

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบบชนิดซี
ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและในหญิงบริการอาชีพพิเศษ

นายชัชวาลย์ อภิชาติปิยกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบนิกซี่
ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีและในหญิงบริการอาชีพพิเศษ

นายชัชวาลย์ อภิชาติปิยกุล
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้สนับสนุนการเงินทำให้การวิจัยสำเร็จลงได้ และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ น.พ. วิจารณ์ พานิช และศาสตราจารย์ ดร. วิชัย บุญแสงที่ให้คำแนะนำตลอดจนสนับสนุนการวิจัยนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณพัชโรบล นารถประทานจากสำนักงานควบคุมโรคติดต่อ เขต 10 ที่ประสานงานในการหาตัวอย่างของการศึกษาทำให้การศึกษาสำเร็จด้วยดี

บทวิเคราะห์

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี ส่วนใหญ่เกิดขึ้นในผู้ที่ได้รับเลือดหรือผลิตภัณฑ์ของเลือดที่มีเชื้อนีปนอยู่ และยังไม่แน่ชัดว่าเชื้อนี้สามารถติดต่อทางเพศสัมพันธ์ ตัวอย่างของการศึกษาเป็นหญิงบริการอาชีพพิเศษ จำนวน 333 รายในสามจังหวัดของภาคเหนือและผู้ติดเชื้อเอชไอวีจากเพศสัมพันธ์ 201 ราย นำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี และนำซีรัมที่ให้ผลบวกมาวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสนี้โดยวิธี RT-PCR และใช้ primer set ของส่วน NS5 และ 5'-UTR จากการศึกษาพบความชุกของการติดเชื้อไวรัสนี้ในหญิงบริการอาชีพพิเศษในจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน และ จังหวัดเชียงรายในอัตรา ร้อยละ 5.98, 3.92 และ 2.63 ตามลำดับ และมีอัตราเฉลี่ยร้อยละ 4.2 หญิงบริการอาชีพพิเศษที่นำมาศึกษาจาก จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงราย ส่วนใหญ่เป็นชาวไทยใหญ่ แต่หญิงบริการอาชีพพิเศษที่นำมาศึกษาจากจังหวัดลำพูน ส่วนใหญ่เป็นชาวไทยพื้นราบ จากการศึกษาพบว่าช่วงเวลาที่ประกอบอาชีพและอายุของหญิงบริการอาชีพพิเศษมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีในหญิงบริการ อาชีพพิเศษจากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน พบส่วนใหญ่ติดเชื้อ HCV-1a ตามด้วยสายพันธุ์ HCV-3a และ HCV-1b แต่ไม่สามารถวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีจากซีรัมของหญิงบริการอาชีพพิเศษจังหวัดเชียงรายที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสนี้ ส่วนการศึกษาความ ชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีในผู้ป่วยเอชไอวี พบความชุกร้อยละ 5.93 ร้อยละ 83 ของผู้ติดเชื้อเป็นชาย ภายหลังการวิเคราะห์สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบชนิดซี พบส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ HCV-3a ตามด้วย HCV-1a, HCV-1b และ HCV-3b โดยจะพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดนี้ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีอาการมากกว่าไม่มีอาการ จากการศึกษาครั้งนี้พบอัตราความชุกของการติดเชื้อของไวรัสตับอักเสบชนิดซีในหญิงบริการอาชีพพิเศษทั้งสามจังหวัดและในผู้ติดเชื้อเอชไอวีสูงกว่าหญิงที่มาบริจจาคโลหิต (0.99%) หรือหญิงตั้งครรภ์ (1.5%) แสดงให้เห็นว่า อาจเกิดการแพร่กระจายของไวรัสนี้โดยทางเพศสัมพันธ์ กองควบคุมโรคติดต่อควรมีการเฝ้าระวัง ตรวจสอบความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีในหญิงบริการอาชีพพิเศษเพื่อควบคุมการกระจายของเชื้อไวรัสได้

Abstract

Hepatitis C virus, a causative agent of non-A, non-B hepatitis, is commonly transmitted by parenteral exposures. Although, sexual contact seems to be a route of transmission, it is still unclear. To investigate the sexual transmission of HCV, we decide to study in the group of commercial sex workers (CSW) and non-intravenous drug user(IVDU) HIV infected patients. Sera from 333 CSW from 3 provinces of the Northern part of Thailand and 201 HIV-infected patients who enrolled at Maharaj Nakorn Chiang Mai Hospital were collected and assessed for HCV antibody by ELISA and for HCV subtypes by RT-PCR method using NS5 and/or 5'-UTR primer sets. The prevalence of HCV antibody positive CSW in Chiang Mai, Lumpoon and Chiang Rai were 5.98, 3.92 and 2.63 percent respectively, with an average of 4.2. Fifty percent CSW from Chiang Mai and 53% CSW from Chiang Rai are Burmese whereas eighty percent CSW from Lumpoon are local. In addition the prevalence of HCV antibody positive was found in CSW with longer duration of working in the sex trade and more age. By RT-PCR, 57% CSW from Chiang Mai and Lumpoon were detected against HCV primer sets of NS5 and 5'-UTR and found HCV-1a subtype prevailing , followed by the subtypes of HCV-3a and HCV-1b. All HCV antibody positive CSW from Chiang Rai were not detected against these primer sets. In non-IVDU HIV-infected patients, the prevalence of HCV antibody positive was 5.93%, of which 83 percent was men. Eighty three percent of HIV-infected sera were positive to the HCV primer sets, showing that HCV-3a was the most common subtype(40%) followed by HCV-1a, HCV-1b and HCV-3b. In the HIV-infected patients, we found that the symptomatic patients have higher prevalence of HCV antibody than asymptomatic HIV-infected patients. Taken together, the prevalence of HCV antibody positive CSW in three provinces * CCSW and non-IVDU HIV-infected patients was significantly higher than that of the prevalence in normal female blood donors(0.99%) and pregnant women (1.5%). These studies suggest that the HCV antibody screening in CSW of the Northern area of Thailand should be performed for the advantages of controlling the spreading of HCV infection by sexual transmission.

