

Thesis Title	Genetic Analysis of Hepatitis B Virus (HBV) Mutants in HBV/HIV-1 Co-infected Patients in Thailand	
Author	Mr. Woottichai Khamduang	
Degree	Doctor of Philosophy (Biomedical Science)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi	Advisor
	Dr. Nicole Ngo-Giang-Huong	Co-advisor
	Assoc. Prof. Satawat Thongsawat, M.D.	Co-advisor
	Prof. Alain Goudeau, M.D.	Co-advisor
	Dr. Catherine Gaudy-Graffin	Co-advisor

ABSTRACT

Until 2005, Thailand has been considered an endemic area for chronic hepatitis B virus (HBV) infection due to the $\geq 8\%$ prevalence of hepatitis B surface antigen (HBsAg). Despite implementation of universal infant hepatitis B vaccination since 1992, mother-to-child transmission of HBV still occurs and remains the major cause of chronic infection. Another concern is the emergence of lamivudine (3TC) resistance HBV in HIV-HBV co-infected patients. Indeed, >200,000 HIV infected patients have initiated HIV treatment, regardless of their HBV infection status, with a combination of three antiretroviral drugs including 3TC. This antiviral drug also possesses an activity against HBV which may fade in the long term due to

the emergence of resistance mutations. This thesis includes 3 objectives: 1) identify HBV mutants possibly associated with vaccine failure in infants born to HBsAg-positive mothers, 2) evaluate the rate of occult HBV infection in pregnant women with isolated anti-HBc antibody and the impact on perinatal transmission, 3) assess the long term HBV response to 3TC and identify mutants associated with antiviral treatment failure in patients co-infected with HIV.

In the first part, the prevalence of perinatal HBV transmission and characterization of the HB variants in HBV-infected mother-child pairs were analyzed in a large group of HIV-infected pregnant women who participated in 2 nationwide perinatal HIV prevention trials. Among 3,349 HIV-infected pregnant women, 237 (7%) were found HBsAg positive. Eleven of 229 (5%) children born to HBsAg-positive mothers were found HBsAg and/or HBV DNA-positive between 2–6 months of age. Nine mother-child pairs had the complete series of samples available for HBV genetic analysis. Seven point mutations in the “a” determinant were identified in 6 mother-child pairs. Based on direct sequencing and cloning analysis, 3 patterns of transmission were observed: i) transmission of wild-type variants from mothers with high HBV DNA level ($>6.5 \log_{10}$ IU/mL), ii) transmission of minor variants from mothers with high HBV DNA level and iii) transmission of variants already present ($>20\%$ of viral population) in mothers.

In the second part, the risk factors associated with isolated anti-HBc and occult HBV infection in a group of HIV-infected HBsAg negative pregnant women and the impact of occult HBV infection on perinatal transmission of HBV were analyzed. All women were tested for anti-HBs and anti-HBc antibodies. Those with isolated anti-HBc antibody were then tested for HBV DNA. Women with detectable

HBV DNA (threshold: 15 IU/mL) were considered as having occult HBV infection. Of 1,682 HBsAg negative women, 229 (14%) had isolated anti-HBc. Multivariate analysis showed that low CD4 count, age over 35 years, birth in northern region of Thailand and positive anti-HCV serology were independently associated with isolated anti-HBc antibody. Occult HBV infection was identified in 24% (95%CI, 18-30) of women with isolated anti-HBc and was inversely associated with HIV RNA levels. Forty-four of 47 women with isolated anti-HBc and occult HBV infection had HBV DNA below 100 IU/mL; whereas only 3 women had HBV DNA between 100 and 1,000 IU/mL. The sS117I+T118K+R160K mutation was identified in one woman with occult HBV infection. None of these women transmitted HBV to their infants.

