รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีและความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนจากการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย

Human Pegivirus viraemia and sequence polymorphism have the beneficial effects on HIV clinical outcome among Thai HIV-infected individuals

นางสาว ญาดา ตันสิริ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

คณะแพทยศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีและความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนจากการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย

Human Pegivirus viraemia and sequence polymorphism have the beneficial effects on HIV clinical outcome among Thai HIV-infected individuals

นางสาว ญาดา ตันสิริ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

คณะแพทยศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีและความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนจากการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย
แหล่งเงิน กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประจำปีงบประมาณ 2560 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 พ.ย. 60 ถึง 1 พ.ย. 61
หัวหน้าโครงการ: ดร.ญาดา ตันสิริ คณะแพทยศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และผู้ร่วมโครงการวิจัย: ผศ.นพ.ดร.ปกรัฐ หังสสูต คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสร่วมกันสองชนิดนั้น ไวรัสชนิดหนึ่งสามารถไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสอีกชนิดหนึ่งได้ จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าไวรัสกลุ่ม Flaviviruses เช่น จีบีไวรัสซีหรือฮิวแมนเพกิไวรัส ไวรัสตับอักเสบซี เด็งกี่ไวรัส สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ การศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีพบว่าผู้ที่ตรวจพบฮิวแมนเพกิไวรัสในกระแสเลือดจะมีอัตราการอยู่รอดที่มากกว่าและมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อที่ดีกว่าผู้ที่ตรวจไม่พบ โดยส่งผลให้มีปริมาณของเม็ดเลือดขาวชนิดซีดีสี่ที่สูงกว่า มีปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดที่ต่ำกว่า มีการดำเนินโรคสู่ระยะภูมิคุ้มกันบกพร่องที่ช้ากว่า และมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาต้านไวรัสที่ดีกว่า และยังพบว่าชิ้นส่วนของฮิวแมนเพกิไวรัสที่มีผลต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีคือ ส่วนเปลือกนอกของไวรัสหรือเอ็นวิลอปอีสองและส่วนนอนสตรัคเจอรัลห้าเอ เมื่อทำการศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีนส่วนของนอนสตรัคเจอรัลห้าเอของฮิวแมนเพกิไวรัสในเม็ดเลือดขาวชนิดซีดีสี่พบว่าการแสดงออกของนอนสตรัคเจอรัลห้าเอนี้สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ และยังพบอีกว่าชิ้นส่วนโปรตีนเพียงสิบหกอะมิโนแอซิดก็สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้อย่างมีประสิทธิ-ภาพ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษารูปแบบและลำดับของอะมิโนแอซิดของโปรตีนนอนสตรัคเจอรัลห้าเอจากฮิวแมนเพกิไวรัสที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ และพัฒนาวิธีการวัดปริมาณของฮิวแมนเพกิไวรัสในกระแสเลือดโดยใช้เทคนิค Digital Droplet PCR หรือ ddPCR เพื่อศึกษาปริมาณของฮิวแมนเพกิไวรัสที่มีผลต่อการควบคุมปริมาณของเอชไอวีในกระแสเลือด ผลของงานวิจัยนี้จะได้รูปแบบและลำดับอะมิโนแอซิดของนอนสตรัคเจอรัลห้าเอจากฮิวแมนเพกิไวรัสที่มีผลต่อการค. วบคุมการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีในกระแสเลือด เพื่อใช้ในการออกแบบยาหรือโปรตีนสายสั้นสำหรับการผลิตวัคซีนที่ใช้ในการป้องกันหรือรักษาการติดเชื้อเอชไอวีในผู้ติดเชื้อคนไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ : Human Pegivirus, GB virus C, HIV, Envelope 2, Nonstructural 5A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Human Pegivirus viraemia and sequence polymorphism have the beneficial effects on HIV clinical outcome among Thai HIV-infected individuals.

Researcher: Dr.Yada Tansiri

Faculty: Medicine **Department:** -

ABSTRACT

Viral infection may lead to interfere with the replication of other virus in coinfected host. Flaviviruses have been found the association with the inhibitory effect on HIV replication in vitro including GB virus C (GBV-C) or Human Pegivirus, Hepatitis C virus (HCV), and Dengue virus. In a meta-analysis, Human Pegivirus viraemia is associated with prolonged survival and good HIV clinical outcomes. Several studies have been reported the association between the presence of Human Pegivirus viraemia and higher CD4+ T cell counts, lower plasma HIV loads, better antiretroviral therapy responsiveness and slower HIV disease progression among HIV-infected patients. Moreover, in vitro study showed the direct effect of Human Pegivirus on HIV replication by at least two proteins such as nonstructural 5A (NS5A) and envelope protein 2 (E2). Expression of NS5A protein and some part of NS5A from Human Pegivirus in CD4+ T cells is able to inhibit HIV replication. It has been characterized that only 16 amino acids on NS5A is sufficient for inhibition of HIV replication in vitro. We proposed that the amino acid sequence polymorphism on NS5A from Human Pegivirus is the potential target for inhibiting HIV replication and Human Pegivirus loads result in HIV inhibitory effect. To determine if amino acid polymorphism on NS5A protein from Human Pegivirus show the inhibitory effect on HIV replication, we study the NS5A sequences obtained from HIV-infected patients. We also develop the method to measure Human Pegivirus loads by using Digital Droplet PCR (ddPCR) to study the association between the level of Human Pegivirus and the control of plasma HIV loads. Characterization of amino acid sequence polymorphism on NS5A protein by which Human Pegivirus presents the control of plasma HIV loads may lead to the new drug design or specific peptide for therapeutic or prophylaxis vaccine against HIV infection.

Keywords : Human Pegivirus, GB virus C, HIV, Envelope 2, Nonstructural 5A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับการสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ เครื่องมือ และตัวอย่างที่ใช้ในการทำวิจัย โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 เลขที่สัญญา KREF18903) และท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครที่ได้เล็งเห็นความสำคัญ และยินดีบริจาคเลือดเพื่อความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้

ดร.ญาดา ตันสิริ

ผศ.นพ.ดร.ปกรัฐ หังสสูต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย II

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ IV

สารบัญ V

สารบัญตาราง VII

สารบัญภาพ IX

บทที่ 1 บทนำ 10

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 10

1.2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 11

1.3. ขอบเขตของการวิจัย 12

1.4. วิธีดำเนินการวิจัย 12

1.5. สมมุติฐานงานวิจัย 13

1.6. กรอบแนวความคิดในการวิจัย 13

1.7. คำสำคัญของการวิจัย 13

1.8. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 13

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15

2.1. ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 15

2.2. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 18

3.1. กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา 18

3.2. การสกัดอาร์เอ็นเอจากพลาสมา (RNA extraction) 20

3.3. การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus 21

3.4. การวิเคราะห์ Phylogenetic tree 21

3.5. การวิเคราะห์ความหลากหลายของ E2 และ NS5A ของ Human Pegivirus 22

3.6. การรวบรวมข้อมูล (Data Collection) 23

3.7. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data Analysis and Statistics) 23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.8. การหาปริมาณ Human Pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR) 23

3.9. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration) 24

บทที่ 4 ผลการวิจัย 26

4.1. การสกัด Viral RNA จากตัวอย่างน้ำเหลือง (plasma) 26

4.2. การสกัด Viral RNA จากตัวอย่างน้ำเหลือง (plasma) 26

4.3 การวัดปริมาณไวรัสของ Human pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR) 36

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 40

5.1 สรุปผลการวิจัย 40

5.2 ข้อเสนอแนะ 41

บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย 42

6.1. ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัย 42

6.2 ผลผลิตที่ได้จากโครงการวิจัย 42

บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง 43

ภาคผนวก 45

ภาคผนวก ก งบประมาณเพื่อการวิจัย 45

ประวัตินักวิจัย 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ 5'NTR และ E2 ที่ใช้ในการตรวจหาจีบีไวรัสซีในกระแสเลือด (Human Pegivirus viraemia) 21
ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ต่อ 5'NTR ที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ ของ Human Pegivirus 22
ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ต่อส่วน E2 และ NS5A ของ Human Pegivirus 22
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารที่ต้องใช้เพื่อการวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR) 23
ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ Digital droplet PCR (ddPCR) 24
ตารางที่ 6 แสดง ข้อมูลของกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา 26
ตารางที่ 7 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน5'NTR ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR 27
ตารางที่ 8 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน5'NTR ด้วยวิธี Nested-PCR 27
ตารางที่ 9 แสดงการเตรียม reaction ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR ด้วยวิธี RT-PCR 28
ตารางที่ 10 แสดงการเตรียม reaction ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR ด้วยวิธี Nested-PCR 28
ตารางที่ 11 แสดง primers ต่อส่วน 5'NTR ของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR 29
ตารางที่ 12 แสดง primers ต่อส่วน Envelope 2 ของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR 30
ตารางที่ 13 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน E2 ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR 31
ตารางที่ 14 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน E2 ด้วยวิธี Nested-PCR 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 15 แสดง primers ต่อส่วน Envelope 2 ชุดที่สองของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR 33
ตารางที่ 16 แสดง primers ต่อส่วน Envelope 2 ชุดที่สองของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR 34
ตารางที่ 17 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน NS5A ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR 34
ตารางที่ 18 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน NS5A ด้วยวิธี Nested-PCR 35
ตารางที่ 19 แสดง primers และ probe ต่อส่วน 5'NTR ของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของ Human pegivirus ด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR) 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของ Human pegivirus ด้วยการใช้ gel electrophoresis 29
ภาพที่ 2 แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของ E2 ของ Human pegivirus ด้วยการใช้ gel electrophoresis 32
ภาพที่ 3 แสดงการแปลผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ในรูปแบบกราฟ 37
ภาพที่ 4 แสดงการผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี 38
ภาพที่ 5 แสดงการผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีในรูปแบบของสัญญาณที่ได้มาจาก Droptet 38
ภาพที่ 6 แสดงการผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus (copies/ml) โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การตรวจพบเชื้อไวรัสชนิด Human Pegivirus ในกระแสเลือด (viraemia) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral treatment) แสดงให้เห็นว่าผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้มีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีมากกว่าผู้ที่ตรวจไม่พบ Human Pegivirus ในกระแสเลือด และได้มีการศึกษาด้านไวรัสวิทยาของการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus และเชื้อเอชไอวีพบว่าชิ้นส่วนของ Human Pegivirus คือส่วนของ Envelope 2 และ Nonstructural protein 5A มีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่าการติดเชื้อ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยน่าจะมีผลต่อการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี จึงได้ศึกษาวิจัยในด้านระบาดวิทยาของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส รวมทั้งการศึกษา genotype ที่มีในประเทศไทย ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน และศึกษารูปแบบและลำดับของกรดอะมิโน (sequence polymorphism) ของ Envelope 2 และ Nonstructural protein 5A ของ Human Pegivirus จากผู้ติดเชื้อคนไทย ที่สามารถแสดงการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองได้ เพื่อจะนำผลของการศึกษาวิจัยนี้ไปออกแบบ peptides และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลองต่อไป เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวัคซีนสำหรับการติดเชื้อเอชไอวี

