การตรวจหาการดื้อต่อยาต้านไวรัสเอดส์ในผู้ติดเชื้อ HIV โดยวิธี multiplex selective polymerase chain reaction

ผู้วิจัยหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม

ผู้วิจัยร่วม ศาสตราจารย์นายแพทย์ประพันธ์ ภานุภาค
นางสาวสุณี ศิริวิชยกุล
นางสาวชุติธร เกตุลอย

หน่วยงาน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งทุน งบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2544

จำนวนเงิน 500,000 บาท

บทนำ

โรคเอดส์ เป็นโรคติดต่อที่เป็นปัญหาสำคัญของชาติ ก่อให้เกิดปัญหาทั้งทางด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจ สังคม และความมั่นคงของประเทศ ปัจจุบัน ยังไม่มีวัคซีนที่จะป้องกัน และยาที่จะรักษาให้หายขาดได้

ในปัจจุบัน ประเทศไทยมียาต้านไวรัสเอดส์ที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข รวมทั้งสิ้น 11 ชนิด ประกอบด้วยยา 3 กลุ่ม คือ (1) Nucleoside analog RT inhibitors (NRTIs) ได้แก่ AZT, ddC, ddI, d4T และ 3TC (2) Non-nucleoside analog RT inhibitors (NNRTIs) ได้แก่ nevirapine และ efavirenz และ (3) Protease inhibitors (PIs) ได้แก่ saquinavir, indinavir, ritronavir และ nelfinavir [1]

เป้าหมายหลักในการรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอดส์ (Antiretroviral Therapy) คือช่วยลดอัตราการดำเนินไปของโรค (disease progression) และลดอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วย ด้วยการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวี (HIV replication) ให้น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยสามารถติดตามประสิทธิภาพของการรักษาจากระดับ CD4 cell count และระดับ plasma HIV RNA ควบคู่กันไป [2] อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ยาเดี่ยวในการรักษา (monotherapy) ไม่สามารถยับยั้ง viral replication ได้อย่างสมบูรณ์ การใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน (combination therapy) จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากกว่า [3] โดยช่วยลดจำนวนเชื้อได้ในระยะยาว ทำให้การเพิ่มจำนวนเชื้อลดลง ส่งผลให้วิวัฒนาการการกลายพันธุ์ของเชื้อ (viral evolution) ช้าลง จึงเป็นการช่วยป้องกันการเกิดเชื้อกลายพันธุ์ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาได้อีกทางหนึ่งด้วย [4] แต่อย่างไรก็ตามการรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอดส์ในระยะยาวก็มีข้อจำกัด คือมีการพัฒนา**การดื้อยา**เกิดขึ้น [3]

ยาทุกตัวที่มีใช้ทางคลินิกขณะนี้ ล้วนแต่มีรายงานการเกิดเชื้อดื้อยาแล้วทั้งสิ้น [5] นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อดื้อยายังสามารถติดต่อจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่ง (transmission) ได้อีกด้วย[6] มีรายงานว่าการเกิดเชื้อดื้อยานั้น มีความสัมพันธ์กับการลดลงของจำนวนเซลล์ CD4 และการเพิ่มขึ้นของปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viral load) ตำแหน่งการกลายพันธุ์ต่อการดื้อยาชนิดหนึ่ง ๆ มักเกิดขึ้นได้หลายจุด (resistance codons) ผู้ป่วยที่ได้รับยา AZT มักพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 70 และ 215 [7] โดยการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง T215Y/F จะพบบ่อยที่สุด และมีความสำคัญมากที่สุด ผู้ป่วยที่ได้รับยา ddI มักพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 74 และ 184 ผู้ป่วยที่ได้รับยา 3TC มักพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 184 และผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม NNRTIs มักพบว่าเกิดการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 103 และ 181 [8] อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้มีรายงาน

ว่าการกลายพันธุ์บางตำแหน่ง ได้แก่ Q151M [9] มักเกิดขึ้นเมื่อผู้ป่วยได้รับยาหลายชนิดร่วมกัน (combination therapy) และเมื่อเกิดขึ้นแล้วจะทำให้ผู้ป่วยเกิดการดื้อต่อยากลุ่ม NRTIs ทั้งกลุ่ม

ดังนั้นการตรวจหาการดื้อยาต้านไวรัสเอดส์ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี จึงมีประโยชน์ทางคลินิก คือ สามารถรู้ถึงการตอบสนองของไวรัส สามารถทำนายความล้มเหลวของการใช้ยา [10,11] และมีประโยชน์ในการตัดสินใจเปลี่ยนยาให้กับผู้ป่วย [12] นอกจากนี้ยังมีประโยชน์กับผู้ป่วยใหม่ที่ยังไม่ได้รับยาอีกด้วย ว่าควรได้รับยาตัวใดดี

การตรวจหาการดื้อต่อยาต้านไวรัสเอดส์ มี 2 วิธี คือ [11,13]

1. Phenotypic Assay เป็นการตรวจดูลักษณะการแสดงออกของเชื้อดื้อยา โดยดูความไวของเชื้อ HIV ที่ถูกยับยั้งด้วยยาชนิดต่าง ๆ โดยวัดออกมาเป็นค่าเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ 50% หรือ 90% ในหลอดทดลอง (*in vitro*) หรือเรียกว่า 50% หรือ 90% Inhibition Concentration (IC_{50} หรือ IC_{90}) แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าของ wild type HIV

อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของวิธีนี้คือ เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้ระยะเวลานาน (เป็นสัปดาห์) ไม่สามารถกำหนดค่า cut off ที่มีนัยสำคัญทางคลินิกได้อย่างแน่นอน อีกทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง และทำได้เฉพาะในห้องปฏิบัติการใหญ่ ๆ บางแห่งเท่านั้น

2. Genotypic Assay เป็นการตรวจดูการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นของ gene ณ ตำแหน่ง ซึ่งเป็น target ของยาต้านไวรัสเอดส์ โดยดูลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ คือ RT และ PR ของ HIV-1 gene โดยวิธีนี้ขั้นตอนแรกจะอาศัยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มจำนวน (Amplification) HIV-1 RNA หรือ DNA ให้มากพอ ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ทาง genotype ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งทำได้หลายวิธี คือ

2.1 Automated DNA sequencing เป็นวิธีมาตรฐานทาง genotypic assay สามารถตรวจดูลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ทั้งหมด แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตำแหน่งที่มีรายงานไว้ว่าเกี่ยวกับการเกิดเชื้อดื้อยาหรือไม่ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีราคาแพงมาก และทำได้เฉพาะห้องปฏิบัติการใหญ่ ๆ ที่มีเครื่อง sequence เท่านั้น

2.2 Point mutation assays เป็นวิธีการตรวจดูเฉพาะตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ ที่มีรายงานไว้แล้วเท่านั้น ซึ่งทำได้ 2 วิธี

2.2.1 Probe by hybridization-based assays ได้แก่ Line probe assay (LiPA) [14] อาศัยหลักการ reverse DNA hybridization เพื่อตรวจหา point mutation อาศัยการจับกันของ HIV-1 PCR product กับ oligonucleotide probe ที่อยู่บน paper strip แล้วดูสีบน strip ที่เปลี่ยนแปลงไป (colorimetric signal) วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และมีความไวสูงสำหรับตรวจ minority species แต่วิธีการนี้ไม่สามารถตรวจในกรณีที่เชื้อมี polymorphism และปัจจุบันวิธีนี้สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้เพียงในกลุ่ม NRTIs เท่านั้น

2.2.2 Selective PCR [15] อาศัยหลักการ selective priming โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์ (WT หรือ MT primer) ในการเพิ่มจำนวนผลผลิต แล้วตรวจดูผลที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis ข้อดีของวิธีนี้คือให้ sensitivity และ specificity สูงกว่า PCR ทั่ว ๆ ไป

ตารางเปรียบเทียบ Phenotypic และ Genotypic HIV Resistance assays [11]

ข้อดี	ข้อจำกัด
Phenotypic assays	
วัดความไวต่อยาซึ่งเกิดจากเชื้อกลายพันธุ์โดยตรง ให้ข้อมูลทาง cross-resistance ได้	ทำได้ยาก , ราคาแพง ใช้ระยะเวลาในการทำนาน (สัปดาห์) ต้องการเทคนิคในการทำมาก ไม่สามารถใช้ตรวจ minor species ค่า cutoff ที่มีผลทางคลินิกยังไม่มีระบุชัดเจน
Genotypic assays	
ทำได้ง่าย , ราคาถูกกว่า phenotypic assay ใช้ระยะเวลาในการทำรวดเร็ว (วัน) ไม่ต้องการเทคนิคในการทำมากนัก การกลายพันธุ์ที่เกิดมักสัมพันธ์กับวิธี phenotypic assay พบการกลายพันธุ์ได้ก่อนที่จะเกิด phenotypic resistance	ไม่ได้วัดความไวต่อยาโดยตรง บางครั้งการกลายพันธุ์ที่ได้ไม่สัมพันธ์กับวิธี phenotype ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการแปลผล ไม่สามารถใช้ตรวจ minor species

จะเห็นได้ว่าทั้งสองวิธี มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน การวิจัยครั้งนี้เลือกการพัฒนาการตรวจหาการกลายพันธุ์ของการดื้อต่อยาต้านไวรัสเอดส์ในตำแหน่งที่พบได้บ่อย และมีความสำคัญ โดยได้พัฒนาวิธี multiplex selective PCR ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ point mutation โดยอาศัยหลักการเดียวกันกับ selective PCR แต่จะสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้หลายตำแหน่งในหลอดทดลองเดียวกัน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่แพง นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่อง PCR ได้อีกด้วย เหมาะแก่การจะนำไปพัฒนาเป็นงาน routine ไว้ทดสอบเชื้อดื้อยาในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาเทคนิคการตรวจหาการกลายพันธุ์โดยวิธี multiplex selective PCR
2. นำเทคนิคที่พัฒนาได้มาลองตรวจหาการกลายพันธุ์ของ HIV-1 RT gene ของผู้ติดเชื้อ HIV-1 ที่ได้รับยาต้านไวรัสเอดส์แล้วแต่อาการไม่ดีขึ้น (viral load > 1000 copies/mL) 20 ราย โดยนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับวิธี sequencing analysis ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐานว่าให้ผลถูกต้องหรือไม่ อย่างไร

วัสดุ และวิธีการ

การพัฒนาเทคนิค multiplex selective PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อ HIV

1. การออกแบบ Primer

จากรายงานตำแหน่งการกลายพันธุ์ ซึ่งก่อให้เกิดการดื้อต่อยาต้านไวรัสเอดส์ชนิดต่าง ๆ ใน Los Alamos Drug Resistance Database ได้เลือกตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบได้บ่อย และมีความสำคัญ และใช้ Human immunodeficiency virus type 1, strain CM240 (U54771) ซึ่งเป็น strain ที่พบในคนไทยเป็น reference strain มาใช้ในการออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม MacVector เพื่อทำ multiplex PCR โดยมี primer ทั้งหมด 2 ชุด คือ

ชุดแรก สำหรับทำ RT-PCR และ first-PCR โดยออกแบบ primer คู่นี้ ให้สามารถ amplify ส่วนของ *RT* gene ในตำแหน่ง 1969-2796 ซึ่งจะให้ PCR products ขนาด 828 bp. สำหรับเป็น template ในการทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป

Location		Sequence	Product size
1969 – 1990	OU	5' – GGG GAA TTG GAG GTT TTA TCA A -- 3'	828 bp
2773 – 2796	OL	5' – GTT CCT TCT GAT GCT TTT TGT CTG – 3'	

ชุดที่สอง สำหรับทำ multiplex selective PCR ซึ่งได้ออกแบบ primer ให้จำเพาะกับตำแหน่งต่าง ๆ ที่เกิดการกลายพันธุ์ แต่ละตำแหน่งจะมี primer 2 เส้น คือ wild type primer และ mutant primer โดยออกแบบให้ได้ PCR products ขนาดต่าง ๆ กัน

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการปรับเปลี่ยน primers ทั้งหมด 3 ครั้ง เพื่อเพิ่มความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primers ให้มากขึ้น

การออกแบบ primer ครั้งแรก

ออกแบบ primer แบบ non-additional mismatch เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 103, 151, 181, และ 184 ดังแสดงในตารางที่ 1 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 : primer sequences ที่ออกแบบไปโดยใช้หลักการ non-additional mismatch

Codon	Location	Drug			Sequence	Product size
103	2308 – 2331	NNRTIs	IU	Upper	5' – CAT TAA AGA AAA AGG ACA GCA CCA – 3'	153 bp
	2432 – 2460		103W	Lower	5' – C TCC CAC ATC TAG TAC TGT TAC TGA TTT T – 3'	
			103M	Lower	5' – C TCC CAC ATC TAG TAC TGT TAC TGA TTT G – 3'	
151	2308 – 2331	MDR	IU	Upper	5' – CAT TAA AGA AAA AGG ACA GCA CCA – 3'	286 bp
	2574 – 2593		151W	Lower	5' – GGT GAT CCT TTC CAT CCC TG – 3'	
			151M	Lower	5' – GGT GAT CCT TTC CAT CCC AT – 3'	
181	2308 – 2331	NNRTIs	IU	Upper	5' – CAT TAA AGA AAA AGG ACA GCA CCA – 3'	377 bp
	2665 – 2684		181W	Lower	5' – CAA GTC ATC CTT GTA TTG AT – 3'	
			181M	Lower	5' – CAA GTC ATC CTT GTA TTG AC – 3'	
184	2308 – 2331	3TC	IU	Upper	5' – CAT TAA AGA AAA AGG ACA GCA CCA – 3'	390 bp
	2673 – 2697		184W	Lower	5' – CAG ATC CTA CAT ACA AGT CAT CCT T – 3'	
			184M	Lower	5' – CAG ATC CTA CAT ACA AGT CAT CCT C – 3'	

การออกแบบ primer ครั้งที่สอง

ได้ทำการปรับเปลี่ยน primer เนื่องจาก primer ที่ออกแบบไปครั้งแรกมีข้อจำกัดคือ ปัญหาการเกิดผลบวกปลอม (false positive) ซึ่งเกิดจาก primer leakage (เมื่อใช้ WT primer กับ MT template หรือ MT primer กับ WT template) อย่างไรก็ตามปัญหานี้สามารถแก้ไขได้ โดยการทำ template serial dilution ไปเรื่อย ๆ [7] อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก อีกทั้งยังสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย การออกแบบ primer โดยนำหลักการ Amplification Refractory Mutation System (ARMS) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหา genetic mutation ที่มีมานานแล้ว มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อดื้อยา จึงน่าจะเป็นวิธีที่เข้ามาช่วยแก้ไขปัญหา primer leakage ได้ดีกว่า จึงได้ออกแบบ primer ชุดที่สองขึ้น โดยเติม mismatch (additional mismatch) เข้าไปที่ตำแหน่งเบสรองสุดท้ายของปลายด้าน 3' ของ primer ซึ่งได้ออกแบบไป 5 ตำแหน่ง คือ 103, 151, 181, 184 และ เพิ่มตำแหน่ง 215 เข้ามาด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2

และจากรายงานของ Newton CR และคณะ [16] พบว่าการออกแบบ primer โดยหลักการ ARMS นั้น สามารถเติม mismatch ได้หลายแบบ เช่น ที่ตำแหน่งเบสรองสุดท้ายของปลายด้าน 3' ของ primer ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มักใช้กัน (เหมือนที่ได้ออกแบบไปในครั้งที่สอง) หรือ เติม mismatch เข้าไปในตำแหน่งเบสที่ 3, 5 หรือ 7 ถัดจากเข้าไปจากปลายด้าน 3' ของ primer หรือจากรายงานของ Okayama H และคณะ [17] ที่แนะนำการตรวจหา genetic disease โดยการใช้ primer ที่เติม mismatch มากกว่า 1 ตำแหน่งทางปลายด้าน 3' เพื่อเพิ่มความจำเพาะของ primer อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนว่าการเติม additional mismatch ณ ตำแหน่งใด จะเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุด จากหลักการดังกล่าว จึงได้ออกแบบ primer ของตำแหน่ง 103 เพิ่มอีก 1 คู่ ตามรายงานของ Okayama H.

ตารางที่ 2 : primer sequences ที่ออกแบบโดยใช้หลักการ Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Codon	Location	Drug			Sequence	Product size
103	2162 – 2184		IU	Upper	5'-GCC AGG AAT GGA TGG ACC AAA GG-3'	
" 2 "	2432 – 2463	NNRTIs	103W	Lower	5'-C ATC TCC CAC ATC TAG TAC TGT TAC TGA TTC T-3'	302 bp
mismatch			103M	Lower	5'-C ATC TCC CAC ATC TAG TAC TGT TAC TGA TTC G-3'	
103	2162 – 2184		IU	Upper	5'-GCC AGG AAT GGA TGG ACC AAA GG-3'	
" 3 "	2432 – 2463	NNRTIs	103W	Lower	5'-C ATC TCC CAC ATC TAG TAC TGT TAC TGA TCC T-3'	302 bp
mismatch			103M	Lower	5'-C ATC TCC CAC ATC TAG TAC TGT TAC TGA TCC G-3'	
	2162 – 2184		IU	Upper	5'-GCC AGG AAT GGA TGG ACC AAA GG-3'	
151	2574 – 2601	MDR	151W	Lower	5'-AT ATT GCC GGT GAT CCT TTC CAT CCT TG-3'	440 bp
			151M	Lower	5'-AT ATT GCC GGT GAT CCT TTC CAT CCT AT-3'	
	2162 – 2184		IU	Upper	5'-GCC AGG AAT GGA TGG ACC AAA GG-3'	
181	2665 – 2694	NNRTIs	181W	Lower	5'-A TCC TAC ATA CGA GTC ATC CTT GTA TTG CT-3'	533 bp
			181M	Lower	5'-A TCC TAC ATA CGA GTC ATC CTT GTA TTG TC-3'	
	2162 – 2184		IU	Upper	5'-GCC AGG AAT GGA TGG ACC AAA GG-3'	
184	2673 – 2702	3TC	184W	Lower	5'-A ATC AGA TCC TAC ATA CAA GTC ATC CGT-3'	541 bp
			184M	Lower	5'-A ATC AGA TCC TAC ATA CAA GTC ATC CAC-3'	
	2162 – 2184		215U	Upper	5'-GCC AGG AAT GGA TGG ACC AAA GG-3'	
215	2766 – 2793	AZT	215W	Lower	5'-C CTT CTG ATG CTT TTT GTC TGG TGT TGT-3'	632 bp
			215M	Lower	5'-C CTT CTG ATG CTT TTT GTC TGG TGT TAA-3'	

การออกแบบ primer ครั้งที่สาม

การออกแบบครั้งนี้ เพื่อแก้ไขปัญหา false positive (primer leakage) ที่ยังพบได้ในตำแหน่ง 103 และ 184 และแก้ไขปัญหาของ primer ของตำแหน่ง 215 ที่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อดื้อต่อยา ใน sample ที่มีการกลายพันธุ์แบบ T215Y ได้

จากรายงานของ Frater AJ และคณะ [18] ที่ได้นำหลักการ ARMS มาประยุกต์ใช้ในการออกแบบ primer สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 103 และ 181 โดยวิธี competitive PCR พบว่าการเติม mismatch ที่ตำแหน่งเบสที่ 3 ใน WT primer และตำแหน่งที่ 4 ใน MT primer จะให้ specificity และ sensitivity ที่ดีที่สุด จึงได้ทดลองออกแบบ primer ของตำแหน่ง 103 ใหม่ตามรายงานนี้เพิ่มอีกหนึ่งคู่

จากหลักการของ Newton CR และคณะ [16] ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ได้ออกแบบ primer ของตำแหน่ง 184 ใหม่ ตามหลักการนั้น

และจากรายงานของ Boucher CA และคณะ [19] ที่พัฒนาเทคนิค selective PCR สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 พบว่าสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ ทั้งแบบ T215Y และ T215F จึงได้ออกแบบ primer ตามรายงานนี้

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ primer ชุดของ Boucher CA และคณะ มาทดลองหากลายพันธุ์ในผู้ป่วยคนไทย ก็ยังพบปัญหาเดิม คือ ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ T215Y ได้ ซึ่งเมื่อตรวจดูการเปลี่ยนลำดับเบสของคนไทยแล้ว (Reference : CM240) จะพบว่าการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ซึ่งมี 2 แบบนั้นเป็นดังนี้ คือ T215Y : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACT เป็น TTT และ T215F : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACT เป็น TAT ซึ่งแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ Boucher รายงานไว้ คือ T215Y : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACC เป็น TTC และ T215F : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACC เป็น TAC ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเนื่องจากสาเหตุนี้ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจหาเชื้อดื้อยาได้ ต่อมาจึงได้ทดลองออกแบบ primer ตำแหน่ง 215 เพิ่มอีกหนึ่งคู่ โดยออกแบบให้ primer มีลำดับเบสจำเพาะต่อคนไทย

<u>ตารางที่ 3</u> : primer sequences ที่ออกแบบครั้งที่ 3

Codon	Location	Drug			Sequence	Product size
103	2321 – 2346	NNRTIs	*IU	Upper	5' - GGA CAG CAC CAA ATG GAG GAA ATT AG -3'	141 bp
	2432 – 2461		*103W	Lower	5'-TCC CCC ACA TCT AGT ACT GTT ACT GAT GTT-3'	
			*103M	Lower	5'-TCC CCC ACA TCT AGT ACT GTT ACT GAG TTT-3'	
151	2321 – 2346	MDR	*IU	Upper	5' - GGA CAG CAC CAA ATG GAG GAA ATT AG -3'	281 bp
	2574 – 2601		*151W	Lower	5'-AT ATT GCC GGT GAT CCT TTC CAT CCT TG-3'	
			*151M	Lower	5'-AT ATT GCC GGT GAT CCT TTC CAT CCT AT-3'	

Codon	Location	Drug			Sequence	Product size
181	2321 – 2346	NNRTIs	*IU	Upper	5' - GGA CAG CAC CAA ATG GAG GAA ATT AG -3'	374 bp
	2665 – 2684		*181W	Lower	5'-A TCC TAC ATA CGA GTC ATC CTT GTA TTG CT-3'	
			*181M	Lower	5'-A TCC TAC ATA CGA GTC ATC CTT GTA TTG TC-3'	
184	2321 – 2346	3TC	IU	Upper	5' - GGA CAG CAC CAA ATG GAG GAA ATT AG -3'	380 bp
	2673 – 2700		184W	Lower	5'-A ATC AGA TCC TAC ATA CAA GTC ATC GTT-3'	
			184M	Lower	5'-A ATC AGA TCC TAC ATA CAA GTC ATC GTC-3'	
215 Boucher และคณะ	2321 – 2346	AZT	IU	Upper	5' - GGA CAG CAC CAA ATG GAG GAA ATT AG -3'	471 bp
	2766 – 2791		215W	Lower	5' – TT CTG ATG TTT TTT GTC TGG TGT GGT -- 3'	
			215M	Lower	5' – TT CTG ATG TTT TTT GTC TGG TGT GAA– 3'	
215	2321 – 2346	AZT	*IU	Upper	5' - GGA CAG CAC CAA ATG GAG GAA ATT AG -3'	468 bp
	2766 -- 2788		*215W	Lower	5' – TG ATG CTT TTT GTC TGG TGT AGT – 3'	
			*215M	Lower	5' – TG ATG CTT TTT GTC TGG TGT AAA – 3'	

* คือ primer ที่พัฒนาได้สำเร็จ

2. การพัฒนาวิธีการ multiplex selective PCR ให้ได้มาตรฐาน

2.1 การเลือก control

Positive Control สำหรับ wild type ได้แก่ wild type plasmid, wild type virus stock (HIV III B) และ known wild type isolate (sequencing analysis)

Positive Control สำหรับ mutant ได้แก่ mutant plasmid ที่มี mutation ของตำแหน่ง 151 และ known mutant isolate (sequencing analysis) สำหรับ mutation ของตำแหน่งอื่น ๆ

2.2 การพัฒนา selective PCR แยกเป็นราย codon

การหาสภาวะที่เหมาะสม (optimal condition)ในการทำ selective PCR โดยแยกทำเป็นแต่ละ codon พยายามปรับหาสภาวะ PCR ของแต่ละตำแหน่งที่จะนำมา multiplex กัน ให้มีสภาวะใกล้เคียงกัน ทั้ง annealing temperature และ Mg^{2+} concentration โดยใช้ positive control เป็นตัวปรับหาสภาวะที่เหมาะสม

หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมได้แล้ว นำมาทำ serial dilutions กับ wild type plasmid (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 10^6 copies) และ wild type viral stock (ซึ่ง vary ปริมาณจาก 500 ถึง 500,000 copies/mL) เพื่อตรวจดูความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

2.3 การพัฒนา multiplex selective PCR

นำแต่ละตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ปรับหาสภาวะที่เหมาะสมเป็นแต่ละ codon ได้แล้ว และไม่เกิดผลบวกปลอมขึ้น มา multiplex กัน แล้วพยายามปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR ร่วมกันต่อไป

การนำเทคนิคที่พัฒนาได้มาตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย

หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex selective PCR ได้แล้ว และไม่เกิดผลบวกปลอมขึ้น นำเทคนิคที่พัฒนาได้มาทดลองตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่ได้รับยามาแล้วมากกว่า 6 เดือน โดยผู้ป่วยต้องมีปริมาณเชื้อ virus ในกระแสเลือดมากกว่า 1,000 copies/mL โดยนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับวิธี sequencing analysis ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน ว่าผลที่ได้ถูกต้องหรือไม่ อย่างไร

วิธีการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย

1. การแยก HIV RNA จาก plasma (Plasma HIV RNA Preparation for PCR Analysis)

นำ EDTA plasma 1 mL. มาปั่นให้ได้ HIV RNA pellet ที่ 17,000 rpm เป็นเวลานาน 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นดูด supernatant ทิ้ง เติม lysis buffer (guanidium isothiocyanate) 600 µL incubate ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ตกตะกอน HIV RNA ด้วย isopropanol 600 µL. vortex แล้วนำไปปั่นให้ได้ตะกอนที่ 14,000 rpm, 15 นาที, ที่อุณหภูมิห้อง ดูด supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 1 mL. นำไปปั่นให้ได้ตะกอนที่ 14,000 rpm, 5 นาที, อุณหภูมิห้อง ดูด supernatant ทิ้ง แล้วเติม DEPC-treated water 20 µL. เก็บที่ –70°C ถ้ายังไม่ใช้เพื่อนำไปใช้ทำ PCR ต่อไป

2. การเตรียม complementary DNA (cDNA) โดยวิธี Reverse Transcription (RT)

เอนไซม์ reverse transcriptase สามารถเปลี่ยน mRNA เป็น cDNA ได้ ในปฏิกิริยา 1 reaction ประกอบด้วย 5 µL sample RNA, 25 pmol of primer OL, 1X RT-buffer, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTPs, 60 units recombinant Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase และ 32 units RNase Inhibitor ในปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยา 20 µL นำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะการทำงานของเครื่องที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่ –20°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

เพื่อป้องกันการปนเปื้อน (contaminate) ของ DNA อื่น ๆ ในตัวอย่างของ RNA , น้ำยาในปฏิกิริยาต่าง ๆ และการปนเปื้อนในระหว่างการปฏิบัติการ จึงต้องมีตัวควบคุมเพื่อบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนนั้นว่ามีหรือไม่ โดยการทำ non-reverse transcribe (NRT) control (ใช้ DEPC-H_2O แทนเอนไซม์ reverse transcriptase) เพื่อนำไปทำในขั้นตอน multiplex PCR ควบคู่ไปกับ cDNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจากตัวอย่างเดียวกัน เป็นการบ่งบอกการปนเปื้อนจากตัวอย่าง และการทำ water negative control (ใช้ DEPC-H_2O แทนตัวอย่าง RNA) เพื่อดูการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นกับน้ำยาและจากการปฏิบัติการในขั้นตอนต่าง ๆ

3. การตรวจการกลายพันธุ์ โดยวิธี Multiplex Selective PCR

3.1 First PCR Amplification

ปฏิกิริยา PCR รอบแรกนี้จะเพิ่มจำนวน sequence ในบริเวณที่ครอบคลุมส่วนของ RT gene ที่ตำแหน่ง 1969-2796 เพื่อให้ครอบคลุมตำแหน่งการกลายพันธุ์ต่างๆ ที่จะทำในขั้นต่อไป โดยใช้ oligonucleotide primers (OU และ OL) ซึ่งจะให้ PCR product ขนาด 828 bp. ในปฏิกิริยา 1 reaction ประกอบด้วย 10 µL cDNA, 1X PCR-buffer, 1.25 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, 25 pmol primer OU, 25 pmol primer OL และ 1.25 U per reaction of *Taq* polymerase ในปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยา 50 µL นำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะการทำงานของเครื่อง ให้ denature DNA ที่ 94°C 5 นาที 1 รอบ จากนั้นให้เครื่องทำงานด้วยสภาวะ 94°C 1 นาที, 53°C 1 นาที และ 72°C 1 นาที เป็นจำนวน 40 รอบ และ 72°C 10 นาที 1 รอบ แล้วให้เครื่องลดอุณหภูมิลงมาที่ 4°C เก็บ PCR product ไว้ที่ 4°C เพื่อทำการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

3.2 Multiplex selective PCR Amplification

แบ่งออกเป็น 2 ชุด ตาม annealing temperature ที่แตกต่างกัน คือ

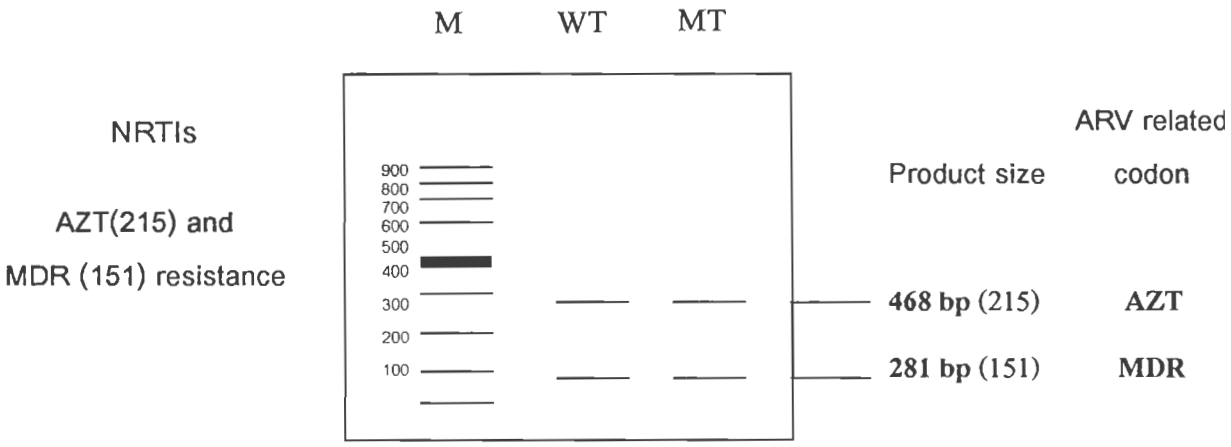
1. Multiplex selective PCR สำหรับ codon 151 และ 215

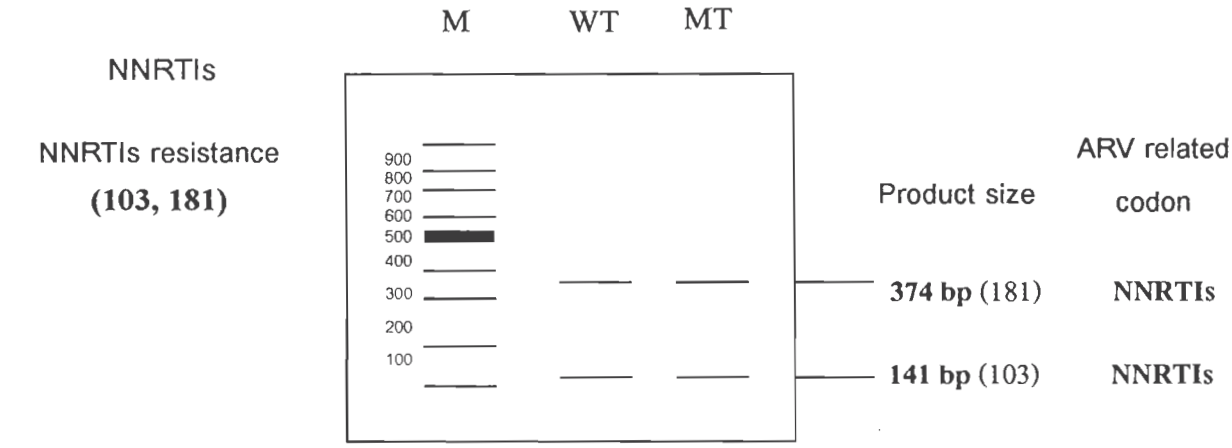
ในปฏิกิริยา 1 reaction ประกอบด้วย 3 µL DNA template, 1X PCR-buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.8 mM dNTPs, primer *IU (10pmol), primer *151WT/MT (5pmol) และ primer *215WT/MT (12.5 pmol) และ 1.25 U per reaction of *Taq* polymerase ในปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยา 50 µL นำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะการทำงานของเครื่องเป็น 94°C 5 นาที 1 รอบ ต่อด้วย 94°C 30 วินาที, 50°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ 72°C 10 นาที

2. Multiplex selective PCR สำหรับ codon 103 และ 181

ในปฏิกิริยา 1 reaction ประกอบด้วย 3 µL DNA template, 1X PCR-buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.8 mM dNTPs, primer *IU (10pmol), primer *103WT/MT (15pmol) และ primer *181WT/MT (5 pmol) และ 1.25 U per reaction of *Taq* polymerase ในปริมาตรสุทธิของปฏิกิริยา 50 µL นำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะการทำงานของเครื่องเป็น 94°C 5 นาที 1 รอบ ต่อด้วย 94°C 30 วินาที, 48°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ 72°C 10 นาที

รูปแสดงผลที่ได้จากการทำ Multiplex selective PCR





4. การวิเคราะห์หาผลผลิตจากการทำ Multiplex selective PCR (Analysis of Amplification Products)

วิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 10 µL PCR product ผสมกับ 2 µL. loading dye นำไปใส่ในหลุมของ 1.2 % agarose gel แล้วนำไป run electrophoresis อ่านผลโดยใช้ short-wavelength UV light transilluminator จากนั้นให้ score ของผลผลิตที่ได้ว่าเป็น wild type หรือ mutant โดยใช้ 100 bp DNA leader เป็น marker ช่วยบอกขนาดของ products ที่ได้ว่าใช่ที่ต้องการหรือไม่ ถ่ายรูปผลการทดลองที่ได้

เพื่อความเชื่อถือได้ของผลการทดลอง จึงต้องทำการ blind sample ทุก sample เพื่อไม่ให้เกิดความลำเอียงของผู้ทำ ร่วมกับการทำ positive และ negative control ควบคู่ไปด้วยเสมอ เพื่อแสดงว่าเทคนิคการทำ PCR ถูกต้องเชื่อถือได้ และไม่มีการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นจากน้ำยาและการปฏิบัติการในขั้นตอนต่างๆ นอกจากนี้เพื่อความถูกต้องของผลการทดลอง จึงได้มี criteria ในการให้ score ของผลผลิตที่ได้ โดยจะให้ score ว่าเป็น wild type หรือ mutant ก็ต่อเมื่อผลผลิตที่ได้ให้ band ชัดเจนว่าเป็นตัวใดตัวหนึ่งเท่านั้น กรณีที่ band ที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจนจะทำซ้ำใหม่ทุกครั้ง

ผลการศึกษาวิจัย

ผลการพัฒนาเทคนิค multiplex selective PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อ HIV

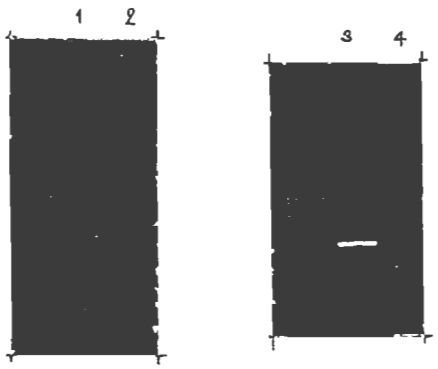
1. ผลการทดลองของ primer ที่ออกแบบครั้งแรก

ผลการทดลอง primer แบบ non-additional mismatch กับ positive control ต่าง ๆ ที่ได้เลือกเอาไว้ คือ plasmid control และ known sequence isolate ทั้ง wild type และ mutant พบปัญหาการเกิด false positive ขึ้น อันเนื่องมาจาก primer leakage (เมื่อใช้ WT primer กับ MT template หรือ MT primer กับ WT template) ซึ่งแก้ไขปัญหานี้ โดยการทำ template serial dilution ของรอบ first PCR amplification ก่อนนำไปทำ multiplex selective PCR ในรอบต่อไป ซึ่งการแก้ไขปัญหาด้วยวิธีการนี้ได้มีรายงานการทำมานานแล้ว

การทดลองครั้งนี้ ได้ multiplex selective PCR สองชุด ตาม annealing temperature ที่แตกต่างกัน คือ

- Multiplex selective PCR ตำแหน่ง 103 กับ 181
- Multiplex selective PCR ตำแหน่ง 151 กับ 184

ตัวอย่าง Known Wild Type Isolate multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 103 ร่วมกับ 181 และตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 184



Lane	Type of primers	Expected Product size
1	Cd 103+181 WT	153+377 bp
2	Cd 103+181 MT	-
3	Cd 151+184 WT	286+390 bp
4	Cd 151+184 MT	-

อย่างไรก็ตามการแก้ไขปัญหาด้วยวิธี template serial dilution นี้ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก กล่าวคือสิ้นเปลืองทั้งเวลา และค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก sample แต่ละรายนั้น ใช้ dilution template ที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้ยังอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายอีกด้วย

การนำการออกแบบ primer โดยอาศัยหลักการ Amplification Refractory Mutation System (ARMS) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหา genetic mutation ที่มีมานานแล้ว มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อ HIV ที่ดื้อยา จึงน่าจะเป็นวิธีที่เข้ามาช่วยแก้ไขปัญหาผลบวกปลอม (false positive) ได้ดีกว่า จึงได้ใช้หลักการนี้ในออกแบบ primer ชุดที่สองขึ้นใหม่

2. ผลการทดลองของ primer ที่ออกแบบครั้งที่สอง

หลักการ Amplification Refractory Mutation System (ARMS) มีรายงานครั้งแรกโดย Newton CR และคณะ โดยพบว่าการออกแบบ primer เพื่อตรวจหา mutation นั้น มักเกิดปัญหา false positive ขึ้นได้ง่าย จึงได้ทดลองออกแบบ primer โดยการเติม mismatch เพิ่มเข้าไปที่ตำแหน่ง base ต่าง ๆ จากทางปลายด้าน 3' ของ primer ของทั้ง wild type และ mutant primer เช่น เติมที่ตำแหน่งเบสรองสุดท้ายของปลายด้าน 3' ของ primer ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมมากที่สุด หรือ การเติม mismatch เข้าไปในตำแหน่งเบสที่ 3, 5 หรือ 7 ถัดเข้าไปจากปลายด้าน 3' ของ primer หรืออาจเติม mismatch 3 ถึง 4 base ติดกันไปเลยทางปลายด้าน 3' ของ primer อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนว่าควรเติม additional mismatch ที่ตำแหน่งใด จึงจะเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจหา mutation โดยวิธี selective PCR นี้

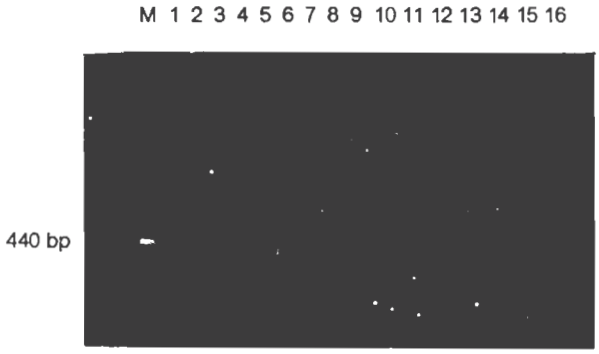
การออกแบบ primer ในครั้งนี้ จึงอาศัยหลักการ ARMS มาออกแบบ โดยการเติม mismatch (additional mismatch) เข้าไปที่ตำแหน่งเบสรองสุดท้ายของปลายด้าน 3' ของ primer หนึ่งตำแหน่ง โดยได้ทำไปทั้งสิ้น 5 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง 103, 151, 181, 184 และ 215 ซึ่งได้เพิ่มเข้ามาด้วย

หลังจากหาสภาวะที่เหมาะสมของ primer แต่ละตำแหน่งได้แล้ว จึงนำมาทำ serial dilutions กับ wild type plasmid (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 10^6 copies) และ wild type viral stock (ซึ่ง vary ปริมาณจาก 500 ถึง 500,000 copies/mL) เพื่อดูความจำเพาะ (specificity) และความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (sensitivity) ถ้า primer นั้นมีความจำเพาะดีแล้ว ก็จะนำไปทำ multiplex selective PCR ต่อไป

ผลการทดลองการทำ selective PCR แยกเป็นราย codon

1. **ตำแหน่ง 151, 181 และ 215 ไม่พบผลบวกปลอม** (false positive) เกิดขึ้นเลย ทั้งใน wild type plasmid และ wild type viral stock นอกจากนี้ยังได้ทดลองดู specificity ของ primer ตำแหน่ง 151 กับ mutant plasmid ของตำแหน่ง 151 (vary ปริมาณจาก 500 ถึง 10^6 copies) ผลการทดลองก็ไม่พบ false positive เกิดขึ้นเช่นเดียวกัน

ตัวอย่าง การ vary ปริมาณ Wild Type Plasmid กับ selective PCR ของ ตำแหน่ง 151

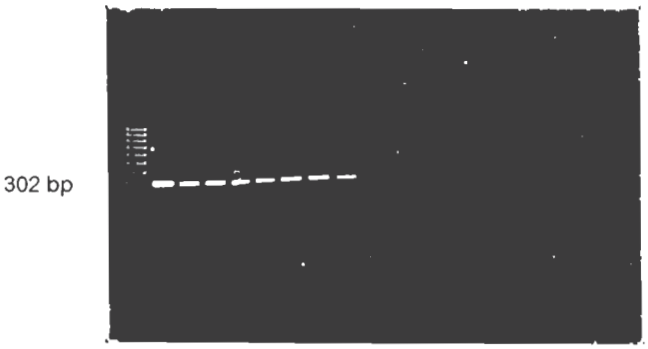


Lane	Type of primers	ปริมาณ plasmid (copies)
1	151WT	10^6
2	151WT	10^5
3	151WT	10^4
4	151WT	8000
5	151WT	4000
6	151WT	2000
7	151WT	1000
8	151WT	500
9	151MT	10^6
10	151MT	10^5
11	151MT	10^4
12	151MT	8000
13	151MT	4000
14	151MT	2000
15	151MT	1000
16	151MT	500

ผลจากการทำ serial dilutions พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ มีความไวที่ 1,000 copies กับทั้ง wild type plasmid และ wild type viral stock

2. **ตำแหน่ง 103 และ 184 พบว่าเกิดผลบวกปลอม** (false positive) ถึงแม้ว่าปริมาณ template จะน้อยก็ตาม (1,000 copies)

ตัวอย่าง การ vary ปริมาณ Wild Type Plasmid กับ selective PCR ของตำแหน่ง 103 (1 mismatch)



Lane	Type of primers	ปริมาณ plasmid (copies)
1	103WT	10^6
2	103WT	10^5
3	103WT	10^4
4	103WT	8000
5	103WT	6000
6	103WT	4000
7	103WT	2000
8	103WT	1000
9	103MT	10^6
10	103MT	10^5
11	103MT	10^4
12	103MT	8000
13	103MT	6000
14	103MT	4000
15	103MT	2000
16	103MT	1000

จะเห็นได้ว่ามีผลบวกปลอมเกิดขึ้น แม้จะมีปริมาณ template น้อย ซึ่งเกิดเนื่องจาก primer leakage ต่อมาได้ลองออกแบบ primer ณ ตำแหน่ง 103 ใหม่อีกหนึ่งคู่ ตามรายงานของ Okayama H และคณะ ที่แนะนำการตรวจหา genetic disease โดยการใช้ primer ที่เติม mismatch มากกว่า 1 ตำแหน่งทางปลายด้าน 3' เพื่อเพิ่มความจำเพาะของ primer โดยได้ลองเพิ่ม mismatch ทางปลายด้าน 3' ของ primer เป็น 2 mismatch ติดกัน

ตัวอย่าง การ vary ปริมาณ Wild Type Plasmid กับ selective PCR

ตำแหน่ง 103 (2 mismatch ติดกัน)

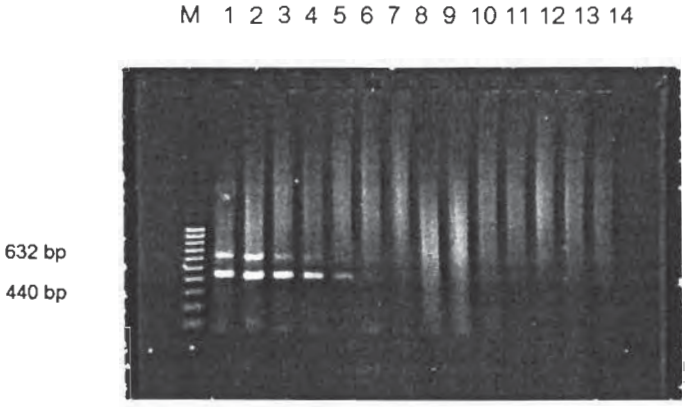
Lane	Type of prime	ปริมาณ plasmid (copies)
1	103WT	10^6
2	103WT	10^5
3	103WT	10^4
4	103WT	8000
5	103WT	6000
6	103WT	4000
7	103WT	2000
8	103WT	1000
9	103MT	10^6
10	103MT	10^5
11	103MT	10^4
12	103MT	8000
13	103MT	6000
14	103MT	4000
15	103MT	2000
16	103MT	1000

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าการเพิ่ม mismatch เข้าไปใน primer มากขึ้น ทำให้ความจำเพาะ (specificity) ของ primer ดีขึ้น โดยไม่ได้ทำให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจพบ ลดลง อย่างไรก็ตามยังคงพบปัญหาผลบวกปลอมได้ เมื่อมีปริมาณ plasmid template สูง ๆ (10^6 copies) ซึ่งได้พัฒนาแก้ไข ดังจะกล่าวต่อถึงต่อไปในขั้นตอนการออกแบบ primer ใหม่ครั้งที่ 3

ผลการทดลองการทำ multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215

จากการทำ selective PCR แยกเป็นราย codon ได้สำเร็จ 3 ตำแหน่ง (151, 184 และ 215) จึงได้นำตำแหน่ง 151และ 215 มาปรับหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ multiplex selective PCR ร่วมกัน จากนั้นทดลองทำ serial dilutions กับ wild type plasmid (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 10^6 copies) และ wild type viral stock (ซึ่ง vary ปริมาณจาก 50 ถึง 500,000 copies/mL) เหมือนกับตอนทำแยกเป็นราย codon เพื่อดูความจำเพาะ และความไว ของ primer

ตัวอย่าง การ vary ปริมาณ Wild Type Viral Stock กับ Multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215



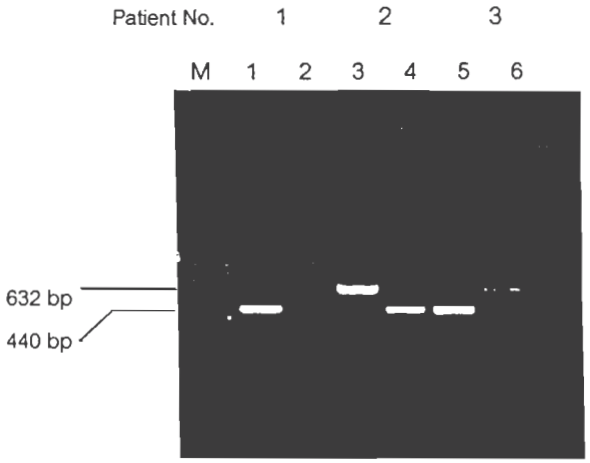
Lane	Type of primers 151WT+215WT	ปริมาณ virus (copies/mL)
1	151WT+215WT	500,000
2	151WT+215WT	50,000
3	151WT+215WT	5,000
4	151WT+215WT	1,000
5	151WT+215WT	500
6	151WT+215WT	100
7	151MT+215MT	50
8	151MT+215MT	500,000
9	151MT+215MT	50,000
10	151MT+215MT	5,000
11	151MT+215MT	1,000
12	151MT+215MT	500
13	151MT+215MT	100
14	151MT+215MT	50

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215 นี้ มีความจำเพาะที่ดี คือไม่ให้ผลบวกปลอมเกิดขึ้นเลย แม้ปริมาณ wild type virus stock จะมากถึง 500,000 copies/mL และให้ความไวในการตรวจพบที่ 1,000 copies/mL

การนำ multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215 มาทดลองตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย

จากการที่ประสบความสำเร็จในการทำ multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215 แล้ว จึงได้ลองนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นได้นี้มาตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย ทั้งสิ้น 10 ราย โดยนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับวิธีการ sequencing analysis ว่าถูกต้องหรือไม่

ตัวอย่าง ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย 3 ราย



Lane	Type of primer	Type of sample By sequencing	Expected Product size
1	151WT+215WT	1. T215Y	440 bp
2	151MT+215MT		632 bp *
3	151WT+215WT	2. Q151M	632 bp
4	151MT+215MT		440 bp
5	151WT+215WT	3. T215F	440 bp
6	151MT+215MT		632 bp

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ ไปเปรียบเทียบกับวิธี sequencing analysis พบว่า

- การตรวจหากลายพันธุ์ของตำแหน่ง 151 ให้ผลถูกต้องกับคนไข้ทุกราย
- การตรวจหากลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ให้ผลถูกต้องกับคนไข้เพียงบางรายเท่านั้น โดยพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ (wild type) ได้อย่างถูกต้องทุกราย แต่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ทุกราย

จากการศึกษาพบว่าการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 นั้น สามารถเกิดได้สองแบบ คือ

- การที่ amino acid T เปลี่ยนเป็น Y
  ซึ่งจะทำให้ลำดับ nucleotide เปลี่ยนจาก CCT เป็น CAT
- การที่ amino acid T เปลี่ยนเป็น F
  ซึ่งจะทำให้ลำดับ nucleotide เปลี่ยนจาก CCT เป็น CTT

และเมื่อนำผลผู้ป่วยที่ได้จากวิธี sequencing analysis มาตรวจดูลำดับ nucleotide พบว่าผลการทดลองที่นั้น สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ T215F ได้เท่านั้น โดยไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ T215 Y ได้

จากการรวบรวมข้อมูลผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาใน รพ.จุฬาลงกรณ์ พบว่า prevalence ของการเกิดการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 จะเกิดการกลายพันธุ์แบบ T215Y ได้มากกว่า T215F ถึงสองเท่า ดังนั้นควรออกแบบ primer ของตำแหน่ง 215 ใหม่ เพื่อให้สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ทั้งสองแบบพร้อมกัน ซึ่งจะกล่าวถึงต่อไปในการออกแบบ primer ครั้งที่สาม

3. ผลการทดลองของ primer ที่ออกแบบครั้งที่สาม

การออกแบบครั้งนี้ ได้ออกแบบให้ primer ของทุกตำแหน่งกลายพันธุ์มี upper primer ร่วมกัน (*IU) เพื่อให้สามารถนำมา multiplex กันได้ง่าย โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 151 และ 181 ชุดเดิม เนื่องจาก primer ของสองตำแหน่งนี้ ให้ความจำเพาะที่ดีต่อการตรวจหาการกลายพันธุ์อยู่แล้ว จึงต้องทำการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม และทำ template serial dilution ใหม่ เพื่อตรวจดูความจำเพาะและความไวของ primer ชุดนี้ด้วย ซึ่งให้ผลความจำเพาะที่ดี ไม่มีผลบวกปลอมเกิดขึ้น และความไวที่ 1,000 copies ทั้งตำแหน่ง 151 และ 181

แก้ไข primer ของตำแหน่งที่มีปัญหา 3 ตำแหน่งใหม่ ได้แก่ ตำแหน่ง 103, 184 และ 215 ดังนี้

1. **ตำแหน่ง 103** ที่ยังให้ผลบวกปลอมขึ้น เมื่อ template มีปริมาณมาก ลองออกแบบ primer ใหม่ ตามรายงานของ Frater AJ และคณะ [17] ที่ได้นำหลักการ ARMS มาประยุกต์ใช้ในการออกแบบ primer สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 103 และ 181 โดยวิธี competitive PCR พบว่าการเติม mismatch ที่ตำแหน่งเบสที่ 3 ใน WT primer และตำแหน่งที่ 4 ใน MT primer จะให้ specificity และ sensitivity ที่ดีที่สุด จึงได้ทดลองออกแบบ primer ของตำแหน่ง 103 ใหม่

ผลจากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม และการทำ serial dilutions กับ wild type plasmid (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 10^6 copies) และ wild type viral stock (ซึ่ง vary ปริมาณจาก 500 ถึง 500,000 copies/mL) พบว่ามีความจำเพาะที่ดี (ไม่มีผล false positive เกิดขึ้นเลย) และมีความไวในการตรวจพบที่ 1,000 copies ทั้งใน wild type plasmid และ wild type viral stock

2. **ตำแหน่ง 184** ที่ให้ผลบวกปลอมกับ template ไม่ว่าจะมีปริมาณน้อยหรือมาก จึงแก้ไขใหม่ ตามรายงนของ Newton CR และคณะ โดยทดลองเติม mismatch เข้าไปที่ตำแหน่ง base ตัวที่ 3 ถัดเข้ามาจากปลายด้าน 3' ของ ทั้ง wild type และ mutant primer

ผลจากการปรับหาสภาวะที่เหมาะสม และการทำ serial dilutions กับ wild type plasmid (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 10^6 copies) และ wild type viral stock (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 500,000 copies/mL) พบว่ามีความจำเพาะที่ดีขึ้น (ไม่มีผล false positive เกิดขึ้นเลย) แต่พบว่าความไวลดลงอย่างมาก คือ ต้องมีปริมาณ template มากกว่า 50,000 copies/mL ขึ้นไปใน wild type viral stock จึงสามารถตรวจได้

แสดงว่าการเติม mismatch เพิ่มเข้าไปใน primer นั้น มีผลอย่างมากต่อความจำเพาะของ primer ซึ่งจะเห็นได้ว่าจากการออกแบบ primer ของตำแหน่ง 184 ไปทั้งสองครั้งนั้น ครั้งแรกที่เติม mismatch ที่ตำแหน่ง base รองสุดท้าย พบว่าความจำเพาะของ primer ไม่ดีเลย อย่างไรก็ตาม เมื่อลองเปลี่ยนตำแหน่งการเติม mismatch พบว่าแม้ว่าจะมีความจำเพาะดีขึ้น แต่ก็ทำให้ความไวลดลงอย่างมากด้วย ซึ่งยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนว่า การเติม mismatch เข้าไปใน primer ที่ตำแหน่งใดเป็นตำแหน่งที่ดีที่สุด การศึกษาในครั้งนี้ได้ตัดตำแหน่งนี้ออกไปจากการทดลอง อย่างไรก็ตามจะได้ทำการพัฒนาให้ดีขึ้นต่อไป

3. **ตำแหน่ง 215** จากการที่ ARMS primer ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้แบบ T215 Y ได้ จึงได้ออกแบบ primer ใหม่ ตามรายงานของ Boucher CA และคณะ [18] ที่ได้พัฒนาเทคนิค selective PCR สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ซึ่งพบว่าสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ ทั้งแบบ T215Y และ T215F

ผลการทดลอง primer ตามรายงานของ Boucher CA โดยหาสภาวะที่เหมาะสม และทำ serial dilutions กับ wild type plasmid และ wild type viral stock พบว่ามีความจำเพาะดี และมี sensitivity ที่ 1,000 copies จากนั้นนำมาทำ multiplex selective PCR กับตำแหน่ง 151 แล้วนำมาทดลองหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย 10 รายเดิม ก็ยังพบปัญหาเดิม คือ ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ T215Y ได้ ซึ่งเมื่อตรวจดูการเปลี่ยนลำดับเบสของคนไทยแล้ว (Reference : CM240) พบว่าการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ซึ่งมี 2 แบบนั้น มีความแตกต่างจากของรายงานในต่างประเทศ คือ

- การกลายพันธุ์แบบ T215Y

มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACT เป็น TTT ซึ่งแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ Boucher รายงานไว้ คือ ลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACC เป็น TTC

- การกลายพันธุ์แบบ T215F

มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACT เป็น TAT ซึ่งแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ Boucher รายงานไว้ คือ ลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACC เป็น TAC

ซึ่งการที่ไม่สามารถตรวจหาเชื้อ HIV ที่เกิดการกลายพันธุ์แบบ T215Y ได้นั้นอาจเนื่องมาจากสาเหตุนี้

จึงได้ทดลองออกแบบ primer ตำแหน่ง 215 ให้มีลำดับเบสจำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงการกลายพันธุ์แบบคนไทยที่กล่าวมาแล้ว

ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม และทำ serial dilutions กับ wild type plasmid และ wild type viral stock ของตำแหน่ง 215 คู่ใหม่นี้ พบว่ามีความจำเพาะดี และมี sensitivity ที่ 1,000 copies และเมื่อนำไปทดลองหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย พบว่า สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ทั้งแบบ T215Y และ T215F ซึ่งได้นำมาทำ multiplex selective PCR กับตำแหน่ง 151 ต่อไป

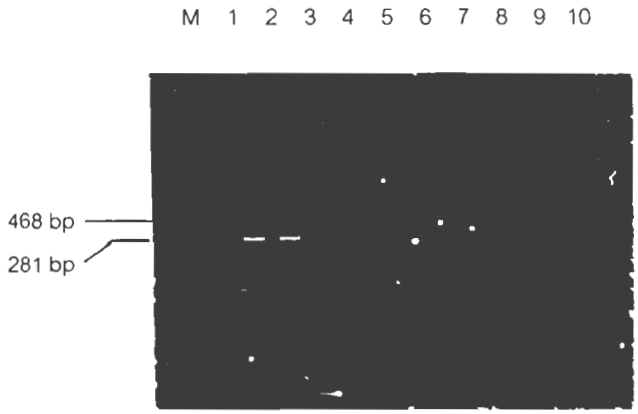
ผลการทดลองการทำ multiplex selective PCR

จากการออกแบบ primer ครั้งนี้ ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ multiplex selective PCR ได้ 2 ชุด ตาม condition และ annealing temperature ที่ต่างกัน คือ

1. **Multiplex Selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215**
2. **Multiplex Selective PCR ของตำแหน่ง 103 ร่วมกับ 181**

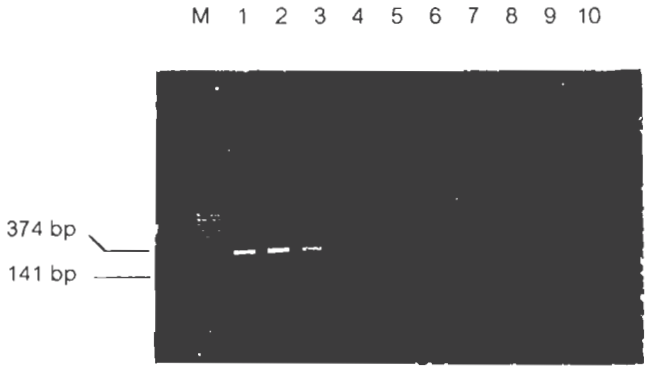
จากนั้นทดลองทำ serial dilutions กับ wild type plasmid (ซึ่ง vary ปริมาณ จาก 500 ถึง 10^6 copies) และ wild type viral stock (ซึ่ง vary ปริมาณจาก 500 ถึง 500,000 copies/mL) เหมือนกับตอนทำแยกเป็นราย codon เพื่อดูความจำเพาะ และความไว ของ primer ซึ่งพบว่า multiplex selective PCR ของทั้งสองชุด มีความจำเพาะที่ดี คือไม่ให้ผลบวกปลอมเกิดขึ้นเลย แม้ปริมาณ wild type virus stock จะมากถึง 500,000 copies/mL และให้ความไวในการตรวจพบที่ 1,000 copies/mL

