

## การกระจายตัวของฟีโนไทป์ของเชื้อเอชไอวีจากผู้ติดเชื้อในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

วิธยา สารจันทร์<sup>1</sup>, ไมตรี ปะการะสังข์<sup>2\*</sup>, จุฬารัตน์ ปรัชชาติกุล<sup>2</sup>, พรทิพย์ ปันละอ<sup>2</sup>, สนิทพร ลุนชัยญา<sup>3</sup>

Received: August 23, 2012

Revised & Accepted: September 21, 2012

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการประเมินฟีโนไทป์ของผู้ติดเชื้อไวรัสเอชไอวีจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ซึ่งมีระดับของ CD4 ลิ้มโพลีที่ต่างกัน เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อจากหน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จำนวนทั้งหมด 316 ตัวอย่าง คัดเลือกตัวอย่างแบ่งออกตามระดับของ CD4 ลิ้มโพลีที่ต่างกันได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม A มีระดับ CD4 ลิ้มโพลี น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร กลุ่ม B ระดับ CD4 ลิ้มโพลี ระหว่าง 201-499 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และกลุ่ม C มีระดับ CD4 ลิ้มโพลี มากกว่า 500 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตัวอย่างทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี nested PCR และการหาลำดับเบสในส่วน C2V3 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ด้วยวิธีการทาง bioinformatics พบว่าจากตัวอย่างทั้งหมด 316 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอและหาลำดับเบสได้ทั้งหมด 42 ตัวอย่าง โดยกลุ่มตัวอย่าง A มีทั้งหมด 21 ตัวอย่าง พบฟีโนไทป์แบบ SI ทั้งหมด 8 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 38.1 พบ NSI จำนวน 13 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 61.9 ในขณะที่กลุ่ม B มีจำนวน 12 ตัวอย่าง โดยเป็นฟีโนไทป์แบบ SI 3 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 25 และ NSI พบ 9 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 75 ส่วนในกลุ่ม C ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ทั้งหมดเป็นฟีโนไทป์ NSI จากการศึกษาทั้ง 3 กลุ่มตัวอย่าง ฟีโนไทป์แบบ SI พบว่าตำแหน่ง V3 tip พบ GPGQ ถูกแทนที่ด้วย GPGR หรือ GPGH มากกว่าร้อยละ 50 (กลุ่ม A; ร้อยละ 62.5 และกลุ่ม B; ร้อยละ 66.7) ผลของ net charge ในกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะฟีโนไทป์แบบ SI จะมี positive net charge สูงกว่าฟีโนไทป์แบบ NSI เมื่อพิจารณาเฉพาะฟีโนไทป์แล้วพบว่าอัตราการพบฟีโนไทป์ SI ในกลุ่มระดับ CD4 ลิ้มโพลี ต่ำจะพบได้มากกว่ากลุ่มระดับ CD4 ลิ้มโพลี สูงซึ่งจะเป็นไปในทางตรงข้ามกับการพบฟีโนไทป์ชนิด NSI จากผลการศึกษาทำให้เข้าใจลักษณะการกระจายตัวของฟีโนไทป์ของเชื้อและจะเป็นแนวทางในการใช้ยาด้านไวรัสต่อไป

**คำสำคัญ:** เอชไอวี 1, ฟีโนไทป์ของเอชไอวี 1, วี 3 ลูป, ระดับซีดีโฟร์

<sup>1</sup>นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์

<sup>2</sup>ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์

<sup>3</sup>หน่วยจุลชีววิทยาดิฉัน โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

## Distribution of HIV phenotype from HIV infected patients in Srinagarind Hospital

Sarajan V<sup>1</sup>, Pakarasang M<sup>2\*</sup>, Pariyachatikul J<sup>2</sup>, Pinlaor P<sup>2</sup>, Lunchaiya R<sup>3</sup>