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี (Human immunodeficiency virus หรือ HIV) พบว่าสามารถมีการติดเชื้อจุลชีพชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย (coinfection) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลชีพที่มีการติดต่อได้ทางเดียวกับการติดเชื้อเอชไอวี (route of infection) อย่างไรก็ตามจุลชีพเหล่านี้มีทั้งชนิดที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic microbes) และชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic microbes) มีการศึกษาพบว่าการติดเชื้อจุลชีพบางชนิดในผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่งผลให้มีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีขึ้น และจากการศึกษาในหลอดทดลองหรือ in vitro study แสดงให้เห็นว่าจุลชีพบางชนิดนั้นสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีได้ เช่น Orientia (Rickettsia) tsutsugamushi (1), Measles virus (2), Dengue virus (3), GB virus C/Hepatitis G virus (GBV-C/HGV) หรือ Human Pegivirus (4) เป็นต้น โดยที่ Human Pegivirus มีหลักฐานทางงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อร่วมกันกับเชื้อเอชไอวีมีผลต่อการดำเนินโรคของเชื้อเอชไอวีที่ชัดเจนที่สุดและมากที่สุด (4-8) การติดเชื้อ Human Pegivirus สามารถพบได้มากในผู้ติดเชื้อเอชไอวี เนื่องจากมีวิธีการติดต่อไปสู่ผู้อื่น (route of infection) เหมือนกับการติดเชื้อเอชไอวี เช่น การติดต่อผ่านทางเพศสัมพันธ์, การติดเชื้อผ่านการรับเลือด, การส่งผ่านเชื้อจากแม่ไปสู่ลูก เป็นต้น (9) จากการศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ประมาณร้อยละ 15 - 40 ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี (10) สามารถจัดกลุ่ม Human Pegivirus ด้วยการแบ่งแบบ genotype ได้ทั้งหมด 7 genotypes ดังนี้ genotype 1 ส่วนมากพบในประเทศแถบแอฟริกาตะวันตก, genotype 2 พบได้มากในสหรัฐอเมริกาและในประเทศแถบยุโรป, genotype 3 พบได้มากในประเทศแถบเอเชีย, genotype 4 พบได้มากในประเทศแถบแอฟริกาใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, genotype 5 พบได้มากในแอฟริกาใต้ และ genotype 6 และ 7 พบว่าเป็น genotype ใหม่ที่พบได้ในประเทศจีน (11-12) จากผลการศึกษาด้วย phylogenetic analysis ของผู้วิจัยพบว่า ผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสส่วนใหญ่ติดเชื้อ Human Pegivirus ชนิด genotype 2 ที่ร้อยละประมาณ 70 และพบว่ามี genotypes อื่นๆ ร่วมด้วย คือ genotype 3 และ 4 (13) ในปี 1998 ได้มีงานวิจัยพบว่าในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสที่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วมด้วยจะมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีกว่าผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีแต่ไม่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus โดยพบว่าผู้ที่มีการติดเชื้อร่วม (coinfection) จะมีอัตราการอยู่รอดหรือ survival rate ที่สูงกว่า (4, 14) และมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีกว่า (4) รวมทั้งมีอัตราการลดลงของระดับ CD4+ T cell counts ในกระแสเลือดที่ช้ากว่า (7, 15) และมีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) ที่ช้ากว่า (7) เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นยังพบว่าการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral drug) ก็ให้ผลที่ดีเช่นกัน กล่าวคือ ผู้ที่ติดเชื้อร่วมจะมีผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัสที่ดีมากกว่าผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วมด้วย จากการศึกษาด้านไวรัสของ Human Pegivirus กับความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในหลอดทดลอง พบว่าส่วนประกอบของไวรัส คือ envelope 2 (E2) และ nonstructural protein 5A (NS5A) มีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีได้ การศึกษาวิจัยนี้จึงเน้นไปที่การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยที่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus กับการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี รวมทั้งศึกษาด้านไวรัสของ Human Pegivirus ที่สัมพันธ์กับความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี โดยดูที่ลำดับอะมิโนแอซิดของ envelope 2 และ nonstrustural protein 5A ของ Human Pegivirus เพื่อนำความรู้จากการศึกษานี้ไปใช้ในการอธิบายผลของการติดเชื้อร่วม (coinfection) กับการดำเนินโรคของเชื้อเอชไอวีและใช้ความรู้จากลำดับอะมิโนแอซิดในการพัฒนาวัคซีนสำหรับการติดเชื้อเอชไอวีต่อไป (vaccine development)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1. เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus (viraemia) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย และศึกษาผลของการติดเชื้อของ Human Pegivirus ร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวี ที่มีผลให้การดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีดีมากกว่าผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2. เพื่อศึกษาลำดับกรดอะมิโน (amino acid polymorphism) ที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีได้ เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาวัคซีนสำหรับผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การตรวจหาการติดเชื้อ Human Pegivirus ในตัวอย่างเลือด (plasma) จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยด้วยเทคนิค nested reverse-transcription polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus (viraemia) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย และศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวีกับการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณของเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) และค่าทางภูมิคุ้มกัน (peripheral CD4 T cell counts) ของผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับการติดเชื้อ Human Pegivirus และผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับอะมิโนแอซิด (amino acid sequences) ของ envelope 2 และ nonstructural 5A (NS5A) ของ Human Pegivirus เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับอะมิโนแอซิด (amino acid polymorphism) กับการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี โดยใช้ค่าปริมาณของเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA)

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาการระบาดของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในคนไทย โดยศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี เพื่อดูผลของการติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วมกับการติดเชื้อเอชไอวี (Human Pegivirus coinfection) กับการดำเนินโรค (Clinical outcomes) ของการติดเชื้อเอชไอวี โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในกระแสเลือดด้วยวิธี nested reverse-transcription polymerase chain reaction (Nested RT-PCR) ของชิ้นส่วนของไวรัสประกอบด้วยส่วน 5' Nontranslated regions หรือ 5'NTR และการตรวจยืนยันด้วยชิ้นส่วนเปลือกนอกของไวรัสเอนวิลอปอีสองหรือ Envelop 2 (E2) ผู้ติดเชื้อที่ตรวจพบการติดเชื้อด้วยชิ้นส่วนของไวรัสทั้งสองชนิดจะวินิจฉัยว่ามีการตรวจพบไวรัส Human Pegivirus ในกระแสเลือดหรือ Human Pegivirus viraemia และศึกษาความสำคัญของการติดเชื้อร่วมกัน (Coinfection) ของ Human Pegivirus กับผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีโดยศึกษาปริมาณของเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) และค่าทางภูมิคุ้มกัน (peripheral CD4 T cell counts) เปรียบเทียบกันระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดกับผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว และศึกษาลำดับอะมิโนแอซิด (amino acid sequences) ของ envelope 2 และ nonstructural 5A (NS5A) ของ Human Pegivirus ที่มีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ (HIV replication)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 สมมุติฐานงานวิจัย

ผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับ Human Pegivirus จะมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีกว่าผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว โดยมีค่าปริมาณของเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) ที่ต่ำกว่าประกอบกับมีค่าทางภูมิคุ้มกัน (peripheral CD4 T cell counts) ที่สูงกว่า

สมมุติฐาน (หลัก) การติดเชื้อจีบีไวรัสซีในผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีผลต่อการดำเนินโรคของเอชไอวีที่ดีกว่าผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว

สมมุติฐาน (รอง) ลำดับอะมิโนแอซิดของโปรตีนเอ็นเอสห้าเอและอีทูของจีบีไวรัสซีมีผลต่อการควบคุมปริมาณไวรัสในผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับจีบีไวรัสซี

1.6 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

ผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับ Human Pegivirus จะมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีกว่าผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว โดยมีค่าปริมาณของเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) ที่ต่ำกว่าประกอบกับมีค่าทางภูมิคุ้มกัน (peripheral CD4 T cell counts) ที่สูงกว่า ซึ่งการติดเชื้อ Human Pegivirus น่าจะมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี ซึ่งโครงการนี้จะศึกษาความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี รวมทั้งศึกษาลำดับอะมิโนแอซิด (amino acid polymorphism) ของ envelope 2 และ non-structural 5A protein (NS5A) ของ Human Pegivirus ที่น่าจะมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีได้ ที่จะส่งผลให้มีปริมาณของเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดที่ต่ำกว่า

1.7 คำสำคัญของการวิจัย

Human Pegivirus

GB virus C

HIV

Envelope 2

Nonstructural 5A

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.8.1. อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus (Human Pegivirus viraemia) จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทย

1.8.2. จีโนไทป์ของ Human Pegivirus (Human Pegivirus genotypes) ที่พบได้ในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.8.3. ผลของความหลากหลายของอะมิโนแอซิด (amino acid polymorphisms) ของส่วนเปลือกนอกของไวรัสหรือเอนวิลอปสอง (envelope 2: E2) และส่วนนอนสตรัคเจอรัลห้าเอ (nonstructural 5A: NS5A) ของ Human Pegivirus

1.8.4. ผลของความหลากหลายของอะมิโนแอซิด (amino acid polymorphisms) ของเอนวิลอปสอง (envelope 2: E2) และนอนสตรัคเจอรัลห้าเอ (nonstructural 5A: NS5A) ของ Human Pegivirus กับผลการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาวิธีการรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี โดยใช้ประโยชน์ของการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus (coinfection) โดยการหารูปแบบและลำดับอะมิโนแอซิด (amino acid sequence polymorphism) ของชิ้นส่วนของไวรัสจาก Human Pegivirus คือส่วน Nonstructural 5A หรือ NS5A จากผู้ติดเชื้อเอชไอวี เพื่อศึกษาหาคุณสมบัติของ NS5A ในการควบคุมการติดเชื้อเอชไอวีโดยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีในกระแสเลือด ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในวงวิชาการได้คือการใช้ความรู้ของรูปแบบและลำดับอะมิโนแอซิดในการออกแบบโปรตีนสายสั้นหรือเปปไทด์ (peptide) และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีในหลอดทดลองต่อไป เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาวัคซีนสำหรับการติดเชื้อเอชไอวี รวมทั้งสามารถนำไปศึกษาด้านกลไก (mechanism) ที่ใช้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวี เพื่อใช้ในการพัฒนายาประเภทชีววัตถุต้นแบบ (Biologic) และชีววัตถุคล้ายคลึง (Biosimilar) สำหรับการป้องกันการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเอชไอวี เพื่อลดอัตราการติดเชื้อเอชไอวีรายใหม่หรือใช้ในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีให้มีปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดที่ลดลง ส่งผลให้ผู้ติดเชื้อเหล่านี้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นและสามารถลดอัตราการแพร่เชื้อไปสู่ผู้ติดเชื้อรายใหม่ได้อีกด้วย ยิ่งไปกว่านั้น โครงการนี้ได้ออกแบบการศึกษาวิจัยจากอาสาสมัครคนไทยรวมทั้งศึกษาสายพันธุ์ของเอชไอวีที่พบได้ในประเทศไทย ทำให้ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ได้จริงกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อสังคมในด้านการควบคุมสถานการณ์ของการติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทยได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

การติดเชื้อเอชไอวีหรือโรคเอดส์ (Human Immunodeficiency Virus: HIV หรือ Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) เป็นปัญหาที่สำคัญของโลกรวมทั้งประเทศไทย ปัจจุบันมีผู้ป่วย HIV/AIDS ทั่วโลก มากกว่า 33 ล้านคน และในประเทศไทยประมาณ 800,000 ถึง 1,000,000 คน ถึงแม้มีความพยายามที่จะลดจำนวนผู้ติดเชื้อลงด้วยการรณรงค์การใช้ถุงยางอนามัย แต่พบว่าในกลุ่มเสี่ยงบางกลุ่มอัตราการติดเชื้อได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว [1] ถึงแม้ว่าการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral treatment, ART) ได้ผลเป็นอย่างดี แต่ผู้ป่วยต้องรับประทานยาดังกล่าวอย่างตรงเวลาจนตลอดชีวิต นอกจากนี้ ยายังมีผลข้างเคียง (side effects) ทั้งที่เกิดขึ้นระยะสั้นและระยะยาวพอสมควร ดังนั้น แนวทางการรักษาผู้ติดเชื้อด้วยยาต้านไวรัสอาจไม่ใช่การแก้ปัญหา HIV/AIDS แบบยั่งยืน

การพัฒนาวัคซีนที่ใช้ป้องกัน HIV/AIDS เป็นการแก้ปัญหาที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างว่าสามารถป้องกันและควบคุม HIV/AIDS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมี cost-benefit ที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้มีความพยายามจากนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก และใช้เงินในการวิจัยมากมายมหาศาล การพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ป้องกันโรคนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จ โดยสาเหตุหลักมาจาก สายพันธุ์ที่หลากหลายของไวรัสชนิดนี้ และการที่เรายังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกที่อาจใช้ในการป้องกัน หรือควบคุมการติดเชื้อเอชไอวี

การศึกษาการติดเชื้อไวรัสร่วม (coinfection) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีพบว่า การติดเชื้อไวรัสบางชนิดมีผลมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดี เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อไวรัสร่วมด้วยกับผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสอื่นร่วมด้วย โดยผลการศึกษาการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus กับผลการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี (clinical outcomes) เนื่องจากการติดเชื้อ Human Pegivirus ใช้ช่องทางเดียวกันกับการแพร่ของเชื้อเอชไอวี คือ ผ่านการมีเพศสัมพันธ์ การรับเลือด และสามารถติดต่อได้ผ่านทางเลือด เช่น การใช้เข็มฉีดยาร่วมกัน ทำให้อุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus พบได้ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีมากกว่าในประชากรทั่วไปที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี พบว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus จากการตรวจในผู้ที่มีสุขภาพดี (ไม่ติดเชื้อเอชไอวี) ที่เข้ารับการบริจาคเลือดในประเทศที่พัฒนาแล้ว (developed countries) พบได้ประมาณร้อยละ 1-5 แต่จะพบการติดเชื้อที่สูงกว่าในประเทศที่กำลังพัฒนาคืออัตรามากกว่าร้อยละ 20 ซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย

การตรวจหาการติดเชื้อ Human Pegivirus นั้นสามารถทำได้โดยการตรวจหาไวรัสในกระแสเลือดโดยตรงหรือการตรวจหาสารน้ำของภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะกับไวรัสชนิดนี้ได้จากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้น้ำเหลืองหรือ plasma ในการตรวจ เนื่องจาก Human Pegivirus ติดต่อได้ผ่านทางเลือดจึงสามารถตรวจหาไวรัสได้ในกระแสเลือด โดยการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงในกระแสเลือดนั้นจะบ่งบอกว่าผู้ติดเชื้อนั้นมีไวรัสที่เพิ่มจำนวนอยู่ในกระแสเลือด (viraemia) และยังมีการติดเชื้อ Human Pegivirus อยู่ หรือเรียกว่า Active infection แต่ถ้าตรวจพบสารน้ำที่จำเพาะต่อ Human Pegivirus หรือ antibody ในกระแสเลือด แสดงว่าผู้ติดเชื้อนั้นเคยมีการติดเชื้อ Human Pegivirus มาก่อนและได้มีการกำจัดไวรัสออกไปแล้ว ดังนั้นถ้าตรวจพบสารพันธุกรรมของไวรัสในกระแสเลือดจะแสดงว่ามีการติดเชื้อ Human Pegivirus อยู่ แต่ถ้าตรวจพบแอนติบอดีในกระแสเลือดจะแสดงว่าเคยมีการติดเชื้อ Human Pegivirus มาก่อน ซึ่งการศึกษาวิจัยนี้ต้องการศึกษาผลของการติดเชื้อ Human Pegivirus กับการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี ดังนั้นจึงออกแบบการศึกษาโดยตรวจหาการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดด้วยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในน้ำเหลือง เพื่อศึกษาผลของการมีอยู่ของ Human Pegivirus ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวี (HIV replication) ซึ่งส่งผลให้ผู้ที่มีการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus และเอชไอวีมีปริมาณของเชื้อเอชไอวีที่ต่ำกว่าผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผู้ติดเชื้อเอชไอวีสามารถพบการติดเชื้อจุลชีพชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย (coinfection) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลชีพที่มีการติดต่อได้ทางเดียวกับเอชไอวี (route of infection) อย่างไรก็ตามจุลชีพเหล่านี้มีทั้งชนิดที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic microbes) และชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic microbes) มีการศึกษาพบว่าการติดเชื้อจุลชีพบางชนิดในผู้ติดเชื้อเอชไอวีส่งผลให้มีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีขึ้น และจากการศึกษาในหลอดทดลองหรือ in vitro study พบว่าจุลชีพบางชนิดสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ เช่น โอเรียนเทีย (ริกเก็ตเซีย) ซึซึกามูชิ (Orientia (Rickettsia) tsutsugamushi) (8), มีเซิลไวรัส (Measles virus) (9), เด็งกี่ไวรัส (Dengue virus) (10), จีบีไวรัสซีหรือฮิวแมนเพกิไวรัส (GB virus C or Human Pegivirus) (4) เป็นต้น โดยการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี มีหลักฐานทางงานวิจัยที่แสดงให้เห็นชัดเจนที่สุดและมากที่สุด (1-5) รวมทั้งการติดเชื้อ Human Pegivirus ไม่ได้ก่อให้เกิดโรค จากผลงานวิจัยพบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี Human Pegivirus ในกระแสเลือด (GBV-C viraemia) จะมีอัตราการอยู่รอดหรือ survival rate ที่สูงกว่าผู้ที่ตรวจไม่พบ Human Pegivirus ในกระแสเลือด (2, 4) และมีการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีกว่า (4) โดยมีอัตราการลดลงของระดับเม็ดเลือดขาวชนิดซีดีสี่ (CD4+ T cell counts) ในกระแสเลือดที่ช้ากว่า (1, 5) และมีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) ที่ช้ากว่า (5) ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral therapy) การติดเชื้อร่วมกับ Human Pegivirus นอกจากมีผลต่อผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสแล้ว พบว่ายังมีผลต่อการรักษาด้วยยาต้านไวรัสที่ดีอีกด้วย ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยจะมีผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral drug) ที่ดีกว่าผู้ที่ไม่ได้ติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วม รวมทั้งจากการศึกษาในหลอดทดลองหรือ in vitro study พบว่า Human Pegivirus สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ ชิ้นส่วนของ Human Pegivirus ในส่วนนอนสตรัคเจอรัลห้าเอ (Nonstructural protein 5A หรือ NS5A) แสดงหลักฐานที่สำคัญในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีในหลอดทดลองได้ (6, 7) โดยพบว่าโปรตีน NS5A เพียงบางส่วนเท่านั้นที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเอชไอวี กล่าวคือ ส่วนของโปรตีน NS5A ที่ประกอบด้วยอะมิโนแอซิดจำนวน 85 ตัวสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ (6, 11) และยังพบอีกว่าส่วนของโปรตีน NS5A ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 152 ถึง 167 ที่ประกอบด้วยอะมิโนแอซิดเพียงสิบหกตัวเท่านั้นก็สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ โดยมีลำดับของกรดอะมิโนคือ VDGIPVSWDADARAPA และกรดอะมิโนที่มีความสำคัญ คือ กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 158 ที่เป็นชนิด Serine (S) โดยจากการศึกษานี้พบว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7) ต่อมาได้มีการศึกษาผลของ NS5A นี้ในไวรัสชนิดอื่นๆ ของกลุ่ม Flaviviridae พบว่า NS5A จากไวรัสตับอักเสบซีหรือ Hepatitis C virus (HCV) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีในหลอดทดลองได้เช่นกัน (6) แสดงให้เห็นว่าลำดับอะมิโนแอซิดจากโปรตีน NS5A ของ Human Pegivirus และไวรัสตับอักเสบซีมีความสำคัญในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีในประเทศไทย และศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายของอะมิโนแอซิด (amino acid polymorphism) กับการควบคุมปริมาณของเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV loads) โดยศึกษารูปแบบและลำดับอะมิโนแอซิด (amino acid sequence polymorphism) ของ NS5A จาก Human Pegivirus จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส รวมทั้งศึกษาปริมาณของ Human Pegivirus ในกระแสเลือด (Human Pegivirus loads) โดยการพัฒนาวิธีใหม่เพื่อวัดปริมาณ Human Pegivirus โดยใช้เทคนิค droplet digital PCR หรือ ddPCR เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีว่าขึ้นอยู่กับปริมาณของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดหรือไม่ เพื่อที่จะได้องค์ความรู้ใหม่คือรูปแบบและลำดับอะมิโนแอซิดจาก NS5A ในการออกแบบโปรตีนสายสั้นเพื่อใช้ในการศึกษาหน้าที่และโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวีได้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาอายุระหว่าง 21-60 ปี ทั้งหมด 100 คน เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (Antiretroviral-naïve patients) อาสาสมัครเหล่านี้มาจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย ซึ่งผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีได้รับการตรวจปริมาณ HIV RNA (HIV loads) และค่า CD4+ T cell counts ด้วยวิธีมาตรฐาน

ขนาดตัวอย่าง และ การคำนวณ

กลุ่มประชากรมีการคำนวณจำนวนตัวอย่าง ดังนี้

การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อจีบีไวรัสซี (GB virus C) ของอาสาสมัครจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และศูนย์วิจัยโรคเอดส์ สภากาชาดไทย ซึ่งข้อมูลเดิมของอัตราการติดเชื้อจีบีไวรัสซี คิดเป็นร้อยละ 26 โดยยอมให้มีความคลาดเคลื่อนได้ไม่เกินร้อยละ 5

ดังนั้นจึงนำมาคำนวณจำนวนตัวอย่างได้ดังนี้

กำหนดระดับความเชื่อมั่นในการสรุปข้อมูล = 95%

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.05/2} = 1.96$ (two-tails)

สูตร $n = (Z_{\alpha/2})^2 PQ/d^2$

P = อัตราการติดเชื้อจีบีไวรัสซีในประชากรไทย จากข้อมูลเดิม = 0.26

Q = 1-0.26

d = acceptable error = 0.05

แทนค่า

$n = (1.96)^2 (0.26)(1-0.26) / (0.05)^2$

$= 301.68 \sim 302$

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงใช้ประชากร 302 คน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการคำนวณจำนวนตัวอย่างข้างต้น เพื่อให้มีจำนวนเพียงพอสำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงเลือกกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด จำนวน 300 คน โดยทำการศึกษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวีรายใหม่, ตัวอย่างน้ำเหลือง (plasma) จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้ารับการตรวจปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และน้ำเหลือง (plasma) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เคยเข้าโครงการวิจัยของนพ. ปกรัฐ หังสสูต

ประชากร (Population) ผู้ติดเชื้อเอชไอวี

ประชากรเป้าหมาย (Target Population) ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus ร่วมด้วย

ประชากรกลุ่มควบคุม (Control Population) ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus

วิธีการเข้าถึงอาสาสมัคร (Approach to participant) เป็นผู้ป่วยในความดูแลของแพทย์ผู้วิจัยและติดต่อแพทย์เจ้าของผู้ป่วยในการแนะนำตัวผู้วิจัยแก่อาสาสมัคร

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inclusion criteria)

1. มีช่วงอายุระหว่าง 21 ถึง 60 ปี
2. ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อเอชไอวี (anti-HIV positive)
3. ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral drug-naïve)

เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครออกจากโครงการวิจัย (Exclusion criteria)

1. มีอายุต่ำกว่า 21 ปี หรือสูงกว่า 60 ปี
2. ไม่ได้เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี (anti-HIV negative)
3. แพทย์ผู้ทำการรักษาวินิจฉัยให้เริ่มทำการรักษาด้วยยาต้านไวรัส

กระบวนการขอความยินยอม (Informed consent process) แพทย์ผู้ทำวิจัยอธิบายให้ข้อมูลแล้วให้ผู้ช่วยเป็นผู้แจกเอกสารให้อาสาสมัครนำกลับไปพิจารณาก่อนตัดสินใจ โดยใช้ตัวอย่างการศึกษา ดังนี้

1. น้ำเหลือง (plasma) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เข้ารับการตรวจปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
2. น้ำเหลือง (plasma) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เคยเข้าโครงการวิจัยของนพ. ปกรัฐ หังสสูต

การจัดการกับตัวอย่างทางชีวภาพที่เหลือ

การขอเก็บตัวอย่างไว้เพื่องานวิจัยในอนาคตเป็นระยะเวลา 20 ปี การเก็บตัวอย่างจะใช้รหัสในการระบุถึงตัวตน ซึ่งจะไม่เชื่อมโยงถึงอาสาสมัคร แต่จะมีการใช้ข้อมูลผลการทดลองที่ได้ต่อไปในโครงการวิจัยในอนาคต โดยจะเก็บตัวอย่างไว้ที่ หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้ความดูแลของ นายแพทย์ ปกรัฐ หังสสูต ซึ่งการเข้าถึงตัวอย่างจะต้องได้รับการอนุมัติจาก นายแพทย์ ปกรัฐ หังสสูต ก่อน โครงการวิจัยที่จะศึกษาในอนาคตจะต้องเกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยหลักที่ได้รับการรับรอง และก่อนทำวิจัยจะต้องเสนอโครงร่างให้คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยรับรองจึงจะดำเนินการได้

3.2. การสกัดอาร์เอ็นเอจากพลาสมา (RNA extraction)

พลาสมาจากกลุ่มตัวอย่าง 150 ไมโครลิตรนำไปสกัด RNA ด้วยชุดสกัด RNA จากไวรัส เพื่อนำไปใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human Pegivirus

พลาสมาจากกลุ่มประชากรทั้งหมด 100 คน ได้นำไปสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยใช้ชุดสกัด Viral RNA extraction จากนั้นเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจหา Human pegivirus ในขั้นตอนต่อไป

วิธีการสกัด viral RNA โดยการใช้ Viral RNA extraction kit มีดังนี้

3.2.1 เตรียมพลาสมาปริมาตร 150 ไมโครลิตรใน 1.5 ml tube และใส่สาร RAV 1 ลงไป 600 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer

3.2.2 นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.2.3 เติม absolute ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงไปในหลอด จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex mix เป็นเวลา 10-15 วินาที

3.2.4 เตรียม collection tube และใส่สารผสมลงไป 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.5 เติมสารผสมที่เหลืออีก 700 ไมโครลิตรลงไปใน collection tube และนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.6 เติมสาร RAW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปใน collection tube และนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.7 เติมสาร RAV3 ปริมาตร 600 ไมโครลิตรลงไปใน collection tube และนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.8 เติมสาร RAV3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงไปใน collection tube และนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 5 นาที

3.2.9 เติม Rnase-free water ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงไปใน collection tube ส่วนบน filtered membrane และนำไปปั่นที่ความเร็ว 11,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.2.10 เก็บส่วนของ viral RNA ในหลอด 1.5 ml และเก็บไว้ที่ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3. การศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus

นำพลาสมามาตรวจหา RNA ของ Human Pegivirus ด้วยวิธี Nested-reverse transcriptase-PCR (nested-RT-PCR) โดยใช้ primers ต่อส่วนห้าเอ็นทีอาร์หรือ 5'NTR (nontranslate region) และส่วนเปลือกนอกของไวรัสหรือเอ็นวิลอปสองหรือ E2 (envelope glycoprotein E2)

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของ 5'NTR และ E2 ที่ใช้ในการตรวจหาจีบีไวรัสซีในกระแสเลือด (Human Pegivirus viraemia)

Regions	Outer primers	Inner primers	Product Size (bps)
5'NTR	+AAGCCCCAGAAACCGAC GCC -TGAAGGGCGACGTGGAC CGT	+CGGCAAAAGGTGGTGGATG -GTAACGGGCTCGGTTTAACG	204
E2	+TGTGGGGTTCCGTDTCTT GGTT -RAACGTHCCRCTVGGAG GCT	+TGGNTCWGCCAGCTGYACCA TAGC -DTCYCGGATCTTGGTCATGG	340

3.4. การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

ใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR (nontranslate region) สำหรับการศึกษา genotype ของ Human Pegivirus มาตรวจหา ด้วยวิธี Nested PCR (nested-PCR) และทำการหาลำดับเบสโดยวิธี sequencing จากนั้นนำลำดับเบสของส่วน 5'NTR ของ Human Pegivirus มาทำการวิเคราะห์ genotypes ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ต่อ 5'NTR ที่ใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์ของ Human Pegivirus

Regions	Outer primers	Inner primers	Product size (bps)
5'NTR	+ GGTCGTAAATCCCGGTCACC -CCCACTGGTCCTTGTCAACT	+TAGCCACTATAGGTGGGTCT -ATTGAAGGGCGACGTGGA CC	188

3.5. การวิเคราะห์ความหลากหลายของ E2 และ NS5A ของ Human Pegivirus

นำพลาสมาที่สกัดสารพันธุกรรมแล้วมาวิเคราะห์ลำดับเบสของ E2 และ NS5A ของ Human Pegivirus ด้วยวิธี Nested-RT-PCR และแปลงลำดับเบสให้เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม Clustal W จากนั้นวิเคราะห์ความหลากหลายอะมิโนแอซิดของ E2 และ NS5A จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละคน เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของ E2 และ NS5A กับการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี โดยการวิเคราะห์จากค่าปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV loads) และค่าทางภูมิคุ้มกัน CD4+ T cell counts

ตารางที่ 3 แสดงลำดับเบสของไพร์เมอร์ต่อส่วน E2 และ NS5A ของ Human Pegivirus

Regions	Outer primers	Inner primers	Product size (bps)
E2	+GDC GYG AYT CGA ARA TMG AYG -AAGATCAACGGGACCAGCCG TGCCTCA	+ GATATCGAARATMGAYG TGTGGAG - TTAGGTACCGCCTCAGC CAGCTTCAT	745
NS5A	+ ATGTNYTGAATGGGCAACTC - TCCCCAHACWGGCATCTCTC	+ ATGYTDGGBTAYGGNGARAC - GTCTCCGTYCCDAKBTCAAT	378

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลของอาสาสมัครประกอบด้วย เพศ, อายุ, ช่วงเวลาที่ติดเชื้อเอชไอวี, ค่าเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA) จะถูกรวบรวมเพื่อใช้วิเคราะห์ร่วมกับอุบัติการณ์การติดเชื้อ Human Pegivirus โดยเปรียบเทียบระหว่างผู้ติดเชื้อร่วมของเอชไอวีและ Human Pegivirus และผู้ติดเชื้อเอชไอวีเพียงอย่างเดียว และข้อมูลด้านความหลากหลายของอะมิโนแอซิด (amino acid polymorphism) ของส่วน Envelope 2 และ nonstructural 5A ของ Human Pegivirus จะวิเคราะห์ร่วมกับค่าเอชไอวีในกระแสเลือด (plasma HIV RNA)

3.7. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้วิเคราะห์ (Data Analysis and Statistics)

การเปรียบเทียบระหว่างสองตัวแปรจะใช้ Mann-Whitney test และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสองตัวแปรจะใช้ Spearman's rank correlation test และค่า P values ที่น้อยกว่า 0.05 แสดงว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

3.8. การหาปริมาณ Human Pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR)

ใช้ Viral RNA ที่ปริมาณ 100 นาโนกรัม ในการวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR) ได้เป็นหน่วย copies ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณสารที่ต้องใช้เพื่อการวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR)

Reagents	Volume per reaction (ul)	Final concentration
Supermix	5	1x
Reverse transcriptase	2	20 U/ul
300 mM DTT	1	15 mM
Primers and probe	1	250 nM
RNase/DNase-free water	10	-
Viral RNA	Variable	100 ng

เตรียม master mix ดังแสดงในตารางที่ 4 สำหรับตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดและ negative controls 2 ชนิด คือ negative control ที่ไม่มีการใส่ viral RNA และ negative control ที่ไม่มีการใส่ Reverse transcriptase และทำสองซ้ำ (Duplicate) ของตัวอย่างทั้งหมด, negative และ positive controls สำหรับการทำการทดลองแต่ละครั้ง ใช้ One-Step RT-ddPCR Advanced kit for probes (Biorad) และใช้เครื่อง Bio-Rad

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C1000 Touch Thermal Cycler ในการทำ PCR ด้วย conditions ที่ได้ทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ Digital droplet PCR (ddPCR)

Cycling step	Temperature (Celsius)	Time	Number of cycles
Reverse transcription	50	60 mins	1
Enzyme activation	95	10 mins	1
Denaturation	95	30 sec	40
Annealing/extension	59	1 mins	
Enzyme deactivation	98	10 mins	1
Hold	4	-	1

3.9. ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Consideration)

โดยวิเคราะห์ตามหลักจริยธรรมการวิจัยในคน 3 ข้อ หลักความเคารพในบุคคล (Respect for person)

โครงการวิจัยนี้ครอบคลุมถึง

การเคารพในศักดิ์ศรีความเป็นมนุษย์ โครงการวิจัยนี้กระทำอยู่บนพื้นฐานของความเท่าเทียมกันไม่มีการเลือกปฏิบัติไม่ว่าอาสาสมัครเข้าโครงการวิจัยจะมีเชื้อชาติ เศรษฐฐานะ ระดับการศึกษา พื้นฐานทางวัฒนธรรมหรือภาษาพูด เป็นอย่างไร และในเอกสารชี้แจงรายละเอียดของโครงการวิจัยได้นำเสนอข้อมูลเกี่ยวกับโครงการวิจัยอย่างถูกต้อง ครบถ้วน และไม่มีการปิดบังรายละเอียดแต่อย่างใด อาสาสมัครเข้าโครงการวิจัยจะไม่ถูกละเลยสิทธิในการได้รับการดูแลรักษา และมีสิทธิที่จะถอนตัวจากโครงการวิจัยได้อย่างเสรีโดยไม่ต้องชดใช้ค่าเสียหาย ท้ายที่สุดโครงการวิจัยนี้ไม่มีการชักจูงให้อาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยโดยการเสนอให้อามิสสินจ้าง

การเคารพในศักดิ์ศรีของกลุ่มเปราะบางและอ่อนแอ ช่วงอายุของกลุ่มประชากรเป้าหมายในโครงการวิจัยนี้อยู่ที่อายุระหว่าง 21 ถึง 60 ปี ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงไม่มีบุคคลที่อายุต่ำกว่า 18 ปีหรือผู้เยาว์เข้าร่วมโครงการวิจัยแต่อย่างใด สำหรับผู้ใหญ่ที่ด้อยความสามารถในการตัดสินใจ การตัดสินใจเข้าร่วมในโครงการวิจัยสามารถถูกกระทำโดยผู้แทนโดยชอบธรรมซึ่งทางผู้ทำการวิจัยได้จัดให้มีเอกสารแสดงความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยินยอมของผู้แทนโดยชอบธรรมซึ่งได้ชี้แจงสิทธิพื้นฐานของอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยไว้อย่างละเอียดเช่นกัน

การเคารพในความเป็นส่วนตัวยังครอบคลุมการรักษาความลับ ข้อมูลของอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งในส่วนของข้อมูลทางการแพทย์และ/หรือข้อมูลทั่วไปจะได้รับการปกปิดโดยไม่มีการเปิดเผยแก่สาธารณชนไม่ว่ากรณีใดๆ ซึ่งรายละเอียดของการรักษาข้อมูลของอาสาสาสมัครได้ถูกชี้แจงอย่างละเอียดในหัวข้อการปกป้องรักษาข้อมูลของอาสาสมัครในเอกสารชี้แจงราย ละเอียดโครงการวิจัย

หลักการให้ประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (Beneficence/Non-maleficence)

โครงการวิจัยนี้มีประโยชน์ที่ครอบคลุมทั้งการให้คุณประโยชน์และการไม่ก่อให้เกิดโทษ โดยได้มีการชี้แจงออกมาในหัวข้อประโยชน์ที่ได้รับและความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้นในการเข้าร่วมโครงการวิจัยในเอกสารชี้แจงรายละเอียดโครงการวิจัย

หลักความยุติธรรม (Justice)

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายอยู่ที่การศึกษาค้นคว้าให้ได้มาซึ่งวิธีที่สามารถช่วยควบคุมปริมาณเอชไอวีในผู้ติดเชื้อเอชไอวี และประชากรที่เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ส่วนหนึ่งคือผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อเอชไอวี จึงสามารถที่จะกล่าวได้ว่าข้อมูลที่จะได้จากโครงการวิจัยนี้เป็นประโยชน์สำหรับกลุ่มประชากรที่ถูกเลือกเข้ามาทำการศึกษาอย่างโดยตรง โดยมีการคัดเลือกอาสาสมัครแบบสุ่ม โดยอาสาสมัครจะต้องมีคุณสมบัติตรงตามเกณฑ์ที่ได้แจ้งไว้ใน (inclusion criteria) จึงจะสามารถเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1. การรวบรวมข้อมูลของกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยที่ทำการศึกษาในมนุษย์ จึงต้องมีการขอจริยธรรมการวิจัย โดยโครงการนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมี approval number คือ 10/2561

การรวบรวมกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา โดยเป็นกลุ่มประชากรอายุระหว่าง 21-60 ปี ที่ติดเชื้อเอชไอวีจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และศูนย์วิจัยโรคเอดส์สภากาชาดไทย จำนวน 100 คน โดยเก็บตัวอย่างเลือด และนำมาแยกพลาสมาเพื่อใช้ในการตรวจหา Human pegivirus เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ Human pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย

ตารางที่ 6 แสดง ข้อมูลของกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

Demographic data	Data (n=100)
Gender: Male	71/100 (71%)
Female	29/100 (29%)
HIV-RNA loads (copies/ml)	11,932 (44-5,349,748)
HIV-RNA loads (log)	4.02 (1.64-6.73)

จากตารางที่ 6 ข้อมูลของกลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อ Human pegivirus ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย จำนวน 100 คน พบว่า ส่วนใหญ่เป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง คือ เพศชายจำนวน 71% และเพศหญิง 29% จากค่าปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือดหรือ plasma HIV-RNA loads พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 11,932 copies/ml โดยมีค่า plasma HIV-RNA loads ของกลุ่มประชากรที่ต่ำสุดและค่าสูงสุดอยู่ที่ 44 และ 5,349,748 copies/ml ตามลำดับ และค่า Log ของปริมาณเอชไอวีในกระแสเลือด พบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 4.02 และค่า Log ต่ำสุดและสูงสุดอยู่ที่ 1.64 และ 6.73 ตามลำดับ

4.2. การสกัด Viral RNA จากตัวอย่างน้ำเหลือง (plasma)

การตรวจหา Human pegivirus ด้วยการใช้ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) มีการศึกษาหาอุณหภูมิและ condition ที่เหมาะสมของ primers ต่อส่วน 5'nontranslated region

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือ 5'NTR ของ Human pegivirus ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า condition ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR

Steps	Temperature (C)	Time
Reverse Transcription PCR	42	5 mins
cDNA amplification		
Enzyme activation	95	3 mins
Denature	95	3 seconds
Annealing	59	20 seconds
For 40 cycles		
Extension	72	2 mins
Hold	4	-

ตารางที่ 8 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR ด้วยวิธี Nested-PCR

Steps	Temperature (C)	Time
Enzyme activation	94	5 mins
Denature	95	30 seconds
Annealing	54	30 seconds
Extension	72	30 seconds
For 35 cycles		
Final Extension	72	5 mins
Hold	4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงการเตรียม reaction ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR ด้วยวิธี RT-PCR

Reagents	Volumes (ul)
Rnase-free water	5.8
Master mix	10
Forward primer	0.4
Reverse primer	0.4
50x RT mix enzymes	0.4
Viral RNA	3

ตารางที่ 10 แสดงการเตรียม reaction ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน 5'NTR ด้วยวิธี Nested-PCR

Reagents	Volumes (ul)
Rnase-free water	18.2
10x buffer	2.5
10 mM dNTP	0.5
MgCl2	0.75
Forward primer	0.4
Reverse primer	0.4
Taq polymerase	0.25
DNA	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดง primers ต่อส่วน 5'NTR ของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR

Reaction	Primer sequences
Reverse transcriptase-PCR	
Forward primer	AAGCCCCAGAAACCGACGCC
Reverse primer	TGAAGGGCGACGTGGACCGT
Nested-PCR	
Forward primer	CGGCAAAAGGTGGTGGATG
Reverse prime	GTAACGGGCTCGGTTTAACG

ภาพที่ 1 แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของ 5'NTR ของ Human pegivirus ด้วยการใช้ gel electrophoresis

จากรูปที่ 1 แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของ Human pegivirus ด้วยการใช้ gel electrophoresis หลังจากขั้นตอน Reverse transcriptase PCR และ Nested PCR โดยใช้ปริมาณ gel ที่ 2% และ 25 basepairs ladder เป็น marker สำหรับส่วน 5'NTR ของ Human pegivirus ที่มีขนาด 208 basepairs

ผลการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด 15 คน พบว่ามีผู้ติดเชื้อเอชไอวี 7 คนที่สามารถตรวจพบส่วน 5'NTR ของ Human pegivirus ได้ แสดงว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีนี้มีการติดเชื้อ Human pegivirus ร่วมด้วย (coinfection) เนื่องจากสามารถตรวจพบสารพันธุกรรมได้ในตัวอย่างเลือด (plasma) ซึ่งผู้วิจัยจะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เหลืออยู่จนครบ 100 คน

4.2.1 การศึกษาอุบัติการณ์ของ Human pegivirus viremia ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยด้วยวิธี Nested RT-PCR โดยใช้ 5'NTR primers

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด 100 คน ได้มีการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อแยกส่วน plasma เพื่อตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus หรือ HPgV viremia ด้วยวิธี Nested RT-PCR โดยได้มีการสกัด viral RNA จาก plasma และได้มีการตรวจ HPgV viremia ด้วยวิธี Nested RT-PCR โดยใช้ primer ต่อส่วน 5'nontranslated region ของไวรัสจากผู้ติดเชื้อทั้งหมด 100 คนแล้ว พบว่า มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดเชื้อ Human pegivirus ร่วมด้วย (coinfection) ทั้งหมด 35 คน คิดเป็น 35% ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนได้ที่ประมาณหนึ่งในสามของผู้ติดเชื้อทั้งหมด

4.2.2 การศึกษาอุบัติการณ์ของ Human pegivirus viremia ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย ด้วยวิธี Nested RT-PCR โดยใช้ E2 primers

จากผลการศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยการตรวจวัดชิ้นส่วนของ 5'nontranslated region จากนั้นจะมีการตรวจชิ้นส่วนของไวรัสส่วนอื่น เพื่อยืนยันการติดเชื้อ Human pegivirus ในกระแสเลือด โดยการศึกษาชิ้นส่วนของส่วนเปลือกนอนกของไวรัสหรือ Envelope 2 (E2) ซึ่งการศึกษานี้ได้มีการหา conditions ที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสารพันธุกรรม Envelope 2 ของ Human pegivirus ในกระแสเลือด โดยการใช้ primers ที่จำเพาะต่อ Envelope 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 และใช้วิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR ในการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส ดังแสดง 13 และ 14 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แสดง primers ต่อส่วน Envelope 2 ของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR

Reaction	**Primer sequences**
Reverse transcriptase-PCR	
Forward primer	TGTGGGGTTCCGTDTCTTGGTT
Reverse primer	RAACGTHCCRCTVGGAGGCT
Nested-PCR	
Forward primer	TGGNTCWGCCAGCTGYACCATAGC
Reverse prime	DTCYCGGATCTTGGTCATGG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน E2 ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR

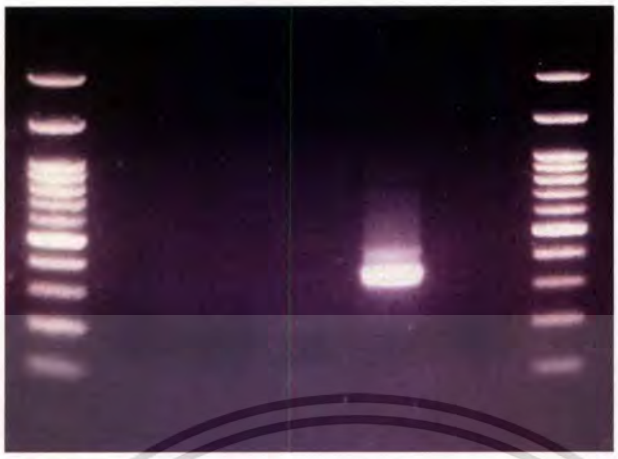
Steps	Temperature (C)	Time
Reverse Transcription PCR	42	5 mins
cDNA amplification		
Enzyme activation	95	3 mins
Denature	95	3 seconds
Annealing	54	20 seconds
For 40 cycles		
Extension	72	2 mins
Hold	4	-

ตารางที่ 14 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน E2 ด้วยวิธี Nested-PCR

Steps	Temperature (C)	Time
Enzyme activation	94	5 mins
Denature	95	30 seconds
Annealing	53	30 seconds
Extension	72	30 seconds
For 35 cycles		
Final Extension	72	5 mins
Hold	4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ภาพที่ 2</u> แสดงการตรวจหาสารพันธุกรรมของ E2 ของ Human pegivirus ด้วยการใช้ gel electrophoresis



จากการศึกษาหา conditions ที่เหมาะสมในการตรวจหาไวรัสในกระแสเลือดของ Human pegivirus ด้วยการตรวจชิ้นส่วนของ Envelope 2 พบว่า เมื่อนำไปใช้ตรวจในตัวอย่างเลือดจริงของผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 50 ราย พบว่า ไม่สามารถตรวจหาชิ้นส่วนของไวรัสชนิดนี้ได้ และได้มีการใช้ตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ตรวจพบการติดเชื้อ Human pegivirus โดยการใช้ชิ้นส่วน 5'NTR ก็ไม่สามารถตรวจหาชิ้นส่วน E2 ได้เช่นกัน ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า อาจเป็นเพราะว่า conditions ที่ใช้ในการทำ Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR นั้น อาจจะยังไม่เหมาะสม จึงได้ปรับ conditions ใหม่ โดยปรับ annealing temperature และ จำนวน cycles พบว่า ยังไม่สามารถตรวจพบชิ้นส่วนนี้ในตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้ ผู้วิจัยจึงได้ใช้ primers ที่ใช้ในการตรวจหาชิ้นส่วน E2 ชุดใหม่ เนื่องจากมีสมมุติฐานว่า primers ชุดเดิมนั้น อาจจะจับกับชิ้นส่วนของไวรัสไม่ได้ หรือจับได้แต่จับได้ไม่ดี จึงทำให้ไม่สามารถตรวจหาชิ้นส่วน E2 ได้ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR สำหรับ primers ชุดนี้ ดังแสดงในตารางที่ 12 ผู้วิจัยได้ใช้ primers ต่อชิ้นส่วน E2 ชุดใหม่ในการตรวจหาการติดเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 แสดง primers ต่อส่วน Envelope 2 ชุดที่สองของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR

Reaction	Primer sequences
Reverse transcriptase-PCR	
Forward primer	GDC GYG AYT CGA ARA TMG AYG
Reverse primer	AAGATCAACGGGACCAGCCGTGCCTCA
Nested-PCR	
Forward primer	GATATCGAARATMGAYGTGTGGAG
Reverse prime	TTAGGTACCGCCTCAGCCAGCTTCAT

ผู้วิจัยได้ทดลองหา conditions ที่เหมาะสมในการตรวจหาชิ้นส่วนของ envelope 2 ของ Human pegivirus โดยการใช้ primers ชุดใหม่ และทดลองหา annealing temperature ที่เหมาะสม พบว่าไม่สามารถตรวจหาชิ้นส่วนนี้ได้ในตัวอย่างผู้ติดเชื้อเอชไอวี เนื่องจากชิ้นส่วน envelope ของไวรัสมักมีความหลากหลายของลำดับอะมิโนแอซิด (amino acids) หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ที่สูงมาก จึงอาจทำให้ไม่สามารถออกแบบ ผู้วิจัยมีสมมุติฐานว่า สายพันธุ์ของ Human pegivirus ที่พบได้ในประเทศไทยอาจจะไม่สามารถตรวจหาการติดเชื้อในกระแสเลือดโดยการตรวจที่ envelop 2 ด้วย primers ทั้งสองชุดนี้ได้ ผู้วิจัยได้เปลี่ยนการตรวจชิ้นส่วนของไวรัสจากการตรวจ envelop 2 เป็นการตรวจหาการติดเชื้อโดยการตรวจที่ nonstructural 5A หรือ NS5A แทน เนื่องจากเป็นชิ้นส่วนของไวรัสที่มีความหลากหลายของลำดับอะมิโนแอซิด (amino acids) หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ที่น้อยกว่า envelop 2 และสามารถใช้เพื่อตรวจหาการติดเชื้อในกระแสเลือดได้เช่นกัน

4.2.3 การศึกษาอุบัติการณ์ของ Human pegivirus viremia ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย ด้วยวิธี Nested RT-PCR โดยใช้ NS5A primers

ผู้วิจัยได้เปลี่ยนการตรวจหาชิ้นส่วนของไวรัสจาก envelope 2 มาเป็น nonstructural 5A หรือ NS5A และได้ใช้ primers ชุดใหม่ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนนี้ ดังแสดงในตารางที่ 15 เพื่อทดลองหา conditions ที่เหมาะสมในการตรวจหาชิ้นส่วนของ nonstructural 5A ของ Human pegivirus และทดลองหา annealing temperature ที่เหมาะสม พบว่าสามารถหา conditions ที่เหมาะสมในการตรวจหาชิ้นส่วน NS5A ของ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR เพื่อศึกษาการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ ดังแสดงในตารางที่ 16 และตารางที่ 17 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 แสดง primers ต่อส่วน Envelope 2 ชุดที่สองของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR

Reaction	Primer sequences
Reverse transcriptase-PCR	
Forward primer	ATGGTYTAYGGYCCTGGVCAAA
Reverse primer	TACTGCARTCYTCCATGATGACAT
Nested-PCR	
Forward primer	CTGGVCAAAGYGTYACCATT
Reverse prime	TTCAAGAATCCTCGCAGCATTCT

ตารางที่ 17 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน NS5A ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR

Steps	Temperature (C)	Time
Reverse Transcription PCR	42	5 mins
cDNA amplification		
Enzyme activation	95	3 mins
Denature	95	3 seconds
Annealing	54.9	20 seconds
For 40 cycles		
Extension	72	2 mins
Hold	4	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 แสดง condition ที่เหมาะสมของการตรวจหาการติดเชื้อ Human pegivirus โดยใช้ primers ต่อส่วน NS5A ด้วยวิธี Nested-PCR

Steps	Temperature (C)	Time
Enzyme activation	94	5 mins
Denature	95	30 seconds
Annealing	55.4	30 seconds
Extension	72	30 seconds
For 35 cycles		
Final Extension	72	5 mins
Hold	4	

จากผลการศึกษาการติดเชื้อ Human pegivirus ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย จำนวน 100 คน โดยการใช้ primers ต่อส่วน nonstructural 5A ด้วยวิธี Reverse transcriptase-PCR และ Nested-PCR พบว่า มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดเชื้อ Human pegivirus ร่วมด้วย (coinfection) ทั้งหมด 35 คน คิดเป็นร้อยละ 38 ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนได้ที่ประมาณหนึ่งในสามของผู้ติดเชื้อทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษาการติดเชื้อ Human pegivirus ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีโดยการตรวจชิ้นส่วนของไวรัส envelope 2 และ nonstructural 5A พบว่าสามารถตรวจอัตราการติดเชื้อได้ใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 35 และร้อยละ 38 ตามลำดับ เมื่อใช้การวิเคราะห์โดยให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่สามารถตรวจชิ้นส่วนของไวรัสทั้ง envelope 2 และ nonstructural 5A เพื่อเป็นการยืนยันการตรวจพบเชื้อในกระแสเลือดเป็นผู้ติดเชื้อ Human pegivirus พบว่ามีอัตราการติดเชื้อร้อยละ 27 ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมด จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การตรวจการติดเชื้อในกระแสเลือดของ Human pegivirus จะต้องใช้การตรวจชิ้นส่วนของไวรัสอย่างน้อยสองโปรตีน โดยการใช้ primers ต่อชิ้นส่วน envelope 2 และ nonstructural 5A ให้ผลที่น่าเชื่อถือ ผู้ที่สามารถตรวจพบทั้งสองโปรตีนได้ในกระแสเลือด จะถูกจัดว่าเป็นผู้ที่มี Human pegivirus ในกระแสเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวัดปริมาณไวรัสของ Human pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR)

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการหาปริมาณของไวรัสของ Human Pegivirus โดยมีสมมติฐานว่า ปริมาณของไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดน่าจะมีผลต่อการควบคุมหรือการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวี (HIV replication) ในกระแสเลือดได้ ผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus และมีปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ที่สูงน่าจะมีผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีที่ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus และมีปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ที่ต่ำกว่า ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดโดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) และออกแบบ Primers และ probes ในการตรวจหา Human Pegivirus ที่จำเพาะต่อส่วน 5'nontranslated region หรือ 5'NTR ของไวรัส และรายงานผลของปริมาณไวรัสในกระแสเลือดเป็นหน่วย copies ต่อมิลลิลิตร จากการคำนวณสัญญาณของการวัดจาก events มาเป็นหน่วย copies ต่อมิลลิลิตรหรือ copies/ml

4.3.1 การพัฒนาวิธีการตรวจปริมาณของไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR)

ผู้วิจัยได้ใช้ตัวอย่างเลือดหรือ plasma จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการตรวจยืนยันแล้วว่ามีการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือด ซึ่งพบว่าสามารถตรวจเจอชิ้นส่วนของไวรัสทั้ง 5'NTR และ NS5A มาใช้เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสในเบื้องต้น และได้ออกแบบ primers และ probe เพื่อใช้ตรวจหาปริมาณไวรัสต่อชิ้นส่วนของ 5'NTR ดังแสดงในตารางที่ 19

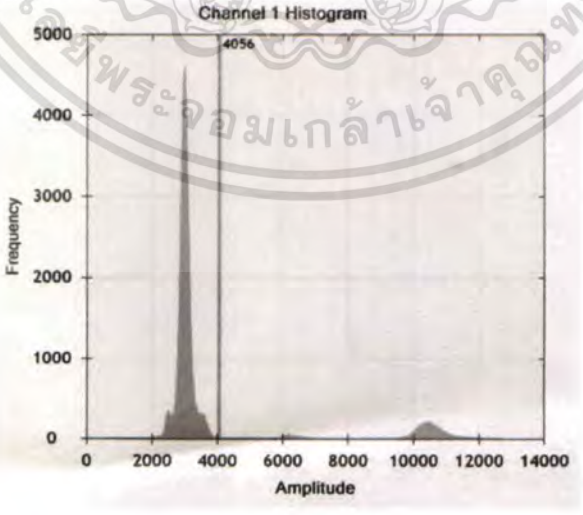
ตารางที่ 19 แสดง primers และ probe ต่อส่วน 5'NTR ของ Human pegivirus ที่ใช้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของ Human pegivirus ด้วยวิธี Digital droplet PCR (ddPCR)

Reaction	Primer sequences
Primers	
Forward primer	CGCTGATCGTGCAAAGGGATG
Reverse primer	GCTCCACGGACGTCACACTGG
Probe	
FAM-	GCACCACTCCGTACAGCCTGAT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

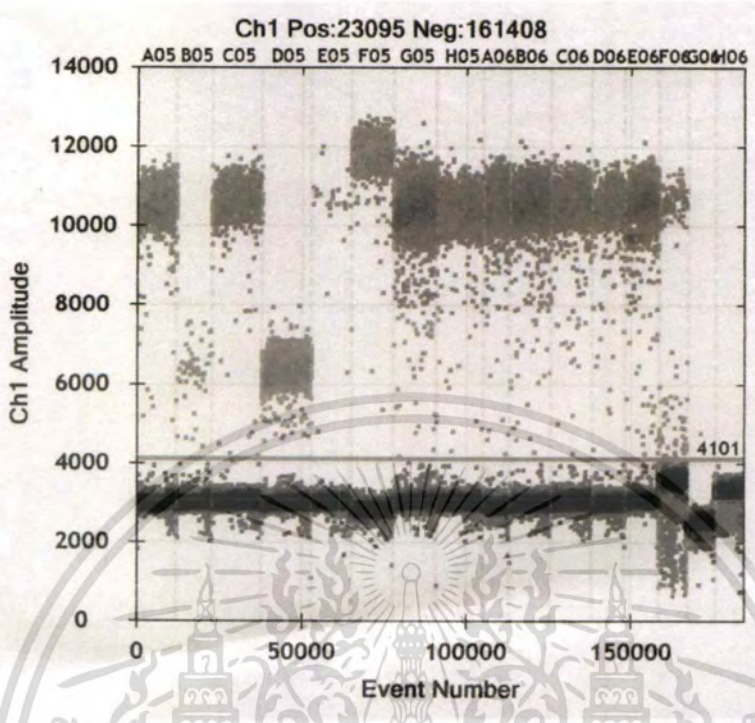
จากผลการพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) โดยออกแบบ primers และ probe ต่อส่วน 5'NTR นั้น พบว่าสามารถหาตำแหน่งที่ใช้ในการแปลผลเพื่ออ่านค่าสัญญาณของการวัดจากเครื่อง (Amplitude) ในการแยกผลบวกและผลลบได้อย่างแม่นยำ รวมทั้งผลของปริมาณสัญญาณการวัดหรือ Frequency ก็ให้ค่าที่น่าเชื่อถือเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 3 แสดงว่าวิธีการตรวจปริมาณไวรัสด้วย primers และ probe ต่อส่วน 5'NTR ให้ผลที่ดีและน่าเชื่อถือ จากนั้นผู้วิจัยได้ใช้ condition นี้ในการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของ Human Pegivirus จากตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีผลยืนยันว่ามีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ดังแสดงในภาพที่ 4 จากผลการวัดปริมาณไวรัสในกระแสเลือดของ Human Pegivirus โดยการอ่านค่าสัญญาณจากเครื่อง พบว่า ผู้ติดเชื้อเอชไอวีแต่ละรายมีปริมาณของไวรัสในกระแสเลือดของ Human Pegivirus ที่ไม่เท่ากัน เมื่อเปรียบเทียบกับสัญญาณของ negative controls ทั้งสองค่า พบว่า การวัดปริมาณไวรัสนี้ให้ผลที่น่าเชื่อถือ และสามารถวัดค่าปริมาณไวรัสได้หลายค่า และเมื่อเปรียบเทียบค่าสัญญาณการวัดกับปริมาณค่าสัญญาณของ droplet พบว่า แต่ละตัวอย่างที่ทำการวัด รวมทั้ง negative controls ทั้งสองตัวอย่าง มีปริมาณของ droplet ที่มากกว่า 8,000 ขึ้นไป แสดงว่าค่าสัญญาณที่อ่านได้นั้นมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 14 ราย และ negative controls จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ไม่ใส่ template และตัวอย่างที่ไม่ใส่ reverse transcriptase และใช้ค่าสัญญาณของ negative controls ทั้งสองตัวอย่างในการกำหนดค่าปริมาณของไวรัส

<u>ภาพที่ 3</u> แสดงการแปลผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ในรูปแบบกราฟ

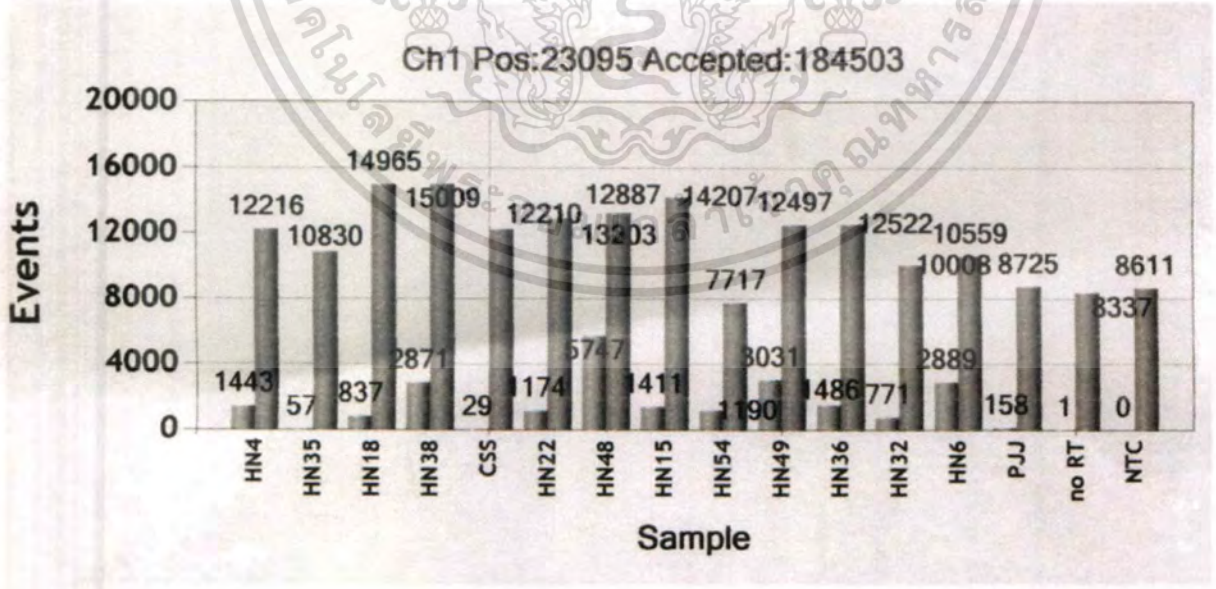


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4 แสดงการผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี



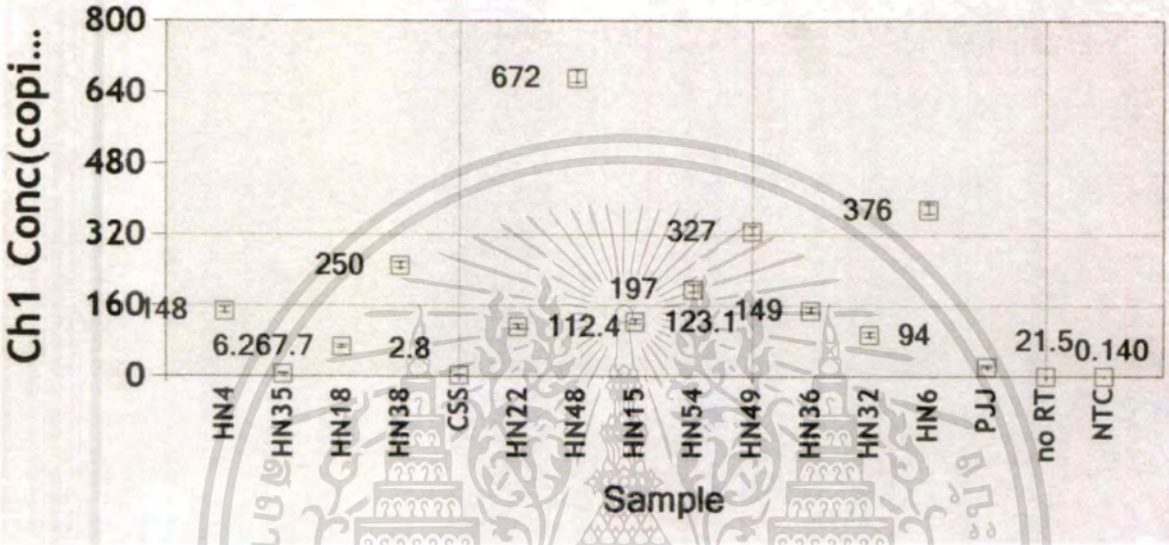
ภาพที่ 5 แสดงการผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีในรูปแบบของสัญญาณที่ได้มาจาก Droptet



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ในหน่วย copies/ml โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 14 ราย ดังแสดงในรูปที่ 6

<u>ภาพที่ 6</u> แสดงการผลค่าปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus (copies/ml) โดยการใช้ Digital droplet PCR (ddPCR) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการหาอุบัติการณ์การติดเชื้อ Human Pegivirus ในประเทศไทย โดยทำการศึกษาการระบาดของ Human Pegivirus ในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย เนื่องจากมีการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีผลให้การดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีดีกว่าในกลุ่มผู้ที่ไม่มีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus โครงการนี้จึงศึกษาการระบาดของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย จำนวน 100 คน โดยพัฒนาวิธีการตรวจหาการติดเชื้อไวรัส Human Pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptase nested polymerase chain reaction หรือ Reverse transcriptase nested-PCR และใช้ชิ้นส่วนของไวรัสในการตรวจหา 2 โปรตีน คือ ชิ้นส่วน 5'nontranslated region (5'NTR) และ nonstructural 5A (NS5A) ในการออกแบบ primers เพื่อใช้ในการตรวจวัด โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดโดยใช้ primers ต่อ 5'NTR และ NS5A ด้วยวิธี Reverse transcriptase nested-PCR ได้สำเร็จและให้ผลที่น่าเชื่อถือ กล่าวคือ การตรวจพบชิ้นส่วนของไวรัสของ Human Pegivirus ทั้งสองชิ้นส่วน ผู้ติดเชื้อเอชไอวีจะได้รับการวินิจฉัยว่ามีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในกระแสเลือด ซึ่งถ้าผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีการตรวจพบเพียงชิ้นส่วนเดียว คือตรวจพบ 5'NTR หรือ NS5A อย่างใดอย่างหนึ่ง จะไม่ได้รับการวินิจฉัยยืนยันว่าการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในกระแสเลือด ดังนั้น โครงการนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดที่น่าเชื่อถือของการตรวจ Human Pegivirus ในกระแสเลือดได้สำเร็จ และสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาการระบาดของ Human Pegivirus ได้ในกลุ่มประชากรอื่นๆ ในประเทศไทย เนื่องจากโครงการนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจ Human Pegivirus ที่ออกแบบมาจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่พบได้ในประเทศไทย โครงการวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการพัฒนาวิธีการตรวจหาการระบาดของ Human Pegivirus ด้วยวิธี Reverse transcriptare nested-PCR อีกทั้งยังเป็นงานวิจัยแรกที่ได้มีการตรวจหารการระบาดหรืออุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในคนไทย

จากผลการศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย จำนวน 100 คน พบว่า การใช้ primers ต่อชิ้นส่วน 5'NTR ของ Human Pegivirus จะพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ที่ร้อยละ 35 และเมื่อใช้ primers ต่อชิ้นส่วน NS5A ของ Human Pegivirus จะพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ที่ร้อยละ 38 ซึ่งการให้ primers ทั้งสองชนิดนี้แสดงอัตราการติดเชื้อ Human Pegivirus ไม่แตกต่างกันมาก แต่เมื่อวิเคราะห์ผลอุบัติการณ์ของการติดเชื้อโดยวินิจฉัยผู้ที่มีการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดจากการตรวจพบทั้งสองชิ้นส่วนของไวรัส คือ การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจพบทั้ง 5'NTR และ NS5A ในกระแสเลือด พบว่ามีอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ที่ร้อยละ 27 เมื่อเปรียบเทียบกับผลอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus โดยการใช้ primers ต่อชิ้นส่วน 5'NTR หรือ NS5A เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งนั้น ให้ผลความคลาดเคลื่อนของอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ที่แตกต่างกันถึงร้อยละ 8 และร้อยละ 11 ตามลำดับ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การศึกษาการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Reverse transcriptase nested-PCR ควรจะใช้ primers ต่อชิ้นส่วน 5'NTR และ NS5A ในการวิเคราะห์ผล

โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดโดยการใช้เทคโนโลยีใหม่ คือ Droplet Digital polymerase chain reaction หรือ ddPCR โดยการออกแบบ primers ให้จำเพาะต่อชิ้นส่วน 5'nontranslated region (5'NTR) ของไวรัสได้สำเร็จ โดยสามารถวัดปริมาณของไวรัสได้ในหน่วย copies ต่อมิลลิลิตรหรือ copies/ml ซึ่งเป็นหน่วยการวัดที่ใช้ทั่วไปและเป็นมาตรฐานสำหรับการแปลผลปริมาณของไวรัสในกระแสเลือด

5.2 ข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดได้โดยการใช้ Droplet Digital polymerase chain reaction หรือ ddPCR ได้สำเร็จ และได้ทดลองวัดในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในกระแสเลือด จำนวน 14 ราย พบว่าให้ผลการตรวจวัดปริมาณไวรัสที่น่าเชื้อถือ ผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะให้มีการตรวจวัดปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus เพิ่มเติม เพื่อศึกษาปริมาณของไวรัสของ Human Pegivirus ที่พบได้ในประเทศไทย และศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีเพิ่มเติม เพื่อศึกษาผลของปริมาณของไวรัส Human Pegivirus ที่อาจมีผลในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเอชไอวี (HIV replication) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ผลการศึกษาที่ได้จากโครงการวิจัย

ผลผลิตที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ คือ วิธีการตรวจการติดเชื้อในกระแสเลือดของ Human Pegivirus ในประชากรคนไทย ด้วยวิธี Reverse transcriptase nested polymerase chain reaction หรือ Reverse transcriptase nested-PCR โดยตรวจที่ชิ้นส่วน 5'nontranslated region (5'NTR) และ nonstructural 5A (NS5A) ของไวรัส และวิธีการหาปริมาณไวรัสของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดด้วยวิธี Droplet Digital polymerase chain reaction หรือ ddPCR และได้พัฒนาวิธีการตรวจทั้งสองชนิดให้สามารถใช้ในประชากรคนไทยได้ และได้ตรวจสอบวิธีการตรวจให้มีความแม่นยำและให้ผลที่น่าเชื่อถือ รวมทั้งได้ผลอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ Human Pegivirus ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย โดยพบว่าผู้ติดเชื้อเอชวีมีการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดที่ร้อยละ 27 หรือประมาณหนึ่งในสามของผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทยทั้งหมด

6.2 ผลผลิตที่ได้จากโครงการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ในการศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อร่วมของ Human Pegivirus ในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย สามารถนำผลการทดลองไปใช้ในการเขียนโครงการวิจัยเพื่อเสนอขอรับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ (Research Grant for New Scholar, MRG) ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และได้รับทุนวิจัยนี้เพื่อทำการศึกษาวิจัยนี้ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง

1. Philpott S, Weiser B, Anastos K, Kitchen CM, Robison E, Meyer WA, 3rd, et al. Preferential suppression of CXCR4-specific strains of HIV-1 by antiviral therapy. J Clin Invest. 2001 Feb;107(4):431-8.

2. Grivel JC, Garcia M, Moss WJ, Margolis LB. Inhibition of HIV-1 replication in human lymphoid tissues ex vivo by measles virus. J Infect Dis. 2005 Jul 1;192(1):71-8.

3. McLinden JH, Stapleton JT, Chang Q, Xiang J. Expression of the dengue virus type 2 NS5 protein in a CD4(+) T cell line inhibits HIV replication. J Infect Dis. 2008 Sep 15;198(6):860-3.

4. Xiang J, Wunschmann S, Diekema DJ, Klinzman D, Patrick KD, George SL, et al. Effect of coinfection with GB virus C on survival among patients with HIV infection. N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):707-14.

5. Tillmann HL, Heiken H, Knapik-Botor A, Heringlake S, Ockenga J, Wilber JC, et al. Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. N Engl J Med. 2001 Sep 6;345(10):715-24.

6. Nunnari G, Nigro L, Palermo F, Attanasio M, Berger A, Doerr HW, et al. Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. Ann Intern Med. 2003 Jul 1;139(1):26-30.

7. Williams CF, Klinzman D, Yamashita TE, Xiang J, Polgreen PM, Rinaldo C, et al. Persistent GB virus C infection and survival in HIV-infected men. N Engl J Med. 2004 Mar 4;350(10):981-90.

8. Zhang W, Chaloner K, Tillmann HL, Williams CF, Stapleton JT. Effect of early and late GB virus C viraemia on survival of HIV-infected individuals: a meta-analysis. HIV Med. 2006 Apr;7(3):173-80.

9. Karayiannis P, Pickering J, Zampino R, Thomas HC. Natural history and molecular biology of hepatitis G virus/GB virus C. Clin Diagn Virol. 1998 Jul 15;10(2-3):103-11.

10. Hekmat S, Mohraz M, Vahabpour R, Jam S, Bahramali G, Banifazl M, et al. Frequency and genotype of GB virus C among Iranian patients infected with HIV. J Med Virol. 2008 Nov;80(11):1941-6.

11. Naito H, Abe K. Genotyping system of GBV-C/HGV type 1 to type 4 by the polymerase chain reaction using type-specific primers and geographical distribution of viral genotypes. J Virol Methods. 2001 Jan;91(1):3-9.

12. Tucker TJ, Smuts HE. GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1-5. J Med Virol. 2000 Sep;62(1):82-3.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. Tansiri Y, Techakriengkrai N, Hansasuta P. GB virus C viraemia has a beneficial effect on antiretroviral treatment in Thai patients. (to be submitted).

14. Toyoda H, Fukuda Y, Hayakawa T, Takamatsu J, Saito H. Effect of GB virus C/hepatitis G virus coinfection on the course of HIV infection in hemophilia patients in Japan. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1998 Mar 1;17(3):209-13.

15. Heringlake S, Ockenga J, Tillmann HL, Trautwein C, Meissner D, Stoll M, et al. GB virus C/hepatitis G virus infection: a favorable prognostic factor in human immunodeficiency virus-infected patients? J Infect Dis. 1998 Jun;177(6):1723-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

งบประมาณเพื่อการวิจัย

รายการ	จำนวนเงิน (บาท)
1. **งบดำเนินการ**	
1.1 .ค่าใช้สอย	-
-	
1.2 ค่าวัสดุ (ให้ระบุรายละเอียด)	
- ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	
- ค่าชุดสกัด RNA ของไวรัสจากตัวอย่างเลือด	30,000
- ค่าน้ำยา (reagent) ในการทำ RT-PCR	35,000
- ค่าน้ำยา (reagent) ในการทำ Nested PCR	20,000
- ค่าอุปกรณ์พลาสติกที่ใช้ตลอดงานวิจัย	10,000
- ค่าวัสดุสำนักงาน	5,000
1.3 ค่าสาธารณูปโภค (ให้ระบุรายละเอียด) เช่น ค่าส่งไปรษณีย์	-
2. **งบลงทุน (ค่าครุภัณฑ์)**	-
- ให้ระบุรายการครุภัณฑ์และชี้แจงความจำเป็นแต่ละรายการ	-
รวมงบประมาณที่เสนอขอ	**100,000**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล นางสาว ญาดา ตันสิริ

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2550
วท.ด.	จุลชีววิทยาทางการแพทย์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2558

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) T cell immunology, Human Immunodeficiency Virus infection, Flow cytometry

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2556	Conference scholarship recipients	Global vaccine enterprise

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2550	โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
2559	ทุนนักวิจัยหลังปริญญาเอก	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (CASAF)
2561	ทุนวิจัย	Asia Research Center

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) 2015, Tansiri Y, Rowland-Jones S, Ananworanich J, Hansasuta P: Clinical Outcome of HIV Viraemic Controllers and Noncontrollers with Normal CD4 Counts is Exclusively Determined by Antigen-specific CD8 + T-cell-mediated HIV Suppression. Public Library of Science ONE (PLoS One). Mar 12;10(3):e0118871.

2) 2013, Techakriengkrai N, Tansiri Y, Hansasuta P: Poor HIV Control in HLA-B*27 and B*57/58 Noncontrollers is Associated with Limited Number of Polyfunctional Gag p24-specific CD8+ T cells. Journal of Acquired Immunity Deficiency Syndrome (JAIDS). 2; 27(1): 17-27.

3) 2013, Tansiri Y, Rowland-Jones S, Ananworanich J, Hansasuta P: Specificity of T-cell Response, Not Protective HLA Restrictions, Determines Control of HIV Replication in Thai Viraemic Controllers. AIDS Vaccine 2013 Conference. Barcelona, Spain. (Poster presentation).

4) 2012, Tansiri Y, Rowland-Jones S, Ananworanich J, Hansasuta P: The Superiority of Polyfunctional HIV-Gag Specific T-Cell Response on the HIV Control. The Royal Golden Jubilee-Ph.D. Congress XIII, Bangkok, Thailand. (Poster presentation).

5) 2011, Y Tansiri*, N Techakriengkrai*, P Hansasuta: Different Clinical Outcomes in HLA-B27+ and B57+/58+ HIV-infected Volunteers is Exclusively Determined by Polyfunctional T Cells. Keystone Symposia 2011 (Protection from HIV: Targeted Intervention Strategies). British Columbia, Canada. (Poster presentation).

6) 2009, Y Tansiri*, N Techakriengkrai*, W Kaewkhunthong, N Laichuthai, P Rattanachinakorn, Y Chaisupamongkollat, J Stapleton, P Hansasuta: GB Virus C Viraemia has a Beneficial Effect on Antiretroviral Treatment in Thai Patients. Keystone Symposia 2009 (HIV Immunobiology: From Infection to Immune Control). Colorado, USA. (Poster presentation).

การเสนอผลงานวิชาการ

1) 2013, Specificity of T-cell Response, Not Protective HLA Restrictions, Determines Control of HIV Replication in Thai Viraemic Controllers. AIDS Vaccine 2013 Conference, Barcelona, Spain.

2) 2012, The Superiority of Polyfunctional HIV-Gag Specific T-Cell Response on The HIV Control, The Royal Golden Jubilee-Ph.D. Congress XIV, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) 2011, Different Clinical Outcomes in HLA-B27+ and B57+/58+ HIV-infected Volunteers is Exclusively Determined by Polyfunctional T Cells, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Protection from HIV: Targeted Intervention Strategies), British Columbia, Canada.

4) 2009, GB Virus C Viraemia has a Beneficial Effect on Antiretroviral Treatment in Thai Patients, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (HIV Immunobiology), Colorado, United States of America.

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะ หรือ อื่นๆ)

-

อื่นๆ

-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
THE THAILAND RESEARCH FUND

ที่ นร ๖๒๐๘/๐๐๒๖/๒๕๖๒

๑ มีนาคม ๒๕๖๒

เรื่อง เสนอทุนอุดหนุนการวิจัย

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) มีความยินดีที่จะแจ้งให้ทราบว่าสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ สกว. ได้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัย เรื่อง "การวิเคราะห์ส่วนการรับรู้ของซีดีแปดทีเซลล์ที่จำเพาะต่อเอชไอวีเพื่อการตัดต่อพันธุกรรมในการรักษาการติดเชื้อเอชไอวีด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันบำบัด" ซึ่งมี ดร.ญาดา ตันสิริ สังกัด คณะแพทยศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ในวงเงิน ๖๐๐,๐๐๐.๐๐ บาท (หกแสนบาทถ้วน) ตามรายละเอียดดังแนบ

สกว. จึงขอเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาลงนามในสัญญาทั้ง ๔ ฉบับ และลงนามในเอกสารแนบหมายเลข ๒ หน้า ๓/๔ พร้อมด้วยหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุนและพยานหนึ่งท่าน และส่งคืนสัญญาทั้ง ๔ ฉบับ ให้ สกว. เมื่อทุกฝ่ายได้ลงนามครบถ้วนแล้ว สกว. จะส่งสัญญาฉบับหนึ่งคืนมาให้ท่านเก็บไว้เป็นหลักฐาน

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาดำเนินการด้วย จักขอบคุณยิ่ง

ขอแสดงความนับถือ

(ศ.ดร.สมปอง คล้ายหนองสรวง)
รองผู้อำนวยการด้านการวิจัยพื้นฐานและการพัฒนานักวิจัย
และรักษาการผู้อำนวยการฝ่ายวิชาการ
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

เรียน รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและนวัตกรรม
ด้วย สกว. ได้อนุมัติทุนอุดหนุนการวิจัย
วิทยานิพนธ์ในการทำงานวิจัยของ
อาจารย์รุ่นใหม่ โดย ดร.ญาดา ตันสิริ
เข้าหัวหน้าโครงการ
จึงเรียนมาเพื่อ ลงนามในสัญญาด้วย
กราน พลโพ.
7/3/62

ฝ่ายวิชาการ
โทรศัพท์ ๐ ๒๒๗๘ ๘๒๔๙, ๕๕ หรือ ๐ ๒๒๗๘ ๘๒๐๐ ต่อ ๘๓๒๑, ๘๓๘๙, ๘๓๙๙
โทรสาร ๐ ๒๒๗๘ ๘๒๔๘
e-mail: varisara@trf.or.th, kanchanit@trf.or.th, chayada@trf.or.th, sutasinee@trf.or.th, pensiri@trf.or.th

"ถ้าคุณต้องการทำวิจัย...biodata ให้โอกาส เชิญลงทะเบียนรับทราบโจทย์วิจัย ที่ http://biodata.trf.or.th"

MRG๖๒๘๐๐๔๘

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400
14th Floor, S M Tower, 979/17-21 Phaholyothin Road, Samsennai, Phayathai, Bangkok 10400, Thailand
Tel : +66 (0) 2278-8200 Fax : +66 (0) 2298-0476 http :// www.trf.or.th E-mail : callcenter@trf.or.th

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ KREF186013 ตั้งแต่วันที่ 30 พ.ย.60 ถึงวันที่ 30 พ.ย. 61

แหล่งทุน: ทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ : ผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีและความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนจากการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการ: อ.ดร.ญาดา ตันสิริ

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
							ค่าจ้างชั่วคราว	ค่าตอบแทน	ค่าใช้สอย	ค่าวัสดุ	ค่าสาธารณูปโภค	ค่าครุภัณฑ์	
	งบประมาณที่ได้รับการอนุมัติ (ตามแผน)		100,000.00										-
25 ธ.ค. 60	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 1 = 95%)		95,000.00		95,000								
	จำนวนเงินที่ได้รับ (งวดที่ 2 = 5%)		5,000.00		5,000.00								
	หัก ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 1)	INV000016916		53,448.56	46,551.44		-	-	-	53,448.56	-	-	53,448.56
	ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 2)	5048088110, 5007401181011416, D0000922115, AT0091810071713		1,949.00	44,602.44		-	-	-	1,949.00	-	-	1,949.00
	ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 3)	ISO181228079;ISO181106069		25,741.96	18,860.48		-	-	-	25,741.96	-	-	25,741.96
	ค่าใช้จ่าย (ครั้งที่ 4)	IV1902-104, 62020409, 71010		18,696.11	164.37		-	-	-	18,696.11	-	-	18,696.11
	งบประมาณคงเหลือ		100,000.00		164.37	0.00							
	รายละเอียดค่าใช้จ่าย												
ครั้งที่ 1													
25 ธ.ค. 60	ค่าน้ำยาในการตรวจสารพันธุกรรมของไวรัส	INV000016916								53,448.57			53,448.57
	รวมครั้งที่ 1		-	-	-	-	-	-	-	53,448.57	-	-	53,448.57
ครั้งที่ 2													
29 ธค 60	ค่าวัสดุสำนักงาน	009/7286								445.00			445.00
5 มค 61	ค่าวัสดุสำนักงาน	102-003352								310.00			310.00
18 กค 61	ค่าวัสดุสำนักงาน	D0000922115								934.00			934.00
31 กค 61	ค่าวัสดุสำนักงาน	RT0091810071713								260.00			260.00
	รวมครั้งที่ 2		-	-	-	-	-	-	-	1,949.00	-	-	1,949.00

บันทึกรายการรับ-จ่ายเงิน โครงการวิจัย สัญญาเลขที่ KREF186013 ตั้งแต่วันที่ 30 พ.ย.60 ถึงวันที่ 30 พ.ย. 61

แหล่งทุน: ทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการ : ผลของการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีและความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนจากการติดเชื้อร่วมกันของ Human Pegivirus ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีคนไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการ: อ.ดร.ญาดา ตันสิริ

ว/ด/ป	รายการ	เลขที่อ้างถึง	รายการรับ - จ่าย			รายรับ	รายจ่าย						รวม
			รับ	จ่าย	คงเหลือ	ดอกเบี้ยรับ	งบบุคลากร	งบดำเนินงาน				งบลงทุน	รายจ่าย
ครั้งที่ 3													
19 ธค 61	ค่าน้ำยาการตรวจสารพันธุกรรมไวรัส	ISO181106069								1,810.59			1,810.59
29 ธค 61	ค่าน้ำยาการตรวจสารพันธุกรรมไวรัส	ISO181228079								23,931.37			23,931.37
	รวมครั้งที่ 3		-	-	-	-	-	-	-	25,741.96	-	-	25,741.96
ครั้งที่ 4													
19 กย 61	ค่าน้ำยาในการตรวจสารพันธุกรรมไวรัส	RC-6200256								7,161.51			7,161.51
19 กย 61	ค่าน้ำยาในการตรวจสารพันธุกรรมไวรัส	62020409								6,291.60			6,291.60
19 กย 61	ค่าน้ำยาในการเพาะเลี้ยงเซลล์	71785								5,243.00			5,243.00
	รวมครั้งที่ 4		-	-	-	-	-	-	-	18,696.11	-	-	18,696.11

ลงชื่อหัวหน้าโครงการ ญาดา ตันสิริ วันที่ 18 มี.ค. 19