บทนำ

โรคไวรัสตับอักเสบที่มีปัญหาในประเทศไทยนอกจากเกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดเอ และบีแล้ว ปัจจุบันเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีเริ่มจะมีบทบาทสำคัญมากขึ้นเพราะเชื่อนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดของโรคตับอักเสบหลังจากได้รับเลือดหรือผลิตภัณฑ์จากเลือด (Post transfusion NANBH) นอกจากนี้ยังพบแบบ sporadic non A non B hepatitis (1,2) ในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีนั้น 10-20% จะมีอาการดีซ่านและผู้ป่วยประมาณ 50% จะมีการดำเนินโรคเป็นโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) นักวิจัยบางกลุ่มให้ความสำคัญของเชื้อไวรัสซีมีโอกาสดังเกิด hepatocellular carcinoma มากกว่า เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี (3)

ในปัจจุบันได้จำแนกเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีนี้จัดอยู่ในกลุ่ม flaviviridae มีลักษณะ spherical virus like particle ขนาด 55-65 nm และมี spike ด้วย เป็นไวรัสชนิด RNA สายเดี่ยวที่มีความยาว 9,400 nucleotides หรือ 3011 amino acid ส่วน DNA genome ของ HCV สามารถแยกออกมาได้เป็นส่วน core, envelope E1, E2 และส่วน nonstructural NS2, NS3, NS4, NS5 (4) และในปัจจุบันสามารถจำแนกชนิดของ HCV genotype ที่พบในโลกตามหลักการของ Dr. Okamoto และ Dr. Simmonds แบ่งเป็น 6 ชนิด คือ HCV genotype 1-6 (5,6) (ซึ่ง Dr. Okamoto's classification จะจัดเป็น HCV genotype I, II, III, IV, V, VI ซึ่งจะเหมือนกับ Dr. Simmonds' Classification HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b ความคล้าย) ส่วน Dr. Simmonds' Classification จะมี HCV genotype 4, 5, 6 ซึ่งไม่มีชื่อเรียกว่าใน Dr. Okamoto's classification นับตั้งแต่พบ HCV การเรียกชื่อสายพันธุ์ของ HCV ที่พบไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับผู้รายงานโดยยังไม่มีข้อตกลงให้เรียกเป็นมาตรฐานสากล ในปี 1994 Simmonds และคณะจึงได้สรุปและจำแนกสายพันธุ์ของ HCV ออกเป็น 6 genotypes ในปี 1995 Takita และคณะได้รายงาน novel HCV genotype ใหม่ HCV-7, HCV-8, HCV-9 ที่พบในประเทศเวียดนามและประเทศไทย (7,8) ในปี 1996 Doi และคณะได้รายงานพบ novel HCV subtype ของ HCV major type 6 ในผู้ป่วยตับอักเสบใน จ. เชียงใหม่ ประเทศไทย ภายหลังที่เปรียบเทียบถึง nucleotide sequence พบว่าเป็น HCV กลุ่มเดี่ยวของที่ Takita พบ (9) ดังนั้นการเรียกชื่อ genotype ใหม่ นอกเหนือ genotype 1-6 ควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น วิธีการวิเคราะห์ genotype ของ HCV นั้นมีหลายวิธี วิธีหนึ่งคือ การทำ RT-PCR ของส่วน genomic HCV RNA ภายหลังสกัด genomic RNA จากซีรัมแล้วนำ RNA ที่ได้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) และการใช้ cDNA เป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวน DNA โดยขบวนการ nested PCR จากนั้นนำ PCR product มาวิเคราะห์ nucleotide sequence โดยการทำ direct sequencing analysis หรือนิยม amplified เช่น NSS, core region, NS5b วิธีที่สองคือการใช้ specific primer ที่จำเพาะต่อบริเวณใดของ genomic HCV เช่น บริเวณ core region (10,11) บริเวณ NS5b และอาจวิเคราะห์ nucleotide sequence ร่วมด้วยเพื่อ

บริเวณ NS5b และอาจวิเคราะห์ nucleotide sequence ร่วมด้วยเพื่อแยก HCV subtype (12) วิธีที่สามคือภายหลังจาก amplified HCV genome ในส่วน core region แล้วนำ PCR product มาวิเคราะห์โดยใช้ hybridization line probe assay (13) ส่วนวิธีสุดท้ายคือการ amplified ส่วน 5-noncoding region และใช้ restriction enzyme มาย่อย PCR products ให้เป็นส่วนๆ ซึ่งเรียกว่า Restriction fragment length polymorphism (RFLP) (14,15)

อุบัติการณ์ความชุกของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่กระจายทั่วไปในโลกจะแปรไปตามภูมิภาคนั้น เช่น ในประเทศอเมริกามีความชุก ร้อยละ 0.4-0.6 ส่วนทางประเทศในทวีปยุโรปมีความชุกร้อยละ 0.2-0.8 ในกลุ่มประเทศทางอเมริกาใต้มีความชุกร้อยละ 0.5-1.7, ในประเทศญี่ปุ่นมีความชุกร้อยละ 1.1-1.5 ส่วนประเทศไทยมีความชุกร้อยละ 1.4-2.4 (16,17) และจากการศึกษาชนิดของ HCV genotype ที่พบในผู้ป่วยจากโลหิต, ผู้ติดยาเสพติดพบเป็นชนิด HCV 3a ส่วนใหญ่รองมาเป็น HCV 1b, HCV 1a (12) ส่วนในผู้ป่วยตับอักเสบชนิด cirrhosis และ HCC พบส่วนใหญ่เป็น HCV 3a (18,19) นอกจากนี้ยังพบ novel subtypes ของ HCV major type 6 ในผู้ป่วยตับอักเสบที่ จังหวัด เชียงใหม่ (9) โดยทั่วไปจะพบ HCV 1a มากที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (15) HCV 1b พบมากที่สุดที่ประเทศอิตาลี (20, 21), ญี่ปุ่น (22) HCV 3a นอกจากพบในประเทศไทยพบที่ Australia, อังกฤษ และ Brazil, HCV 4a พบส่วนใหญ่ในประเทศตะวันออกกลาง, อียิปต์, HCV 5a พบในประเทศแถบแอฟริกาใต้ และ HCV 6 พบในประเทศฮ่องกง (13) ความแตกต่างของ HCV genotype อาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของพยาธิสภาพของโรค เช่น HCV 1b จะไม่ตอบสนองต่อการรักษาผู้ป่วยด้วย alpha interferon (22,23) พบ HCV 1d ในผู้ป่วยตับแข็งในอินโดนีเซีย (24) นอกจากนี้ยังพบว่าอุบัติการณ์การตรวจพบ HCV ร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวี จะมีผลทำให้ผู้ป่วยโรคเอดส์มีอาการเพิ่มมากขึ้น (25)

เชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซีสามารถแพร่กระจายโดยทางเลือดแล้ว (26) ทางเพศสัมพันธ์ก็เป็นทางหนึ่งของการแพร่กระจายเชื้อ มีนักวิจัยหลายกลุ่มที่รายงานว่าพบการแพร่กระจายเชื้อโดยเพศสัมพันธ์ (27,28) จากการศึกษาการรณรงค์จากซีรัมของหญิงอาชีพพิเศษ พบ anti-HCV antibodies คิดเป็นร้อยละ 9.76 (Apichartpiyakul C, Personal communication) นับตั้งแต่มีการกระจายของเชื้อไวรัสเอดส์ไปกลุ่มรักร่วมเพศ, ผู้ติดยาเสพติด และระบาดไปยังหญิงอาชีพพิเศษบริการทางเพศแล้ว การกระจายของเชื้อในไวรัสตับอักเสบชนิดซีในหญิงกลุ่มนี้ได้มีรายงานความชุกของการติดเชื้อสูงกว่าคนปกติ (29,30) นอกจากนี้ นพ. สุรพล สุวรรณกุล พบมีการติดเชื้อ HCV เพิ่มขึ้นในคนไทยที่ติดเชื้อเอชไอวี

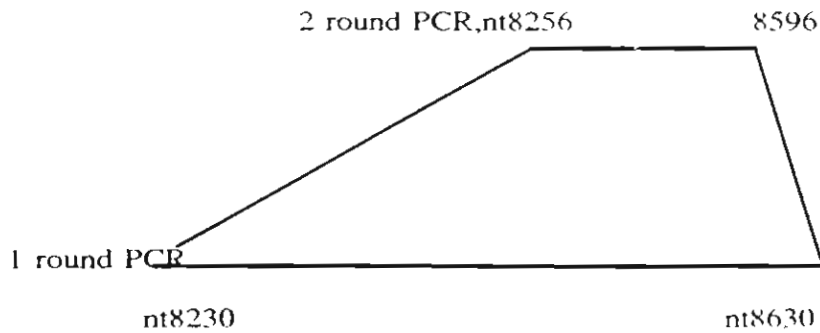
การศึกษารังนี้จะเป็นการทราบถึงความชุกและชนิดของ HCV genotype ที่พบในหญิงบริการทางเพศและผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี โดยจะเน้นการศึกษาในหญิงอาชีพบริการทางเพศและผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ติดยาเสพติดซึ่งส่วนใหญ่มีการแพร่กระจายของโรคทางเพศสัมพันธ์ เพื่อจะเกิดความรู้พื้นฐานการกระจายของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี, การเตรียมชนิดของวัคซีนที่จะใช้ในอนาคต

วิธีการทดลอง

1. เจาะเลือดในผู้หญิงอาชีพพิเศษบริการทางเพศที่มาตรวจที่ศูนย์กามโรค จ. เชียงใหม่ จำนวน 114 ราย จ. ลำพูน จำนวน 102 ราย จ. เชียงราย จำนวน 117 ราย นำซีรัมมาตรวจหา anti-HCV antibody โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (Abbott Diagnostic ELISA kit, 2 nd Generation, Wiesbaden-Delkenheim, Germany) เพื่อให้ได้ตัวอย่างซีรัมที่พบ anti-HCV antibody

2. เจาะเลือดในผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 201 ราย ที่ทราบว่ามีการติดเชื้อเอชไอวีทางเพศสัมพันธ์ เพื่อตรวจหา anti-HCV antibody โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูปตามข้อ 1. จากกลุ่มตัวอย่างนี้เราไม่ทราบ ถึงความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ดังนั้นจะใช้ตัวอย่างที่ให้ผลบวกคือ anti-HCV antibody ในการศึกษาขั้นต่อไป

3 นำซีรัมที่ให้ผลบวกคือ anti-HCV antibody นำมาศึกษาโดยการ amplified ในส่วน NS5b region ของ HCV genome โดยจะ extract ซีรัมให้ได้ HCV RNA โดย acid-guanidinium isothiocyanate-phenol-chloroform method หลังจากนั้น HCV RNA จะถูก transcribe โดยใช้ reverse transcriptase enzyme, RNase inhibitor พร้อมทั้ง primer 167R (5'-GGCGGAATTCC TG GTCATAGCCTCCGTGAA-3', nt 8601-8630, antisense) ภายหลังได้ resultant cDNA จึงนำมา amplified จำนวนของ DNA ให้เพิ่มขึ้นโดยรอบแรกจะใช้ universal primer เช่น primer 166 (5'-TGGGGATCCCGTATGATACCCGCTGCTTTGA-3', nt 8230-8260 sense) และ primer 167R โดยใช้ ampli Taq DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 94°C- 1 นาที, 40°C-1.5 นาที และ 72°C- 2 นาที ต่อ 1 รอบ โดยจะทำการ amplified 35 รอบ ต่อจากนั้น นำ 5 microliter ของ PCR products รอบแรกนำมา amplified โดยใช้ primer set หลายคู่ เช่น (I) HC 23, HC24 และ HC26 (HC23; 5' TTTGACTCAACCGTCACTGA-3'; nt 8256-8275 antisense; HC24: 5' CTCAGGCT CGCCGCATCCTC-3'; nt 8577-8596, antisense; HC26 : 5'-CTCAGGTTCCGCTCGFTCC CTC-3' ; nt 8577-8596 antisense (II) HC15+HC16 (HC15 : 5'-ACTGTCACTGAACAGGAC AT-3' ; nt 8265-8284, sense; HC16: 5'-GCTCTATCCTCATCGACGCC-3', nt 8568-8587, antisense. (III) HC23 และ HC28 (HC28: 5'-CACGAGCATGGTGAGTCCCGGAGC-3', nt 8507-8531, antisense (IV) HC23 และ HC32 (HC32: 5'-AGGTAGCACGTCAGCGTGTTTCC-3' ; nt 8454-8476, antisense) และ (V) HC23 และ HC34 (HC34: 5'-TAGCACGTCATGGTGTTT CCCAT-3'; nt 8451-8473, antisense) โดยจะใช้อุณหภูมิ 94°C- 1 นาที, 40°C- 1.5 นาที และ 72°C- 2 นาที ต่อ 1 รอบ โดยจะ amplify 35 รอบ



1st_PCR

#166+#167R

2nd_PCR

HC23 +HC24+,HC26 ; HC23 +HC28

HC23 +HC32 ; HC23 +HC34

5. หลังจากนั้นนำ PCR product จากการ amplified ส่วน core region และ NS5b ของ HCV genome นำมาแยกโดยกระแสไฟฟ้าใน 2% agarose gel ที่มี ethidium bromide แล้วนำไปส่องดูโดยแสง UV-illuminator นำ PCR product มา purified โดยใช้ QIAquick PCR purification kit แล้วนำ DNA นั้นไปทำ direct sequence หรือนำ purified DNA ไป clone โดยจะสอดใส่ลงใน PCR II Vector (Invitrogen, USA) ซึ่งเป็น vector ที่มี hanging T อยู่ ทำให้สามารถ insert PCR product ลงใน vector และใช้ T4 ligase enzyme ภายหลัง vector ที่ถูก insert ด้วย PCR product จะถูกคัดเลือกให้เกิด colony สีขาวใน media ที่มี IPIG นำ clone ที่ได้ไปทำ miniprep เพื่อเลือก clone ที่มี PCR product แทรกอยู่ ตรวจสอบลำดับเบสโดยการทำ direct sequencing โดยใช้ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction FS(Perkin Elmer Ltd.) ทำการวิเคราะห์ nucleotide sequence โดยเทียบกับ nucleotide sequence ที่ทราบในแค่ HCV subtype ใน HCV genome data banks ซึ่งจะใช้ programe DNASIS

จังหวัดเชียงรายจำนวน 3 ราย ที่ตรวจพบ anti- HCV antibody ไม่สามารถ amplify โดยใช้ชุด primer ในส่วน NS5 และ 5'-UTR (ตารางที่ 3)

ซีรัมที่ให้ผลลบจากการเพิ่มขยาย HCV genome โดยวิธี RT-PCR นั้น ภายหลังนำมาตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะโดยใช้ชุดน้ำยา INNO-LIA HCV Ab III ในตัวอย่างซีรัมของหญิงบริการอาชีพพิเศษจังหวัดเชียงราย รหัส ชร 66 พบแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อส่วน NS 3, NS 5 และแปลผลว่าผลบวก และในตัวอย่างซีรัม ชร 70 ตรวจพบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อส่วนโปรตีนของ NS 3 ซึ่งแปลผลบวก ส่วนตัวอย่างซีรัม ชร 84 ให้ผลการตรวจแอนติบอดีต่อโปรตีนของส่วน core, NS 3 และ NS 4 ไม่ชัดเจนและแปลผลเป็น indeterminate ส่วนซีรัมรหัส ลพ 89 ให้ผลบวกชัดเจนโดยใช้ชุดน้ำยา INNO-LIA HCV Ab III ในซีรัมของหญิงบริการอาชีพพิเศษจากจังหวัดเชียงใหม่ 3 รายนั้น รหัส ss1/62, ss1/104 ให้ผล indeterminate ส่วน ss1/109 ให้ผลบวกเมื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของ HCV ส่วนซีรัมของผู้ติดเชื้อเอชไอวี รหัส HIV 21, HIV 53 ที่ไม่สามารถวิเคราะห์สายพันธุ์ของ HCV ได้ ให้ผลบวกเมื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนของ HCV

Table 1. เชื้อชาติของหญิงบริการอาชีพพิเศษ

	ไทย	พม่า	ไทยใหญ่	ลื้อ อีโก้-มุเซอร์	จีนฮ่อ
เชียงใหม่	33.33	0	50.43	14.53	1.71
เชียงราย	7.02	27.19	52.63	12.28	0.88
ลำพูน	83.33	3.13	1.04	10.42	2.08

Table 2. อายุเฉลี่ยและช่วงเวลาการทำงานของหญิงบริการอาชีพพิเศษ

	อายุ (ปี)	ช่วงเวลาการทำงานในอาชีพนี้ (เดือน)
เชียงใหม่	23.32 $\pm$ 5.18	8.15 $\pm$ 11.30
เชียงราย	20.80 $\pm$ 4.50	7.89 $\pm$ 9.96
ลำพูน	27.48 $\pm$ 6.89	27.37 $\pm$ 27.21

Table 3. ผลการ amplified ในส่วน และ 5'-UTR ของ HCV ในผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดซี

Code	Nested PCR with HC 23+24+26	Nested PCR with HC 15+16	Nested PCR HC 23+34	Nested PCR 5'-UTR	HCV genotype
ขร66	negative	negative	negative	negative	negative
ขร70	negative	negative	negative	negative	negative
ขร84	negative	negative	negative	negative	negative
ลพ2	positive	ND	ND	ND	1a
ลพ17	positive	ND	ND	ND	3a
ลพ58	positive	ND	ND	ND	1a
ลพ89	negative	negative	ND	negative	negative
ss1/1	positive	ND	ND	ND	3a
ss1/18	positive	ND	ND	ND	1a
ss1/22	positive	ND	ND	ND	1b
ss1/63	2 bands	negative	2 bands	weakly positive	type 1
ss1/84	positive	ND	positive	ND	1a
ss1/104	negative	negative	ND	negative	negative
ss1/109	negative	negative	negative	Strange bands	negative
HIV3	positive	positive	ND	ND	3a
HIV11	positive	positive	ND	ND	3b
HIV16	positive	negative	ND	ND	1a
HIV21	negative	negative	ND	negative	negative
HIV40	negative	negative	negative	positive	type 3
HIV53	negative	negative	negative	negative	negative
HIV117	positive	positive	ND	ND	3a
HIV127	negative	positive	ND	positive	3a
HIV131	positive	ND	ND	ND	1b
HIV159	positive	ND	ND	ND	1a
HIV171	positive	negative	ND	ND	1b
HIV184	strange band	negative	negative	weakly positive	type 1

Table 4. Prevalence of anti-HCV antibodies in commercial sex worker by age

Age (years)	No. of Test	Number of positive Anti-HCV antibodies	Positive%
≤ 20	127	3	2.36
21 – 30	159	7	4.40
≥ 31	47	4	8.51
Total	333	14	4.20

Table 4. Prevalence of anti-HCV antibodies in commercial sex worker by working time

Working Time(month)	No. of Test	Number of positive Anti-HCV antibodies	Positive %
0.03 - 6	166	4	2.41
6.01 - 12	86	3	3.49
12.01- 18	2	0	0
18.01- 24	32	4	12.5
> 24	47	3	6.38

Table 6.ผลการตรวจ INNO-LIA HCV Ab III ในตัวอย่างที่ให้ผลลบของ RT-PCR
 ต่อส่วน 5'-UTR และ NS5 ของ HCV genome

code	cov	INNO-LIA HCV AbIII						
		C1	C2	E2/NS1	NS3	NS4	NS5	result
ชร66	21.4	faintband	faintband	neg	+/-	neg	1+	reactive
ชร70	160.2	neg	neg	neg	2-3+	neg	neg	reactive
ชร84	177.9	<1+	neg	neg	+/-	+/-	neg	indeterminate
ลพ89	121.5	1+	+/-	1+	+/-	3+	neg	reactive
ss1/63	43.8	neg	neg	neg	+/-	+/-	neg	indeterminate
ss1/104	434.2	neg	neg	neg	neg	+/-	neg	indeterminate
ss1/109	24.2	faintband	neg	neg	2+	faintband	neg	reactive
HIV21	535.9	<1+	+/-	neg	1+	faintband	faintband	reactive
HIV53	276.5	2+	1+	+/-	1+	faintband	neg	reactive
HIV127	501.1	3+	2+	2+	3+	3+	2+	reactive
HIV184	107.5	3+	2+	neg	neg	faintband	+/-	reactive

บทวิเคราะห์

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีในซีรัมเป็นการแสดงผลทางอ้อมที่บ่งว่าบุคคลนั้นมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซี ความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีในหญิงบริการอาชีพพิเศษทั้งสามจังหวัดมีอัตราความชุกแตกต่างกัน โดยจะพบความชุกของไวรัสตับอักเสบนิดซีในจังหวัดเชียงใหม่ร้อยละ 5.98 ในจังหวัดลำพูนมีความชุกรองมาคิดเป็นร้อยละ 3.92 และในจังหวัดเชียงใหม่มีความชุกร้อยละ 2.63 ซึ่งพบสูงกว่าในหญิงที่มาบริจาคโลหิตที่โรงพยาบาลพระปิ่นเกล้าที่พบอัตราการติดเชื้อไวรัสนี้เพียงร้อยละ 0.99(31) และในหญิงที่มาบริจาคโลหิตที่ภาคเหนือ (32) นอกจากนี้ยังพบสูงกว่าหญิงตั้งครรภ์ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลแม่และเด็กจังหวัดเชียงใหม่ (ชัชวาลย์และคณะ, manuscript preparation) อัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีในหญิงบริการอาชีพพิเศษทั้งสามจังหวัดมีความแตกต่างกัน โดยพบความชุกสูงในจังหวัดเชียงใหม่มากกว่าในจังหวัดลำพูนและจังหวัดเชียงราย ความชุกของการติดเชื้อเกี่ยวข้องกับช่วงเวลาของการทำงานในอาชีพนี้หรืออายุของหญิงบริการอาชีพนี้ แต่พบว่าแนวโน้มในหญิงบริการอาชีพพิเศษที่มีอายุมากจะมีอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีสูงกว่าหญิงบริการอาชีพพิเศษที่มีอายุน้อยกว่า (ตารางที่ 4) และในหญิงบริการอาชีพพิเศษที่ทำอาชีพนี้มานานจะมีแนวโน้มการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีสูงขึ้น หญิงบริการอาชีพในจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดเชียงรายส่วนใหญ่เป็นชาวไทยใหญ่ แสดงถึงมีการอพยพของหญิงจากเขตพม่ามาทำอาชีพนี้ในสองจังหวัดมากกว่าคนไทยพื้นราบ ส่วนจังหวัดลำพูนส่วนใหญ่เป็นชาวไทยพื้นราบ และอายุของการทำงานในอาชีพนี้มากกว่าจังหวัดอื่น การศึกษานี้พบความชุกของการติดเชื้อสูงเช่นเดียวกับการศึกษาของพิพัฒน์และคณะที่ศึกษาในหญิงบริการอาชีพพิเศษในจังหวัดราษีไศลที่พบความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีร้อยละ 9.5 (33) และการศึกษานำร่องในหญิงบริการอาชีพพิเศษที่มาตรวจคลินิกกามโรคของจังหวัดเชียงใหม่ก็พบการติดเชื้อร้อยละ 9.76 ส่วนการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีในผู้ติดเชื้อไวรัสเอดส์ พบความชุกของการติดเชื้อร้อยละ 5.97 ซึ่งสูงกว่าบุคคลที่มาบริจาคโลหิต ในการศึกษาพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอดส์ที่มีอาการจำนวน 5 คนที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีร่วมด้วยและพบ 2 คนในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเอดส์ที่ไม่แสดงอาการ การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของสุรพลและคณะที่พบความชุกในผู้ติดเชื้อไวรัสเอดส์ที่ไม่มีอาการร้อยละ 9 และในผู้ติดเชื้อไวรัสเอดส์ที่มีอาการ (32) และผลสอดคล้องกับการศึกษาในต่างประเทศที่แสดงว่าการพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิดซีในผู้ป่วยเอดส์ที่มีอาการสูงกว่าคนที่ไม่มีอาการ (34)

รับผู้ป่วยที่ติดเชื้อทั้งไวรัสเอดส์และไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 12 ราย สามารถวิเคราะห์สายพันธุ์ได้เพียง 8 รายคิดเป็นร้อยละ 83 ในซีรัมสองรายที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้อาจปราศจากเชื้อไวรัสหรือเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ primer ที่ใช้อยู่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

ส่วนในหญิงบริการอาชีพพิเศษในจังหวัดเชียงใหม่ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 นั้น สามารถวิเคราะห์ได้เพียง 5 รายโดยพบว่าการกระจายของชนิดสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 ส่วนใหญ่ร้อยละ 55 เป็นชนิด HCV genotype 1 ร้อยละ 18 เป็น HCV genotype 3 รูปแบบของการกระจายของสายพันธุ์เป็นเช่นเดียวกับในซีรัมของหญิงบริการอาชีพพิเศษจังหวัดลำพูนที่พบสองในสามรายเป็น HCV-1a และที่เหลือเป็น HCV-3a รูปแบบการกระจายของสายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 ที่ต่างจากผู้บริจาคโลหิตและผู้ป่วยติดเชื้อเอดส์ที่ติดเชื้อนี้ อาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ genotype 1 มีความสามารถในการแพร่เชื้อโดยทางเพศสัมพันธ์สูงกว่า HCV genotype อื่น แต่ไม่สามารถวิเคราะห์สายพันธุ์เชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 ในหญิงบริการอาชีพพิเศษที่จังหวัดเชียงใหม่ได้ แม้ว่าจะมีระดับแอนติบอดีของเชื้อไวรัสเอดส์สูงและสองในสามรายให้ผลบวกถ้าทดสอบด้วย INNo-Lia จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 ในผู้ติดเชื้อไวรัสเอดส์สูงกว่าผู้บริจาคโลหิต โดยพบอัตราสูงในผู้ติดเชื้อไวรัสเอดส์ที่มีอาการมากกว่าผู้ที่ไม่มีอาการ รูปแบบการกระจายของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่คล้ายกับในผู้บริจาคเลือดและผู้ติดยาเสพติด ส่วนความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 ในหญิงบริการอาชีพพิเศษนั้น พบความชุกของการติดเชื้อไวรัสที่สูงในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน เชียงรายมากกว่านบิงตังครรภ์และนบิงที่มารับบริจาคเลือด ดังนั้นคงควมคุ้มครองโรคติดต่อควรมีการเฝ้าระวังการติดเชื้อของไวรัสทั้งสองชนิดนี้ เพราะการติดเชื้อของไวรัสทั้งสองจะทำให้การดำเนินของโรคไว้นั้นหนักกว่าเดิม นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 ในหญิงบริการอาชีพพิเศษที่จังหวัดเชียงใหม่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ว่ามีสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบนชนิดที่ 1 เกิดขึ้นใหม่ในบริเวณนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
2. Estaban JI, Estaban R, Viladomiu L, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989;2:294-7.
3. Colombo M, Kuo G, Choo QL, Donato MF, Ninno ED, Tommasini MD, Dioguardi N, Houghton M. Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989;ii:1006-8.
4. Choo QL, Richman KH, Han JH, et al Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
5. Simmond P, Holmes C, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall F, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtype by phylogenetic analysis of NS-5 region. *J Gen Virol* 1993;74: 2391-9.
6. Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, Kurai K, Akahane Y, Sugai Y, Tanaka T, Sato K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primer : application to clinical surveys and tracing infectious source. *J Gen Virol* 1992; 73:673-9.
7. Takita H, Okamoto H, Tsuda F, Song P, Nakita S, Chosa T, Iisuka H, Mishiho S, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis C virus variants from Vietnam are classifiable into seventh, eighth, and ninth major genetic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11022-6.
8. Takita H, Okamoto H, Luengrojanakul P, Vareesangthip K, Chainuvati T, Iizuka H, Tsuda F, Miyakawa Y, Miyumi M. Hepatitis C virus variants from Thailand classifiable into five novel genotypes in the sixth(6b), seventh(7c,7d) and ninth(9b,9c) major genetic groups. *J gen Virol* 1995; 76: 2329-35.
9. Doi H, Apichartpiyakul C, Ohba KI, Mizokami M, Hotta H. Hepatitis C Virus(HCV) subtype prevalence in Chiang Mai, Thailand, and identification of novel subtypes of HCV major type 6. *J of Clin Microbiol* 1996; 34 569-74.
10. Kohara T, Kohara K, Yamaguchi K, et al. A second group of hepatitis C virus .

Virus genes 1991; 5: 243-54.

11. Hotta H, Doi H, Hayashi T, Purwanta M, Soemato W, Mizokami M, Ohba K, Homma M. Analysis of the core and E1 envelope region sequences of a novel variants of hepatitis C virus obtained in Indonesia. *Arch Virol* 1994; 136: 53-62.
12. Apichartpiyakul C, Chittivudikarn J, Miyajima H, Homma M, Hotta H. Analysis of Hepatitis C virus isolate among healthy donors and drug addicts in Chiang Mai, Thailand. *J of Clin Microbiol* 1994;32(9): 205-9.
13. Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, Duhamel M, Vanderborght B, Heuverswyn HV, Maerteus G. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74: 1093-102.
14. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4942-6.
15. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SE, Lin CK, Dusheiko G, Suad AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' noncoding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restriction on sequence diversity. *J gen Virol* 1993; 74: 661-8.
16. Boonmar S, Ponjanagaroen B, Watanabe Y, Tanaka Y, Saito I, Miyamura T. Prevalence of hepatitis C Virus antibody among healthy blood donors and non-A, non-B hepatitis patients in Thailand. *Jpn J Med Sci Biol* 1990; 43:29-36.
17. Apichartpiyakul C, Hotta H, Munde Y, Homma M. Seroprevalence of hepatitis C virus infection in blood donor in Chiang Mai.: determination by using the HCV-J nucleocapsid/envelope (c980). Abstracts, Mahidols' Day Symposium, 1992.
18. Apichartpiyakul C, Miyajima H, Doi H, Mizokami M, Homma M, Hotta H. Frequent detection of hepatitis C virus subtype 3a (HCV-3a) isolates in Thailand by PCR using subtype-specific primer. *Microbiol Immunol*, 1995; 39(4): 285-9.
19. Mori S, Kato N, Yagyu A, Tanaka T, Ikeda Y, Petchlai B, Chiewsilp P, Kurimura T, Shimotohno K. New type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;183:334-42.
20. Estaban JI, Estaban R, Viladomiu, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 5: 294-7
21. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T.

- Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9524-8.
22. Pozzatto G, Moretti M, Franzin F, Croce LS, Tiribelli C, Masayu T, Kancko S, Unour M, Kobayaski K. Severity of liver disease with different hepatitis C viral clones. *Lancet* 1991;338:509.
 23. Kanai K, Kako M, Okamoto H. HCV genotypes in chronic hepatitis C and response to interferon. *Lancet* 1992;339:1543.
 24. Hotta H, Doi H, Hayash T, Purwanta M, Soemarto W, Mizokami M, Ohba K, Homma M. Analysis of the core and E1 envelope region sequences of a novel variant of hepatitis C virus obtained in Indonesia. *Arch Virol* 1994;136:53-62.
 25. Giovannini M, Tagger A, Ribero ML, et al. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus and HIV infection : a possible interaction. *Lancet* 1990;335 :1166.
 26. Van der Poel CL, Reesink HW, Schaasberg W, Leentvaar-Kuypers A, Bakker F, Excl-Oehlers PJ, Lelie PN. Infectivity of blood seropositive for hepatitis C virus antibodies. *Lancet* 1990;335:558-60.
 27. Tedder RS, Gilson RJC, Briggs M, Loveday C, Cameron CH, Garson JA, Kelly GE, Weller IVD. Hepatitis C virus evidence for sexual transmission. *Br. Med J* 1991;302:1299-302.
 28. Melbye M. Briggarr RJ, Wantzin P. Kragsgaard K, Ebbesen P, Becker NG. Sexual transmission of hepatitis C virus : Cohort study (1981-9) among European homosexual men. *Br Med J* 1990;301:210-12.
 29. Le Bozec P, Janier M, Schenmetzier C, et al. Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases in Paris, trece France: Reported on 470 patients. *Sexually transmitted diseases* 1994;21(5): 292-3.
 30. Wu JS, Lin HC, Jeng FS, Ma GY, Lee SD, Shang WY. Prevalence, infectivity, and risk factor analysis of hepatitis C virus infection in prostitutes. *J Med Virol* 1993: 39 (4): 312-7.
 31. Buncha C, Incidence the hepatitis C virus detected in blood donors at Somdej Prapinklao hospital. *J Med Navy* 1997; 34(1): 29-34.

32. SuwanagoolS Ticangrim S, Ratanasuwan W, et al. Seroprevalence of ant-HCV antibody among HIV-infected persons and general population. J Med Asso Thai 1995; 78(11): 611- 5.
33. Luksamijarukul P, Deangbubpha A. Hepatitis C antibodies prevalence and risk factors of some female sex workers in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1997; 28(3): 507-11.
34. Ockenya J, Tillman HL, Trautwein C, Stoll M, Manns MP, Schmidt RE. Hepatitis B and C in HIV-infected patients, prevalence and prognostic value. J Hepatol 1997; 27(1): 18- 24.