In the third part, the long-term effect of 3TC on HBV replication in 30 HIV/HBV co-infected patients receiving 3TC-based highly active antiretroviral therapy (HAART) was evaluated. HBV DNA, HIV RNA, absolute CD4 and CD8 T-cells counts, and liver enzymes were measured at baseline, 3 months, 12 months and then every 6 months up to 5 years. Prior to 3TC-based HAART, median HBV DNA level was 7.35 log₁₀ IU/mL (IQR: 5.55-8.07). At 12 months, 23 (67%) patients achieved HBV DNA suppression (≤ 2.18 log₁₀ IU/mL): 100% of HBeAg-negative patients and 47% of HBeAg-positive patients. Seventy-three percent of these patients had HIV RNA <50 copies/mL. The cumulative rates of maintained HBV-DNA suppression among the 23 patients who achieved HBV-DNA suppression were 91%, 87%, and 80% at 1, 2, and 4 years respectively. Of 17 patients who maintained HBV-DNA suppression while still on 3TC, 4 (24%) lost HBsAg and 7 of 8 (88%) HBeAg-positive patients lost HBeAg at their last visit (median duration, 59 months). HBV breakthrough was observed only in HBeAg-positive patients and 6 of 7 patients

presenting HBV breakthrough had the rtM204I/V mutations associated with 3TC resistance along with rtL180M and/or rtV173L. These results suggested that long-term suppression of HBV replication is an additional benefit provided by 3TC-containing HAART for a significant number of HIV/HBV co-infected patients particularly those with HBeAg negative.

In conclusion, HBV mutations that may influence the response to vaccine/immunoglobulins and 3TC therapy were identified. This work provides further insights on the emergence of HBV variants in the context of perinatal HBV transmission and antiretroviral treatment of HIV-HBV-co-infected patients in Thailand. This knowledge may be useful for researchers and public health specialists to develop new strategies or interventions to decrease HBV burden in Thailand as well as in other HBV highly endemic countries.

Key words: Hepatitis B virus, HIV co-infection, vaccine failure, lamivudine resistance, isolated anti-HBc, occult HBV infection

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิดบีที่กลายพันธุ์ในผู้ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีพร้อมกับไวรัสเอชไอวี-1 ในประเทศไทย

ผู้เขียน

นายวุฒิชัย คำดวง

ปริญญา

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. วาสนา ศิริรัมย์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ดร. นิโคล โง-เกียง-ฮวง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รศ. นพ. ศตวรรษ ทองสวัสดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศ. นพ. อแลง กูโด

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ดร. กัททริน กูดี-กราฟแฟง

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จนถึงปี พ.ศ.2548 ประเทศไทยถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มประเทศที่มีการระบาดของโรคตับอักเสบบีแบบเรื้อรังเนื่องจากพบความชุกของโปรตีนเปลือกนอกของไวรัสตับอักเสบบี (HBsAg) มากกว่าร้อยละ 8 และแม้ว่าได้มีการใช้นโยบายการให้วัคซีนไวรัสตับอักเสบบีแบบถ้วนหน้าแก่ทารกแรกเกิดทุกรายตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 การถ่ายทอดไวรัสตับอักเสบบีจากแม่ไปสู่ลูกก็ยังคงเกิดขึ้นและเป็นสาเหตุหลักของการพัฒนาเป็นโรคติดเชื้อแบบเรื้อรัง ข้อกังวลอีกประการหนึ่งคือการเกิดไวรัสตับอักเสบบีที่ดื้อต่อยาลามิวูดีนในผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี ในปัจจุบัน มีผู้ติดเชื้อเอชไอวีมากกว่าสองแสนรายที่เริ่มใช้ยาต้านไวรัสประสิทธิภาพสูงที่มียาลามิวูดีนเป็นองค์ประกอบ ยาลามิวูดีนสามารถออกฤทธิ์กับไวรัสตับอักเสบบี แต่ในระยะยาวแนวโน้มประสิทธิภาพอาจลดลงเนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสที่ทำให้เกิดการดื้อยาชนิดนี้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์ 3 ประการ คือ 1) เพื่อจำแนกไวรัสกลายพันธุ์ที่อาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของการให้วัคซีนในทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 2) เพื่อประเมินอัตราการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝงในหญิงตั้งครรภ์ที่มีแอนติบอดีต่อ

แอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบีเพียงอย่างเดียวและผลกระทบในการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก
3) เพื่อประเมินการตอบสนองของไวรัสตับอักเสบบีต่อการรักษาในระยะยาวและจำแนกไวรัสกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับความล้มเหลวในการรักษาด้วยยาต้านไวรัสในผู้ที่ติดเชื้อร่วมกับไวรัสเอชไอวี

