

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DRUG
RESISTANCE AND SUBTYPE DIVERSITY IN HIV-1 INFECTED
PATIENTS: IMPLICATION FOR SUBTYPE-SPECIFIC
MUTATIONAL PATHWAY ON PROTEASE AND REVERSE
TRANSCRIPTASE GENOTYPES**

CHONLAPHAT SUKASEM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY (PATHOBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาคุณลักษณะการดื้อยาในระดับ โมเลกุล และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส เอชไอวี แบบที่1: ผลการถอดรหัสพันธุกรรม ยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ REVERSE TRANSCRIPTASE และ PROTEASE ต่อวิธีการกลายพันธุ์จำเพาะสายพันธุ์ (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DRUG RESISTANCE AND SUBTYPE DIVERSITY IN HIV-1 INFECTED PATIENTS: IMPLICATION FOR SUBTYPE-SPECIFIC MUTATIONAL PATHWAY ON PROTEASE AND REVERSE TRANSCRIPTASE GENOTYPE)

ชลภัทร สุขเกษม 4436375 SCPA/D

ปร.ด. (พยาธิชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิภา เจริญญาติ, Ph.D., วสันต์ จันทราทิตย์, Ph.D., สุดา เรืองโรจน์พิทักษ์, Ph.D.
วิสุทธิ์ สุชีพศาลเจริญ, M.D.

บทคัดย่อ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวีอาจส่งผลกระทบต่อการรักษา และการศึกษาทางระบาดวิทยาของการดื้อยาด้านไวรัส ในปัจจุบันการพัฒนารวมทั้งการศึกษาและการแปลผลการดื้อยาด้านไวรัสจะใช้ข้อมูลจากสายพันธุ์ B ซึ่งพบมากในทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ ทำให้ข้อมูลการดื้อยาในสายพันธุ์อื่น ๆ มีน้อย ในประเทศไทยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ CRF01_AE ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาผลของสายพันธุ์ต่างๆ ต่อการแปลผล และการดื้อยาด้านไวรัสจำเพาะสายพันธุ์ โดยทำการศึกษาในผู้ติดเชื้อที่รักษาด้วยยาด้านไวรัส 1,880 ราย และยังไม่เคยได้รับยาด้าน 113 ราย ถูถอดรหัสพันธุกรรมบริเวณยีน polymerase จากนั้นจึงจำแนกสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศ แล้วทำการวิเคราะห์ผลในเชิงพรรณนาและวิเคราะห์ เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์จำเพาะสายพันธุ์ นอกจากนี้ทำการศึกษาการดื้อยาด้านไวรัสด้วยวิธีฟีโนไทป์ เพื่อเปรียบเทียบกับผลการแปลผลด้วยวิธีจีโนไทป์ รวมทั้งยังเปรียบเทียบการแปลผลการกลายพันธุ์ด้วยวิธีจีโนไทป์โดยเทคนิคต่าง ผลการศึกษาพบสายพันธุ์ CRF01_AE (95%) ในกลุ่มผู้ติดเชื้อที่รักษาด้วยยาด้านไวรัสและ 81.4% ในกลุ่มผู้ป่วยซึ่งยังไม่เคยได้รับยาด้าน) และ B โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบตำแหน่งการกลายพันธุ์ระหว่างทั้งสองสายพันธุ์ ร่วมกับสายพันธุ์ CRF02_AG พบว่าส่วนใหญ่จะมีรูปแบบ และความถี่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นบางตำแหน่งซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการแปลผลการดื้อยาด้วยวิธีการฟีโนไทป์ เทียบกับวิธีจีโนไทป์ พบว่าทั้งสองวิธีมีความสอดคล้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการแปลผลการกลายพันธุ์ด้วยวิธีด้วยวิธีจีโนไทป์โดยเทคนิคต่างจากสิ่งส่งตรวจหลากหลายสายพันธุ์ พบว่าทั้งสามเทคนิคสามารถแปลผลการกลายพันธุ์ได้ถูกต้อง นอกจากนั้นจากการศึกษาพบว่าในช่วงปี 2000-2005 มีการดื้อยาเพิ่มขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อซึ่งได้รับการรักษาด้วยยาด้านตลอดระยะเวลาการศึกษา โดยตำแหน่งการกลายพันธุ์เอนไซม์ reverse transcriptase ที่พบมากที่สุดคือ M184V/I (919/1,880, 48.9%) and K103N/S/H (416/1,880, 22.1%) แต่ในเอนไซม์ protease มักพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ซึ่งเป็น polymorphism ส่วนในกลุ่มผู้ติดเชื้อ ซึ่งไม่เคยได้รับยามาก่อน พบผู้ป่วย 14 ราย (12.4%) ติดเชื้อมีการกลายพันธุ์ซึ่งส่งผลกระทบต่อดื้อยา จากการพบความชุกของการดื้อยาที่สูงขึ้นในกลุ่มผู้ติดเชื้อซึ่งได้รับการรักษาด้วยยาและในกลุ่มผู้ป่วยซึ่งยังไม่เคยได้รับยาจึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจการระบาด และอัตราความชุกอย่างเป็นระบบทั้งประเทศ รวมทั้งควรมีการถอดรหัสพันธุกรรม ก่อนการรักษาด้วยยาในกลุ่มผู้ป่วยซึ่งยังไม่เคยได้รับยามาก่อน สำหรับการศึกษารายการกลายพันธุ์ซึ่งมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อเอชไอวี แม้ว่าจะพบว่าการแปลผลการดื้อยาด้วยวิธีจีโนไทป์ซึ่งใช้ Rule-base จากเชื้อสายพันธุ์ B เป็นหลัก จะมีความสอดคล้องกับผลจากการทำฟีโนไทป์เป็นส่วนใหญ่ แต่เพื่อให้การแปลผลการดื้อยาด้วยวิธีจีโนไทป์มีประสิทธิภาพสูงสุด ควรมีการสร้างมาตรฐานการแปลผล และทำการศึกษาเพิ่มเติมสำหรับกลุ่มผู้ติดเชื้อสายพันธุ์ CRF01_AE ซึ่งพบการระบาดมากที่สุดในประเทศไทย

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DRUG RESISTANCE AND SUBTYPE DIVERSITY IN HIV-1 INFECTED PATIENTS: IMPLICATION FOR SUBTYPE-SPECIFIC MUTATIONAL PATHWAY ON PROTEASE AND REVERSE TRANSCRIPTASE GENOTYPE

CHONLAPHAT SUKASEM 4436375 SCPA/D

Ph.D. (PATHOBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: VINA CHURDBOONCHART, Ph.D., WASUN CHANTRATITA, Ph.D., SUDA RIENGROJPITAK, Ph.D., WISUT SUKEEPAISARNCHAROEN, M.D.

ABSTRACT

The genetic diversity among HIV-1 subtypes may influence clinical management and drug resistance surveillance as antiretroviral therapy is expanded to resource-constrained regions where diverse non-subtype B strains predominate. Current antiretroviral regimens can be used consistently to treat patients with both non-B and B subtypes, and genotypic resistance algorithms provide adequate guidance. Hence, there is an urgent need to address the deficiency of knowledge about drug resistance in non-B viral subtypes to provide a rational basis for development of country- or region- specific treatment guideline. In this study, the resistance assays was performed and compared to evaluate the performance of any technologies for the detection of drug resistant mutation in any HIV-1 subtypes. Subsequently, the present study characterized and compared resistant mutations in CRF01_AE and B HIV-1 subtypes. Then, the comparison among non-subtype B; CRF01_AE and CRF_02 AG was performed. The frequency of concordance between phenotypic and genotypic resistance testing to interpret drug resistance in CRF01_AE isolates was relatively high. All three genotypic assays were capable of generating comparable and high quality genotyping results in subtype B and non-B drug resistant mutations. The mutation patterns and frequencies were similar between B and CRF01_AE subtypes. However, there are a few mutations that appear to differ in frequency. For the prevalence of antiretroviral drug resistance, the study showed commonly observed genotypic resistance in extensive therapy-experienced patients. In the protease genes, minor mutations or polymorphisms were found in the majority. The results also showed that only 14 drug-naïve patients (12.4%) carried HIV-1 with at least one drug-resistant mutation. Although the data at present do not support the need for establishment of a subtype-specific pathway for the interpretation of drug resistance mutation, in order to establish which the best interpretation system, it is necessary to establish a consensus for the interpretation of genotypic data in CRF01_AE strain that predominate in Thailand. In accordance with preventing the rapid emergence of resistant virus strains, the national programme to monitor antiretroviral drug resistance should be established. Routine genotypic testing in treatment-naïve patients before starting antiretroviral therapy is also recommended to prevent sub therapeutic response and viral failure.

KEYWORDS: ANTIRETROVIRAL / DRUG RESISTANCE / GENOTYPE/ HIV-1 / SUBTYPE-SPECIFIC MUTATIONAL PATHWAY

208 P.