ความชุกของเชื้อเอชไอวี-1 ที่ดื้อยา AZIDOTHYMIDINE (AZT) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่รับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยวิธี SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 215 ของ HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE

นางสาวศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-723-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17366653

PREVALENCE OF HIV-1 AZIDOTHYMIDINE (AZT) RESISTANCE IN HIV-1 INFECTED INDIVIDUALS AT CHULALONGKORN HOSPITAL BY CODON 215 MUTATION OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE (RT) USING SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Miss Sirilak Wangpitakwong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-634-723-3

Thesis Title	Prevalence of HIV-1 Azidothymidine (AZT) Resistance in HIV-1 Infected Individuals at Chulalongkorn Hospital By Codon 215 Mutation of HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) Using Selective Polymerase Chain Reaction (PCR)
By	Miss Sirilak Wangpitakwong
Inter-department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Instructor Kiat Ruxrungtham, M.D.
Thesis Co-advisor	Instructor Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.

Accepted by the Graduate school, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan
..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Pornthep Tiensiwakul
..... Chairman

(Associate Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.)

Kiat Ruxrungtham
..... Thesis Advisor

(Instructor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

Thaweesak Tirawatnapong
..... Thesis Co-advisor

(Instructor Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

S. Chokekijchai
..... Member

(MAJ Sudhichai Chokekijchai, M.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นางสาวศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์ : ความชุกของเชื้อเอชไอวี-1 ที่ดื้อยา AZIDOTHYMIDINE (AZT) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ที่รับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ใช้วิธี SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ ณ ตำแหน่ง 215 ของ HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE (RT) อ.ที่ปรึกษา : นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ทวีศักดิ์ ตีระ-วัฒนพงษ์, 72 หน้า. ISBN 974-634-723-3

ในประเทศไทย การติดเชื้อ HIV-1 ส่วนใหญ่ติดต่อทางเพศสัมพันธ์แบบรักต่างเพศ และส่วนใหญ่เป็นเชื้อ HIV-1สายพันธุ์ E ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 ที่มีการรับรองการใช้ยา azidothymidine (AZT) ในการักษาเอดส์ มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการดื้อยา AZT ของเชื้อ HIV-1 เช่น สหรัฐอเมริกา และยุโรป ซึ่งเป็นภูมิภาคที่มีการระบาดของเชื้อสายพันธุ์ B เป็นสำคัญ ปัญหาการดื้อยา AZT ในส่วนอื่นของโลก รวมทั้งประเทศไทยที่มีการระบาดของเชื้อสายพันธุ์อื่น ยังมีข้อมูลน้อยมาก การที่เชื้อ HIV-1 ดื้อต่อ AZT พบว่าเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกลายพันธุ์ที่ลำดับเบสของ HIV-1 reverse transcriptase(RT)gene ที่พบบ่อยที่สุดและมีความสัมพันธ์ชัดเจนกับการลดความไวต่อยา AZT คือตำแหน่ง 215

จากการศึกษาการตรวจหา genotypic AZT resistance ณ ตำแหน่ง 215 ของ RT gene พบว่า วิธี selective PCR ของ H. Mitsuya และคณะ ไม่สามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ของเชื้อ HIV สายพันธุ์ E ได้ แต่ไม่มีปัญหาในการตรวจเชื้อ HIV-1 สายพันธุ์ B แต่อย่างใด และพบว่า primer L1M ของ primerคู่นอก ไม่สามารถจับคู่กันได้พอดีกับลำดับเบสของไวรัสสายพันธุ์ E ได้ เทคนิค seminested RT-PCR ที่ประยุกต์ขึ้นจากการใช้ ANMER B/AS 62 เป็นprimer คู่นอก และ ANMER B/WT 215 หรือ ANMER B/MT 215 เป็น primer คู่ใน สามารถใช้การตรวจหา genotype ที่ตำแหน่ง 215 ของเชื้อ HIV-1 ได้ทั้งสายพันธุ์ E และ B