ในการศึกษาส่วนแรก ได้วิเคราะห์ความชุกของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูก ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์จากทั่วประเทศที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทางคลินิกระดับชาติ เพื่อป้องกันการถ่ายทอดเชื้อเอชไอวีจากแม่สู่ลูก และทำการศึกษาคุณสมบัติของไวรัสตับอักเสบบีกลายพันธุ์ที่สามารถหลบหลีกผลของวัคซีนได้ จากการศึกษาหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อเอชไอวีทั้งหมดจำนวน 3,349 ราย พบ 237 ราย (7%) ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยมีผลบวกต่อ HBsAg และพบทารก 11 ราย (5%) ที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 229 ราย มีผลบวกต่อ HBsAg และ/หรือมีดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีขณะอายุ 2-6 เดือน สามารถวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของไวรัสจากแม่-ลูก ที่มีสิ่งส่งตรวจครบถ้วนเพียง 9 คู่ โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงและการโคลนนิ่งยีนได้ พบตำแหน่งการกลายพันธุ์บน “a” determinant ของไวรัสอยู่ 7 ตำแหน่งในแม่-ลูก 6 คู่ พบรูปแบบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี 3 รูปแบบ คือ 1) การถ่ายทอดเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมจากแม่ที่มีปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสสูงมากกว่า $6.5 \log_{10}$ ยูนิตสากล/มิลลิลิตร (IU/mL), 2) การถ่ายทอดเชื้อสายพันธุ์กลุ่มน้อยในเลือดแม่ 3) การถ่ายทอดเชื้อสายพันธุ์กลุ่มใหญ่ (พบได้มากกว่า 20% ของประชากรไวรัส) ในเลือดแม่

ในการศึกษาส่วนที่สอง ได้วิเคราะห์ปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางน้ำเหลืองวิทยาที่พบแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบีเพียงอย่างเดียว (isolated anti-HBc) และการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝง (occult HBV infection) ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อเอชไอวีและมีผลบวกต่อ HBsAg อีกทั้งศึกษาผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝงต่อการถ่ายทอดเชื้อไปสู่ลูก หญิงกลุ่มนี้ได้รับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนเปลือกนอก (anti-HBs) และแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ (anti-HBc) ทั้งนี้เฉพาะรายที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์เพียงอย่างเดียวจะได้รับการตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี หากพบผลบวกจะถูกจัดว่ามีการติดเชื้อแบบแอบแฝง (ค่าต่ำสุดที่ตรวจวัดได้ คือ 15 IU/mL) จากการศึกษาหญิงกลุ่มนี้ จำนวน 1,682 ราย พบ 229 ราย (14%) ที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบีเพียงอย่างเดียว จากการศึกษาวิเคราะห์แบบพหุตัวแปรแสดงให้เห็นว่า การมีจำนวนเซลล์ CD4 ที่ต่ำ มีอายุมากกว่า 35 ปี มีภูมิคุ้มกันในพื้นที่ภาคเหนือและมีแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบบี เกี่ยวข้องอย่างป็นอิสระกับการมีลักษณะทางน้ำเหลืองวิทยาที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบีเพียงอย่างเดียว พบว่าหญิงที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบีเพียงอย่างเดียวร้อยละ 24 (ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95%, 18-30) มีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝง โดยมีความสัมพันธ์แบบ

ตรงข้ามกับปริมาณไวรัสเอชไอวี จากหญิงที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบี เพียงอย่างเดียวและติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝงจำนวน 47 ราย มี 44 รายที่มีปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีต่ำกว่า 100 IU/mL มีเพียง 3 รายที่มีปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสระหว่าง 100 ถึง 1,000 IU/mL พบการกลายพันธุ์แบบ sS117I+T118K+R160K ในหญิง 1 รายที่ติดเชื้อแบบแอบแฝง ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากหญิงกลุ่มนี้ไปสู่ลูก

ในการศึกษาส่วนที่สาม ได้ประเมินผลการรักษาระยะยาวด้วยยามิวูดีน ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในผู้ป่วยเอชไอวี 30 ราย ที่ได้รับยาต้านไวรัสประสิทธิภาพสูงที่มีลามิวูดีนเป็นส่วนประกอบ โดยตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีและปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสเอชไอวี วัดจำนวนเซลล์ CD4 และเซลล์ CD8 และวัดปริมาณเอนไซม์ในตับก่อนการรักษาและ ณ 3 และ 12 เดือนหลังเริ่มการรักษา และจากนั้นทุกๆ 6 เดือนจนถึง 5 ปีของการรักษา พบว่าค่ากลางของปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีก่อนการรักษา คือ $7.35 \log_{10}$ IU/mL หลังจากการรักษา 12 เดือน พบว่าลามิวูดีนสามารถกดปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีได้ในร้อยละ 67 ของผู้ป่วย ($\leq 2.18 \log_{10}$ IU/mL) โดยพบปรากฏการณ์นี้ในผู้ที่ไม่มีแอนติเจนอีทั้งหมด และในผู้ที่มีแอนติเจนอีคิดเป็นร้อยละ 47 ทั้งนี้ร้อยละ 73 ของผู้ป่วยมีปริมาณไวรัสเอชไอวีน้อยกว่า 50 copies/mL ผลการศึกษาในผู้ป่วย 23 รายที่สามารถกดปริมาณไวรัสตับอักเสบบีในช่วง 12 เดือนแรกของการรักษา พบว่าประมาณการร้อยละสะสมสัมพัทธ์ของการคงความสามารถในการกดปริมาณไวรัสตับอักเสบบี ณ เวลา 1, 2 และ 4 ปี คิดเป็นร้อยละ 91, 87 และ 80 ตามลำดับ ในผู้ป่วย 17 ราย (24%) ที่ยังคงรับยามิวูดีนที่สามารถกดระดับปริมาณไวรัสตับอักเสบบีได้อย่างต่อเนื่อง มี 4 รายตรวจไม่พบ HBsAg ในการนัดหมายครั้งสุดท้าย และ 7 ใน 8 ราย (88%) ที่เคยมีผลบวกต่อ HBeAg ก่อนการรักษา ตรวจไม่พบ HBeAg ในการนัดหมายครั้งสุดท้าย (ค่ากลาง 59 เดือน) นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการประทุขึ้นของปริมาณไวรัสตับอักเสบบีเฉพาะในผู้ป่วยที่มีผลบวกต่อ HBeAg และ 6 ใน 7 ของผู้ป่วยที่มีการประทุขึ้นของปริมาณไวรัสตับอักเสบบีมีการกลายพันธุ์แบบ rtM204I/V ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยา 3TC ร่วมกับการกลายพันธุ์แบบ rtL180M และ/หรือ rtV173L ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า การกดการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบบีได้เป็นเวลานาน โดยการใช้ยาต้านไวรัสประสิทธิภาพสูงที่มีลามิวูดีนเป็นส่วนประกอบ ยังคงให้ประโยชน์กับผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบี โดยเฉพาะผู้ที่มีผลบวกต่อ HBeAg

โดยสรุป การศึกษานี้ได้แสดงถึงลักษณะการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบบีที่อาจมีอิทธิพลต่อการตอบสนองต่อวัคซีน/อิมมูโนโกลบูลินและการรักษาด้วยยาต้านไวรัส รวมถึงให้ข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเกิดขึ้นของสายพันธุ์ไวรัสตับอักเสบบีในบริบทของการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูก การรักษาด้วยยาต้านไวรัสในผู้ติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับไวรัสตับอักเสบบีในประเทศ

ไทย องค์ความรู้ที่ได้นี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับนักวิจัยและผู้เชี่ยวชาญทางด้านสาธารณสุขในการพัฒนากลยุทธ์ หรือวิธีการใหม่ๆ เพื่อลดจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในประเทศไทย ตลอดจนประเทศอื่นที่อยู่ในพื้นที่ระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

คำสำคัญ: ไวรัสตับอักเสบบี, การติดเชื้อร่วมกับเอชไอวี, ความล้มเหลวของการให้วัคซีน, การติดต่อยาลามิวูดิน, ลักษณะทางน้ำเหลืองวิทยาที่พบแอนติบอดีต่อแอนติเจนคอร์ของไวรัสตับอักเสบบีเพียงอย่างเดียว, การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบแอบแฝง