หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี
ผู้เขียน	นางสาวปาจรีย์ ตรีสุวรรณ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. วุฒิชัย คำดวง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วาสนา ศิริรังษี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	Dr. Nicole Ngo-Giang-Huong	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

แม้ว่าในปัจจุบันมีการใช้วัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีที่มีประสิทธิภาพกันอย่างแพร่หลายในแถบภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก แต่ยังพบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูก โดยปริมาณไวรัสในกระแสเลือดถือเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูก แต่อย่างไรก็ตาม ผลกระทบของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูกยังไม่มีการอธิบายอย่างชัดเจน นอกจากนี้การติดเชื้อไวรัสเอชไอวีร่วมจะส่งผลให้ไวรัสตับอักเสบบีมีการเพิ่มจำนวนมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดร่วมกันนี้จะช่วยประเมินผลกระทบของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูกได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง 1) ความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูก และ2) ความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการตรวจไม่พบแอนติเจนอีของไวรัสตับอักเสบบีในหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับไวรัสเอชไอวี

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแบบย้อนหลังซึ่งได้รับตัวอย่างและข้อมูลจากโครงการวิจัยเพื่อป้องกันการถ่ายทอดเชื้อไวรัสเอชไอวีจากแม่สู่ลูกในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2540 ถึง พ.ศ. 2542 (PHPT-1 และ PHPT-2) ในการศึกษานี้แม่ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีร่วมกับเอชไอวี และมีปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีมากกว่า หรือ เท่ากับ 3.5 $\log_{10}$ IU/mL จะถูกคัดเลือกเพื่อทำการวิจัย ในการประเมินความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมกับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูกจะใช้ตัวอย่างจากแม่ที่ถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสู่ลูกจำนวน 9 รายและแม่ที่ไม่ถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสู่ลูกในอัตราส่วน 1:2 ทำการจับคู่โดยอาศัยปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี และการตรวจพบแอนติเจนอีของไวรัส ส่วนการประเมินความสัมพันธ์ของความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลากหลายทางพันธุกรรมกับการตรวจไม่พบแอนติเจนอี ทำการศึกษาในตัวอย่างแม่ที่ตรวจไม่พบแอนติเจนอี 15 ราย และทำการสุ่มเลือกแม่ที่ตรวจพบแอนติเจนอี 15 รายเป็นกลุ่มควบคุม การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสายจากจีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีโดยชุดน้ำยา BigDye Terminator เวอร์ชั่น 3.1 แล้วนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาจีโนทัยป์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีด้วยวิธีวิเคราะห์ phylogenetic tree และโปรแกรมสำเร็จรูปบนเว็บไซต์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มตัวอย่างจะถูกประเมินและเปรียบเทียบโดยใช้ค่า 1) Shannon entropy scores 2) ระยะห่างทางพันธุกรรม 3) อัตราส่วนระหว่างการกลายพันธุ์แบบ missense กับการกลายพันธุ์แบบ nonsense (dN/dS) และ 4) รูปแบบของการกลายพันธุ์

ผลจากการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีของผู้ติดเชื้อจำนวน 49 รายที่สามารถวิเคราะห์ได้ พบว่าหญิงตั้งครรภ์ 44 รายติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจีโนทัยป์ ซี หญิงตั้งครรภ์ 4 ราย ติดเชื้อจีโนทัยป์ บี และ 1 รายติดเชื้อไวรัสลูกผสมระหว่างจีโนทัยป์ ซี กับ จี เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยค่าเฉลี่ยของ Shannon entropy score พบว่าไวรัสในกลุ่มแม่ที่ถ่ายทอดเชื้อสู่ลูก มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่มแม่ที่ไม่ถ่ายทอดเชื้อสู่ลูก (0.067 เปรียบเทียบกับ 0.043; p<0.0001) แต่ความแตกต่างนี้หายไปเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ของเฉพาะไวรัสตับอักเสบบีจีโนทัยป์ ซี และยังพบการกลายพันธุ์ซึ่งเป็นที่รู้จักและมีความสำคัญที่พบคือการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A1896G ในยีน precore และ T1762/A1764 ในยีน basal core promoter ที่มีผลกระทบต่อการสร้างแอนติเจนอี แต่ไม่พบการกลายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างจำเพาะเจาะจงกับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูก กลุ่มแม่ที่ตรวจไม่พบแอนติเจนอีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่มแม่ที่มีแอนติเจนอี (0.063 เปรียบเทียบกับ 0.045; p <0.0001) แต่ความแตกต่างนี้หายไปเมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ของเฉพาะไวรัสตับอักเสบบีจีโนทัยป์ ซี

การประเมินปัจจัยของไวรัสที่สัมพันธ์กับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูกจะสามารถให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี อย่างไรก็ตามการวิจัยนี้พบว่าการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีจากแม่สู่ลูกไม่มีความสัมพันธ์กับความหลากหลายทางพันธุกรรมและรูปแบบการกลายพันธุ์อย่างจำเพาะเจาะจง ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงในกลุ่มแม่ที่เกิด seroconversion เนื่องจากไวรัสที่ไม่สร้างแอนติเจนอีมีวิวัฒนาการที่เร็วกว่าไวรัสที่สร้างแอนติเจนอี นอกจากนี้การศึกษาในจำนวนกลุ่มประชากรที่มากขึ้นมีความจำเป็นในประเทศไทย เพื่อประเมินความชุกของการกลายพันธุ์ A1896G ของไวรัส ผลกระทบต่อผลการทดสอบและความสำคัญของการตรวจหาแอนติเจนอี ถ้าความชุกของการกลายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A1896G สูงในกลุ่มประชากร การตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบีอาจเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจประเมินการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Genetic Diversity of Hepatitis B Virus in Pregnant Women with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus Co-Infection
Author	Miss Pajaree Treesuwan
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Advisory Committee	Lect. Dr. Woottichai Khamduang Advisor
	Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi Co-advisor
	Dr. Nicole Ngo-Giang-Huong Co-advisor

ABSTRACT

Background & Aims: Despite effective vaccines against HBV are available in Asia Pacific, perinatal HBV transmission still continues to occur. High maternal HBV viral load is a major risk factor for perinatal transmission of HBV however impact of HBV genetic diversity on perinatal transmission is unclear. Since HIV infection increases HBV replication analysis of HBV genetic diversity among HBV/HIV co-infected pregnant women may help to assess its impact on perinatal transmission of HBV. This study aimed to assess the relationship between 1) HBV genetic diversity and perinatal HBV transmission and 2) HBV genetic diversity and HBeAg negativity in HBV/HIV co-infected pregnant women.

Methods: This is a retrospective analysis study using samples and data collected from two large perinatal HIV prevention trials conducted in Thailand during 1997-1999 (PHPT-1 and PHPT-2). HBV/HIV co-infected women with HBV DNA levels ≥ 3.5 $\log_{10}$ IU/mL were included in this study. To assess the relationship between HBV genetic diversity and perinatal HBV transmission, 9 HBV transmitting mothers were matched to HBV non-transmitting mothers on a ratio of 1:2 according to their baseline HBV DNA levels and HBeAg status. To assess the relationship between HBV genetic diversity and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

absence of HBeAg in plasma, 15 women HBeAg negative and 15 women HBeAg positive were randomly selected. Full-length HBV genome was directly sequenced using BigDye Terminator V. 3.1 cycle sequencing kit. HBV genotypes were identified using phylogenetic analysis and web-based tools. HBV genetic diversity was analyzed and compared between groups using 1) Shannon entropy scores, 2) mean genetic distance 3) dN/dS ratio and 4) mutation patterns.

Results: Of 49 pregnant women with available HBV sequence, 44 women were infected with HBV genotype C, 4 with genotype B and one was infected with an inter-genotype recombinant C/G. HBV transmitting women had higher genetic diversity in preS/S regions, using Shannon entropy, than non-transmitting women (0.067vs 0.043; p<0.0001) but this difference disappeared when only HBV genotype C viruses were considered. This study observed several well-known and potential mutations, precore A1896G mutation and basal core promoter (BCP) T1762/A1764 mutations, across the whole HBV genome but no particular mutation pattern was associated with perinatal transmission. HBeAg-negative women had higher genetic diversity than HBeAg positive women (0.063 vs. 0.045; *p* <0.0001) but this difference disappeared when only HBV genotype C viruses were considered.

Conclusions: Assessment of viral factors associated with perinatal transmission of HBV may provide information useful for the design of new and highly effective vaccine to better prevent HBV infection. However, in our study, perinatal transmission of HBV was not associated with a higher genetic diversity of HBV or particular mutation pattern. Higher HBV genetic diversity in women who seroconverted HBeAg may be due more rapid evolutionary rates of HBeAg negative sequences. In addition, large-scale studies are needed to evaluate the prevalence of A1896G mutation and its impact on the result of HBeAg testing and thus, the usefulness of HBeAg testing. Were this prevalence high, HBV DNA quantification would be the appropriate approach to assess viral replication in all HBeAg negative people.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved