



**ANALYSIS OF MUTATIONS IN THE S GENE,
CORE PROMOTER AND PRECORE GENE OF
THE THAI ISOLATES OF HEPATITIS B VIRUS**

KRIANGSAK RUCHUSATSAWAT

อธิปัทนการ

จาก

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-664-060-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
K92a
2000
c. 2
44715 c. 2

3936701 SIMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : HEPATITIS B VIRUS/ MUTATION / CORE PROMOTER
PRECORE GENE / HEPATITIS B e ANTIGEN

KRIANGSAK RUCHUSATSAWAT : ANALYSIS OF MUTATIONS IN
THE S GENE, CORE PROMOTER AND PRECORE GENE OF THE THAI
ISOLATES OF HEPATITIS B VIRUS. THESIS ADVISORS : SIRIRURG
SONGSIVILAI, M.D., Ph.D., TARARAJ DHARAKUL, M.D., Ph.D. 114 P. ISBN
974-664-060-7.

Hepatitis B virus is a major causative agent of hepatitis that can cause life-long chronic infection, cirrhosis, liver cancer, liver failure and death. Detection of viral and immunological markers are useful in the diagnosis and monitoring of the infection. The presence of HBeAg is one indicator of active viral replication, whereas anti-HBe antibody is believed to be a marker of recovery. However, some patients may have active viral infection in the absence of HBeAg which is postulated to be due to mutation in the genes encoding the HBc/HBe antigen.

In order to investigate the prevalence and importance of gene mutations in this region, nucleotide sequences were obtained from 61 chronic hepatitis patients. Of these 61 samples, genotype A, B and C were found in 1.6, 29.5 and 68.9%, respectively. Mutations in the core promoter region at position 1762 (A1762T) and 1764 (G1764A) were found in 33 patients (54.1%), in which 13 (39.4%) were HBeAg-negative and the other 20 (60.6%) were HBeAg-positive.

In the precore region, the classical mutation at position 1896 (G1896A) was found in 19 (31.1%) patients in which 17 (89.5%) were HBeAg-negative and the other 2 (10.5%) were HBeAg-positive. There is a significant correlation between HBeAg-negative status and mutation at G1896A ($p < 0.0001$). The mixed infection with wild type and mutant virus (G1896r) were found in 7 (11.5%) patients in which 6 (85.7%) were HBeAg-positive and one (14.3%) was HBeAg-negative.

In addition, the nucleotide sequences in the S gene were obtained from 10 patients; 8 were from genotype C, 2 were from genotype B. The sequences were used to design a synthetic peptide spanning the 'a' determinant of the HBsAg. However, attempts were unsuccessful in using this peptide as an immunodiagnostic reagent.

In the situation in Thailand where about almost 50 % of HBV infected patients had mutant viruses, HBeAg in the blood may not directly correlate with the absence of active hepatitis B infection.

3936701 SIMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา ; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

เกรียงศักดิ์ ฤชตะศาสตร์: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมส่วน S gene, core promoter และ precore gene ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสายพันธุ์ไทย (ANALYSIS OF MUTATIONS IN THE S GENE, CORE PROMOTER AND PRECORE GENE OF THE THAI ISOLATES OF HEPATITIS B VIRUS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล, พ.บ., Ph.D., ธารารชต์ ธารากุล, พ.บ., Ph.D. 114 หน้า. ISBN 974-664-060-7

เชื้อไวรัสตับอักเสบบี เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งที่ก่อโรคตับอักเสบบี ซึ่งทำให้เกิดการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ตับแข็ง มะเร็งตับ และตาย

การตรวจหาการติดเชื้อของไวรัสตับอักเสบบีโดยใช้วิธีทางวิทยามิติคุ้มกัน สามารถช่วยการวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วมากขึ้น ในการติดเชื้อแบบเรื้อรังที่มีการตรวจพบแอนติเจนอี มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส และการตรวจพบแอนติบอดีต่อแอนติเจนอี เชื่อว่ากำลังจะหายจากโรค แต่พบว่าผู้ป่วยบางรายที่มีแอนติบอดีต่อแอนติเจนอี สามารถตรวจพบ HBV DNA และมีอาการรุนแรงมากขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของยีนที่สร้างแอนติเจน ส่วนคอร์และอี

การศึกษารหัสพันธุกรรมในบริเวณส่วน core promoter และ precore gene ของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ที่แยกได้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับอักเสบบีเรื้อรัง จำนวน 61 ราย สามารถจำแนกเป็นสายพันธุ์ A, B และ C คิดเป็นร้อยละ 1.6 29.5 และ 68.9 ตามลำดับ ความเปลี่ยนแปลงในส่วน core promoter ที่ตำแหน่ง A1762T และ G1764A ในผู้ป่วยจำนวน 33 ราย คิดเป็นร้อยละ 54.1 ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจไม่พบแอนติเจนอี จำนวน 13 ราย (ร้อยละ 39.4) และตรวจพบแอนติเจนอี จำนวน 20 ราย (ร้อยละ 60.6)

ในส่วน precore gene การเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง G1896A มีจำนวน 19 ราย คิดเป็นร้อยละ 31.1 และสัมพันธ์กับผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบแอนติเจนอี จำนวน 17 ราย (ร้อยละ 89.5) และให้ผลที่ตรวจพบจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 10.5) นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อแบบผสม ทั้งแบบดั้งเดิมและกลายพันธุ์ (G1896r) จำนวน 7 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.5 โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่พบแอนติเจนอี 6 ใน 7 ราย (ร้อยละ 85.7) ไม่พบแอนติเจนอี 1 ใน 7 ราย (ร้อยละ 14.3)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน S gene ที่มาจากผู้ป่วยชาวไทย จำนวน 10 ราย พบว่าเป็นสายพันธุ์ A จำนวน 8 ราย และสายพันธุ์ B จำนวน 2 ราย ส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ใช้เป็นแบบในการสังเคราะห์เส้นแป็ปไทด์ให้คล้ายส่วนของ 'a' ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนเคลือบเพลทในการตรวจหาแอนติบอดีโดยวิธีอิลซ่า แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่สามารถใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีได้

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสถานการณ์ของการติดเชื้อไวรัสที่พบในประเทศไทย ประมาณร้อยละ 50 มีการติดเชื้อไวรัสมีวเตนท์ ซึ่งทำให้การตรวจหาแอนติเจนอี อาจจะไม่สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส