeAg positive and anti-HBe positive individuals: a longitudinal analysis. *J Hepatol*. 2009;50(2):273-80.

78. Zhang Z-Q, Zhang X-N, Lu W, Wang Y-B, Weng Q-C, Feng Y-L. Distinct patterns of serum hepatitis B core-related antigen during the natural history of chronic hepatitis B. *BMC gastroenterology*. 2017;17(1):140.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	chavis pholpong
วัน เดือน ปี เกิด	22 June 1995
สถานที่เกิด	surin
วุฒิการศึกษา	Bachelor of Science [B.Sc] (Genetics), Chulalongkorn university
ผลงานตีพิมพ์	บทความวิจัย เรื่อง “การตรวจสอบการกลายพันธุ์บริเวณ basal core promoter ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบครอบพลेटดิจิทัล” เข้ารับการพิจารณาเพื่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 21 (National Graduate Conference 1/2022) เพื่อตีพิมพ์ลงรายงานการประชุมเป็นฉบับเต็ม (Full paper)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY