

ไวรัสตับอักเสบซี : คุณสมบัติทั่วไป ยารักษา การดื้อยาและวิธีตรวจการกลายพันธุ์

Hepatitis C virus: general property, drug treatment,
drug resistance and mutation detection

อัญชลี ศิษยนเรนทร์

ดวงกมล ชันธเลิศ

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

Anchalee Sistayanarain

Duangkamol Kunthalert

Faculty of Medical Science,

Naresuan University

DOI: 10.14456/dcj.2022.21

Received: May 19, 2021 | Revised: October 1, 2021 | Accepted: October 5, 2021

บทคัดย่อ

ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C virus: HCV) เป็นสาเหตุสำคัญของโรคตับอักเสบ โรคตับแข็งและมะเร็งตับ ปัจจุบันมีผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ไวรัสตับอักเสบซีจำแนกได้ 8 สายพันธุ์หลักและแบ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยที่แตกต่างกัน สายพันธุ์ 1-3 พบได้ทั่วโลก แต่สายพันธุ์ 4-6 พบได้เฉพาะบางภูมิภาคเท่านั้น ประเทศไทยพบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีสายพันธุ์ 3 มากที่สุด (ร้อยละ 47.8) สายพันธุ์ 6 (ร้อยละ 34.8) และ 1 (ร้อยละ 17.4) ตามลำดับ แนวทางการรักษาผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเดิมมีข้อจำกัดด้านอาการข้างเคียงและการดื้อยา ปัจจุบันได้มีการใช้ยากลุ่ม direct-acting antivirals agents (DAAs) สำหรับการรักษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ยากลุ่ม DAAs ประกอบด้วย NS3/4A protease inhibitors (PIs), NS5A inhibitors, NS5B nucleoside polymerase inhibitors (NIs) และ NS5B non-nucleoside polymerase inhibitors (NNIs) อย่างไรก็ตามยังคงพบการดื้อยาที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของไวรัส ดังนั้นการตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีอาจมีความจำเป็นในแง่ของการรักษา วิธีการที่นิยมสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ คือการตรวจสอบลำดับเบสและกรดอะมิโนของ NS3, NS5A และ NS5B ของไวรัสตับอักเสบซี

ติดต่อผู้พิมพ์ : อัญชลี ศิษยนเรนทร์

อีเมล : sisaya@rocketmail.com

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) is major course of hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV infection occurs worldwide including Thailand. Hepatitis C virus are classified into 8 main genotypes and several subtypes. Genotypes 1-3 can be detected worldwide while genotypes 4-6 are found in some geographical areas. In Thailand, HCV genotype 3 is the most predominant (47.8%) followed by genotype 6 (34.8%) and 1 (17.4%). Treatment of HCV infection with conventional antiviral drugs encounters the limitation due to the serious side effects and drug resistance. Currently, direct-acting antivirals (DAAs) have been a promising approach for HCV therapy. DAAs are composed of NS3/4A protease inhibitors (PIs),

NS5A inhibitors, NS5B nucleos(t)ide polymerase inhibitors (NIs) and NS5B non-nucleoside polymerase inhibitors (NNIs). However, drug resistance is also found to be associated with viral mutations. Detection of HCV gene mutations would be essential for the treatment. The popular method for the mutation assay is the investigating nucleotide sequence and amino acid sequence of NS3, NS5A and NS5B regions of HCV.

Correspondence: Anchalee Sistayanarain

E-mail: sisaya@rocketmail.com

คำสำคัญ

ไวรัสตับอักเสบซี, NS3, NS5A และ NS5B, การดื้อยา

Keywords

hepatitis C virus, NS3, NS5A and NS5B, drug resistance

บทนำ

ไวรัสตับอักเสบซี (Hepatitis C virus) อยู่ใน *Flaviviridae* มีกรดนิวคลีอิกชนิด RNA สายเดี่ยวแบบสายบวกประกอบด้วยบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีนส่วนโครงสร้าง (structural protein) และบริเวณที่กำหนดการสร้างโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้าง (non-structural protein) ไวรัสตับอักเสบซีเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของโรคตับแข็งและมะเร็งตับ เชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบ่งเป็นสายพันธุ์หลักและสายพันธุ์ย่อยที่แตกต่างกัน โดยพบการแพร่กระจายในแต่ละภูมิภาคของโลก ปัจจุบันที่ต้องคำนึงถึงเมื่อจะทำการรักษาโรคตับอักเสบซีเรื้อรัง ได้แก่ สายพันธุ์ของไวรัส ปริมาณ RNA ของไวรัส อาการอื่นที่เกิดขึ้นที่ตับ และการติดเชื้อไวรัสอื่นร่วมด้วย เป็นต้น ยาที่ใช้รักษาโรคตับอักเสบซีที่มีการพัฒนาในระยะแรก ได้แก่ interferon- α และ Ribavirin แต่มักพบปัญหาอาการข้างเคียง และการดื้อยาที่สัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของไวรัส ดังนั้นจึงมีกลุ่มยาที่มีการพัฒนาขึ้นมาใหม่สำหรับรักษาคือ direct-acting antiviral agents (DAAs) โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามเป้าหมายและกลไกการออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส คือ NS3/4A protease inhibitors (PIs), NS5A inhibitors, NS5B nucleos(t)ide polymerase inhibitors (NIs) และ NS5B non-nucleoside polymerase inhibitors (NNIs) อย่างไรก็ตามกลุ่มยา DAAs ยังมีข้อเสียที่สำคัญ คือ การพบรายงาน ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นในประเด็นของการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบซีที่อาจมีความสัมพันธ์กับการ

ตอบสนอง ต่อการรักษาด้วยยา แนวทางสำหรับการแก้ปัญหาคือการดื้อยาของเชื้อไวรัสประการหนึ่ง คือ การตรวจการกลายพันธุ์ ของไวรัสตับอักเสบซีโดยตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนของไวรัส ซึ่งจะเป็นประโยชน์เพื่อการเลือกยาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการรักษา บทความนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทบทวนองค์ความรู้ทางด้านคุณสมบัติทั่วไป ยารักษา การดื้อยา รวมทั้งวิธีตรวจการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบซีเพื่อนำไปสู่แนวทางการตรวจทางห้องปฏิบัติการ การป้องกันการติดเชื้อ และการรักษา

วิธีการสืบค้นข้อมูล

องค์ความรู้ในบทความนี้ได้จากการสืบค้นรวบรวม วิเคราะห์และวิจารณ์ข้อมูลจากบทความวิจัยทั้งในรูปแบบนิพนธ์ต้นฉบับและบทความพินิจ โดยรวบรวมจากงานวิจัยโดยเฉพาะงานวิจัยจากต่างประเทศที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ การสืบค้นจากฐานข้อมูลทางการแพทย์ที่เป็นฐานข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ โดยการสืบค้นจากฐานข้อมูลทางวิชาการที่น่าเชื่อถือ คือ PubMed โครงสร้างและองค์ประกอบของไวรัสตับอักเสบซี

ไวรัสตับอักเสบซีมีกรดนิวคลีอิกชนิด RNA ขนาดประมาณ 9,600 นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วย 5'UTR, core (C), envelope (E ชนิด E1, E2), P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B และ 3'UTR ที่กำหนดการถอดรหัสได้เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ คือ core, E1, E2 และโปรตีนอื่นคือ p7, NS2, NS3,

NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B (ภาพที่ 1) โปรตีนแต่ละชนิดมีบทบาทสำหรับขั้นตอนการเพิ่มจำนวนและการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่และบทบาทในปฏิสัมพันธ์กับเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญซึ่งเป็นเป้าหมายสำหรับการพัฒนายาเพื่อรักษาโรคตับอักเสบ

โปรตีน core ประกอบเป็น nucleocapsid ของไวรัส

โปรตีน envelope ประกอบเป็น envelope ของไวรัส มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์โฮสต์

โปรตีน P7 มีบทบาทสำคัญในการติดเชื้อและการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสใหม่

โปรตีน NS2 มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส

โปรตีน NS3 ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ serine protease ที่จำเป็นสำหรับการสร้างสายโปรตีน (polypro-

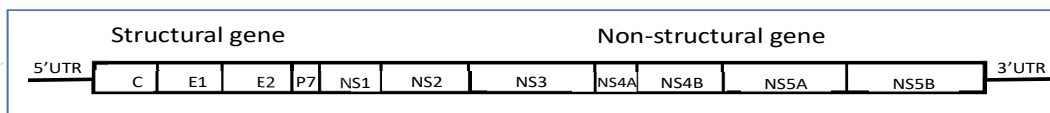
tein) และขั้นตอนการตัดแต่งโปรตีน (post-translational processing) และทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RNA helicase สำหรับขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส (replication)⁽¹⁻²⁾

โปรตีน NS4A ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์สำหรับโปรตีน NS3 และมีความสำคัญในการเกิด phosphorylation ของโปรตีน NS5A

โปรตีน NS4B ทำหน้าที่ในขั้นตอนการแบ่งตัวของไวรัส (replication)

โปรตีน NS5A จำเป็นสำหรับขั้นตอน viral RNA replication และขั้นตอนการประกอบเป็นอนุภาคไวรัส⁽³⁻⁴⁾ และอาจมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยา interferon ที่ใช้สำหรับรักษาโรคตับอักเสบ

โปรตีน NS5B ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RNA-dependent RNA polymerase จำเป็นสำหรับการสร้างสาย RNA⁽⁵⁾ การศึกษาพบว่าโปรตีน NS3 และ NS5A มีบทบาทต่อการทำงานของโปรตีน NS5B



ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสตับอักเสบซี

สายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบซี

ไวรัสตับอักเสบซีจำแนกได้ 8 สายพันธุ์หลัก (genotype) และแบ่งเป็น 86 สายพันธุ์ย่อย (subtype) ที่แตกต่างกัน⁽⁶⁾ โดยแต่ละสายพันธุ์จะมีการกระจายตัวแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคของโลก การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีทั่วโลกในปี 2015 พบการติดเชื้อสายพันธุ์ 1 ได้สูงสุดร้อยละ 44 ตามด้วยสายพันธุ์ 3 และ 4 พบร้อยละ 25 และ 15 ตามลำดับ ส่วนที่เหลือเป็นการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีสายพันธุ์ 2, 5 และ 6⁽⁷⁾ ไวรัสตับอักเสบซีแต่ละสายพันธุ์พบการแพร่กระจายได้แตกต่างกัน⁽⁸⁻¹⁵⁾

สายพันธุ์ 1 กระจายทั่วโลกและพบมากในแถบอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น

สายพันธุ์ 2 พบได้สูงในประเทศอุตสาหกรรมและพบได้ในแอฟริกาใต้และเอเชีย

สายพันธุ์ 3 พบได้ในยุโรป อเมริกา และเอเชียใต้

สายพันธุ์ 4 และ 5 พบส่วนใหญ่ในแถบแอฟริกาและตะวันออกกลาง

สายพันธุ์ 6 พบได้ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย เวียดนาม พม่า

สายพันธุ์ 7 พบได้ในแอฟริกากลาง

Petruzzello และคณะ รายงานการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบทั้งสายพันธุ์ 1-6 นอกจากนี้ยังพบการติดเชื้อแบบหลายสายพันธุ์ (ตารางที่ 1) สำหรับประเทศกัมพูชา พม่า และเวียดนาม พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีสายพันธุ์ 6 ได้สูง⁽¹⁶⁾

ตารางที่ 1 การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้⁽¹⁶⁾

ไวรัสตับอักเสบซี (สายพันธุ์)	การติดเชื้อ (ร้อยละ)
1	35.2
2	11.1
3	19.9
4	0.9
5	0.4
6	30.8
ติดเชื้อแบบหลายสายพันธุ์	1.7

จากรายงานการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในประเทศไทยของ Polaris Observatory HCV Collaborators พบสายพันธุ์ 1a, 1b, 3 และ 6 ร้อยละ 4.4, 13.0, 47.8 และ 34.8 ตามลำดับ⁽⁷⁾ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในผู้ป่วยที่มารับบริการที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย ระหว่างปี 2555-2558 พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีสายพันธุ์ 1, 2, 3 และ 6 ร้อยละ 48.5, 1.1, 45.4 และ 1.5 ตามลำดับ และพบการติดเชื้อแบบหลายสายพันธุ์ร้อยละ 3.5⁽¹⁷⁾ และจากการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตในเขตภาคเหนือตอนล่างของ Sistanarain และคณะ โดยตรวจพบสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้ 4 สายพันธุ์ ที่พบมากที่สุด คือ สายพันธุ์ 3a และจากการศึกษานี้ยังตรวจพบสายพันธุ์ 6 ได้มากกว่าสายพันธุ์ 1a และสายพันธุ์ 1b⁽¹⁸⁾ ระบาดวิทยา

