บทความพิเศษ

Viral Subtypes : HIV, HBV, HCV

ยง ภู่วรวรรณ

ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง subtype hepatitis B และ C จะขอกล่าวถึงไวรัส B ก่อน hepatitis B จริงๆ ก็เป็น DNA ไวรัส เป็น double standed และเป็น circular DNA เพราะฉะนั้นโดยเฉพาะ hepatitis เป็นเรื่องสำคัญคือว่ามี 4 grade ที่จะสร้าง protein ขึ้นมา และเวลาที่เราจะพูดถึง type หรือ subtype ก็แล้วแต่ ของ hepatitis B นี้เรามักจะเน้นในส่วนของ S gene ถ้าบอกว่า DNA virus นี้ จะดีกว่า RNA virus ตรงที่ว่าการกลายพันธุ์ของมัน จะน้อยกว่า RNA virus DNA virus จะกลายพันธุ์น้อยกว่า แต่ยกเว้น hepatitis B hepatitis B ถึงแม้ว่าจะเป็น DNA virus แต่เวลาการแบ่งตัว polymerase มีหน้าที่คล้ายกับ Reverse Transcriptase เพราะฉะนั้นด้วยเหตุนี้นี่เอง ทำให้ hepatitis B นี้ จึงมีโอกาสกลายพันธุ์มากกว่า virus DNA ชนิดอื่น เพราะว่าโดยหลักการ DNA แล้วนี้ จะกลายพันธุ์ค่อนข้างน้อย เพราะฉะนั้นเวลาเราพูดถึงชนิดของ hepatitis B เราจะมองไปในส่วนของ S gene คือในส่วนของตำแหน่งนี้ ซึ่งประกอบไปด้วย PreS1 และ PreS2 และส่วนของ S gene protein ของที่ encode ขึ้นมา ส่วนที่มีความหลากหลายมากที่สุดของ hepatitis B virus นี้ ก็คือส่วนของ PreS1 เพราะฉะนั้นเวลาเราจะจำแนกแจกแจงของ hepatitis B ว่าเป็นชนิดไหน genotype ไหน เราจึงมองลงไปที่ส่วนของ PreS1 เป็นหลัก เพราะมีความหลากหลายมากที่สุด เพราะฉะนั้นในแง่ระบาดวิทยาผมคงไม่กล่าวลงไป ผมคิดว่าทุกคนรู้แล้วว่ามีความสำคัญ แต่แนวโน้มของ hepatitis B ในบ้านเรานี้เริ่มลดลง หลังจากที่เรา mass vaccination program ขณะนี้เด็กที่มีอายุต่ำกว่า 15 ปีลงมานี้มีอัตราการเป็นพาหะ น้อยกว่า 1% แล้ว

Genomic Organization of HBV

- Relaxed-circular, partially double stranded (RC-DNA)
- Minus strand ~ 3.2 kb
- Plus strand (1.7-2.8 kb)
- Four ORFs
  - Pre-S/S ORF
  - Pre-C/C ORF
  - Pol ORF
  - X ORF

Viral Hepatitis Research Unit

Hepatitis B Virus

International Committee on Toxonomy of Viruses

- Group VII : DNA Reverse Transcribing Viruses
- Family : Hepadnaviridae
- Genus : Orthohepadnavirus
- Species : Hepatitis B Virus (HBV)

ถอดความจากคำบรรยายในการประชุมใหญ่วิชาการ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ครั้งที่ 12 ปี พ.ศ. 2547 เพื่อเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษาสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ องค์สภานายิกา สภากาชาดไทย เมื่อวันที่ 14-16 มีนาคม 2547 ณ ห้องควีนส์ปาร์ค โรงแรมอิมพีเรียล ควีนส์ปาร์ค กรุงเทพมหานคร

Epidemiology and Natural History of HBV Infection

- One of the major infectious disease
- Over 2 billion people infected
- Over 350 million chronically infected
- About 2 million deaths per year
- Leads to the risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC)

Clinical outcome of HBV infection

- Host factors
  - Age of the patient
  - Gender
  - Alcohol intake
- Viral load
- Genomic variability of virus (Genotype)

Outcome ของ hepatitis B เมื่อมองระยะยาวแล้ว นอกจาก host factor ปริมาณ viral load แล้ว สิ่งหนึ่งที่เราจะกล่าววันนี้ ก็คือเรื่องของ genotype หลายคนมีความเชื่อว่า genotype ของ hepatitis B น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของโรค ว่าคนไหนมีโอกาสเป็นตับแข็งมากน้อยแค่ไหน ยิ่งเป็น hepatocellular carcinoma เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ไหน เกี่ยวข้องอย่างไรกับ genotype เพราะฉะนั้นถ้าเรามาดู genotype เกี่ยวข้องอย่างไร genotype ของ hepatitis B เมื่อแบ่งตามส่วนของ PreS1 ในปัจจุบันนี้ genotype แบ่งได้ไม่น้อยกว่า 8 genotype คือ A B C D E F G H ถึงตัวสุดท้ายแสดงว่าเรียงตามตัวอักษร คือ genotype A, genotype B, genotype C ไล่มาเรื่อยๆ ในปัจจุบันมี 8 genotype นิสิตปริญญาเอกผมเพิ่งวินิจฉัยคนไข้คนไทยคนหนึ่งเป็น genotype G จริงๆ แล้วเรามีวิธีการอย่างไร แต่อย่างไรก็ตามถ้าดูตามการระบาดวิทยาของ genotype ของ hepatitis B แล้ว เราจะเห็นได้ว่ามีความสำคัญจริงๆ คือสายพันธุ์พบได้ทั่วโลก แต่มักจะพบทางยุโรปและอเมริกา ในประเทศเราส่วนใหญ่เป็น genotype C กับ B ร้อยละ 60 เป็น hepatitis genotype B ร้อยละ 40 เป็น genotype C ร้อยละ 40 และ genotype D อยู่เอเชียใต้ จะเห็นว่า genotype ในอเมริกาใต้ เป็น genotype F ที่จริง genotype G นี้ เพิ่งวินิจฉัยได้และพบเพียงไม่กี่คน คือเป็น A แต่มี G แฝงอยู่เป็นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เพราะฉะนั้นถ้าเรามาดู clinical outcome ของ genotype แล้ว หลายรายงานที่ออกมาคล้ายคลึงกันก็คือ genotype C ค่อนข้างรุนแรงที่สุด ที่บอกว่ารุนแรงที่สุดคือการทำให้เกิดโรคไม่ว่าจะดำเนินโรครุนแรงไปเป็นตับแข็ง หรือมะเร็งตับ อุบัติการณ์ในการเกิดโรค genotype C ค่อนข้างมากกว่า genotype อื่น นอกจากนั้นหลายคนยังบอกว่า genotype อาจจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย antiviral drug โดยการให้ไม่ว่าจะเป็น interferon หรือให้ larmivudine

Geographic Distribution of HBV Genotype

Clinical differences between genotype B & C

Genotype B

Taiwan, Japan & China

- Rarely associated with development of HCC
- More common in young non-cirrhotic HCC patients (age<50 years)
- High prevalence of pre-Core mutation

Genotype C

- More severe liver disease leading to HCC
- More prevalent in patients with cirrhosis and HCC (age>50 years)
- High frequency of Core promoter mutation

จะเห็นว่าข้อมูลของจีน ญี่ปุ่นและไต้หวัน รวมทั้งประเทศไทย ที่ได้ทำเสร็จแล้ว เห็นชัดว่า genotype C นี้ จะทำให้เกิดโรคตับรุนแรงกว่าที่จะไปเป็นมะเร็งตับมาก

กว่า genotype B รวมทั้งที่จะไปเป็นตับแข็งหรือความรุนแรงของโรคมากกว่า แต่ genotype B นี้ พบว่ามี Pre core promoter mutation มากเพราะฉะนั้นด้วยเหตุผลอันนี้ ถ้าเรามาดูว่าประเทศเรา 60% เป็น genotype C 40% เป็น genotype B เพราะฉะนั้นทำไมในเอเชียทั้งหลาย hepatitis B จึงค่อนข้างรุนแรงกว่า hepatitis B ของทางยุโรปหรือทาง Africa เพราะว่าทางเอเชียของเราจะ more prevalent ของ genotype C genotype A แล้วส่วนใหญ่จะออกมาในรูปของ hepatitis genotype D ก็มีการพูดถึงลักษณะของ genotype D นี้จริงๆ แล้วนี้ จะมีลักษณะพิเศษอันหนึ่งมี deletion II amino acid หรือ 33 base ที่ตำแหน่งของ PreS1 เป็นส่วนหนึ่งของ genotype D ซึ่งบ้านเราไม่มี แต่บ้านเรามีลักษณะคล้ายๆ genotype D ก็คือ hepatitis B ของชะนี ซึ่งถ้าดูตามผิวเผินของ genotype นี้ คล้ายกับ genotype D

เพราะฉะนั้นจะเห็นว่าการที่ตอบสนองต่อ interferon ก็เหมือนกัน จะเห็นว่า genotype B และ C นี้ แน่นอนโรคค่อนข้างรุนแรง เพราะฉะนั้นการ response ต่อยาต้องด้อยกว่า genotype A อัตราของการตอบสนองน้อยกว่า ในทำนองเดียวกัน ถ้าไม่มีการรักษา ก็เหมือนกัน genotype B นี้ ดีกว่า genotype C ถ้าใครติดเชื้อ genotype C การรักษาจะได้ผลน้อยกว่า โอกาสจะเป็นโรคร้ายรุนแรงกว่า ข้อมูลทั้งหมด เราได้ทำการศึกษาอีกระดับหนึ่งแล้ว แล้วข้อมูลที่ได้นี้ก็สอดคล้องกับหลายประเทศ แต่เราจะรู้ได้อย่างไรว่าคนไข้คนไหนเป็น hepatitis C genotype อะไร วิธีการทำ genotype ซึ่งจริง ๆ มีหลายวิธี วิธีที่ดีที่สุดที่บอกได้แม่นยำคือการถอดรหัส ก็คือการอ่านรหัสในส่วนของ PreS1 เลย แต่วิธีที่อาจจะง่ายลงมาอีกวิธีหนึ่งคือ amplified ส่วน PreS1 และใช้วิธีของ RFLP โดยการตัดด้วย enzyme อย่างน้อย 6 ตัว ในการตัดเพื่อให้ได้ละเอียด แต่แน่นอนอีกวิธีหนึ่งเราอาจจะออกแบบ primer เป็น specific ต่อ genotype เลย ถ้าขึ้น band นี้เป็น genotype นี้ band นี้เป็น genotype นี้ แต่วิธีนี้จะต้องรู้ genotype ที่ prevalent อยู่ก่อน หรืออาจจะใช้วิธีhybridization นอกจากนี้ยังมีคนที่พยายามจะดูว่าการ genotyping โดยใช้ real time PCR การใช้ PCR RFLP ก็เป็นอีกวิธีโดย amplified fragment โดยเฉพาะในส่วนของ PreS1 ขึ้นมา และหลังจากนั้นก็ตัดด้วย enzyme และดู pattern ว่าเป็น genotype อะไร จะเห็นว่า pattern ออกมามากมายเลย แล้วก็แปลผล

Influences of HBV Genotype

- Clinical features of infection (development of severe liver injury, cirrhosis and HCC)
- Response rate to anti-viral treatment
- Long-term prognosis

Clinical differences between genotype A&D

India & Europe

Genotype A

- Most patients have chronic hepatitis

Genotype D

- More often in patients with acute hepatitis
- More severe liver disease & may be associated with development of HCC (age <40 years)

Response to anti-viral treatment

Response to IFN-α therapy

- Genotype C & D are associated with lower response rate than genotype A & B

Response to lamivudine therapy

- Genotype B seems to have a better response compared with genotype C

Responses to anti-viral treatment

Response to IFN-α therapy

- Genotype C & D are associated with

lower response rate than genotype A & B

Response to lamivudine therapy

- Genotype B seems to have a better response compared with genotype C

เพราะฉะนั้นการทำจะต้องอาศัยความชำนาญในการที่จะดูขนาด band และดู pattern ให้เป็น เพื่อที่จะบอกว่าเป็น genotype อะไร เพราะฉะนั้นแน่นอนก็ไม่ยากนัก แต่ถ้าทำ genotyping โดย sequencing ก็คงจะง่าย ทำ amplified ส่วน PreS1 ขึ้นมาเลย แล้วก็ทำขั้นตอนเข้าสู่ขบวนการถอดรหัส เมื่อถอดรหัสแล้ว อ่านลำดับ base เมื่ออ่านลำดับ base เสร็จแล้ว ก็ไปเปรียบเทียบกับ genotype ที่เป็น standard อยู่แล้ว โดยการทำการวิเคราะห์ขึ้นมา จะออกมาเป็นรูปของ phylogenetic tree และถ้า sequence นี้ไปตกอยู่ใน node ของ genotype อะไรก็จะแปลผลตามนั้น นอกจากนี้ยังมีวิธีการ real PCR ในการทำ genotyping โดยดู melting curve area ในการทำ PCR

HBV genotyping

- Sequencing
- PCR-RFLP
- PCR (using genotype specific primer)
- Genotype Specific Hybridization Probe

Quantification of viral load

- ELISA
- Real - time PCR

Additional findings

- Correlation between HBV genotypes and clinical features of infection
- Correlation between HBV DNA levels and clinical features of infection

เป็นข้อมูลการศึกษาของนิสิตปริญญาเอก แยก 9 genotype โดยดู curve ของ melting ในขบวนการ real time PCR และ real time PCR ก็สามารถวัดในเชิงปริมาณ และ genotype ได้ในเวลาเดียวกัน โดยใช้ one tube ได้ทั้ง quantitative แล้วบอก genotype ได้ด้วยในขณะเดียวกัน แต่ genotype ที่แยกได้จริง ๆ แล้ว จะแยกได้ระหว่าง genotype B กับ genotype C นี้ ค่อนข้างดี genotype A ยังมีปัญหาในการแยกออกไป นับว่าโชคดีของประเทศเราซึ่งมี genotype A น้อยมาก ส่วนใหญ่จะเป็น B กับ C

Benefits of HBV Genotyping by Melting Analysis

- One step processing (Real-time PCR)
- No need for post-PCR processing step
- Decrease the risks of contaminations
- Less time consuming
- High sensitivity & Accuracy for genotyping
- Reproducible
- Can be used to quantify HBV DNA level

Melting curve ตอนที่ทั้งในขบวนการของ lab นี้จะแยกกันค่อนข้างชัด เพราะฉะนั้นข้อดีอันนี้ เราก็วัดปริมาณในปริมาณเดียวกัน พร้อมๆ กัน

Clinical Implication

Quantification of HBV DNA level & determination of genotype during the course of anti-viral treatment are important in terms of

- Diagnosis
- Prognosis
- Decision for the best anti-viral therapy

Hepatitis C virus

- Family Floviviridae
- Genus Hepatitis C
- Genome (+) 55 RNA 9.4 kb
- Enveloped, icosahedral capsid
- Size 40-50 nm in diameter

จะเห็นว่าการวัดเชิงปริมาณโดยใช้ real time PCR ในผู้ป่วยเป็น hepatocellucar carcinoma อัตราการพบ

เป็น genotype C สูงมาก 80% กับ 20% ทั้งๆ ที่ normal ของ population เราเป็น 60% (genotype C) และ 40% (genotype B) แต่ถ้าเราเอาคนไข้ group ที่เป็น hepatoma คนไข้ที่ cirrhosis กับ hepatoma นี้ genotype C นี้จะมากกว่า

การหา genotyping ที่เราทำในขณะนี้ คือการวัดเชิงปริมาณของไวรัสตับอักเสบบีในคนไข้ ซึ่งมีประโยชน์มากในเรื่องของการรักษา หลังจากการรักษาแล้วเราดูว่าปริมาณไวรัสลดลงแค่ไหน เมื่อรักษาไปแล้วเราต้องการวัดปริมาณ viral load ถ้าเรามีคนไข้ที่เป็น hepatitis B แล้วเราวัดเชิงปริมาณในคนไข้ที่ไม่มีอาการ พวกนี้ viral load สูงมาก พอคนไข้ที่เป็นมะเร็งตับแล้ว viral load ต่ำ อันนี้ตรงไปตรงมาและในกลุ่มนี้มี “e” antigen มักจะ negative แล้ว จะพบ viral load ของคนไข้ ถ้าดูจาก asymptomatic carrier, chronic hepatitis และเป็น cirrhosis และ hepatoma ปริมาณ viral load จะค่อยๆ ลดลง จริงๆ แล้ว viral load ไม่มีความสำคัญที่ว่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดความรุนแรงของโรค เพราะว่า virus ได้ integrate และสร้างความเสียหายไปแล้ว เพราะฉะนั้นแน่นอนละ viral load ไม่ได้เกี่ยวข้องกัน เพราะ

Prevalence of HCV in healthy blood donors andHBsAg negative patients with chronic hepatitis

	Blood Donors	HBsAg-ve chronic hepatitis
Australia	0.3%	88%
Hong Kong	0.4%	50%
Japan	0.6-1.9%	68-97%
New Zeland	0.4%	50%
Korea	1.3%	38-46%
Taiwan	0.8-0.95%	44-82%
Thailand	1.5%	42%

HCV infection in drug abuses

	n	Sero+ve n(%)	RNA+ve n(%)
IVDU	104	80(77)	57(54.8)
Methamphetamine	99	11(11)	9(9.1)
Others	49	7(14.3)	10(20)

Hepatitis C virus infection in Drug abuse

Group	Total n	1b(%)	3a(%)	3a,6a(%)	6a(%)
IVDU	57	14.1	68.4	7.0	10.5
Methamphetamine	9	11.0	78.0	0	11.0
Others	10	0	90.0	0	10.0

ฉะนั้นในแง่ของ genotype ก็คงจะเกี่ยวข้องตั้งแต่การวินิจฉัย แล้วถ้าเรารู้ genotype B กับ genotype C เราก็จะบอก cirrhosis ได้ และรวมทั้งการวางแผนการให้การรักษา

Hepatitis C จริงๆ แล้วหลังจาก hepatitis B เริ่มน้อยลง จุดเด่นของ hepatitis C ก็เพิ่มขึ้นๆ มาโดยตลอด ซึ่งเราประมาณการกันว่าจริงๆ แล้ว ในขณะนี้ในประเทศเรามีการติดเชื้อ HCV 8 แสนคน และ hepatitis C จริงๆ ในประเทศเรามีอยู่เท่าไหร่

Hepatitis C ทุกคนก็รู้ว่า semi flavi เป็น single stranded RNA ความยาวประมาณ 10 kb เป็น single strand และสร้างโปรตีนขึ้นมา ในส่วนของ core ส่วนของ envelope ในส่วนของ function ต่างๆ แล้วที่เราพูดถึงเสมอ ในแง่ของ structure ของตัว virus ตับอักเสบ C

HCV genotypic distribution

Genotype	**Area**
1a	United State, North Europe
1b	World wide
2a	Japan, Italy
2b	Japan, Italy
3	SE Asia
4	Africa, Middle East
5	South Africa
6	Hogn Kong, Southeast Asia

HCV genotype

Genotypic distribution in Thailand

(RFLP)

Genotype		
a1	15	11.8
1b	46	36.2
3a	51	40.2
3b	3	2.4
6, 6a	9	7.1
untypeable	3	2.4

Theamboonlers et al.(1999)

Simmonds P Hepatol 1999;31(51):54-60

Hepatitis C นี้ คล้ายกับ HIV ก็คือ quasispecies ก็คือว่าในคนไข้ 1 คน ก็มีความหลากหลาย ถ้าเราดูลำดับ base แล้วก็จะไม่เหมือนกันทีเดียว ในคนไข้คนเดียวกัน แม้จะเป็น genotype เดียวกัน จะต่างกันแค่ 2-5% ของลำดับ base ที่เราเรียกว่า quasispecies ในวารสาร Science วารสารนี้บอกว่าประชากรทั่วโลกติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีไปแล้ว 170 ล้านคน และใน 170 ล้านคนในประเทศไทยบอกว่าติดเชื้อไปประมาณ 5-10% เชื่อหรือไม่ ว่าสถานการณ์เป็นอย่างไร ถ้าเอาตัวเลข 5-10% ของประเทศไทยประชากร 60 ล้านคน ผมว่าเป็นไปไม่ได้จริงๆ แล้ว ทางภาคอีสานคงจะสูงจริง แต่ประชากรของไทยเกือบครึ่งหนึ่งเป็นเด็ก hepatitis C ในเด็กนี้ เราเคยกล่าวมาหลายที่แล้ว ต่ำมากเลย แต่ hepatitis C จริงๆ แล้วมี prevalence เริ่มสูงขึ้นๆ หลังจากผ่านวัยเด็ก เพราะว่าไป expose ต่างๆ มีการศึกษาของธรรมศาสตร์ที่ไปศึกษาที่ในจังหวัดอุบลฯ จำนวนที่พบคือ 2,000 specimens ในเด็กต่ำกว่า 15 ปีนี้ ถึงแม้อยู่ในภาคอีสาน hepatitis C sero positive ก็เป็นอย่าง nearly zero แล้วค่อยไปเริ่มสูงขึ้นทีหลัง อายุ 15 ปี เพราะว่าหลัง 15 ปีมีการใช้เข็มฉีดยา ในทางภาคอีสานอาจจะเป็นตัวเลขจริง แต่เมื่อมองดูทั่วประเทศแล้วผมคิดว่าคงเป็นไปไม่ได้ 5-10% คูณ 60 ล้าน เด็กติดเชื้อ hepatitis C ไปแล้ว 3 ล้านคนหรือ 4 ล้านคน ถ้าดูตัวเลขอันนี้ ซึ่งผมประเมินว่า ในประเทศไทยมีการติดเชื้อ hepatitis B ไปแล้วอยู่ประมาณ 8 แสนคน ตัวเลขเก่ามากที่พิมพ์ในปี 1997 ซึ่งสอดคล้องกับที่เคยบอกว่าในสมัยก่อนตั้งแต่ 1993-94 เป็นอย่างนั้นจริงๆ แนวโน้มของ blood donor ที่เป็น new blood donor นี้ ตรวจพบ anti HCV ลดลงมาโดยตลอด ใช้คำว่า new blood donor แน่นอนตัวเลขนี้อาจจะต่ำกว่าความเป็นจริงของประชาชน คนที่รู้ว่า

ตัวเอง positive ก็ไม่ไปบริจาคโลหิต เพราะฉะนั้นอย่างไรก็ตาม มีแนวโน้มลดลงเหลือ 0.9% ซึ่งลดลงทุกปี จะลดลงด้วยเหตุประการใดก็ตามแต่ ทาง blood bank อาจจะกรองด้วย questionare ออกไปจำนวนหนึ่งแล้วก็ได้ ถึงแม้จะเป็นใน new blood donor อย่างไรก็ตามคงไม่ได้อยู่ที่ 5-10% แน่ๆ ผมคิดว่าต่อให้เพิ่มอีกให้ 1.5 เท่า ก็น่าจะอยู่แถว 1% กว่าๆ หรือ 2% เป็นอย่างมาก เพราะฉะนั้นทั่วประเทศไม่น่าจะอยู่ที่ 5-10% ยกเว้นในบาง area ของภาคอีสานอาจจะยอมรับ

แต่แน่นอนปัญหาของเรามีอยู่ว่ามีจำนวน IVDU อยู่แค่ไหน ผมตัดสินใจเลือกไปทำการศึกษา IVDU ใน 3 จังหวัดทางภาคใต้ ซึ่งการศึกษานี้มีข้อมูลที่สำคัญมาก วันที่เริ่ม IVDU เริ่มฉีดยาเข้าเส้นนี้ ระยะเวลา 6 เดือนถึง 1 ปีก็จะติด HCV 80-90% จะติดหมดเลย ที่ติด hepatitis C หมดเลย เพราะว่าแค่ใช้เวลา 1 ปีเท่านั้นเอง ก็จะติดหมด แสดงว่า hepatitis C ติดทางเข็มฉีดยาง่ายกว่า AIDS มาก กลุ่ม IVDU มาตรวจจะตรวจพบ Hepatitis C เกือบ 80-90% แล้วในขณะเดียวกันกลุ่มที่ติดยาบ้า โอกาสติด hepatitis C ขึ้นมา 10% และกลุ่มที่ติดสารระเหยต่างๆ แสดงว่าการติดยาบ้าคงจะไม่ติดจริง อาจจะมี IVDU แฝงอยู่ ซึ่งเราไม่รู้ก็ได้ เพราะฉะนั้นพวกนี้สูงกว่า เพราะฉะนั้นผมคิดว่าวารสาร science นำตัวเลขพวกนี้มาบวกหรือเปล่าไม่รู้ทำให้มองดูแล้วตัวเลขค่อนข้างมาก ผมคิดว่าบ้านเรา genotype ของ hepatitis C มีหลากหลาย การแยก genotype เป็นวิธีการที่ซับซ้อน เนื่องจากเป็น RNA virus ที่มีความหลากหลาย เพราะเนื่องจากมันมีความหลากหลายนี้เอง genotype จึงเพิ่มขึ้นทุกวัน แต่แน่นอน genotype ของบ้านเราที่สำคัญคือ 1 3 6 ซึ่ง 1 เป็น 1b และ 3a แล้ว genotype 6 ในขณะนี้ genotype 6 เราจะใช้คำว่า 6a หรือ 6 varient ใน genotype 6 นี้น่าสนใจมาก เพราะว่าเป็น genotype ที่พบ เฉพาะ South East Asia ในบ้านเรากับเวียตนาม genotype 6 ของเรานี้ ยังถูกแจกแจงไปเป็น genotype 8 9 11 แล้วทางยุโรปเองนี้ ต้องการเลือด genotype 6 มาก เพราะจะไปทำ kit มาขายเรา พยายามติดต่อมาหาผมบ่อยมากเลย ผมว่าจริงๆ แล้ว genotype 6 เป็น genotype ที่ทุกคนต้องการที่จะไปทำการศึกษา แล้วสิ่งที่สำคัญก็คือพบสายพันธุ์ในบ้านเรา เราควรจะทำการศึกษาเอง genotype ที่สำคัญของเรา ถ้าแยกแล้ว พบบ่อยที่สุดในเมืองไทยจะเป็น 3a รองลงมาเป็น 1b แล้วของเราเป็น 6 varient เพราะใน 6 นั้นยังถูกแฝงไปด้วย 8 9 11 เพราะฉะนั้นจะเห็นได้เลยว่าทุกคนพยายามจะ scope แบบใดแบบหนึ่ง ถึง South East Asia เองนี้ genotype ที่ 6 ก็ไม่เหมือนกับของฮ่องกง หมายถึงในบ้านเราไม่เหมือนกับฮ่องกง แล้ว genotype 6 นี้ ถ้าใครทำ research เกี่ยวกับ genotype 6 แล้วได้ตีพิมพ์แน่ๆ รับรองเลย ไม่ว่าผลการรักษาด้วย interferon genotype 6 เป็นอย่างไร ท้องที่อื่นไม่มีและไม่มีคู่แข่ง ผมต้องการจะถอดรหัส genotype 6 นี้ ผมทำ genome research ของ genotype 6 ผมได้ลงพิมพ์แน่ๆ เพราะที่อื่นไม่มี เพราะฉะนั้นสิ่งหนึ่งที่เราทำ ตรงนี้ผมบอกได้เลยว่าเขาอยากได้ เขาต้องการ ส่วน genotype อื่นๆ ก็คล้ายๆ กัน จะเห็นว่าจากการศึกษาของบ้านเราจริงๆ แล้วก็ไม่ต่างกัน ของเราส่วนใหญ่ก็จะเป็น 1b, 3a ส่วน genotype 6 จริงๆ นี้หลังจากที่ประเมินทั้งประเทศแล้ว genotype 6 ก็จะอยู่ที่ประมาณ 10-15% ที่จะเป็น genotype 6 ทีนี้การที่จะหา hepatitis C นี้ จะวินิจฉัยอย่างตรงไปตรงมาจาก sero แล้วมาถึง molecular ก็มีมากมาย ที่เรารู้จักกันดีอยู่แล้ว แล้วก็มาถึง genotype จริง ถ้าถามผม ในขณะนี้ว่าจะแยก subtype ของมันได้อย่างไร ดีที่สุด ถามผมในขณะนี้ผมก็บอกว่า sequencing ดีที่สุด โดยการดูลำดับ base ในส่วนของ non coding กับ core region จะเป็นตัวที่ง่ายที่สุด และบอกได้ถูกต้องที่สุด เพราะการทำด้วยวิธีอื่นๆ คงจะตอบมีทั้ง untypeable และมีทั้ง type ต่างๆ ถ้าพูดถึงในส่วนของ core region ในการวินิจฉัยผมคิดว่าทุกคนพวกเราคุ้นอยู่แล้ว การวินิจฉัยโดยใช้ RFLP ส่วนที่จะใช้คงจะใช้ในส่วนคงที่ คงหนีไม่

พ้น non coding กับส่วนของ core region จะเอาส่วนไหนก็ได้ ที่พยายาม design ขึ้นมา ส่วนในการที่เมื่อเราวินิจฉัยว่ามี RNA อยู่ เราจะ genotyping การ genotyping นี้ มีหลายวิธี ที่จะบอกว่า genotype อะไร วิธีที่หนึ่งก็คือทำ PCR และตัดด้วย enzyme ดู polymorphisms การตัดด้วย enzyme ก็มีหลายวิธี สู้การทำ sequencing ไม่ได้ มีวิธีการอีกอันหนึ่ง คือ line probe assay เราเองได้มีประสบการณ์หมดทุกวิธี จะเห็นว่าการใช้ PCR และ RFLP เพื่อ genotyping hepatitis C นี้ ก็เหมือน hepatitis B ถ้าอยากให้ละเอียดก็ใช้ enzyme หลายๆ ตัว และคนแปลผลจะต้องเก่งมี subtype มากมาย ถ้าเกิน 1 2 3 4 เพื่อที่จะออกมาว่าอันนี้เป็น genotype 1 หรือ 3 อะไรต่างๆ เพราะ genotype มีมากมายเหลือเกิน แต่ clinician ต้องการนี้ ต้องการให้ผมบอกว่าเป็น genotype 1 หรือไม่ใช่ genotype 1 เขาต้องการแค่นี้เท่านั้นเอง ที่ clinician บอกให้ทำ แล้วบอกว่าถ้าเป็น genotype 1 เขาบอกว่าจะดื้อต่อ interferon ถ้าไม่ใช่ genotype 1 ตอบสนองต่อ interferon การรักษาได้ดีกว่า clinician เขาไม่สนใจว่าเป็น genotype อะไร แต่ผมบอกว่าเป็น genotype 6 ล่ะ response ต่อ interferon data ไม่มีใครรู้ แน่นอนทำด้วย sequencing 1-5 เมื่อเข้าไปดูใช้ phylogenetic ว่าอยู่ใน nodeไหน ถ้าอยู่ในกลุ่มไหน node ไหน เราก็อ่าน genotype เป็นแบบนั้นเลย ใน 77 คนถ้าที่เป็น blood donor ที่เราทำการศึกษา เราก็จะ classified ได้ชัดเลย โดยใช้ referenceที่เป็น known เข้าไป 1 ตัวหรือ 2 ตัวก็ได้ จะมี referencestrain อยู่ในนี้ เข้าไปเกาะ strain กับ reference strainก็แสดงว่า specimen นั้นเป็น genotype อะไร ก็ตรงไปตรงมา ไม่ยากเลยเพราะ computer ทำให้ ส่วนการตรวจ assay ด้วย Line probe assay นี้ จริงๆ ก็ตรงไปตรงมา ก็คือการอ่าน band ที่ band นี้บวก band นี้ แต่อย่าลืมว่าอันนี้แพงมาก แล้วจริงๆ ที่เราทำการศึกษาโดยเอาของ Innogenetic เข้ามาทำ ผลปรากฏว่าไม่สามารถอ่าน genotype 6 ได้ เพราะว่าเขาไม่มี genotype 6 จะถูก delete ไปอยู่ genotype 1 หมด แล้วไม่สามารถได้ genotype 6 เราก็ทำเปรียบเทียบ 3 วิธีแล้วก็ตีพิมพ์ลงใน J. Viral Method ลงไปเลยว่า genotype6 อ่านไม่ได้

Laboratory test for HCV

- Serology
- anti HCV
- Molecular
- HCV-RNA
- RT-PCR
- NAT
- Quantitative : Real-time PCR
- HCV genotype

Methods for HCV Genotyping

PCR and RFLP

- core (Mellor et al 1996)
- 5' NCR (Davidson et al 1995)
- 5' NCR and core (Buoro et al 1999)

Sequencing

- 5' BCR, core, NS3, NSS (Chan et al 1992)
- NS5 (Simmonds et al 1993)

INNO-LiPA 5'NCR

ในแง่ของ application ของ genotype ก็ตรงไปตรงมา ในแง่ระบาดวิทยาก็จะรู้ว่าตัวนี้เป็นอะไร เมื่อสักครู่นี้มีคำถาม HIV ยกตัวอย่างให้ดู เพื่อ identified ติดเชื้อมาจากไหน หรือดูที่ outcome อย่างที่ผมบอกแล้ว ว่า genotype 3 รักษาด้วย interferon ซึ่งค่อนข้างได้ผลดี การรู้ genotype ก็คล้าย HIV มาช่วย vaccine development ในเรื่องของการที่รู้ว่ามาจากไหน อันนี้เป็นข้อมูลของเราทำร่วมกับ รพ.พระมงกุฎเกล้า เป็นเรื่องที่น่าสนใจมาก ก็คือว่าเราสนใจว่า hepatitis C นี้ติดต่อระหว่างสามีภรรยามากน้อยแค่ไหน เพราะ interspon-sal transmission ก็ไปเลือก hepatitis C มา 160 ราย

แล้วก็เจาะเลือดคู่สามี ภรรยา ใน 160 รายนี้ แต่ละรายอยู่กินกันมา 20-30 ปี มีลูกแล้วหลายคน ใน 160 รายนี้ เราเจอ positive antibody ด้วยกันคือ 4 ใน 160 ราย พอบอกว่า 160 รายเจอ 4 ราย เขาก็รู้กันอยู่แล้วมีเปอร์เซนต์เท่านี้ เมื่อเราทำก็อยู่ประมาณอย่างนี้ เรารู้อยู่แล้ว ผมก็บอกว่าใน 4 รายนี้ เราทำ classified คู่กับสามีกับภรรยา ใน 4 รายนี้ มีภรรยาหรือสามีคู่หนึ่งไม่มี ตรวจไม่พบ HCV RNA คือมีแต่ antibody ก็เลยเหลือ 3 คู่ เพราะว่าคู่หนึ่งตกหล่นไปแล้วที่เป็น negative RNA ก็แสดงว่าตรวจพบ anti HCV แต่ไม่มี viremia ก็เลยเหลือ 3 คู่ ในที่สุดเหลือ 3 คู่นี้ ผมก็บอกว่าใน 3 คู่เราจะพิสูจน์ได้อย่างไรว่า ภรรยาติดกับสามี หรือสามีติดกับภรรยา เราก็แน่นอนใช้ molecular tool เข้ามาจับ สิ่งแรกที่เราดูเราก็ดู polymorphisms ของมัน ดู genotype ก่อนแล้วก็ดู polymorphisms แล้วก็ถอดรหัส ผลออกมาผมสรุปง่ายๆ เพื่อให้เร็วขึ้น สมมติว่าสามีเป็นพันธุ์เชาเชา ส่วนภรรยาเป็นเทอเรีย ก็แสดงว่าต่างคนต่างไปเอามา แต่ถ้าแน่นอนละเป็นสายพันธุ์เดียวกัน ก็แสดงว่าติดกันก็ตรงไปตรงมา ผลปรากฏว่าใน 3 คู่นี้ จะมีสายพันธุ์เดียวกันแค่คู่เดียว อีก 2 คู่ต่างสายพันธุ์กัน ทั้งคู่สามีภรรยาถ้าไปตรวจสอบแล้วนี้ มี risk factor ทั้งนั้น ที่เคยผ่าตัดได้เลือดมาเมื่อปีที่แล้วอะไรต่างๆ เพราะฉะนั้นจากทั้งหมดเราดู polymorphisms ก่อน คือดู polymorphisms อย่างนี้เหมือนกันหรือเปล่า ไม่เหมือนกันเลย นี่สามี นี่ภรรยา subtype ก็ไม่เหมือนกัน สามีกับภรรยาคือ 2A กับ 2B และ 3a กับ 3b ไม่เหมือน สามีหลายคู่ที่ไม่เหมือน และดู phylogenstic tree ถ้าคู่สามีภรรยาที่เหมือนกันจริงๆ ก็ต้องเสี่ยง และจากการถอดรหัส เราตอบได้เลยว่าในที่สุดจะพบ genotype A จริงๆ เลยก็คู่เดียว ใน 160 อีก 2 คู่น่าจะไปรับมา เพราะฉะนั้นข้อมูลทั้งหมดสามารถตีพิมพ์ใน Journal Gastroe enterology ได้เรียบร้อยแล้ว เมื่อปีที่แล้ว ผมยกตัวอย่างอันหนึ่งคล้ายๆ กับคนไข้ HIV เป็นการพิสูจน์ว่าเขาได้รับจากใคร บังเอิญเรามีคนไข้เด็กคนหนึ่งที่เป็นไข้เลือดออก แล้วก็ได้รับเลือดไปทั้งหมดนี้ 12 donor 10 ยูนิตเป็น fresh frozen plasma และ 12 ยูนิตเป็น platelet บังเอิญที่เขาได้รับเลือดนี้ แม่คนไข้เป็นพยาบาล เพราะฉะนั้นเขากลัวเอดส์มากเลย เขาก็เลยขอเลือดจากนักเรียนพยาบาล ก็เชื่อว่านักเรียนพยาบาลนี้ไม่เป็นเอดส์ แต่ไม่ได้นึกถึง hepatitis C ก็เลยไม่ได้ตรวจกรอง hepatitis C แล้วนำเลือดให้เด็กคนนี้ หลังจากนั้นอีก 5 อาทิตย์ต่อมาเด็กก็ตัวเหลืองตาเหลือง เป็น hepatitis C แล้วก็ส่งมาให้เรา สิ่งแรกที่เราตรวจก็คือตรวจพบ antibody ต่อ hepatitis C เราเจอแบบนี้เมื่อปีที่แล้ว เมื่อสองปีที่แล้วก็เจออีก ที่โรงพยาบาลชานเมือง เราบอกว่าให้แม่ไปเจาะเลือดนักเรียนพยาบาลที่ไปบริจาคเลือดมาทั้งหมดเลย 12 donors เขาเจาะมาให้หมดเลย และใน 12 donors นี้ เราตรวจ antibody ต่อ hepatitis C พบ 1 ราย คนเดียวเท่านั้นเองในจำนวน 12 คน ผมก็โยนคำถามให้นิสิตปริญญาเอกบอกว่าพิสูจน์ให้หน่อยว่า donor กับ recipient คนนี้เขาติดกัน ผมบอกเขาว่าห้ามถอดรหัส ห้าม sequencing ไม่ให้ sequence ความจริงผมก็บอกว่าเขาคิดเป็นหรือไม่

Application of HCV Genotype

- Epidemiology
- Identification (Source of HCV infection)
- Treatment Outcome
- Prevention and Vaccine Development

Inter-spousal transmission

อันแรกที่เขาทำก็คือว่า genotype recipient กับ donor ทันทีเลย เป็น 3a ทั้งคู่ donor ก็ 33a recipient ก็ 3a สรุปแล้ว 3a 60% ก็ประมาณ 50-60% สำหรับเมืองไทยอยู่แล้ว เพราะฉะนั้นก็ไม่ได้บอกอะไร ผมก็บอกว่า hepatitis C ส่วนไหนที่ hypervariable มากที่สุด ที่มีการกลายพันธุ์สูงที่สุด ก็คงหนีไม่พ้นในส่วนของ envelop ก็ให้ amplified ในส่วนของ envelop แล้วดู polymorphisms ของ envelop ใช้ enzyme ที่มีอยู่ใน lab polymorphisms และก็เปรียบเทียบกับคน 2 คน จะ

เห็นว่า recipient กับ donor amplified ขึ้นมาแล้ว จะเห็นว่า recipient, donor ว่าเหมือนกันมากเลย control คนอื่นไม่เหมือน recipient กับ donor มี pattern ที่คล้ายกัน เราเลือกในส่วนที่ hypervariable เปรียบเทียบกับ control อื่นๆ ที่ genotype 3a ใช้ enzyme หลายๆ ตัว เราก็พอจะบอกได้ว่า donor กับ recipient อันนี้นี่น่าจะมีความสัมพันธ์กัน โดยที่เอา 3a คนอื่น ไม่ relate กันเลย เพราะเราไป select มา ผลงานก็สามารถมาตีพิมพ์ในวารสาร Infection ได้อย่างสบายเลย อันนี้เป็นแนวความคิดว่าจริงๆ แล้วว่าจะเป็นอย่างไร และนำมาเปรียบเทียบ

ส่วนการ treatment genotype อย่างที่ว่านี้ hepatitis B ทุกคนรู้ว่าถ้าเป็น genotype 1 จะดื้อ ถ้าไม่ใช่ 1 จะ response ดีกว่า เพราะฉะนั้น clinician ต้องการให้เราดูว่าเป็น 1 หรือไม่ใช่ 1 เท่านั้น ที่จริงถ้า clinician ต้องการเช่นนี้ง่ายนิดเดียว ผมเองก็บอกไม่กล้าทำ เพราะการรักษาในปัจจุบันทุกคนก็รู้แล้วก็คงหนีไม่พ้น interferon, pegulated interferon ในปัจจุบันที่ใช้อยู่ มีคนไข้โครงการ 30 บาท โทรมาถามผม บอกว่ามีคนร้องเรียนอยากจะเอา pegulated interferon เข้าไปอยู่ในโครงการ 30 บาท คงต้องให้พิจารณากันเอง

Case study

11 year old boy

"Dengue shock Syndrome"

- 10 units → fresh frozen plasma
- 12 units → platelets

↓ 5 weeks

Jaundice, malaise, dark urine

"anti-HCV positive"

1 donor → anti - HCV positive

HCV genotype : 3a

RFLP : Hypervariable region

↓

Heterogeneity of HCV genome

RFLP

- Rsa I
- Ava I
- Hae III
- Dpn II
- BstU I

Treatment and outcome

- Selected treatment HCV genotype non I better than I

Interferon Sensitivity Determining Region (ISDR)

- NS5A
- Interaction with IFN-induced Protein Kinase (PKR)

Treatment of HCV

- IFN-alpha
- Ribavirin

เพราะฉะนั้นอีกอันหนึ่งที่จะให้เห็นคือว่า ในส่วนของ NS5A ที่เกี่ยวข้องกับ interferon ผมคงจะยังไม่ลงไปใน detail ว่าไปเกี่ยวข้องอย่างไรกับ genotype

Acknowledgements

We would like to express our gratitude towards the entire staff of the Viral Hepatitis Research Unit, Department of Pediatrics. Faculty of Medicine, Chulalongkorn University . Hospital, for their tireless effort in collecting the multitude of data required. We also would like to thank the Thailand Research Fund, Senior Research Scholar and Molecular Research Project, Faculty of Medicine. Chulalongkorn University, for supporting our group.