

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคตับอักเสบและการเกิดโรค

โรคตับอักเสบ หมายถึง การอักเสบที่เกิดขึ้นที่เซลล์ตับ (hepatocyte) โดยที่เกิดจากการถูกทำลายจากสาเหตุต่าง ๆ โดยที่เซลล์ตับไม่สามารถรักษาสภาพให้หายเองได้ และทำให้อาการของโรคดำเนินไปทำให้เกิดผลพยาธิสภาพที่ตับ ทำให้อัตราการทำงานของตับล้มเหลวจนกระทั่งก่อให้เกิดภาวะตับวายได้ (hepatic failure) โรคตับอักเสบแบ่งเป็น 2 ประเภท ตามระยะเวลาการติดเชื้อและการดำเนินไปของโรค โรคตับอักเสบชนิดเฉียบพลันจะเป็นการอักเสบที่สามารถรักษาหายได้ประมาณ 6 เดือน แต่หากการอักเสบยังคงดำเนินไปร่างกายไม่สามารถรักษาสภาพเซลล์ตับให้เป็นปกติได้ภายใน 6 เดือนจะเป็นการอักเสบแบบเรื้อรัง โรคตับอักเสบส่วนใหญ่สาเหตุหลักที่สำคัญ คือ การติดเชื้อไวรัส นอกจากนั้นโรคตับอักเสบยังสามารถเกิดจากสารพิษและสารแปลกปลอมต่าง ๆ ติดเชื้ออื่น ๆ หรือจากกระบวนการ autoimmune, Alloimmune (ตาราง 1)

ตาราง 1 สาเหตุการเกิดตับอักเสบ

การติดเชื้อ	โรคกลุ่มออโตอิมมูน	โรคที่เกิดจากสารแปลกปลอมต่าง ๆ (Xenobiotic diseases)	โรคกลุ่มอัลโลอิมมูน
-Hepatitis virus (A-H)	-Hepatitis type 1	-Primary sclerosing	-Chronic graft-
-Systemic virus	("lupoid" ANA, SMA)	cholangitis	versus
Infection	-Hepatitis type 2		host diseases
- Bacterial infection	(Anti-LKM1)		- Liver allograft
- Parasite infection	- Hepatitis type 3		rejection

ที่มา: Neil Kaplowitz, 1997

การติดเชื้อไวรัสก่อให้เกิดการอักเสบ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ ไวรัสที่มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อที่ตับซึ่งเรียกรวมว่า Hepatitis viruses การติดเชื้อในกลุ่มนี้พบได้บ่อยและเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย ส่วนไวรัสอีกกลุ่มหนึ่งทำให้เกิดพยาธิสภาพของระบบต่าง ๆ และมีการติดเชื้อที่ตับร่วมด้วยเช่น ไวรัสทำให้เกิดโรคเริม (herpes simplex virus) เป็นต้น การติดเชื้อ Hepatitis viruses ที่สำคัญและมีความชุกที่สูงสุดในประเทศไทย คือ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ ชนิดบี (Hepatitis B virus, HBV) การติดเชื้อเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดตับอักเสบแบบเรื้อรัง ตับแข็งและมะเร็งตับ กลไกการเกิดโรคการอักเสบของตับที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากเชื้อไวรัสทำลายตับโดยตรง แต่เป็นผลทางอ้อมจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อเชื้อไวรัส (Host immune response) ต่อเซลล์ตับที่ติดเชื้อ (immune-mediated liver injury) เนื่องจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อการติดเชื้อมีหลายแบบ ทำให้ผู้ที่ติดเชื้อมีการตอบสนองไม่เหมือนกันในแต่ละคน ทำให้มีการดำเนินของโรคที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ที่ติดเชื้อ โดยมีการศึกษาพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมของระบบ MHC หรือ human leukocyte antigen (HLA) โดยเฉพาะ HLA class II อาจมีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและการดำเนินของโรคในผู้ติดเชื้อแต่ละคนมีความแตกต่างกัน (Frodsham, AJ., 2005) และปัจจัยเนื่องจากการติดเชื้อในช่วงอายุที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อกลุ่มวัยรุ่นหรือผู้ใหญ่ที่มีการติดเชื้อโดยติดต่อทางเพศสัมพันธ์หรือติดต่อทางเลือด (horizontal transmission) ที่มีระบบการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกายที่สมบูรณ์และเหมาะสมแล้วส่วนใหญ่จะรักษาหายขาด โดยมีโอกาสเป็นตับอักเสบแบบเรื้อรังน้อยกว่าร้อยละ 2 ในขณะที่เด็กที่ติดเชื้อในช่วงอายุ 1 ปีแรกมีโอกาสเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรังมากถึงร้อยละ 90 ส่วนเด็กอายุ 1-5 ปี มีโอกาสติดเชื้อเรื้อรังร้อยละ 30 (Lai, CL., 2007) ดังนั้นการพยากรณ์โรคจากการตอบสนองของการติดเชื้อเพื่อการดำเนินโรคเป็นสิ่งสำคัญในผู้ติดเชื้อเรื้อรัง

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ได้แก่ การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Jung, MC., 2002, pp. 43-50; Vierling, JM., 2007) โดยระบบจะทำงานร่วมกัน โดยในการติดเชื้อครั้งแรก (Primary infection) ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจะมีการตอบสนองในระยะแรก และมีส่วนสำคัญที่จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะให้มีการตอบสนองต่อการติดเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพต่อไป โดยระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอาจต้องใช้เวลาเป็นสัปดาห์ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อแต่ระบบนี้มีประสิทธิภาพในการควบคุมและขจัดไวรัสได้ดีกว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

1. ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเป็นการตอบสนองด้วยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวต่าง ๆ โดยจะมีการกระตุ้นผ่านตัวรับของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่เรียกว่า pattern recognition receptors (PRR) เช่น Toll-like receptors (TLR) เมื่อมีการติดเชื้อโดยไวรัส จะมีคุณสมบัติในการจับกับ PRR ที่มีรูปแบบซ้ำ ๆ ที่จำเพาะ (Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) เมื่อมีการจับที่จำเพาะเกิดขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำสัญญาณต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น interferon regulatory factor (IRF)-1, nuclear factor (NF) และ IRF-7 ซึ่งจะไปกระตุ้น type I interferon (IFN) และกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ต่าง ๆ ทำให้เกิดการอักเสบขึ้นที่เซลล์ (Schwabe, RF., 2006) มีการศึกษาในหนูทดลองที่มีการดัดแปลงสารพันธุกรรมพบว่าเมื่อมีการกระตุ้นการแสดงออกของ TLR จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยยับยั้งการสร้าง mRNA ผ่านการทำงานของ IFN (Isogawa, M., 2005) นอกจากนี้ IFN ยังมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ Kupffer cells (KC) และ dendritic cells (DC) ในเซลล์ตับ ซึ่งเป็นตัวทำหน้าที่เป็น antigen presenting cell (APC) ที่จะเชื่อมโยงกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ นอกจากนี้ KC และ DC จะหลั่งสาร interleukin (IL)-8 และ chemokine (c-c motif) ligand 3 (CCL3) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ natural killer (NK) cells และ natural killer T (NKT) cells นอกจากนี้ IFN ยังควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยกระตุ้นการทำงานของ NK cells และ NKT cells ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเฉียบพลัน ในการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมพบว่าในระหว่างการติดเชื้อไวรัสจะมีเซลล์ NK cells และ NKT cells เพิ่มมากขึ้น 10-12 เท่าในเซลล์ตับ โดย NK cells ซึ่งเป็น cytotoxic lymphocytes สามารถทำลายเซลล์ตับที่ติดเชื้อไวรัสได้โดยตรงไม่ผ่านทางโมเลกุลของ Major Histocompatibility Complex (MHC) class I และสามารถหลั่งสารไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบเช่น IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α และ granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Chang KM, 2010) ส่วน NKT cells สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่มีการรับรู้แอนติเจนที่นำเสนอโดย non-polymorphic MHC-like molecules (CD1d) โดยอาศัยกลไกการทำงานของ perforin และ Fas/Fas-ligand (Chang, KM., 2010; Kakimi, K., 2000) โดยพบว่าการกลไกการทำงานของ NK cells และ NKT cells ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเกิดขึ้นก่อนที่จะมีการกระตุ้นการทำงานของ CD4+ หรือ CD8+ T lymphocytes ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ดังนั้นการตอบสนองในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจึงเป็นการตอบสนองในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อก่อนที่จะมีการอักเสบของตับเกิดขึ้นตามมา (Iannacone, M., 2007; Ratnam, D., 2008)

2. ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านทางสารน้ำกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์

2.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านทางสารน้ำ อาศัยการทำงานของ T helper lymphocytes (Th) (CD4+T cell) ซึ่งโมเลกุลของ CD4 บนผิวเซลล์รับรู้แอนติเจนไวรัสผ่านทางโมเลกุลของ MHC II ที่ทำหน้าที่เป็น APC ที่นำเสนอบน DC โดยที่ CD4+ T cells สามารถรับรู้ไวรัสได้ทุกชนิดโดยเฉพาะ C50-69 เป็นเปปไทด์ในส่วนของ HBcAg และ HBeAg โดย CD4+ T cells แบ่งเป็น T helper 1 (Th1) และ T helper 2 (Th2) cells โดยที่ Th1 จะหลั่งสาร TNF- α , IFN- γ และ IL-2 ซึ่งมีบทบาทในการเหนี่ยวนำและรักษาการตอบสนองของ CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CD8+cells,CTL) และ Th2 cells จะหลั่งสาร IL-4 และ IL-10 มีบทบาทช่วย B lymphocytes ในการสร้างแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ โดยทั่วไปการเพิ่มจำนวนของ CD4+ T cells จะพบมากในตับพร้อมกับการเพิ่มระดับ HBV DNA ของการติดเชื้อแบบเฉียบพลันและการเพิ่มขึ้นของ CD4+ cells จะเกิดขึ้นก่อนที่จะมีการอักเสบของตับและคงอยู่ต่อไปเป็นระยะเวลานานหลังจากหายจากการติดเชื้อแล้ว

2.2 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ เกิดการตอบสนองของ CD8+ Tcells ผ่านทางโมเลกุลของ MHC class I CD8 บนผิวเซลล์สามารถรับรู้ไวรัสได้ทุกชนิดโดยเฉพาะเปปไทด์ส่วน c18-27 ของ hepatitis core แอนติเจน (HBcAg) (Visvanathan, K., 2006) มีการศึกษาการติดเชื้อแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลองพบว่า CD8+ T cells เป็นเซลล์ที่สำคัญที่สุดในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในการขจัดเชื้อไวรัสและการเกิดพยาธิสภาพของตับอักเสบ พบว่าเมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ CD8+ T cells จะทำให้ระยะการติดเชื้อยาวนานกว่าปกติ และอัตราการขจัดเชื้อไวรัสลดลงทำให้เกิดการอักเสบที่ตับช้ากว่าปกติแต่เมื่อมีการให้ CD8+ T cells ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบบี พบมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการขจัดเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้นและระยะเวลาการติดเชื้อจนกลับสู่สภาพปกติ แต่ในทางตรงกันข้ามหากมีการยับยั้งการทำงานของ CD4+ T cells จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ (Thimme, R., 2003)

ตาราง 2 การเปรียบเทียบการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัส
แบบไม่จำเพาะ และแบบจำเพาะ

	การตอบสนองแบบไม่จำเพาะ	การตอบสนองแบบจำเพาะ
คุณสมบัติ		
ระยะเวลา	เกิดขึ้นก่อนและรวดเร็ว	เกิดขึ้นภายหลัง
ความจำเพาะ	Pathogen-associated molecular pattern (PAMP)	Peptide antigens
Genetics	Restricted	Complex
Diversity	จำกัด	มีความหลากหลาย
การจดจำการติดเชื้อ	ไม่มี	Long-lived T-and B-cell responses
Self-tolerance	มี	มี
ส่วนประกอบ		
เซลล์	DC, Kupffer cells, Neutrophils, NK cells, NKT cells	DC, T-cells, B-cells
โปรตีน	Cytokines, chemokines	Cytokines, chemokines,

ที่มา: Vierling, JM., 2007

โดยสรุปพยาธิกำเนิดของตับอักเสบที่เกิดจากการตอบสนองของการติดเชื้อไวรัสเป็น ขบวนการที่ซับซ้อนและมีความต่อเนื่องกันโดยพบว่าการตอบสนองของ CD8+ T cells เป็นสาเหตุ หลักของการทำลายเซลล์ โดยมีเซลล์ที่มีการตอบสนองแบบไม่จำเพาะอื่น ๆ เป็นสาเหตุเสริมทำให้ ภาวะอักเสบมีความรุนแรงขึ้น การกำเริบของภาวะตับอักเสบซึ่งเกิดได้ในระหว่างการดำเนินโรค ตามธรรมชาติ หรือในระหว่างการรักษาด้วยยาต้านไวรัส มักพบในระยะที่มี HBeAg seroconversion ซึ่งส่วนใหญ่มักมีอาการแสดงแตกต่างกันบางรายอาจมีการอักเสบมากจนเกิด ภาวะตับวายได้ การกำเริบของตับอักเสบที่มี HBeAg seroconversion มักพบมีการเพิ่มขึ้นของ ระดับ IL-12 และการลดลงของระดับ HBV DNA แต่อย่างไรก็ตามการกำเริบของตับอักเสบโดยไม่มี HBeAg seroconversion ที่เกิดขึ้นช้า ๆ หรืออย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะทำให้เซลล์ถูก

ทำลายอย่างต่อเนื่อง นำไปสู่การเกิดพังผืดในตับ ตับแข็งและมะเร็งตับในที่สุด (Vierling, JM., 2007; Perrillo, RP., 2001)

อนุไวรัสวิทยาและโครงสร้างของไวรัสตับอักเสบบี

ในปัจจุบันพบว่า มีประเภทของไวรัสตับอักเสบที่มีความสำคัญทางคลินิก 5 ชนิด ได้แก่ ไวรัสตับอักเสบ A (hepatitis A virus, HAV) ไวรัสตับอักเสบ B (hepatitis B virus, HBV) ไวรัสตับอักเสบ C (hepatitis C virus, HCV) ไวรัสตับอักเสบ D (hepatitis D virus, HDV) โรคไวรัสตับอักเสบ E (hepatitis E virus, HEV) ซึ่งไวรัสเหล่านี้มีลักษณะเหมือนกัน คือ มีความจำเพาะต่อการติดเชื้อที่ตับเหมือนกัน แต่มีความแตกต่างกันคือลักษณะทางพันธุกรรม ลักษณะของการติดต่อ และลักษณะของการดำเนินของโรคโดยมีรายละเอียดดังตาราง 3 ดังนี้

ตาราง 3 ลักษณะทางไวรัสวิทยาและทางคลินิกของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดต่าง ๆ

Virus	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Family	Picornavirus	Hepadnavirus	Flavivirus	Viroid	Calicivirus
Virus size (nm)	27-33	42	30-60	36	32-34
Genome structure	Positive single-stranded RNA	Double-stranded DNA	Positive single-stranded RNA	Circular single-stranded RNA	Positive single-stranded RNA
Nucleotides	7480	3200	9400	1700	7500
Envelope	None	Present	Present	None	None
Transmission	Fecal-oral	Blood	Blood	Blood	Fecal-oral
Incubation period (week)	2-4	42	2-25	2-12	2-10
Chronicity of infection	Never	Varied with age of infection	70-85%	Depended on the HBV status	Very rare

ที่มา: Lai, CL., 2008

ไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็นหนึ่งในไวรัสตับอักเสบที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นไวรัสที่มีการติดเชื้อมากที่สุดในประเทศไทยนับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ HBV เป็นไวรัสที่อยู่ในกลุ่ม Hepadnavirus ในปัจจุบันมีการจัดแบ่งกลุ่มเป็นอย่างน้อย 8 สายพันธุ์ (genotype A-H) ซึ่งมีขนาดเล็ก 42-47 นาโนเมตร double strand DNA ขนาด 3.2 kb อนุภาคของไวรัสตับอักเสบบีมีความจำเพาะต่อการติดเชื้อที่ตับ นอกจากนี้ไวรัสยังอาจตรวจพบได้ในอวัยวะหรือเซลล์อื่น ๆ ได้ด้วย เช่น ไต ตับอ่อนและเซลล์เม็ดเลือดขาว อนุภาคไวรัสตับอักเสบบีเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในเลือดของผู้ที่ติดเชื้อ พบว่าอนุภาคของไวรัสมี 3 รูปแบบที่ตรวจพบ คือ อนุภาคแบบทรงกลม อนุภาคแบบแท่ง อนุภาคทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นอนุภาคที่ไม่มีสารพันธุกรรมของไวรัสอยู่ มีเพียงแอนติเจนชนิด surface (HBsAg) เป็นส่วนประกอบ ทำให้ไม่สามารถแพร่เชื้อได้ ส่วนอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ที่เรียกว่า Dane particle ประกอบด้วย envelope nucleocapsid ที่มีแอนติเจนชนิด core (HBcAg) และ HBV DNA จึงเป็นอนุภาคที่สามารถแพร่เชื้อได้ สารพันธุกรรมของไวรัสตับอักเสบบี (HBV DNA) เป็นดีเอ็นเอแบบสายคู่ที่ไม่สมบูรณ์ (relaxed-circular DNA, rcDNA) ซึ่งประกอบด้วยสายลบ (L, minus strand) ที่มีความยาวเต็มตลอดสายยีนในขนาดประมาณ 3200 นิวคลีโอไทด์ และสายบวก (S, plus strand) มีขนาดไม่แน่นอนมีความยาวประมาณ 20-80 % ของสายลบ สายทั้งสองเชื่อมต่อกันที่ปลาย 5' un-translated region (UTR) ของสายดีเอ็นเอในตำแหน่ง direct repeat (DR) ที่ DR1 และ DR2 (Harrison, TJ., 2006, pp. 87-96; Kay, A., 2007, pp. 164-176) ยีนในสายลบประกอบด้วย 4 open reading frames (ORFs) คือ S, C, X และ P โดย 4 ส่วนนี้มีลักษณะที่ซ้อนกัน (overlapping ORFs) โดยเฉพาะส่วน P จะซ้อนอยู่กับ 3 ส่วนที่เหลือ

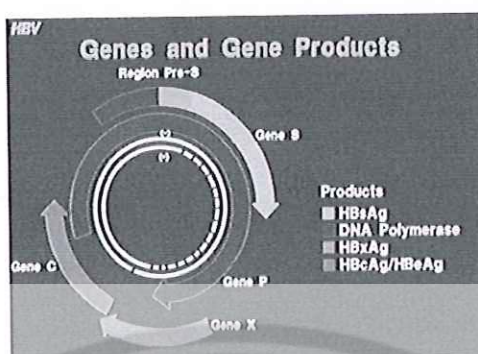
1. S-ORF ประกอบด้วย S, Pre-S1 และ Pre-S2 gene ทำหน้าที่สร้างโปรตีน 3 ชนิด คือ Major protein, middle protein และ large protein ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 ประกอบกันรวมเรียกว่า surface protein (HBsAg) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ envelope ของไวรัส โดยโปรตีนทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนแตกต่างกัน คือ major protein ซึ่งสร้างจาก S gene จะมีส่วนประกอบมากที่สุด คือประมาณร้อยละ 90 และเป็นโปรตีนที่สำคัญโดยเฉพาะตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 121-149 ของ major protein ที่เรียกว่า "a" determinant ที่พบได้ในไวรัสตับอักเสบบีทุกสายพันธุ์ทำให้มีความสำคัญที่ใช้ในการผลิตน้ำยาตรวจการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในปัจจุบันและเป็นส่วนของแอนติเจนที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สร้างแอนติบอดีที่ป้องกันการติดเชื้อได้ (Anti-HBs) และ major protein ยังแบ่งย่อยเป็น sub-determinant ต่าง ๆ ได้แก่ "d" หรือ "y" และ "w" หรือ "r" อีกด้วย ส่วน middle protein สร้างจาก pre-S2 และ S gene ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดถึง

การทำหน้าที่ของโปรตีนนี้ และสุดท้าย large protein ซึ่งสร้างจาก pre-S1, pre-S2 และ S gene โปรตีนส่วนนี้เป็นตำแหน่งที่เชื้อไวรัสใช้ในการผ่านเข้าสู่เซลล์ตับในขั้นตอนเริ่มต้นของการติดเชื้อ

2. C ORF ประกอบด้วย Precore/core gene ทำหน้าที่สร้างโปรตีน core protein (HBcAg) และ envelope protein (HBeAg) โดยโครงสร้าง C ORF จะมีการซ้อนทับกันของปลายด้าน 5' กับปลายด้าน 3' ของ X ORF และด้าน 3' จะซ้อนกับปลายด้าน 5' ของ P ORF core protein ที่สร้างขึ้นมีหน้าที่ป้องกันการทำลายสารพันธุกรรมของไวรัสจากการทำงานของเอนไซม์ exogenous nuclease นอกจากนี้ core protein ยังมีหน้าที่สำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทางด้านเซลล์ของร่างกายในการจับเชื้อไวรัสเนื่องจาก core protein มี epitope ของ CD8+ lymphocytes และ CD4+ lymphocytes ดังนั้นจึงมีบทบาทที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพที่ตับ จากการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Guidotti LG, 2006) ส่วน envelope protein ถูกสร้างจาก precore gene เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้แต่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัสบทบาทหน้าที่ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับ core protein ดังนั้นเชื่อว่าอาจมีหน้าที่เป็น immune tolerogen ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลง และพบว่าการตรวจพบ HBeAg ในเลือดผู้ป่วยที่ติดเชื้อซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าไวรัสอยู่ในภาวะการแบ่งตัวเป็นจำนวนมาก (High levels of viral replication) (Guidotti, LG., 2006, pp. 23-61; Sheila Sherlock and Jame Dooley, 1997)

3. P ORF เป็น ORF ที่ใหญ่ที่สุดของไวรัส ทำหน้าที่สร้าง Polymerase protein ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องในการเพิ่มจำนวนของไวรัสแบ่งเป็น 4 ส่วน ได้แก่ terminal protein มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเริ่มต้นของ reverse transcription ในการสร้างดีเอ็นเอสายลบ ส่วนถัดมาคือ spacer ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด ส่วนต่อมาก็คือ reverse transcriptase ทำหน้าที่สร้าง DNA polymerase และ reverse transcriptase มีหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยทำหน้าที่สร้างดีเอ็นเอสายลบและสายบวก ส่วนสุดท้ายทางปลายคาร์บอกซีของ polymerase protein reverse transcriptase เรียกว่า RNase H ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ ribonuclease H ในการย่อยสลาย pre-genomic RNA (Locarnini, S., 2006)

4. X ORF ทำหน้าที่สร้าง X protein (HBxAg) ปัจจุบัน พบว่า โปรตีนชนิดนี้มีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง เช่น ควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ตับ ควบคุมการถอดรหัสของยีน มีส่วนในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ และยับยั้งการสลายโปรตีน มีความสำคัญในกลไกการเกิดมะเร็งตับ เนื่องจากการศึกษาพบว่า X protein สามารถยับยั้งยีน p53 ได้ ซึ่งยีนชนิดนี้เป็นยีนที่ทำหน้าที่ด้านการเกิดเซลล์มะเร็ง (Murakami, S., 2001; Benhenda, S., 2009)



ภาพ 1 ยีนไวรัสตับอักเสบบี

ที่มา: Michael Torbenson and David, L. Thomas, 2002

การแสดงออกของยีนต่าง ๆ ของไวรัสตับอักเสบบีถูกควบคุมด้วย Promoters และ Enhancers โดย promoters เป็นตำแหน่งที่จับกับเอนไซม์ RNA polymerase II ของเซลล์ตับในขั้นตอนการสร้างสาย RNA ของไวรัส ส่วน enhancers จะทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ promoters อีกระดับหนึ่ง promoters ของไวรัสตับอักเสบบีมี 4 ตำแหน่งโดยจะอยู่ทางด้าน 5' ของยีนที่ถูกควบคุม ได้แก่ Pre-S1 promoter, Pre-S2 promoter, core promoter โดยจะแบ่งย่อยเป็น upstream regulatory region (URR) และ Basal core promoter (BCP), X promoter ส่วน enhancers ของไวรัสตับอักเสบบีมี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ enhancer I (Enh I) อยู่ในส่วนของ polymerase gene และอยู่ทางด้าน 5' ของ X promoter ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ promoters ทั้งหมดโดยจะสามารถกระตุ้นการสร้าง RNA ของไวรัสได้เพิ่มมากขึ้น 10-50 เท่า และ enhancer II (Enh II) อยู่ในส่วนของ X gene และอยู่ทางด้าน 5' ของ core gene ซ้อนกับ precore gene โดยทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ promoters ต่าง ๆ ของ promoters

ไวรัสตับอักเสบบีเป็นไวรัสที่มีกลไกการเพิ่มจำนวนที่มีลักษณะพิเศษ 2 ประการ คือ

1. เมื่อไวรัสผ่านเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะสร้าง DNA ที่สมบูรณ์เรียกว่า cccDNA ขึ้นก่อนเพื่อเป็นต้นแบบในการสร้าง mRNA ของไวรัสต่อไป

2. กลไกการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิดนี้มีขั้นตอนการเปลี่ยนยีนจาก DNA ให้เป็น RNA ที่เป็นตัวกลางก่อน (pre-genomic RNA) เพื่อนำไปสร้าง DNA สายลบก่อนโดยอาศัยกลไก reverse transcription เมื่อสร้าง DNA สายลบที่สมบูรณ์แล้วจะทำการสร้าง DNA สายบวกต่อในกลไก reverse transcription นี้ไม่มีการตรวจสอบความผิดพลาดในการสร้างของลำดับเบสที่

สร้างใหม่ขึ้นมา ดังนั้นไวรัสตับอักเสบบีจึงมีอัตราการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติสูงกว่าไวรัสชนิด DNA ชนิดอื่น ๆ

การตรวจหาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรังอาศัยการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาต่อแอนติเจนและแอนติบอดีต่าง ๆ ที่เป็นโปรตีนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี การตรวจทางเคมีคลินิก คือการตรวจการทำงานของตับ (liver function test) การตรวจหาอัลฟาฟิโตโปรตีน (alpha-feto protein, AFP) และการตรวจทางอนุไวรัสวิทยา โดยการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาปัจจุบันนิยมใช้เนื่องจากสามารถตรวจได้ง่าย ราคาถูก และสามารถตรวจได้ปริมาณมากมีเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติในการตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยการตรวจที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่

1. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) เป็นโปรตีนของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบได้ในเลือด สารคัดหลั่ง และเซลล์ตับ HBsAg เป็นโปรตีนตัวแรกที่ตรวจพบได้หลังการติดเชื้อ โดยตรวจพบได้ภายใน 6-10 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ การตรวจพบเป็นตัวบ่งชี้ทางคลินิกว่ากำลังมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ซึ่งหากร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อไปได้ภายใน 6 เดือนจะมีการวินิจฉัยว่าเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งการตรวจในปัจจุบันส่วนใหญ่ใช้ แอนติบอดีที่ตอบสนองต่อส่วนของ "a" determinant ของเชื้อไวรัสซึ่งมีความจำเพาะกับการตรวจมากกว่าร้อยละ 99.5 (Weber, B., 2003)

2. Hepatitis B Surface Antibody (Anti-HBs) เป็นแอนติบอดีที่สามารถป้องกันการติดเชื้อได้ โดยระดับของแอนติบอดีที่สามารถป้องกันโรคได้ตั้งแต่ 10 mIU/mL ในผู้ที่ติดเชื้อและสามารถสร้างภูมิคุ้มกันเพื่อทำลายเชื้อโรคและป้องกันการติดเชื้อได้ จะตรวจพบหลังการติดเชื้อประมาณ 3-6 เดือน ซึ่งในผู้ที่ได้รับการฉีดวัคซีนจะตรวจพบ Anti-HBs ได้เพียงอย่างเดียวโดยตรวจไม่พบ HBsAg และแอนติบอดีอื่น ๆ เนื่องจากวัคซีนเตรียมมาจาก surface antigen เท่านั้นโดยไม่มีส่วนอื่นของเชื้อไวรัส

3. Hepatitis B core Antibody (Anti-HBc) โดยแอนติบอดีต่อ core antigen แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่

3.1 Anti-HBc IgM เป็นแอนติบอดีที่ร่างกายสามารถสร้างขึ้นได้และตรวจพบในกระแสเลือดเป็นชนิดแรกหลังการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน โดยสามารถตรวจพบหลังจากการตรวจพบ HBsAg ประมาณ 1 เดือน และจะคงอยู่โดยสามารถตรวจพบได้นานประมาณ 6-12 เดือน

ภายหลังการติดเชื้อ (Hatzakis, 2006) anti-HBc IgM มีประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อแบบเฉียบพลันที่อยู่ในระยะ window period ซึ่ง HBsAg ลดต่ำลงและ anti-HBs ยังตรวจไม่พบ

3.2 Anti-HBc IgG เป็นแอนติบอดีที่พบหลังจาก anti-HBc IgM ที่ค่อย ๆ หายไปโดยที่ anti-HBc IgG จะคงอยู่ภายหลังการติดเชื้อนานไปตลอดชีวิต แต่เป็นแอนติบอดีที่ไม่สามารถป้องกันโรคได้ ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบได้ในผู้ที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรังหรือผู้ที่หายจากการติดเชื้อไวรัสแล้ว แต่ในปัจจุบันการตรวจทางห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยาไม่สามารถตรวจหา anti-HBc IgG ได้โดยตรงแต่เป็นการตรวจหาโดยทางอ้อม โดยการตรวจหา total anti-HBc ร่วมกับการตรวจ anti-HBc IgM หากกรณีผล total anti-HBc ให้ผลบวกเพียงอย่างเดียวแสดงว่าเป็นผลบวกของ anti-HBc IgG

4. Hepatitis B envelope Antigen (HBeAg) เป็นโปรตีนที่สามารถตรวจพบได้ในระหว่างที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์ตับ ดังนั้นการตรวจพบ HBeAg จึงเป็นตัวบ่งชี้ว่าน่าจะมีเชื้อไวรัสจำนวนมากในกระแสเลือด และมีโอกาสแพร่เชื้อไปสู่ผู้อื่นสูง โดยจะตรวจพบได้ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 6-12 สัปดาห์ ในกรณีที่ตรวจพบ HBeAg นานมากกว่า 4 เดือน ภายหลังการติดเชื้อแบบเฉียบพลัน แสดงว่ามีโอกาสสูงที่จะมีการดำเนินของโรคเป็นแบบเรื้อรัง

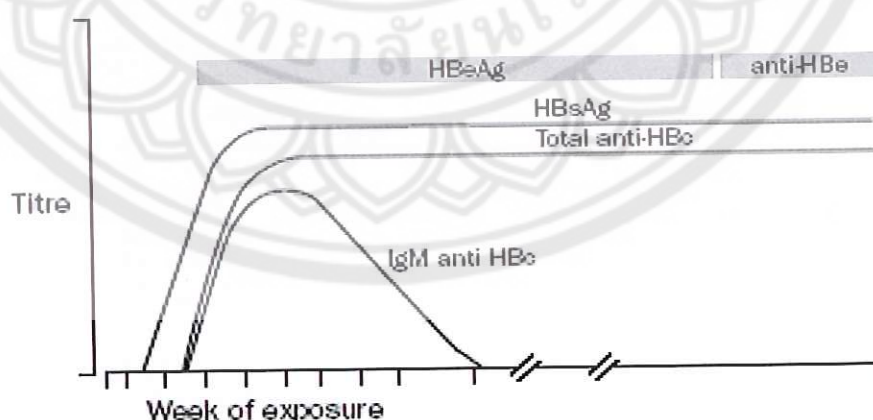
5. Hepatitis B envelope Antibody (anti-HBe) เป็นแอนติบอดีที่ตรวจพบได้ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 3 เดือนเมื่อพบว่าการเกิด HBeAg seroconversion โดย HBeAg จะค่อย ๆ ลดลงจนหายไป และตรวจพบ anti-HBe แทน ซึ่งการตรวจพบ anti-HBe แสดงถึงการพยากรณ์โรคที่ดีขึ้น

การตรวจทางอณูไวรัสวิทยาที่สำคัญคือการตรวจหาปริมาณ HBV DNA ซึ่งสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยได้ทั้งแบบเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ HBV DNA สามารถตรวจพบได้ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 6-10 สัปดาห์ ซึ่งปัจจุบันการตรวจเชิงคุณภาพมีการใช้ไม่แพร่หลายในทางคลินิก เนื่องจากปัจจุบันสามารถตรวจพบ HBsAg ภายหลังการตรวจพบ HBV DNA ได้ภายหลังแค่ 1-2 สัปดาห์ ซึ่งการตรวจได้ง่าย รวดเร็ว และถูก ส่วนการตรวจเชิงปริมาณ HBV ใช้หลักการตรวจด้วยวิธี Real time polymerase chain reaction (real time PCR) ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและติดตามการรักษาด้วยยาต้านไวรัส

การตรวจหาเอนไซม์ของตับ เนื่องจากเมื่อตรวจพบ HBsAg แล้วเริ่มมีการอักเสบของตับ ทำให้เอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) หลั่งออกมาจากเซลล์ตับทำให้ค่าในเลือดสูงขึ้น เอนไซม์นี้มีชื่อที่เรียกอีกอย่างว่า serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) เป็นเอนไซม์อยู่ในเซลล์ตับส่วน hepatocyte ทำหน้าที่กระตุ้นการเกิด transamination ของ alpha-ketoglutarate

และ L-alanine ให้เกิดเป็น glutamate และ pyruvate ค่าปกติของเอนไซม์ ALT คือ 10-60 U/L (ค่าอ้างอิงจากเอกสารกำกับน้ำยา ALT Dimension siemens) ซึ่งหากเกิดการทำลายของเซลล์ตับ เอนไซม์ชนิดนี้ก็จะออกมาสู่กระแสเลือดทำให้ค่าสูงขึ้น ในกรณีผู้ป่วยตับอักเสบแบบเรื้อรัง การกำเริบของตับอักเสบหมายถึงการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของระดับ ALT มากกว่าค่าปกติตั้งแต่ 5 เท่าขึ้นไป ซึ่งเกิดขึ้นได้เองในระหว่างการดำเนินโรคตามธรรมชาติ หรือในระหว่างการรักษาด้วยยาต้านไวรัส มีการศึกษาพบว่าค่าเอนไซม์ตับที่สูงกว่าค่าปกติเพียงเล็กน้อยแม้จะอยู่ในช่วงค่าปกติ ก็พบว่ามีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดการทำลายของเซลล์ตับอย่างมีนัยสำคัญ (Kim HC., 2004) โดยเมื่อมีอาการอักเสบที่เซลล์ตับจะมีอาการคือ ปวดเมื่อยตามตัว อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร จุกแน่นท้องบริเวณชายโครงด้านขวา อาจมีภาวะดีซ่านร่วมด้วย

เมื่อผู้ติดเชื้อที่สามารถหายเองได้เนื่องจากภูมิคุ้มกันของร่างกายสามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ ระดับของ HBsAg และ HBV DNA ลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเข้าสู่ระยะฟื้นตัวระดับ ALT เริ่มลดลงจนเข้าสู่ระดับปกติ ระดับ HBeAg ลดลงและตรวจพบ anti-HBe รวมถึง anti-HBs ซึ่งแสดงว่าผู้ป่วยมีภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อแล้ว ในขณะที่ระดับ anti-HBcIgM เริ่มลดลงและตรวจพบ anti-HBcIgG แทนในระยะนี้มักตรวจไม่พบ HBV DNA แล้ว ดังแสดงดังภาพ 1 และตาราง 4 ยกเว้นผู้ป่วยบางรายที่เรียกว่า occult hepatitis B ที่ตรวจพบ HBV DNA ในระดับต่ำในกระแสเลือดแต่ตรวจไม่พบ HBsAg แล้ว หากร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อออกไปได้ เกิดการอักเสบเกิดขึ้นเรื้อรัง เกิดพังผืดที่ตับ ทำให้เกิดภาวะตับแข็ง จะตรวจพบโปรตีนชนิด AFP สูงขึ้น โปรตีนชนิดนี้จะถูกสังเคราะห์หรือออกมาจากเซลล์ตับที่ผิดปกติ



ภาพ 2 การเปลี่ยนแปลงทางวิทยาภูมิคุ้มกันหลักการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ที่มา: Michael Torbenson and David, L. Thomas, 2002

ตาราง 4 ผลการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาในผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

Serological tests	Hepatitis B immunization	Acute hepatitis B	Recovered Hepatitis b	Chronic hepatitis B	Healthy or inactive carrier	Occult hepatitis B
Anti-HBs	+	-	+	-	-	-/+
Anti-HBc	-	+	+	+	+	+
HBsAg	-	+	-	+	+	-
HBeAg	-	+	-	+	-	-/+
Anti-HBe	-	-	+	-	+	-/+
HBV DNA	-	+	-	+	-/+, <10 ⁶ Copies	+

ที่มา: Michael Torbenson and David, L. Thomas, 2002

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง

ในกรณีที่ตรวจพบ HBsAg นานกว่า 6 เดือนขึ้นไปแสดงถึงการติดเชื้อแบบเรื้อรังซึ่งหากมีการตรวจพบปริมาณไวรัสในระดับสูง และเกิดภาวะตับอักเสบบีแบบเรื้อรังจะก่อให้เกิดภาวะเสี่ยงต่อการเกิดภาวะตับแข็ง และมะเร็งตับในที่สุด (Yuen, MF. and Lai, CL., 2001) การใช้ผลการตรวจวิเคราะห์ในการวินิจฉัยระยะของการติดเชื้อเป็นส่วนสำคัญในการตัดสินใจให้การรักษาและให้ยาต้านไวรัสแก่ผู้ติดเชื้อ ซึ่งการใช้ยาในระยะที่เหมาะสมจะทำให้ลดปริมาณไวรัส และลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิด ตับแข็งและมะเร็งตับ ระยะของการติดเชื้อของไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรังแบ่งเป็น 4 ระยะ ได้แก่

1. ระยะ immune tolerant เป็นระยะแรกของการติดเชื้อส่วนใหญ่พบในเด็กที่ติดเชื้อจากมารดาที่มีไวรัสในกระแสเลือดสูงทำให้เกิดการติดเชื้อในทารก หรือพบในการติดเชื้อในช่วงขวบปีแรกของอายุ ซึ่งระยะนี้อาจนานกว่า 10 ปีขึ้นไป ดังนั้นจึงมักตรวจพบระยะนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อย ส่วนผู้ที่ติดเชื้อครั้งแรกในวัยผู้ใหญ่มักมีระยะนี้ค่อนข้างสั้นหรือไม่มีระยะนี้เลย ในระยะจะตรวจพบปริมาณไวรัสในกระแสเลือดสูง (HBV มากกว่า 2×10^7 IU/mL) ตรวจพบ HBeAg ให้ผลบวก แต่ยังไม่พบการอักเสบที่เนื้อตับ ค่าระดับเอนไซม์ตับ ALT อยู่ในช่วงปกติ ไม่มีอาการแสดงทางคลินิก มีการศึกษาพบว่าสาเหตุที่ยังไม่เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่รุนแรงเนื่องมาจากบทบาทของ HBeAg ที่ทำหน้าที่เป็น immune tolerogen โดยทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่มีต่อการติดเชื้อไวรัสลดลง เพราะมีโครงสร้าง

คล้ายกับ HBcAg ที่เป็นเป้าหมายหลักของระบบภูมิคุ้มกัน (Milich, DR., 1990) ระยะนี้โอกาสผู้ที่ติดเชื้อจะเกิด HBeAg seroconversion ค่อนข้างต่ำ ประมาณร้อยละ 5 ไม่ว่าจะเกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ หรือเกิดจากการรักษา มีการศึกษาที่ประเทศไต้หวันติดตามผู้ติดเชื้อในระยะนี้จำนวน 240 ราย เป็นเวลานาน 10 ปี พบว่าประมาณร้อยละ 5 มีการดำเนินโรคต่อไปเป็นโรคตับแข็ง แต่ไม่มีผู้ใดเป็นมะเร็งตับในช่วงระยะเวลาดังกล่าว (Chu, CM., 2004, pp. 829-834) ดังนั้นในระยะนี้โดยทั่วไปยังไม่ต้องการการรักษาด้วยยาต้านไวรัส เนื่องจากการดำเนินของโรคที่ไม่รุนแรง และมีการตอบสนองต่อการรักษาค่อนข้างน้อยเกิด HBeAg seroconversion ต่ำ

2. ระยะ immune clearance (HBeAg positive chronic hepatitis) เป็นระยะที่ภูมิคุ้มกันของร่างกายเริ่มมีการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสและทำการกำจัดเชื้อไวรัส โดยระยะนี้อาจยาวนานเป็นเดือนจนถึงหลายปี ผู้ป่วยระยะนี้ส่วนใหญ่มีอายุประมาณ 20-40 ปี ระยะนี้จะเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อตับที่มีการติดเชื้อ ในระยะนี้ระดับของปริมาณไวรัสในกระแสเลือดเริ่มลดลงจากระยะ immune tolerance แต่ยังคงอยู่ในปริมาณที่สูง (ส่วนใหญ่ HBV > 2×10^4 IU/mL) ตรวจพบ HBeAg ให้ผลบวก ระดับเอนไซม์ตับ ALT สูงขึ้นเป็นระยะหรืออาจเป็นเวลานานเมื่อมีการตรวจพบยาพิษจากพืชขึ้นเนื้อในตับพบมีการอักเสบอย่างชัดเจน การอักเสบนี้เชื่อว่าเกิดจากปฏิกิริยาการตอบสนองของ CD8+ T cell ที่มีต่อ HBcAg และ HBeAg เพิ่มมากขึ้นทำให้มีการทำลายเซลล์ตับที่มีการติดเชื้อไวรัสด้วยการตายของเซลล์ตับที่ติดเชื้อทำให้ระดับของ HBV DNA ในเลือดลดลง (Chang, JJ., 2007) โดยทั่วไปประมาณร้อยละ 90 ของผู้ป่วยที่เกิด HBeAg seroconversion จะเกิดขึ้นในระยะนี้ และร้อยละ 80-90 ของผู้ป่วยที่เกิด HBeAg seroconversion จะเข้าสู่ระยะที่ 3 คือ Low replication ในระยะนี้ต้องให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัส หรืออินเตอร์เฟอรอน

3. ระยะ inactive immune hepatitis B (Low or non-replicative phase) เป็นระยะที่ร่างกายเกิด seroconversion ของ HBeAg โดยให้ผลการตรวจ AntiHBe เป็นบวก มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดในระดับต่ำ ส่วนใหญ่ HBV < 2,000 copies/mL ซึ่งเป็นระดับที่ตรวจไม่พบด้วยวิธี hybridization แต่ยังตรวจพบด้วยวิธีที่ความไวสูงด้วยวิธี PCR ในระยะนี้ระดับเอนไซม์ตับ ALT จะเข้าสู่ระดับปกติ ไม่ตรวจพบการอักเสบของเนื้อเยื่อตับหรือตรวจพบได้น้อยมาก แต่ในบางรายที่ผู้ป่วยเคยมีการอักเสบของตับที่รุนแรงและยาวนานในระยะ immune clearance อาจตรวจตับแข็งที่มีการอักเสบของตับไม่มาก ในระยะนี้โดยทั่วไปผู้ป่วยไม่จำเป็นต้องให้การรักษา หลังจากเข้าสู่ระยะสงบของการติดเชื้อผู้ป่วยอาจอยู่ในระยะนี้ยาวนานและต่อเนื่อง แต่มีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งกลับไปสู่ระยะ immune clearance อีกครั้งมีการตรวจพบ HBeAg ในทางตรงกันข้ามจะมีผู้ป่วยจำนวนหนึ่งเข้าสู่ระยะที่ 4 คือ ระยะ Re-activation phase มีการศึกษาในประเทศไต้หวันพบว่าในผู้ป่วยที่

ติดเชื้อมีการอักเสบบี แบบเรื้อรังที่เกิด HBeAg seroconversion ขึ้นแล้ว จำนวน 283 ราย มีการติดตามอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 8 ปี พบว่า ร้อยละ 67 ของผู้ป่วยมีระยะสงบต่อเนื่องยาวนานโดยผู้ป่วยกลุ่มนี้มักมีการพยากรณ์ของโรคที่ดี โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีอายุน้อย เนื่องจากมีการอักเสบของตับไม่รุนแรง ร้อยละ 4 กลับเข้าไปสู่ระยะ immune clearance อีกครั้ง ส่วนร้อยละ 24 ดำเนินโรคเข้าสู่ระยะ Re-activation phase ทำให้มีการดำเนินโรคไปเป็นตับแข็ง ร้อยละ 8 และก่อให้เกิดมะเร็งตับร้อยละ 2 (Hsu, YS., 2002)

4. ระยะ Re-activation phase (HBeAg-negative chronic hepatitis) เป็นระยะที่มีความสำคัญทางคลินิก คือ มีการเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ ALT ขึ้นลงมากกว่าระยะอื่น แสดงว่ามีการอักเสบของตับอย่างต่อเนื่องและเป็นระยะ ๆ ระยะนี้พบว่าตรวจไม่พบ HBeAg และตรวจพบ Anti-HBe แต่ตรวจพบปริมาณของไวรัสในกระแสเลือด (HBV DNA) ได้ตั้งแต่ 2×10^3 copies/mL ขึ้นไปแต่ยังมีระดับเฉลี่ยที่ต่ำกว่าระยะ immune clearance กลไกการอักเสบของเซลล์ตับยังไม่ทราบอย่างแน่ชัด เชื่อว่าเกิดจากปฏิกิริยาตอบสนองของภูมิคุ้มกันของร่างกายที่มากขึ้นแต่ไม่มากพอที่จะยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส ผู้ป่วยในระยะนี้มักพบในผู้สูงอายุและมีการดำเนินของโรคไปเป็นมะเร็งตับได้บ่อย มีการศึกษาของไวรัสวิทยาของผู้ป่วยระยะนี้พบว่าการกลายพันธุ์ระดับยีนที่ตำแหน่ง 1896 ของ precore (G1896A) ซึ่งทำให้เกิดการเป็น stop codon ทำให้ไม่เกิดการสร้าง HBeAg หรือ มีการกลายพันธุ์แบบ double mutation คือ มีการกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งพร้อมกัน ที่ยีนตำแหน่ง 1762 และ 1764 (A1762T/G1764A) ของ Basal core promoter (BCP) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมขบวนการถอดรหัส (transcription) ทำให้มีการสร้าง HBeAg ลดลง (Gunther, S., 1999; Bartholomeusz, A., 2001; Carman, WF., 1989)

ตาราง 5 ระยะของการติดเชื้อตับอักเสบแบบเรื้อรังกับผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

Phase	Immune tolerant	Immune clearance	Low replicative	Re-activation
HBeAg/ Anti-HBe	+/-	+/-	-/+	-/+
HBV DNA	$> 2 \times 10^7$ copies/mL	$> 2 \times 10^4$ copies /mL	$< 2 \times 10^4$ copies /mL	$> 2 \times 10^3$ copies /mL
ALT level	Normal	Elevated	Normal	Elevated
Liver Biopsy	Normal or minimal change	Hepatic necroinflammation with variable fibrosis level	Inactive and minimal fibrosis	Hepatic necroinflammation with variable fibrosis level
Treatment Candidate	No	Yes	No	Yes

ที่มา: Hoofnagle, JH., 2007; McMahon, BJ., 2009

เนื่องจากการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการดำเนินโรคพบว่า มีหลากหลายปัจจัยที่มีผลต่อการดำเนินของโรคได้แก่ ปริมาณของไวรัสในกระแสเลือด สายพันธุ์ของไวรัส การกลายพันธุ์ เพศ และอายุของผู้ติดเชื้อ ปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ติดเชื้อ และปัจจัยอื่น ๆ เช่น พฤติกรรม การบริโภค การดื่มสุราเรื้อรัง การสูบบุหรี่ เป็นต้น (Yim, HJ., 2006; Yuen, MF., 2007; Lai, CL., 2007; Lai, CL., 2008) มีการศึกษาที่ประเทศบังคลาเทศในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบเรื้อรัง พบว่าเป็นผู้ชายเป็นส่วนใหญ่โดยพบร้อยละ 87.7 และพบว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตรวจพบ HBeAg จะมีปริมาณ HBV DNA และค่า ALT ในเลือดที่สูงกว่า และมีอายุน้อยกว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตรวจไม่พบ HBeAg อย่างมีนัยสำคัญ (Ahmad, N., 2008) เช่นเดียวกันกับการศึกษาที่ประเทศฝรั่งเศส พบว่าผู้ป่วยกลุ่มที่ตรวจพบ HBeAg จะมีปริมาณ HBV DNA และค่า ALT ในเลือดที่สูงกว่า และมีอายุน้อยกว่า ผู้ป่วยกลุ่มที่ตรวจไม่พบ HBeAg อย่างมีนัยสำคัญ (Zarski, JP., 2006)

ในการดูแลผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบบเรื้อรังการใช้ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัยระยะของการติดเชื้อเพื่อใช้ในการตัดสินใจให้การรักษาเพื่อเกิดประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วย ปัจจุบันการตรวจทางวิทยาภูมิคุ้มกันของไวรัสตับอักเสบบีมีความสำคัญในการตรวจติดตามการติดเชื้อใน

ผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง ปัจจุบันมีการตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์อัตโนมัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา ที่มีการตรวจวิเคราะห์ได้ง่าย และราคาถูกลง โดยใช้หลักการที่มีความจำเพาะและความไวสูง เช่น หลักการ microparticle enzyme immunoassay (MEIA) เป็นต้น ในทางปฏิบัติการตรวจติดตามการดำเนินไปของโรคที่มีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง จะมีการตรวจหาการอักเสบเบื้องต้นของตับ คือ การตรวจหาระดับเอนไซม์ ALT หากมีค่าสูงกว่าปกติ จะมีการแบ่งกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มตามผลการตรวจ HBeAg เนื่องจากการตรวจพบ HBeAg เป็นการบ่งบอกถึงสภาวะที่ไวรัสมีการแบ่งตัวสูง ปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (HBV DNA) จะสูง มีการอักเสบเกิดขึ้นจากภูมิคุ้มกันต้านทานในร่างกาย ทำให้ค่า ALT สูงขึ้น ซึ่งมีการศึกษาพบว่าปริมาณไวรัสในกระแสเลือดเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญที่สุดในพยากรณ์การเกิดตับแข็ง โดยอุบัติการณ์ของตับแข็งที่เพิ่มขึ้นตามระดับ HBV DNA กล่าวคือ ผู้ที่มีระดับ HBV DNA น้อยกว่า 300 copies/mL เป็นตับแข็งร้อยละ 4.5 ส่วนผู้ที่มีระดับ HBV DNA ตั้งแต่ 10^6 copies/mL ขึ้นไปเป็นตับแข็ง ร้อยละ 36.2 โดยความเสี่ยงของการเป็นตับแข็งเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อมีระดับ HBV DNA ตั้งแต่ 10^4 copies/mL ขึ้นไป (Iloeje, UH., 2006) ดังนั้นการตรวจหา HBeAg จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเบื้องต้นในการตรวจติดตามการดำเนินไปของโรค แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสในตำแหน่งของ precore และ BCP ทำให้ไม่ตรวจพบ HBeAg ในเลือด แต่ไวรัสยังคงมีการแบ่งตัว และทำให้ค่า ALT สูงขึ้นกว่าปกติ หรือมีค่าปกติ และมีค่า ALT สูง ๆ ต่ำ ๆ เป็นระยะ ๆ หากเกิดการอักเสบอย่างต่อเนื่องและไม่ทำการรักษาจะทำให้ค่า AFP สูงขึ้นได้ในกรณีที่ตับเกิดตับแข็งก่อให้เกิดมะเร็งตับเกิดขึ้น มีการศึกษาพบว่าค่า AFP สูงขึ้นจะเพิ่มความเสี่ยงอย่างมีนัยสำคัญต่อการดำเนินของโรคไปเป็นโรคมะเร็งตับ (Harada, T., 1980) และมีการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์อาจมีความสัมพันธ์กับการดำเนินของโรคตับอักเสบที่รุนแรงและการเกิดมะเร็งตับเช่นการศึกษาแบบมีกลุ่มควบคุมที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งตับ 60 ราย และผู้ป่วยตับอักเสบแบบเรื้อรังที่ไม่ใช่มะเร็งตับจำนวนเท่ากัน พบว่าการกลายพันธุ์แบบ BCP (A1762T/G1764A) ของเชื้อไวรัสเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับในขณะที่การกลายพันธุ์แบบ Precore (G1896A) ไม่เพิ่มความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งตับ (Tangkijvanich, P., 2010) แต่บางกรณีศึกษาเช่น กรณีศึกษาที่ประเทศไต้หวัน พบว่าการกลายพันธุ์แบบ Precore (G1896A) เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tong, MJ., 2007) การศึกษาหาการกลายพันธุ์ร่วมกับการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์กับความรุนแรงของการดำเนินไปของโรค เพื่อสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าวก่อนจะได้ข้อสรุปที่ชัดเจน

ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จะศึกษาหาความสัมพันธ์การตรวจทางห้องปฏิบัติการในการวินิจฉัยผู้ป่วยตับอักเสบบี แบบเรื้อรังและศึกษาข้อมูลของผู้ป่วยที่มีผลต่อการดำเนินไปของโรค เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบในการรักษา และติดตามการรักษาการติดเชื้อ เพื่อให้มีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วย และศึกษาหาการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบี ใช้ประโยชน์ในการช่วยพยากรณ์การดำเนินไปของโรคเพื่อป้องกันการเกิดภาวะตับแข็งและมะเร็งตับอัตราการเสียชีวิตในผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบบเรื้อรัง เพื่อเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์ในทางระบาดวิทยา และการตรวจวินิจฉัยรักษาต่อไป