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีพบได้ทั่วโลก ปี 2015 องค์การอนามัยโลกรายงานผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแบบเรื้อรังประมาณ 71 ล้านคน อุบัติการณ์การติดเชื้อทั่วโลกพบประมาณร้อยละ 1 พื้นที่ที่พบอัตราการติดเชื้อสูง ได้แก่ ภูมิภาคเมดิเตอร์เรเนียน พบร้อยละ 2.3 อุบัติการณ์ของการตรวจพบ anti-HCV ในกลุ่มประชากรทั่วไปในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ประเทศกัมพูชา ลาว พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา เวียดนาม ไทย) เท่ากับร้อยละ 1.6⁽¹⁶⁾ การศึกษาพบอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในประเทศไทยพบความชุกร้อยละ 2.1-2.2⁽¹⁹⁻²²⁾ การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในผู้ป่วยที่มารับบริการที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ระหว่างปี 2555-2558 พบการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีระหว่างร้อยละ 3.5-4.0⁽¹⁷⁾

การเพิ่มจำนวนของไวรัส (viral replication)

บริเวณ envelope หรือ virion-associated lipoprotein ของไวรัสตับอักเสบซีเข้าจับกับ glycosaminoglycan (GAGs) และ low-density lipoprotein receptor (LDL-R) ที่เป็นตัวรับ (receptor) บริเวณผิวของเซลล์ จากนั้นไวรัสจะจับกับ CD81, scavenger receptor B1 (SR-B1), claudin-1 และ occluding (OCLN) จีโนมของไวรัสจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ไซโตพลาสซึม เกิดการสร้างสายโปรตีนสายยาวที่มีขนาดประมาณ 3,000 กรดอะมิโน แล้วเกิดกระบวนการตัดแต่งโปรตีน (post-translational processing) ได้โปรตีนที่จำเพาะ แต่ละชนิดที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนการสร้างจีโนมและการประกอบเป็นโครงสร้างของอนุภาคไวรัสใหม่ (progeny) หลังจากนั้นอนุภาคไวรัสใหม่จะถูกปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์

ยารักษา

ยาแนะนำในระยะแรกที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยตับอักเสบที่เกิดจากไวรัสตับอักเสบซี คือ PEG Interferon หรือ interferon และ Ribavirin ประสพปัญหาในด้านการรักษาโดยเฉพาะการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีสายพันธุ์ 1 นอกจากนี้ยังพบการเกิดอาการข้างเคียงหลายรูปแบบในผู้ป่วยบางราย เช่น กลุ่มอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ (flu-like symptoms) การระคายเคืองบริเวณผิวหนังที่ฉีดยา การเกิดภาวะ neutropenia การเกิดภาวะภูมิต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง ภาวะซีดที่เกิดจากเซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

(hemolytic anemia) และความผิดปกติทางจิตและประสาท ต่อมามีการพัฒนายารักษากลุ่มใหม่ คือ direct-acting antiviral agents (DAAs) ที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยตรงต่อไวรัสโดยการยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส ยากลุ่ม DAAs ซึ่งมีผลข้างเคียงน้อยกว่า ยากลุ่มเดิม แบ่งเป็นกลุ่มตามเป้าหมายและกลไกการออกฤทธิ์ คือ

1. NS3/4A protease inhibitors (PIs) ออกฤทธิ์โดยการจับกับ NS3/4A protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัสและยับยั้งการหลอมหนีของไวรัสจากระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากมีรายงานพบว่า NS3/4A protease มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้าง interferon⁽²³⁾ โดยยารุ่นแรก (first-generation protease inhibitors) คือ boceprevir และ telaprevir ต่อมามีการพัฒนาเป็นยารุ่นที่สอง (second-generation protease inhibitors) คือ simeprevir และยาในรุ่นถัดไป (next generation drugs) คือ glecaprevir, grazoprevir, paritaprevir และ voxilaprevir

2. NS5A inhibitors ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ที่โปรตีน NS5A ตัวอย่างยา เช่น daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir, velpatasvir, pibrentasvir และ elbasvir

3. NS5B nucleos(t)ide polymerase inhibitors (NIs) และ NS5B non-nucleoside polymerase inhibitors (NNIs) ยากลุ่มนี้ออกฤทธิ์ที่ NS5B และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ polymerase ตัวอย่างยาเช่น sofosbuvir, dasabuvir, radialbuvir และ beclabuvir

การดื้อยาของไวรัสตับอักเสบซี

การดื้อยาของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมีผลต่อประสิทธิภาพการรักษาด้วยยา สาเหตุหนึ่งของการดื้อยาเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงหรือการกลายพันธุ์ของไวรัส โดยไวรัสที่เกิดการกลายพันธุ์สามารถพบได้ในผู้ติดเชื้อ

1. ที่ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยามาก่อน
2. ที่เคยหรืออยู่ในระหว่างการรักษาด้วยยา

มีรายงานความสัมพันธ์ของยาต้านไวรัสกลุ่ม DAAs กับการกลายพันธุ์ในบางตำแหน่งของกรดอะมิโน

ของไวรัส⁽²⁴⁻²⁷⁾ ตัวอย่าง ได้แก่

2.1 NS3/4A protease inhibitors พบรายงานการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

ตำแหน่ง V36M, T54A/S, V55A, R155K, A156S, V170A สัมพันธ์กับยา boceprevir
ตำแหน่ง V36M/A, T54A, R155K, A156S สัมพันธ์กับยา Telaprevir

ตำแหน่ง Q80R, R155K, D168E/V สัมพันธ์กับยา simeprevir

ตำแหน่ง Y56H, D168A/V/Y สัมพันธ์กับยา paritaprevir

ตำแหน่ง R155K, D168E/V/Y สัมพันธ์กับยา Asunaprevir

ตำแหน่ง R155K, D168T/V/Y/H สัมพันธ์กับยา vaniprevir

2.2 NS5A inhibitors พบรายงานการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

ตำแหน่ง M28T, Q30E/H/R/S, L31M/V, H58D, Y93H/N สัมพันธ์กับยา Daclatasvir

ตำแหน่ง Q30E/R, L31M, Y93C/H/N สัมพันธ์กับยา ledipasvir

ตำแหน่ง M28V, L28V, Q30R Y93H สัมพันธ์กับยา ombitasvir

2.3 NS5B polymerase inhibitors พบรายงานการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน

ตำแหน่ง L159F, S282T, C316N/H/F, V321A สัมพันธ์กับยา sofosbuvir

ตำแหน่ง M414T, S556G สัมพันธ์กับยา dasabuvir

ตำแหน่ง A421V, P495L/S สัมพันธ์กับยา beclabuvir

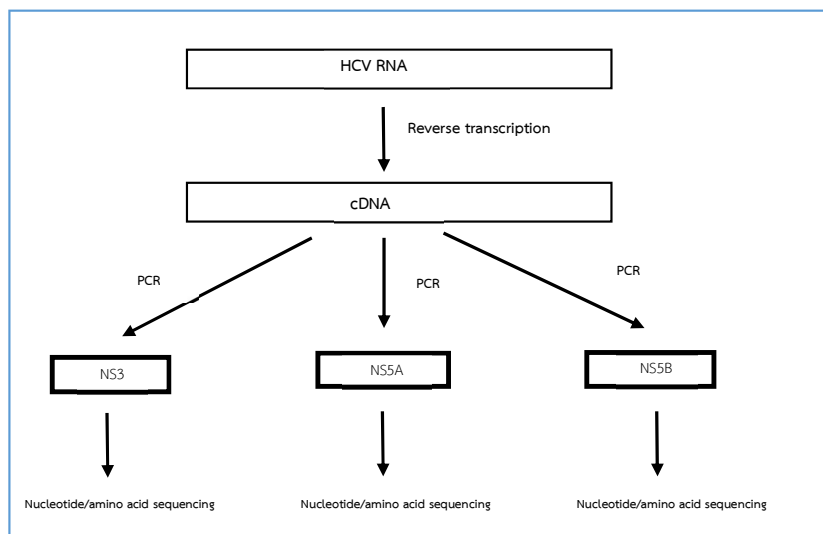
องค์การอนามัยโลก (WHO) มีเป้าหมายในการกำจัดโรคไวรัสตับอักเสบซีให้หมดภายในปี 2573 ซึ่งมีโอกาสที่อาจจะไม่บรรลุตามเป้าหมาย เนื่องจากเหตุผลหลายประการ โดยเหตุผลที่สำคัญประการหนึ่ง คือ รายงานการดื้อยาของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่เพิ่มจำนวน

มากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการรักษาที่ล้มเหลว รวมทั้งอาจส่งผลต่อการควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี ถึงแม้ว่ายากลุ่ม DAAs ได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อใช้สำหรับการรักษา อย่างไรก็ตามยังคงพบรายงานจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาที่สัมพันธ์กับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ประกอบกับการที่ยากลุ่ม DAAs มีราคาแพง ดังนั้นการเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการดื้อยาและการตรวจหาการกลายพันธุ์หรือวิธีการตรวจสอบการดื้อต่อยากลุ่ม DAAs ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจึงมีความสำคัญที่อาจเป็นประโยชน์ต่อแนวทางสำหรับการรักษา

วิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบซี

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี มีความสำคัญในแง่ของการรักษา การตรวจการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS3, NS5A และ

NS5B วิธีการที่นิยม ได้แก่ การตรวจสอบลำดับเบสของยีน NS3, NS5A และ NS5B โดยวิธี sanger sequencing และ next generation sequencing⁽²⁷⁾ โดยทั้งสองวิธีเป็นการหาลำดับเบสและทำการเปลี่ยนเป็นลำดับของโปรตีน จากนั้นตรวจสอบหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์โดยเทียบกับฐานข้อมูลการกลายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากการทำวิจัย ทั้งสองวิธีมีค่าความไวที่แตกต่างกัน สำหรับการตรวจสอบลำดับเบสโดยวิธี sanger sequencing เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง สามารถตรวจสอบการกลายพันธุ์ของทั้ง NS3, NS5A และ NS5B วิธีการ คือ การสร้างสาย DNA จาก RNA ของไวรัสด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase โดยวิธี reverse transcription (RT) จากนั้นเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกบริเวณที่ต้องการตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วจึงนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของ NS3, NS5A และ NS5B gene โดยวิธี RT-PCR และ Nucleotide/amino acid sequencing

อย่างไรก็ตามการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ NS3, NS5A และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีด้วยวิธีการหาลำดับเบสมักเป็นการตรวจหาการกลายพันธุ์แต่ละส่วนแยกจากกัน โดยขั้นตอนการเตรียมจะใช้วิธี PCR ซึ่งมีข้อจำกัดหลายอย่างโดยเฉพาะการปนเปื้อน

DNA หรือ PCR product ดังนั้นเพื่อเป็นการลดปัญหาดังกล่าว อาจมีการนำเทคนิค multiplex PCR ที่สามารถเตรียม NS3, NS5A หรือ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีได้โดยการทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน ซึ่งมีข้อดีหลายประการ เช่น ลดการปนเปื้อน ลดระยะเวลาในการทำและ