ตัวอย่าง การ vary ปริมาณ Wild Type Viral Stock กับ Multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215



Lane	Type of primers	ปริมาณ virus (copies/mL)
1	151WT+215WT	500,000
2	151WT+215WT	50,000
3	151WT+215WT	5,000
4	151WT+215WT	1,000
5	151WT+215WT	500
6	151MT+215MT	500,000
7	151MT+215MT	50,000
8	151MT+215MT	5,000
9	151MT+215MT	1,000
10	151MT+215MT	500

ตัวอย่าง การ vary ปริมาณ Wild Type Viral Stock กับ Multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 103 ร่วมกับ 181

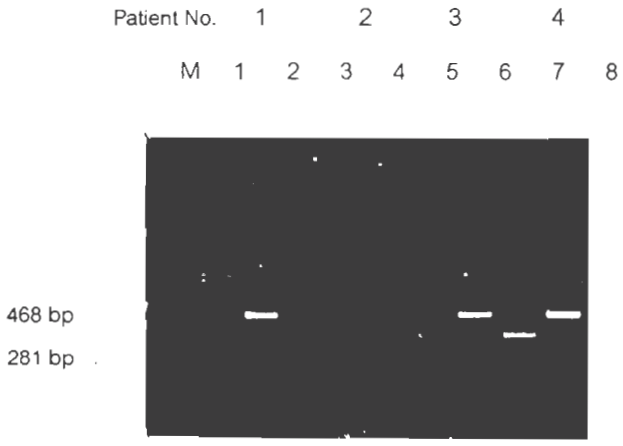


Lane	Type of primers	ปริมาณ virus (copies/mL)
1	103WT+181WT	500,000
2	103WT+181WT	50,000
3	103WT+181WT	5,000
4	103WT+181WT	1,000
5	103WT+181WT	500
6	103MT+181MT	500,000
7	103MT+181MT	50,000
8	103MT+181MT	5,000
9	103MT+181MT	1,000
10	103MT+181MT	500

การนำเทคนิค multiplex selective **ที่พัฒนาได้มาทดลองตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย**

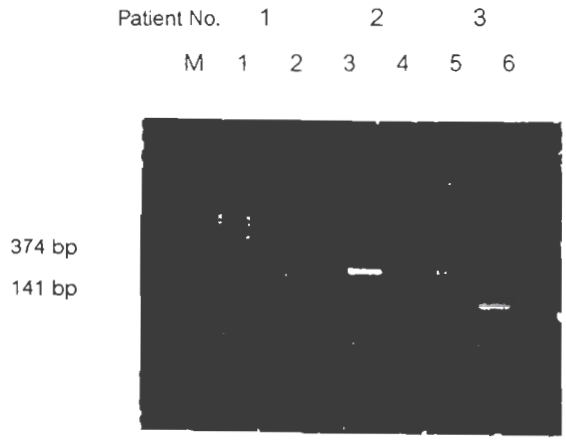
จากการที่ประสบความสำเร็จในการทำ multiplex selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215 และ ตำแหน่ง 103 ร่วมกับ 181 จึงได้นำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นได้นี้มาตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่ได้รับยามาแล้วมากกว่า 6 เดือน โดยผู้ป่วยต้องมีปริมาณเชื้อ virus ในกระแสเลือดมากกว่า 1,000 copies/mL ทั้งสิ้น 20 ราย โดยนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบความถูกต้องกับวิธี sequencing analysis ทุกราย

ตัวอย่าง ผลการทดลอง multiplex selective PCR ของตำแหน่ง **151 ร่วมกับ 215** กับผู้ป่วย 4 ราย (ที่ทำเทียบกับวิธี sequencing analysis)



Lane	Type of primer	Type of sample By sequencing	Expected Product size
1	151WT+215WT	1. Wild Type	281+468 bp
2	151MT+215MT		-
3	151WT+215WT	2. Q151M	468 bp
4	151MT+215MT		281 bp
5	151WT+215WT	3. T215Y	281 bp
6	151MT+215MT		468 bp
7	151WT+215WT	4. T215F	281 bp
8	151MT+215MT		468 bp

ตัวอย่าง ผลการทดลอง multiplex selective PCR ของตำแหน่ง **103 ร่วมกับ 181** กับผู้ป่วย 3 ราย (ที่ทำเทียบกับวิธี sequencing analysis)



Lane	Type of primer	Type of sample By sequencing	Expected Product size
1	103WT+181WT	1. Y181C	141 bp
2	103MT+181MT		374 bp
3	103WT+181WT	2. Wild Type	141+374 bp
4	103MT+181MT		-
5	103WT+181WT	3. K103N	374 bp
6	103MT+181MT		141 bp

ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่ได้รับยามามากกว่า 6 เดือน และมีปริมาณ virus ในกระแสเลือดมากกว่า 1,000 copies/mL จำนวน 10 ราย ด้วยวิธี Multiplex selective PCR โดยใช้ primer 151ARMS ร่วมกับ 215ARMS ที่ได้ออกแบบครั้งที่ 2 และ primer 151ARMS ร่วมกับ 215 ที่จำเพาะกับลำดับเบสคนไทย ที่ออกแบบครั้งที่ 3 เปรียบเทียบกับผลจากวิธี sequencing analysis ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 4 : ตารางแสดงผลการตรวจการกลายพันธุ์ของผู้ป่วย จำนวน 10 ราย ที่ได้จากวิธี multiplex selective PCR โดยใช้ primer 151ARMS ร่วมกับ 215ARMS (ครั้งที่ 2) เปรียบเทียบกับ primer 151ARMS ร่วมกับ 215 ที่จำเพาะกับลำดับเบสคนไทย (ครั้งที่ 3)

ตำแหน่งการกลายพันธุ์	ผลจาก multiplex PCR 151ARMS ร่วมกับ 215ARMS		ผลจาก multiplex PCR 151ARMS ร่วมกับ 215 ที่จำเพาะกับคนไทย		ผลจากวิธี sequencing analysis	
	WT	MT	WT	MT	WT	MT
151	9	1	9	1	9	1
215	3	2	3	7	3	7

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าผลการทดลองในผู้ป่วย 10 ราย

- การตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 151 ให้ผลถูกต้องกับคนไข้ทุกราย
- การตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 โดยวิธี multiplex PCR ของ primer 151ARMS ร่วมกับ 215ARMS ให้ผลถูกต้องเพียง 5 รายจาก 10 รายเท่านั้น โดยพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ (wild type) ได้อย่างถูกต้องทุกราย (3 ราย) และสามารถตรวจหาเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ถูกต้องเพียง 2 รายจาก 7 รายเท่านั้น ซึ่งพบว่า 2 รายนั้นมีการกลายพันธุ์แบบ T215F ส่วนอีก 5 ราย ที่ตรวจไม่ได้นั้น มีการกลายพันธุ์แบบ T215Y ซึ่งเมื่อเปลี่ยน primer ตำแหน่ง 215 ใหม่ ให้มีลำดับเบสจำเพาะกับคนไทย พบว่าสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ได้ถูกต้องทุกราย (7 ราย)

ผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย โดยวิธี Multiplex selective PCR ที่ได้รับยามามากกว่า 6 เดือน และมีปริมาณ virus ในกระแสเลือดมากกว่า 1,000 copies/mL จำนวน 20 ราย ด้วยวิธี Multiplex selective PCR 2 ชุด คือ ตำแหน่ง 151ARMS ร่วมกับ 215 ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับคนไทย และ ตำแหน่ง 103ARMS ร่วมกับ 181ARMS โดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับผลจาก sequencing analysis ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน

ตารางที่ 5 : ตารางแสดงผลการตรวจการกลายพันธุ์ของผู้ป่วย จำนวน 20 ราย ที่ได้จากวิธี multiplex selective PCR เปรียบเทียบกับวิธี sequencing analysis

ตำแหน่งการกลายพันธุ์	ผลจากวิธี Multiplex PCR		ผลจากวิธี sequencing	
	WT	MT	WT	MT
103	17	3	17	3
181	17	3	17	3
151	18	2	18	2
215	7	12	7	13

พบว่าการตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 181 ของผู้ป่วยรายหนึ่ง ให้ผล positive กับทั้ง primer WT และ MT เป็นลักษณะ mix population โดยผลที่ถูกต้องจากวิธี sequencing นั้นให้ผลเป็น WT และยังพบลักษณะนี้ได้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 151 ของผู้ป่วยรายหนึ่ง ให้ผล positive กับทั้ง primer WT และ MT เป็นลักษณะ mix population โดยผลที่ถูกต้องจากวิธี sequencing นั้นให้ผลเป็น MT

ส่วนการตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 พบว่าไม่สามารถ detect mutation ในผู้ป่วย 1 ราย

วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการพัฒนาวิธีการตรวจหาทาง genotypic resistance โดยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการตรวจหา genotypic resistance ที่ทำได้ง่าย ราคาถูก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นงาน routine ได้กับห้องปฏิบัติการทั่วไปที่มีเครื่อง PCR

การพัฒนาเทคนิค multiplex selective PCR นี้ พบปัญหาค่อนข้างมาก โดยเฉพาะการเกิดผลบวกปลอม ซึ่งเกิดจากปัญหา primer leakage (เมื่อใช้ WT primer กับ MT template หรือ MT primer กับ WT template) อย่างไรก็ตามปัญหานี้สามารถแก้ไข โดยการทำ template serial dilution ไปเรื่อย ๆ [7] แต่วิธีนี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยาก อีกทั้งยังสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย การออกแบบ primer โดยนำหลักการ Amplification Refractory Mutation System (ARMS) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหา genetic mutation ที่มีมานานแล้ว มาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาเชื้อดื้อยา จึงน่าจะเป็นวิธีที่เข้ามาช่วยแก้ไขปัญหา primer leakage ได้ดีกว่า โดยหลักการนี้อาศัยการเติม mismatch เพิ่มเข้าไปใน primer เพื่อช่วยลดปัญหา primer leakage ที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการเติม mismatch เข้าไปที่ตำแหน่ง base รองสุดท้ายจากปลาย 3' ของ primer ที่นิยมทำกัน สามารถเพิ่ม specificity ต่อ primer ได้เพียง 3 ตำแหน่ง (ตำแหน่ง 151, 181 และ 215) จาก 5 ตำแหน่งเท่านั้น อย่างไรก็ตามเมื่อนำตำแหน่ง 215 ARMS ที่ได้มาทดลองกับ known sample (sequencing analysis) พบว่าไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่งนี้แบบ T215 Y ได้

การแก้ไข primer ที่ยังประสบปัญหาอยู่

1. ตำแหน่ง 103 : โดยการเปลี่ยนตำแหน่งการเติม mismatch ตามรายงานที่แนะนำไว้ของ Okayama H และ Frater AJ พบว่า primer ที่ได้ออกแบบใหม่ตามรายงานของ Frater AJ ให้ความจำเพาะที่ดี และความไวที่ 1,000 copies กับทั้ง wild type plasmid และ wild type virus stock

2. ตำแหน่ง 184 : โดยการเปลี่ยนตำแหน่งการเติม mismatch ตามรายงานที่แนะนำไว้ของ Newton CR พบว่าเมื่อความจำเพาะดีขึ้น ทำให้ความไวลดลงอย่างมากด้วย จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่นอนว่า การเติม mismatch เข้าไปใน primer ที่ตำแหน่งใดเป็นตำแหน่งที่ดีที่สุด การศึกษาในครั้งนี้ได้ตัดตำแหน่งนี้ออกไปจากการทดลอง อย่างไรก็ตามจะได้ทำการพัฒนาให้ดีขึ้นต่อไป (ตำแหน่ง 215 นั้น จะกล่าวถึงต่อไป)

3. ตำแหน่ง 215 : ได้ออกแบบ primer ใหม่ ตามรายงานของ Boucher CA และคณะ [18] ที่ได้พัฒนาเทคนิค selective PCR สำหรับตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ที่พบว่าสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ ทั้งแบบ T215Y และ T215F อย่างไรก็ตาม เมื่อนำ primer ชุดของ Boucher CA และคณะ มาทดลองหากลายพันธุ์ในผู้ป่วยคนไทย ก็ยังพบปัญหาเดิม คือ ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์แบบ T215Y ได้ ซึ่งเมื่อตรวจดูการเปลี่ยนลำดับเบสของคนไทยแล้ว (Reference : CM240) จะพบว่าการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 215 ซึ่งมี 2 แบบนั้นเป็นดังนี้ คือ T215Y : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACT เป็น TTT และ T215F : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACT เป็น TAT ซึ่งแตกต่างจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ Boucher รายงานไว้ คือ T215Y : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACC เป็น TTC และ T215F : มีลำดับเบสเปลี่ยนจาก ACC เป็น TAC ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าอาจเนื่องจากสาเหตุนี้ จึงทำให้ไม่สามารถตรวจหาเชื้อดื้อยาได้ ต่อมาจึงได้ทดลองออกแบบ primer ตำแหน่ง 215 เพิ่มอีกหนึ่งคู่ โดยออกแบบให้ primer มีลำดับเบสจำเพาะต่อคนไทย ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ ทั้งแบบ T215Y และ T215F

อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ก็ยังไม่มีรายงานที่แน่ชัดว่า ควรเลือกเติม mismatch ณ ตำแหน่งใด จึงเป็นตำแหน่งที่ดีที่สุด เนื่องจาก specificity ของ primer นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งการเติม mismatch เพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดขึ้นจากตัวแปรอื่นด้วย เช่น the nature of the mismatch, the kinetics of association and dissociation of primer-template DNA duplex at the annealing and extension temperatures และ the effect of a mismatch on the stability of the duplex DNA formed

และจากผลการทดลองเทคนิคที่พัฒนาได้ ในผู้ป่วยจำนวน 20 ราย พบว่าสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ตำแหน่ง 103, 181, และ 151 ได้ดี ส่วนตำแหน่ง 215 ให้ผลผิดพลาดในการตรวจ 1 ราย โดยไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้ และจากเทคนิคนี้ยังแสดงผล mixed population ในผู้ป่วยบางรายด้วย อย่างไรก็ตามต้องมีการพัฒนาเทคนิคต่อไป เพื่อยืนยันว่าผลที่ได้นั้นเกิดจาก mixed population จริง ๆ

สรุปผลการศึกษาวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ สามารถพัฒนา multiplex selective PCR ได้สองชุด คือ Multiplex Selective PCR ของตำแหน่ง 151 ร่วมกับ 215 และ Multiplex Selective PCR ของตำแหน่ง 103 ร่วมกับ 181 อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความไว (sensitivity) อย่างมาก คือมีความไวที่ 1,000 copies เท่านั้น ซึ่งจะต้องพัฒนาความไวให้มากขึ้นต่อไป และจากการเปรียบเทียบผลการตรวจหาการกลายพันธุ์ในผู้ป่วย 20 ราย ด้วยวิธี multiplex selective PCR กับผลจากวิธี sequencing analysis ซึ่งเป็นวิธีการมาตรฐาน พบว่ามี 1 รายที่ไม่สามารถ detect mutation ของการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 215 ได้ อย่างไรก็ตามจะต้องทดสอบกับจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อตรวจดู specificity ที่ได้ต่อไป

งานวิจัยที่ต้องทำต่อไป

1. เพิ่ม sensitivity ของวิธีการ multiplex selective PCR ให้มากขึ้น เพื่อให้สามารถ detect virus ได้ต่ำกว่า 1,000 copies/mL
2. พัฒนาเพื่อให้สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ได้หลายตำแหน่งเพิ่มขึ้น
3. นำไปทดสอบกับจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น เพื่อตรวจดู specificity
4. ศึกษาเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของ HIV-1 RT gene ของผู้ติดเชื้อ HIV-1 ที่ยังไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ กับผู้ติดเชื้อ HIV-1 ที่ได้รับยาต้านไวรัสเอดส์แล้วแต่อาการไม่ดีขึ้น (viral load > 1000 copies/mL)
5. ศึกษาระบาดวิทยา และความชุก ในผู้ติดเชื้อก่อน และหลังได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ โดยเฉพาะยาในกลุ่ม TAM (AZT ร่วมกับ d4T) และยาในกลุ่ม NNRTIs ต่อไป
6. พัฒนาเป็นวิธีการตรวจ เพื่อศึกษาระบาดวิทยาของประเทศ ซึ่งเป็นวิธีการที่ประหยัดกว่าวิธี sequencing analysis อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของวิธีนี้คือสามารถตรวจการกลายพันธุ์ได้เพียงบางตำแหน่งเท่านั้น
7. ศึกษาเพิ่มเติม เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิก ในห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่อง sequence ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Mitsuya H, Yarchoan R. Develpoment of antiretroviral therapy for AIDS and related disorders. In: Broder S, Merigan T, Bolognesi D, eds. **Texbook of AIDS** medicine. Willams & Willkins, 1994 : 721-742.
2. Mellors JW, CR Rinaldo Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. **Science** 1996 ; 272 : 1167-70.
3. Ivensen AKN, Shafer RW, Wehrly K, et al. Multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains resulting from combination antiretroviral therapy. **J Virol** 1996 ; 70 : 1086-90.
4. Larder BA. Viral resistance and the selection of antiretroviral combinations. J **Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 1995 ; 10(Suppl.1) : S28-33.
5. Moyle GJ. Use of viral resistance patterns to antiretroviral drugs in optimising selection of drug combinations and sequences. **Drugs** 1996 ; 52 : 168-85.
6. Erice A, Mayers DL, Strike DG, Sannerud KJ, McCutchan FE, Henry K, et al. Brief report : primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. N Engl J Med 1993 ; 328 : 1163-5.
7. Larder BA, Kellam P, Kemp SD. Zidovudine resistance predicted by direct detection in DNA from HIV-infected lymphocytes. **AIDS** 1991 ; 5 : 137-44.
8. Larder BA. 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance suppressed by a mutation conferring human immunodeficiency virus type 1 resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. **Antimicrob Agents Chemother** 1992 ; 36 : 2664-9.
9. Schmit J-C, Van Laethem K, Ruiz L, et al. Multiple dideoxynucleoside analogue-resistant (MddNR) HIV-1 strains isolated from patients from different European countries. **AIDS** 1998 ; 12 : 2005-15.
10. Perrin L, Telenti A. HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practice. **Science** 1998 ; 280 : 1871-3.
11. Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection. **JAMA** 1998 ; 279 : 1984-91.

12. Mellors J. Testing time as resistance HIV-1 faces next wave of attack. Lancet 1999 ; 354 : 135.

13. Rodriguez-Rosado R, Briones C, Soriano V. Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. AIDS 1999 ; 13 : 1007-14.

14. Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, et al. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type1 reverse transcriptase gene. Antimicrob Agents Chemother 1997 ; 41 : 284-91.

15. Eastman PS, Urdea M, Besemer D, Stempien M, Kolberg J. Comparison of selective polymerase chain reaction primers and differential probe hybridization of polymerase chain reaction products for determination of relative amounts of codon 215 mutant and wild-type HIV-1 populations. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1995 ; 9 : 264-73.

16. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA : The amplification refractory mutations system (ARMS). Nucl Acid Res 1989 ; 17 : 2503-16.

17. Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG. Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. J Clin Med 1989 ; 144 : 105–13

18. Frater AJ, Chaput CC, Beddows S, Weber JN, McClure M. Simple detection of point mutations associated with HIV-1 drug resistance. J Virol Methods 2001 ; 93 : 145-56.

19. Boucher CA, Tersmette M, Lange JM, Kellam P, de Goede RE, Mulder JW, et al. Zidovudine sensitivity of human immnunodeficiency viruses from high-risk, symptom-free individuals during therapy. Lancet 1990 ; 336 : 585-90.