### Abstract

This study determined phenotypes of HIV-1 viruses from HIV infected patients having various CD4-count levels in Srinagarind Hospital. The total of 316 HIV-1 infected blood samples were collected from Srinagarind Hospital. All samples were classified into 3 groups. Group A was the samples with CD4 count lower than 200 cells/mm<sup>3</sup>, group B was CD4 count 201-499 cells/mm<sup>3</sup> and group C was CD4 count higher than 500 cells/mm<sup>3</sup>. Extracted DNA samples were amplified for C2V3 region by nested PCR and then DNA sequencing. HIV phenotypes were obtained by using bioinformatics technique from DNA sequencing data. 42 out of 316 HIV-1 blood samples were obtained the complete data with C2V3 amplification and sequencing. The complete data samples including 21 blood samples from group A which related to SI phenotype 8 samples (38.1 %) and 13 blood samples were NSI phenotype (61.9 %). In group B 12 blood samples were 3 (25 %) and 9 (75 %) blood samples with SI and NSI phenotype, respectively. All 9 blood samples of group C were NSI phenotype. The study showed that more than 50 % of SI viruses from 3 groups had GPGR or GPGH instead of GPGQ at V3 tip position (group A; 62.5 % and group B 66.7 %). It also revealed that SI viruses had positive net charge higher than NSI phenotype. In consideration among each phenotype, SI phenotypes were found in samples with low CD4 count in higher rate than high CD4 count samples. In contrary, NSI phenotypes favored high CD4 count samples than low CD4 count samples. This study suggests that good understanding of HIV-1 phenotypic spreading must be the valuable tool for efficient anti-retrovirus drugs management.

**Keywords:** HIV-1, Phenotype of HIV-1, V3 loop, CD4 count

<sup>1</sup> Graduate School, <sup>2</sup> Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University,

<sup>3</sup> Clinical Microbiology Laboratory Unit, Srinagarind Hospital, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand.

\*Corresponding author: (e-mail: maitree@kku.ac.th)

## บทนำ

การติดเชื้อไวรัสเอชไอวียังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญ แม้ว่าในปัจจุบันได้มีการพัฒนาและคิดค้นยาที่สามารถลดจำนวนของเชื้อแต่ยังไม่มียาที่รักษาให้หายขาดได้ ยาที่ใช้ในปัจจุบันแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้หลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส กลุ่มที่ยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส และยากกลุ่มใหม่ที่เป็นกลุ่มขัดขวางการจับกันของ Gp120 กับตัวรับช่วย (coreceptor antagonists) ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อเอชไอวีในปี พ.ศ. 2531<sup>(1)</sup> ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบบเอชไอวี 1 เชื้อเอชไอวี 1 จะจับอย่างจำเพาะกับตัวรับบนผิวเซลล์ของผู้ติดเชื้อเพื่อเข้าสู่ร่างกาย ตัวรับที่สำคัญดังกล่าวคือ CD4 receptor และตัวรับช่วย (coreceptor) ซึ่งตัวรับช่วยที่สำคัญคือ CXCR4 และ CCR5 ไวรัสจะเข้าเซลล์ได้ดีจะต้องจับทั้งตัวรับหลักและตัวรับช่วย เชื้อเอชไอวีทุกสายพันธุ์จะมีการเลือกใช้ตัวรับช่วย ชนิดในชนิดหนึ่งหรือทั้ง 2 ชนิดในการเข้าสู่เซลล์ของผู้ติดเชื้อ การเลือกใช้ตัวรับช่วยสามารถอธิบายฟีโนไทป์ของไวรัสเอชไอวีได้ โดยเชื้อที่เลือกใช้ตัวรับช่วยแบบ CCR5 เรียกไวรัสนี้ว่าฟีโนไทป์แบบ NSI ส่วน เชื้อที่เลือกใช้ coreceptor แบบ CXCR4 จะมีฟีโนไทป์แบบ SI<sup>(2)</sup> ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีในระยะแรก จะได้รับยาทันทีเพื่อทำลายเชื้อที่เข้าสู่ร่างกายและคงระดับของ CD4 ไว้ ซึ่งส่วนใหญ่มักพบฟีโนไทป์แบบ NSI และเมื่อมีการดำเนินของโรคจนเข้าสู่โรคเอดส์เต็มขั้นมักพบว่าฟีโนไทป์เปลี่ยนเป็นแบบ SI<sup>(3)</sup> การศึกษาเพื่อทราบการเลือกใช้ตัวรับช่วยของเชื่อนั้นจึงเป็นประโยชน์ต่อการรักษารวมทั้งการดำเนินไปของโรคได้เป็นอย่างดี<sup>(4)</sup> และมีประโยชน์ต่อการได้รับยาต้านที่สอดคล้องกับฟีโนไทป์ของไวรัส ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการเพื่อวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของไวรัสของผู้ป่วย ซึ่งวิธี nested PCR และหาลำดับเบสเป็นการทำนายลักษณะทางฟีโนไทป์โดยใช้ลักษณะทางจีโนไทป์ โดยทำการศึกษาลำดับเบสบน V3 loop ซึ่งเป็น variable region ชนิดหนึ่งมีขนาด 105 เบส หรือเทียบเท่ากรดอะมิโน 35 ตัว และเป็นชิ้นส่วนที่อยู่บนไกลโคโปรตีน 120 (Gp120) เป็นตำแหน่งที่มีความหลากหลายในการเลือกใช้ตัวรับช่วยเพื่อเข้าสู่เซลล์ของผู้ป่วย<sup>(5)</sup> การศึกษาที่ผ่านมาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ 11 และ 25 บน V3 loop จะพบการแทนที่ของกรดอะมิโน และให้ผล positive charge ค่าสูง<sup>(6)</sup>

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ฟีโนไทป์ของไวรัสของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ที่มีระดับ CD4 แตกต่างกัน

ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการประเมินการดำเนินไปของโรคในผู้ป่วย และการเลือกใช้ยาเพื่อใช้ในการรักษาได้ถูกต้องแม่นยำที่สุด

## วัสดุและวิธีการศึกษา

### 1. ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือเลือดซึ่งได้รับจากหน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จำนวน 316 ตัวอย่าง โดยได้ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ ดังนี้ กลุ่ม A จำนวน มีระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร กลุ่ม B มีระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ ระหว่าง 201-499 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และกลุ่ม C มีระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ มากกว่า 500 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกแยกเก็บเฉพาะส่วน peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดยวิธี Ficoll-Hypaque gradient centrifugation ปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 2,800 rpm เป็นเวลา 30 นาที ดูดเก็บส่วน PBMC และปั่นล้างเซลล์ด้วย 1X phosphate buffer saline (PBS) ที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm จำนวน 2 ครั้ง

### 2. วิธีการศึกษา

#### 2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัด DNA จากตัวอย่าง PBMC โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAamp mini kit (QIAGEN, Chatworth, CA)

#### 2.2 ปฏิกริยา PCR

เพิ่มปริมาณ HIV-DNA ในส่วน C2-V3 ซึ่งอยู่บนไกลโคโปรตีน 120 ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ forward และ reverse primers ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตามลำดับดังนี้

##### Primer คู่ที่ 1

Forward primer (AI1): 5' ACTATGGGGTTCCTGTGTG 3'

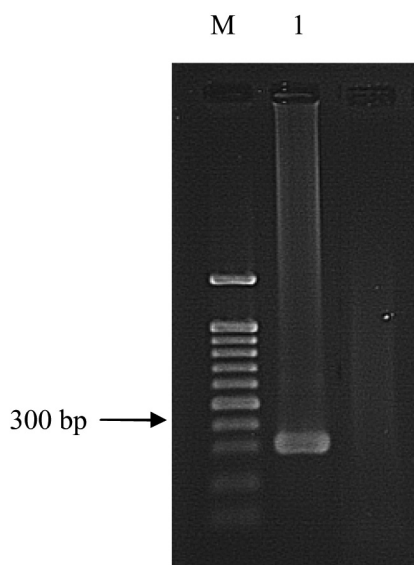
Reward primer (AI2): 5'CCTCCTCCAGGTCTGAA 3'

##### Primer คู่ที่ 2

Forward primer (CI1): 5' GGCAGTCTAGCAGAAGAAAAGATAATAATCAGA 3'

Reward primer (BI2): 5'ATCTCCTCCTGATGGTGGCTGAA 3'

ผลบวกควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างดีเอ็นเอและผลบวกควบคุมโดยใช้ดีเอ็นเอของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ยืนยันผลบวกด้วยวิธี DNA sequencing ได้ผลผลิตที่มีขนาด 300 bp (รูปที่ 1) ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการแยกในกระแสไฟฟ้าใน agarose gel เข้มข้นร้อยละ 1.5



รูปที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอแสดงตัวอย่างผลบวกควบคุม ขนาด 300 bp M: 1 kb DNA ladder และ lane 1: ผลบวกควบคุม

### 2.3 วิเคราะห์ตำแหน่ง V3 loop ด้วยวิธี DNA sequencing

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากทุกตัวอย่างที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง C2-V3 แล้ว มาวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing ของบริษัท 1<sup>st</sup> BASE และวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบลำดับโปรตีนอ้างอิงตามฐานข้อมูลจาก Genbank: accession no. AAC54023 โดยใช้โปรแกรม Bioinformatics

### 2.4 การวิเคราะห์ฟีโนไทป์

ฟีโนไทป์แบบ SI

เกณฑ์หลัก

- ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 11 และ 25 จะพบกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนหรือไลซีน

เกณฑ์รอง

- การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ (ตำแหน่ง 6-8) จากแอสพาราจีน-แอสพาราจีน-ทรีโอนีน/เซอรีน เป็น

กรดอะมิโนชนิดอื่น และ V3 tip (ตำแหน่ง 15-18) จะเป็นกรดอะมิโนชนิดไกลซีน-โพรลีน-ไกลซีน-อาร์จินีน/ฮิสทีดีน (GPGR หรือ GPGH)

ฟีโนไทป์แบบ NSI

- กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 11 และ 25 ไม่พบกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนหรือไลซีน, ตำแหน่ง N-linked glycosylation ยังคงกรดอะมิโนชนิดแอสพาราจีน-แอสพาราจีน-ทรีโอนีน/เซอรีน และ V3 tip ที่ตำแหน่ง 18 จะไม่พบกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนหรือฮิสทีดีน

โครงการนี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เลขที่ HE510631

### ผลการศึกษา

#### ผลการคัดเลือกตัวอย่างศึกษาและระดับ CD4 ลิมโฟไซต์

จากตัวอย่างเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 316 ราย ที่ได้รับจากหน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ตั้งแต่เดือนธันวาคม ปี 2553 ถึง เดือนสิงหาคม ปี 2554 พบว่าตัวอย่างที่สามารถเพิ่มขยาย HIV DNA และหาลำดับเบสได้ครบมีจำนวน 42 ราย โดย กลุ่ม A มีค่าเฉลี่ยระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ เท่ากับ  $97 \pm 66$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (ช่วงระหว่าง 3-200 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) กลุ่ม B ค่าเฉลี่ยระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ เท่ากับ  $326 \pm 73$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (ช่วงระหว่าง 219-496 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) และกลุ่ม C ค่าเฉลี่ยระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ เท่ากับ  $812 \pm 219$  เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (ช่วงระหว่าง 529-1,508 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

#### ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง C2-V3 ด้วยวิธี nested PCR

กลุ่ม A สามารถเพิ่มปริมาณได้จำนวน 21 ตัวอย่าง กลุ่ม B 12 ตัวอย่างและกลุ่ม C 9 ตัวอย่าง

#### ผลการทำนายฟีโนไทป์ของเอชไอวีจากตัวอย่างศึกษา

ตัวอย่างจากทั้ง 3 กลุ่ม ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 42 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing พบว่า กลุ่ม A มี 8 ตัวอย่าง (A5, A18, A24, A27, A33, A37, A42 และ A45) มีฟีโนไทป์เป็นแบบ SI คิด

เป็นร้อยละ 38.1 พบฟิโนไทป์แบบ NSI จำนวน 13 ราย คิดเป็น ร้อยละ 61.9 และ พบ positive net charge อยู่ระหว่าง 3-9 ดังแสดงในรูปที่ 2 กลุ่ม B มี 12 ตัวอย่าง ที่สามารถวิเคราะห์ลำดับโปรตีนได้ ซึ่ง 3 ใน 12 ตัวอย่าง (B2, B3 และ B21) มีฟิโนไทป์เป็นแบบ SI คิดเป็นร้อยละ 25 และ ฟิโนไทป์แบบ NSI จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 75

โดยมี positive net charge อยู่ระหว่าง 3-6 ดังแสดงในรูปที่ 3 และกลุ่ม C มี ตัวอย่างทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ลำดับโปรตีนได้ และพบฟิโนไทป์เป็นแบบ NSI ทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 4 ลักษณะของฟิโนไทป์และลำดับโปรตีนบน V3 loop จากผู้ติดเชื้อเอชไอวี 1 ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ดังแสดงใน ตารางที่ 1

**ตารางที่ 1** ลักษณะของฟิโนไทป์และลำดับโปรตีนบน V3 loop จากผู้ติดเชื้อเอชไอวี 1 ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์

| CD4<br>count level<br>(cell/ $\mu$ l)     | phenotype    | % of pheno-<br>type in group | No. of sample |                           |                                   | Range<br>of net<br>charge |
|-------------------------------------------|--------------|------------------------------|---------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
|                                           |              |                              | N-link site   | V3 tip<br>GPGR or<br>GPGH | R or K<br>at 11 or<br>25 position |                           |
| Group A (21)<br>( $< 200$ cell / $\mu$ l) | SI (n = 8)   | 38.1                         | 1             | 5                         | 6                                 | 3 - 9                     |
|                                           | NSI (n = 13) | 61.9                         | 10            | 1                         | 0                                 | 1 - 5                     |
| Group B (12)<br>(201-499 cell / $\mu$ l)  | SI (n = 3)   | 25                           | 1             | 2                         | 2                                 | 3 - 6                     |
|                                           | NSI (n = 9)  | 75                           | 6             | 2                         | 0                                 | 3 - 5                     |
| Group C (9)<br>( $> 500$ cell / $\mu$ l)  | SI (n = 0)   | 0                            | 0             | 0                         | 0                                 | -                         |
|                                           | NSI (n = 9)  | 100                          | 7             | 2                         | 0                                 | 3 - 5                     |

## วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

ปัจจัยต่างๆในการนำเชื้อเข้าสู่เซลล์ถือว่ามีความสำคัญต่อการเลือกใช้ในการรักษาผู้ป่วยเอชไอวี/เอดส์ เชื้อเอชไอวีจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของผู้ติดเชื้อได้นั้นจะต้องอาศัยตัวรับบนผิวเซลล์หลัก คือ CD4 ซึ่งจะจับอย่างจำเพาะกับ Gp120 และยังต้องอาศัยตัวรับช่วยอีกด้วย CXCR4 และ CCR5 เป็นตัวรับช่วยที่พบเป็นส่วนใหญ่ว่าเชื่อมีการเลือกใช้ในการเข้าสู่เซลล์ผู้ป่วย การศึกษาลักษณะฟิโนไทป์บน V3 loop ซึ่งตำแหน่งนี้เป็นส่วนที่มีความหลากหลายในการที่เชื้อจะเลือกใช้ตัวรับช่วยในการเข้าสู่เซลล์ การทำนายลักษณะฟิโนไทป์โดยศึกษาในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 11 และ 25 (11/25 rule)<sup>(7,8)</sup> บน V3 loop เปรียบเทียบตำแหน่งโปรตีนโดยลักษณะที่บ่งชี้ถึงฟิโนไทป์แบบ SI คือตำแหน่ง 11 และ 25 จะพบว่าเป็นกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนหรือไลซีน

การศึกษครั้งนี้ พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 316 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ C2-V3 และสามารถ

วิเคราะห์ด้วยวิธี DNA sequencing ได้ 42 ตัวอย่าง การทำนายผลฟิโนไทป์แบบ SI จากทั้ง 3 กลุ่มคิดเป็นร้อยละ 38.1 (8/22), 25 (2/12) และ 0 ในกลุ่ม A, B และ C ตามลำดับ จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ระดับ CD4 count ที่มีค่าต่ำมีแนวโน้มที่จะให้ฟิโนไทป์เป็นแบบ SI มากกว่าระดับ CD4 สูง ส่วนการพบฟิโนไทป์ของไวรัสแบบ NSI นั้นพบว่าในตัวอย่างที่ระดับ CD4 count ต่ำจะพบได้น้อยกว่าในตัวอย่างที่มีระดับ CD4 count สูง และยังสัมพันธ์กับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่าผู้ติดเชื้อในระยะท้ายที่มีระดับ CD4 count ต่ำจะพบลักษณะฟิโนไทป์แบบ SI เป็นส่วนใหญ่<sup>(3)</sup> นอกเหนือจากการศึกษาฟิโนไทป์ในตำแหน่ง 11 และ 25 แล้ว ในประเทศไทย sub-type E พบว่าที่ตำแหน่ง N-linked glycosylation (ตำแหน่งที่ 6-8 บน V3 loop) ซึ่งมีชนิดกรดอะมิโนเป็นแอสพาราจิน-X-ทรีโอนีน/เซอรีน (N-X-T/S) ตามลำดับ<sup>(9)</sup> ในผู้ป่วยที่มีฟิโนไทป์แบบ SI ที่ตำแหน่งนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้โดยพบว่า ใน

กลุ่มที่มีระดับ CD4 count ที่ต่ำกว่า 500 เซลล์ต่อลูกบาศก์ มิลลิเมตร ที่ให้ผลฟีโนไทป์แบบ SI พบการเปลี่ยนแปลงของ ตำแหน่ง N-linked glycosylation มีเพียง 1 ตัวอย่าง (A33) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของชนิดอะมิโนที่ตำแหน่งนี้ การศึกษา ผ่านมาของลักษณะฟีโนไทป์แบบ SI พบว่าที่ตำแหน่ง V3 tip (ตำแหน่ง 15-18 บน V3 loop) จะเป็นกรดอะมิโนชนิดไกล ซีน-โพรลีน-ไกลซีน-อาร์จินีน/ฮิสทีดิน (GPGR หรือ GPGH) ตามลำดับ <sup>[9]</sup> ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ คือมากกว่าร้อยละ 50 ของตัวอย่างที่มีฟีโนไทป์แบบ SI จะพบ GPGR หรือ GPGH ที่ตำแหน่ง V3 tip นอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโนชนิด GPGK ใน 6 ตัวอย่าง (A24, A26, A27, A45, B2 และ B7) ส่วนผล positive net charge พบว่า ฟีโนไทป์แบบ SI จะมีแนวโน้มค่าที่สูง

การศึกษานี้วิเคราะห์ผลด้วยวิธี nested PCR และ DNA sequencing ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถประเมินลักษณะ ฟีโนไทป์ของผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้และชี้ให้เห็นว่า ในระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ ที่แตกต่างกัน การมีค่า CD4 ในระดับที่

ต่ำ มีแนวโน้มที่จะพบฟีโนไทป์แบบ SI ขณะที่ผู้ป่วยที่มีค่า CD4 ลิมโฟไซต์ ในระดับที่สูงกว่ามีแนวโน้มจะพบฟีโนไทป์ แบบ NSI ดังนั้น ความแตกต่างของระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ อาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ใช้ในการทำนายลักษณะฟีโนไทป์ของ ผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยและ พัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาล ศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษา และขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาทุกท่านที่ให้คำแนะนำและ ช่วยเหลือในการทำวิจัยมาโดยตลอด

| Sample No. | 10                                    | 20 | 30 | Net charge | CD4 count |
|------------|---------------------------------------|----|----|------------|-----------|
| Pos        | CTRPSNNRTSITI^GPGQV^FYRTGDIIGNIRKAYC  |    |    |            |           |
| A5         | ....FRKI...TR.-...R.-.....G.T.D.....  |    |    | 8          | 170       |
| A9         | .....TH.-.....-.....E.T.D..R...       |    |    | 4          | 199       |
| A10        | .....K.T.M-.....-F...E...D.....       |    |    | 4          | 86        |
| A18        | ....FKKI..RMR.-...R.-.....G.T.D..N.H. |    |    | 9          | 114       |
| A19        | ....F.....H.-...A-L...E.V.D..Q...     |    |    | 3          | 106       |
| A23        | .....V.-.....T-W..P.....D.....        |    |    | 3          | 77        |
| A24        | ....FSK.IR.FR.-...K.-.....A.--HKKE.F. |    |    | 8          | 6         |
| A26        | .....PM-...K.-.....Q...               |    |    | 4          | 6         |
| A27        | .....VK.RM.M-...K.-...K..E...D.K..H.  |    |    | 6          | 47        |
| A28        | .....K.VS.-.....-.....D..R...         |    |    | 4          | 132       |
| A33        | .....RM.F-...H.-...K.....D...H.       |    |    | 6          | 150       |
| A34        | .....R...FR.-.....-...K..A.T.D..N...  |    |    | 5          | 121       |
| A36        | .....T.....H.-...R.-...L....Q.D..R... |    |    | 5          | 100       |
| A37        | .....T...KRM.M-...R.-...S..E...D...H. |    |    | 6          | 63        |
| A38        | .....KGVH.-...S-...K..E...D..Q.F.     |    |    | 4          | 114       |
| A39        | ....Y.IRKGIIH.GL.Q...-I.Q..N...D..... |    |    | 5          | 83        |
| A40        | .....RG...F-.....-...EV.....Q.H.      |    |    | 4          | 7         |
| A42        | ....D.R..R...-...R.-.....E...D...F.   |    |    | 5          | 7         |
| A44        | .....I.GTR.-...M-.....D..Q.F.         |    |    | 1          | 61        |
| A45        | ....ETKEKRM.V-...K.-...S..E.T.D.K.... |    |    | 3          | 196       |
| A46        | .....K..N.-...AL...P...T.D.....       |    |    | 4          | 68        |

รูปที่ 2 ลำดับของกรดอะมิโนบน V3 loop, ค่า net charge และระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ ในตัวอย่างกลุ่ม A ตำแหน่ง 6-8; N-linked glycosylation ตำแหน่ง 15-18; V3 tip

| Sample No. | 10                                    | 20 | 30 | Net charge | CD4 count |
|------------|---------------------------------------|----|----|------------|-----------|
| Pos        | CTRPSNNTRTSITI^GPGQV^FYRTGDIIGNIRKAYC |    |    |            |           |
| B1         | .....KG.HM-.....I.Q.....D.....        |    |    | 4          | 219       |
| B2         | ....ETKEKRM.V-...K.-...S..E.T.D.K.... |    |    | 3          | 425       |
| B3         | ....A.T..R.M.-...R.-Y.TV...-----      |    |    | 5          | 367       |
| B5         | .....VN-.....-.....D.....             |    |    | 3          | 496       |
| B7         | .....VHM-...K.-.FL.....D..Q...        |    |    | 3          | 302       |
| B8         | ....VRI..K.Y.-...R.-...S.EG.G.D.....  |    |    | 5          | 387       |
| B11        | .....L.L-.....-.....T.D.....          |    |    | 3          | 244       |
| B12        | ....HE.I...LR-.....-.....V.DA.Q...    |    |    | 3          | 276       |
| B13        | .....HM-....A-.Q..E..D.....           |    |    | 3          | 224       |
| B18        | ....VRI..K.Y.-...R.-...S.EG.G.D.....  |    |    | 5          | 239       |
| B19        | .I.....H.-...M-.....T.....            |    |    | 5          | 371       |
| B21        | ....Y.V..KM.T-...H.-I.K.EG.V...K....  |    |    | 6          | 347       |

รูปที่ 3 ลำดับของกรดอะมิโนบน V3 loop, ค่า net charge และระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ ในตัวอย่างกลุ่ม B ตำแหน่ง 6-8; N-linked glycosilation ตำแหน่ง 15-18; V3 tip

| Sample No. | 10                                    | 20 | 30 | Net charge | CD4 count |
|------------|---------------------------------------|----|----|------------|-----------|
| Pos        | CTRPSNNTRTSITI^GPGQV^FYRTGDIIGNIRKAYC |    |    |            |           |
| C1         | ....G....K..N.-...R.-...P.EV..D....S. |    |    | 5          | 529       |
| C3         | ....F.....PM-...RA-...K.....D.T....   |    |    | 3          | 951       |
| C5         | .....-.....M-.....D.....              |    |    | 3          | 591       |
| C6         | .....VR-.....-..Q.....DT.....         |    |    | 3          | 1149      |
| C8         | ....K....FH-.....-..Q..N.T.DP.....    |    |    | 5          | 979       |
| C18        | ....N....I.M.R-.....-Y....LV.D....H.  |    |    | 5          | 854       |
| C19        | .I.....VAM-.....-..K.....D.....       |    |    | 3          | 711       |
| C20        | .....K..N.-....T-...P...T.D.....      |    |    | 4          | 1508      |
| C21        | .....T.I...VR-.....-..T..A...D.....   |    |    | 4          | 904       |

รูปที่ 4 ลำดับของกรดอะมิโนบน V3 loop, ค่า net charge และระดับ CD4 ลิมโฟไซต์ ในตัวอย่างกลุ่ม C ตำแหน่ง 6-8; N-linked glycosilation ตำแหน่ง 15-18; V3 tip

## เอกสารอ้างอิง

- Weniger BG, Limpakarnjanarat K, Ungchusak K, Thanprasertsuk S, Choopanya K, Vanichseni S, et al. The epidemiology of HIV infection and AIDS in Thailand. AIDS 1991; (5 Suppl 2): S71-85.
- Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA. The CCR5 and CXCR4 coreceptors central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses 2004; 20: 111-26.
- Delobel P, Sandres-Saune K, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, et al. R5 to X4 switch of the predominant HIV-1 population in cellular reservoirs during effective highly active antiretroviral therapy. J Acquir Immune Defic Syndr 2005; 38: 382-92.
- McNearney T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A, et al. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 10247-51.
- Chesebro B, Nishio J, Perryman S, Cann A, O'Brien W, Chen IS, et al. Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. J Virol 1991; 65: 5782-9.

6. Delobel P, Nugeyre MT, Cazabat M, Pasquier C, Marchou B, Massip P, et al. Population-based sequencing of the V3 region of env for predicting the coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1572-80.
7. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1992; 66: 6777-80.
8. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 1992; 66: 3183-7.
9. Yu XF, Wang Z, Beyrer C, Celentano DD, Khamboonruang C, Allen E, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 from patients with AIDS in northern Thailand. *J Virol* 1995; 69: 4649-55.