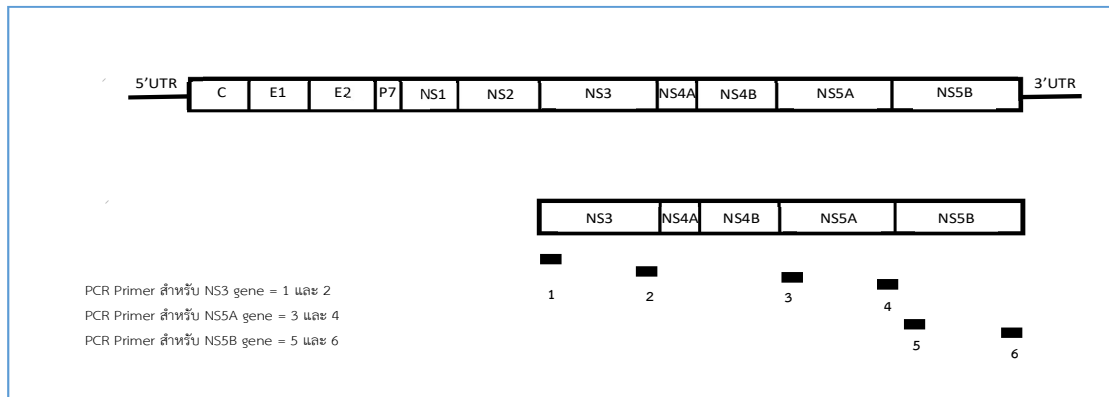
ประหยัดค่าใช้จ่าย สำหรับแนวคิดการทำ multiplex PCR สามารถทำได้หลายแบบโดยจะขึ้นอยู่กับความต้องการในการตรวจการกลายพันธุ์ของตำแหน่งใดบ้าง (ภาพที่ 3) ยกตัวอย่าง เช่น

1. การทำ multiplex PCR ของ NS3 และ NS5A โดยใช้ PCR primer 1, 2, 3 และ 4

2. การทำ multiplex PCR ของ NS3 และ NS5B โดยใช้ PCR primer 1, 2, 5 และ 6

3. การทำ multiplex PCR ของ NS5A และ NS5B โดยใช้ PCR primer 3, 4, 5 และ 6

4. การทำ multiplex PCR ของ NS3, NS5A และ NS5B โดยใช้ PCR primer 1, 2, 3, 4, 5 และ 6



ภาพที่ 3 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของ NS3, NS5A และ NS5B gene โดยวิธี multiplex PCR

เชื้อไวรัสตับอักเสบซีพบได้ทั่วโลกซึ่งยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข โดยก่อให้เกิดโรคตับอักเสบและอาจเป็นสาเหตุของโรคมะเร็งตับ สำหรับยาที่ใช้ในการรักษาโรคตับอักเสบชนิดซีในระยะแรกสามารถก่อให้เกิดอาการข้างเคียงและการเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสที่ส่งผลให้เกิดการดื้อยา ต่อมาจึงมีการพัฒนายาในกลุ่ม DAAs ที่มีกลไกยับยั้งขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของไวรัส อย่างไรก็ตามมีรายงานจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการตรวจพบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่สัมพันธ์กับการดื้อยากลุ่ม DAAs⁽²⁴⁻²⁷⁾ ถึงแม้ว่ายากลุ่ม DAAs จะมีประสิทธิภาพในการรักษาที่ดีแต่อาจเกิดปัญหาในการรักษาที่อาจจะยังไม่ครอบคลุมเชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์ได้ทั้งหมด สำหรับวิธีที่นิยมในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีส่วนใหญ่จะเป็นการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS3, NS5A และ NS5B เพื่อแก้ไขปัญหาการไม่ตอบสนองต่อยาด้านไวรัสตับอักเสบซีที่เกิดขึ้นเนื่องจากการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัส ดังนั้นการตัดสินใจ

หาทางเลือกก่อนการรักษาที่เหมาะสมโดยการตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีก่อนการรักษาจึงเป็นสิ่งที่ควรพิจารณาในแง่ของความคุ้มค่า และการเลือกสูตรยาที่เหมาะสมที่สุด และเนื่องจากรายงานหรือข้อมูลในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่มีสัมพันธ์กับการดื้อยากลุ่ม DAAs ยังคงมีจำกัด ดังนั้นการตรวจหาการกลายพันธุ์ของไวรัสจะเป็นประโยชน์โดยเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นแนวทางเพื่อการบริหารจัดการสำหรับการเลือกยารักษาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

บทความนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย “การเตรียมยีน NS3, NS5A และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ชุดการตรวจ” โดยมหาวิทยาลัยนเรศวร ได้รับการการสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 (R2564B008)

เอกสารอ้างอิง

- Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Molecular virology of hepatitis c virus. *viral hepatitis rev.* 1997;3:51–62.
- Suzich JA, Tamura JK, Palmer–Hill F, Warrenner P, Grakoui A, Rice CM, et al. Hepatitis C virus NS3 protein polynucleotide–stimulated nucleoside triphosphatase and comparison with the related pestivirus and flavivirus enzymes. *J Virol.* 1993;67:6152–8.
- Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:13038–43.
- Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000032.
- Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA–dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* 1996;15:12–22.
- Chen M, Ma Y, Chen H, Dai J, Luo H, Jia M, et al. Complete genome sequencing and evolutionary analysis of HCV subtype 6xg from IDUs in Yunnan China. *PLoS One.* 2019;e0217010.
- Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2:161–76.
- Tallo T, Norder H, Tefanova V, Krispin T, Schmidt J, Ilmoja M, et al. Genetic characterization of hepatitis C virus strains in Estonia: Fluctuations in the predominating subtype with time. *J Med Virol.* 2007;79:374–82.
- Katsoulidou A, Sypsa V, Tassopoulos NC, Boletis J, Karafoulidou A, Ketikoglou I, et al. Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: Temporal trends in HCV genotype–specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates. *J Viral Hepat.* 2006;13:19–27.
- Sievert W, Altraif I, Razavi HA, Abdo A, Ahmed EA, Alomair A, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int.* 2011;31:61–80.
- Chao DT, Abe K, Nguyen MH. Systematic review: Epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;34:286–96.
- Nguyen MH, Keeffe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:S97–101.
- Mauss S, Berger F, Vogel M, Pfeiffer–Vornkahl H, Alshuth U, Rockstroh JK, et al. Treatment results of chronic hepatitis C genotype 5 and 6 infections in Germany. *Z Gastroenterol.* 2012; 50:441–4.
- Bunchornravakul C, Chavalitdhamrong D, Tanwandee T. Hepatitis C genotype 6: A concise review and response–guided therapy proposal. *World J Hepatol.* 2013;5:496–504.
- Cornberg M, Razavi HA, Alberti A, Bernasconi E, Buti M, Cooper C, et al. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Europe, Canada and Israel. *Liver Int.* 2011;31(Suppl 2):30–60.
- Petruzziello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up–date of

- the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* 2016; 22:7824-40.
17. Vandelaer S, Hirankarn N. Prevalence of HCV infection at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Chula Med J.* 2018;62:67-78.
 18. Sistayanarain A, Kunthalert D, Vipsoongnern Y. A shift in the Hepatitis C virus genotype dominance in blood donor samples from Thailand. *Mol Biol Rep.* 2011;38:4287-90.
 19. Louisirirothanakul S, Myint KS, Srimee B, Kanoksinsombat C, Khamboonruang C, Kunstadter P, et al. The prevalence of viral hepatitis among the Hmong people of northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2002;33:837-44.
 20. Ishida T, Takao S, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D. Prevalence of hepatitis B and C virus infection in rural ethnic population of northern Thailand. *J Clin Viral.* 2002;24:31-5.
 21. Chunlertrith K, Sukeepaisarnjaroen W, Mairiang P, Urwijitaroon Y, Takase K, Yamauchi T, et al. Clinico-epidemiology of hepatitis C viral infection in northeastern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2000;31:273-6.
 22. Jatapai A, Nelson KE, Chuenchitra T, Kana K, Eiumtrakul S, Sunantarod E, et al. Prevalence and risk factors for hepatitis C virus infection among young Thai men. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83:433-9.
 23. Li K, Foy E, Ferreón JC, Nakamura M, Ferreón AC, Ikeda M, et al. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:2992-7.
 24. Lontok E, Harrington P, Howe A, Kieffer T, Lennerstrand J, Lenz O, et al. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology.* 2015;62:1623-32.
 25. Vermehren J, Sarrazin C. The role of resistance in HCV treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012;26:487-503.
 26. Kati W, Koev G, Irvin M, Beyer J, Liu Y, Krishnan P, et al. In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:1505-11.
 27. Bhatia M, Gupta E. Emerging resistance to directly-acting antiviral therapy in treatment of chronic Hepatitis C infection-A brief review of literature. *J Family Med Prim Care.* 2020; 9:531-8.