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาคือ ผู้ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 150 คน ที่มารับการรักษาที่คลินิค HIV โรง-พยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2538 ถึงสิงหาคม 2539 โดยได้แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (กลุ่มละ 50คน) ตามประวัติการรับการรักษาด้วยยา AZT ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยา AZT มาก่อน, กลุ่มที่ 2 คือผู้ป่วยที่เคยได้รับยา AZT มาน้อยกว่า 6 เดือน, กลุ่มที่ 3 คือผู้ป่วยที่เคยได้รับยา AZT มานานกว่า 6 เดือน ผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นชาย (75%) มีอายุ 18-67 ปี (เฉลี่ย= 34.12 ปี) ส่วนใหญ่ติดต่อทางเพศสัมพันธุ์แบบรักต่างเพศ (94%) และเป็นระยะติดเชื้อที่แสดงอาการ (เป็นผู้ที่มีอาการสัมพันธ์กับเอดส์ 69 ราย และเป็นเอดส์ 56 ราย) ผลการศึกษาพบว่าตรวจไม่พบการกลายพันธุ์ของเชื้อ HIV-1 ณ ตำแหน่ง 215 ในผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 ในขณะที่ตรวจพบ 22% ในกลุ่มที่ 2 และ 42% ในกลุ่มที่ 3 อย่างมีนัย-สำคัญทางสถิติ ($p< 0.01$, Chi-square test) ในการศึกษาแบบ Prospective พบว่า ผู้ป่วย 7 ใน10 ราย มีการกลายพันธุ์ ของเชื้อ HIV-1 ณ ตำแหน่ง 215 ของ RT ภายใน 12 เดือน หลังได้รับการรักษาด้วยยา AZT

ดังนั้น การศึกษา genotypic AZT resistance ของเชื้อ HIV-1 โดยวิธี PCR ในสายพันธุ์ E จำเป็นต้องมีการดัดแปลง และจากการศึกษานี้ยังไม่พบการระบาดของเชื้อดื้อยา AZT ในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยามาก่อน แต่การให้ยา AZT แบบเดี่ยวๆในผู้ป่วยที่มีจำนวน CD4 เซลล์ต่ำๆ เช่น ต่ำกว่า 100 อาจก่อให้เกิดเชื้อกลายพันธุ์ที่ดื้อยา AZT ภายใน 6 เดือน ถึง ร้อยละ 22 ผลการศึกษานี้จึงสนับสนุนข้อเสนอแนะที่ให้รักษาผู้ติดเชื้อ HIV แต่เบื้องต้น นั่นคือ CD4 เซลล์ต่ำกว่า 350/μL และใช้ยาต้านเอดส์มากกว่า 2 ชนิดเป็นอย่างน้อย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ศิริลักษณ์ หวังพิทักษ์วงศ์

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อและบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นบทคัดย่อ

C 745547 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: : HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE / AZT-RESISTANCE / SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

SIRILAK WANGPITAKWONG : PREVALENCE OF HIV-1 AZIDOTHYMIDINE (AZT) RESISTANCE IN HIV-1 INFECTED INDIVIDUALS AT CHULALONGKORN HOSPITAL BY CODON 215 MUTATION OF HIV REVERSE TRANSCRIPTASE (RT) USING SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). THESIS ADVISOR: INSTRUCTOR KIAT RUXRUNGTHAM, M.D., THESIS CO-ADVISOR : INSTRUCTOR THAWEESAK TIRAWATNAPONG, 72 pp. ISBN 974-634-723-3

In Thailand, most of the individuals infected with Human Immunodefciency Virus type 1(HIV-1) are heterosexuals and the majority carries HIV-1 subtype E. Much has been reported of azidothymidine (AZT) resistance of HIV-1 in North America and Europe where HIV-1 subtype B predominates. However little is known about the HIV-1 AZT resistance in other part of world, particulary in regards to other subtypes. The HIV reverse transcriptase (RT) gene of AZT-resistant viral isolates demonstrated a characteristic pattern of nucleotide changes. The most common mutation that associated with a significant reduction of sensitivity to AZT is at the codon 215.

In the previously described (Mitsuya H., et al.) selective PCR for de- tection of codon 215 AZT resistant mutant failed to detect HIV-1 subtype E while detected subtype B. The des-cribed sense primer (L1M) of the outer pair was found mismatching with the target sequence of subtype E virus. A seminested RT-PCR was then developed by which ANMER/AS 62 were used as outer primers and ANMER B/WT 215 or ANMER B/MT 215 were used as a second primer pair for the detection of either codon 215 wild type or mutant, respectively. This modified PCR assay was showed to detect the codon 215 genotypes of both HIV-1 subtype E and B.

One hundred and fifty HIV-1 infected patients who attended the HIV Clinic at Chula longkorn hospital, from December 1995 to August 1996 were enrolled into 3 groups (50 of each) according to the history of AZT-monotherapy as follows : AZT naive (group I), AZT experienced for less than 6 months (group II) and AZT experienced for more than 6 months (group III). Most of the subjects were male (75%) with the range of 18-67 years old (mean= 34.12). The majority were heterosexuals (94%) and were symptomatic HIV patients (69 of ARC, and 56 of AIDS).

There was no AZT resistant at 215 mutant in the AZT naive group, whereas, 22% of group II and 42% of group III showed the 215 mutant genotype ($p<0.01$, Chi-square test). Moreover, in 10 of the naive group who were followed-up in the prospective study, 7 subjects showed a switching from wild type to mutant virus within 12 months of AZT therapy.

In conclusion, to studyAZT-resistant at the codon 215 mutation in HIV-1 subtype E, the selective PCR needs a modification. There was no evidence of AZT-resistant HIV-1 transmission in the AZT-naive. The patients with CD4 cell count below 100, has a 22% risk of development of AZT-resistant mutant within 6 months after treated with AZT monotherapy. This finding supports the strategy of early treatment with combination therapy in the patients with a higher CD4 count which is below 350 cells/μL.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ศิริลักษณ์ วังพิทักษ์วงศ์

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep gratitude to the followings, who have helped in making this thesis possible.

Dr. Kiat Ruxrungtham, the lecturer of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his excellent advice, indispensable help, constructive criticisms and encouragement thoughout the period of this study.

Dr. Thaweesak Tirawatnapong, the lecturer of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for his supporting primers synthesis and invaluable guidance in PCR technology.

Professor Praphan Phanuphak, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his invaluable advice and assistance.

Dr. Hiroaki Mitsuya, NIH, USA., MAJ Dr. Sudhichai Chokekijchai, Department of Medicine, Pramongkutklao Hospital, for providing the primer sequences and the PCR protocol.

All staffs at the HIV-AIDS clinic of Chulalongkorn Hospital, for their kind help in collecting the blood specimens and follow up the patients.

Sincere thanks go to the staffs of the Department of Microbiology.

Finally, I am deeply indepted to my parents and sister for their love and warmly supports.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT....iv

ENGLISH ABSTRACT....v

ACKNOWLEDGEMENTS....vi

LIST OF TABLES....ix

LIST OF FIGURES....x

ABBREVIATIONS....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION....1

II LITERATURE REVIEW

HISTORY....4

ETIOLOGY....4

HIV-1 BIOLOGY....5

HIV LIFE CYCLE....6

Transmission....6

Target cells....7

Attachment and Entry....7

Replication....8

Latency, Activation and Trigger factors....9

Genetic control of HIV....10

VARIATION....12

IMMUNOPATHOGENESIS OF HIV....12

Immunological abnormalities....13

CD4+ Cell Death....14

CLINICAL MENIFESTATIONS....15

LABORATORY DIGNOSIS....17

ANTIRETROVIRAL THERAPY....20

Nucleoside analog Reverse Transcriptase Inhibitor....21

AZT RESISTANCE....22
HIV Protease Inhibitor....24
Combination Therapy....25
III MATERIALS AND METHODS
PART I. Develpoment of selective PCR for genotypic analysis of codon 215....26
1. The previously described selective PCR....26
1.1 Plasmid control....26
1.2 Primer selection....26
1.3 Analysis of codon 215 of *RT* gene by the previously described selective PCR protocol....28
2. Validation of RT-PCR assay in clinical samples....29
2.1 Study group....29
2.2 Sample preparation : RNA extraction....29
2.3 cDNA synthesis....30
2.4 PCR Amplification....30
2.5 Analysis of Amplification products....30
PART II. Modified seminested RT-PCR to detect both HIV-1 subtype E and B....31
PART III. Study the prevalence of AZT-resistant mutation at codon 215....32
A. Cross-sectional study....32
B. Prospective Study....33
IV RESULTS....34
V DISCUSSION....46
VI CONCLUSIONS....49
REFERENCES....51
APPENDIX I....64
APPENDIX II....65
APPENDIX III....69
BIOGRAPHY....72

LIST OF TABLES

Table		Page
I	HIV-1 Genes and Gene Products	11
II	1993 revised classification system for HIV infection and expanded AIDS surveillance case definition for adolescents	15
III	Effect of Mutation on Drug Susceptibility to AZT-monotherapy	24
IV	Characteristics of the studygroups	39
V	The prevalence of AZT-resistant codon 215 genotype and the correlation with CD4 cell counts	40
VI	Clinical And Laboratory Details	44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Schematic representation of selective PCR procedured used to detect mutation in the reverse transcriptase gene at codon 215 conferring AZT resistance....27
2. Analysis of plasmid DNA (wild type and mutant 215) with the previously described selective 215 RT-PCR....35
3. The modified selective 215 RT-PCR assay for the detection of HIV-1 subtype E....36
4. Analysis of RT codon 215 in HIV-1 infected patients with modified selective PCR....37
5. AZT-215 mutation and means of CD4 cell count between the group of less than and more than6 months of AZT treatment....41
6. Comparison of the prevalences of codon 215 mutant between the patients with baseline CD4 less than and more than 100/μL....42
6. The prospective results of patients no.6 and 10....45

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

ADCC	=	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
AIDS	=	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
ARC	=	AIDS-related Complex
ARV	=	AIDS-associated retrovirus
Asymp	=	Asymptomatic
B-cells	=	Bursa-derived lymphocytes
bp	=	base pair
^{o}C	=	Degree Celcius
CD	=	Cluster of Differentiation
CDC	=	Centers for Diseases Control
DDW	=	Deionized distilled water
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxynitrogentriphosphates
DW	=	Distilled water
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
env	=	envelpoe
et al.	=	et alii
g	=	gram
gp	=	glycoprotein
HCl	=	hydrochloride acid
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
HTLV	=	Human T Lymphotropic Virus
i.e.	=	id est
Ig	=	Immunoglobulin
IVDU	=	Intravenous drug user
LAV	=	Lymphadenophathy Associated Virus
LTRs	=	Long terminal repeats

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

M	=	Molar
mg/L	=	milligram per liter
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
min(s)	=	minute(s)
mL	=	milliliter
mm^3	=	cubic millimeter
nm	=	nanometer
NNRT	=	Non nucleoside analogue reverse transcriptase
NSI	=	Non Syncytium Inducing
PBMCs	=	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PGL	=	Persistent Generalized Lymphadenopathy
pol	=	polymerase
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	round per minute
RT	=	Reverse Transcriptase
T-cells	=	Thymus-derived lymphocytes
Tris	=	Tris-(hydroxymethy)-aminoethane
U	=	Unit
µg	=	microgram
µL	=	microliter
UV	=	Ultraviolet
WHO	=	World Health Organization

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย