การดื้อต่อยาในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ และยาในกลุ่มที่ไม่ใช่นิวคลีโอไซด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวิร์สทรานคริปเทส ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี-1 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบดูเพล็ก

นางสาวชุติธร เกตุลอย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1735-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20433888

GENOTYPIC RESISTANCE TO NUCLEOSIDE AND NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS IN HIV-1 INFECTED PATIENTS BY DUPLEX SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION

Miss Chutitorn Ketloy

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science
Program of Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-1735-9

Thesis Title	Genotypic Resistance to Nucleoside and Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in HIV-1 Infected Patients by Duplex Selective Polymerase Chain Reaction
By	Miss Chutitorn Ketloy
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

..... Dean of Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Vilai Chintanez, M.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

..... Member
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Issarang Nuchprayoon, M.D., Ph.D.)

ชุติธร เกตุลอย : การดื้อต่อยาในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ และยาในกลุ่มที่ไม่ใช่นิวคลีโอไซด์ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์รีเวิร์สทรานคริปเทส ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี-1 โดยปฏิกิริยาลูกโซ่แบบ**ดูเพล็ก.** (Genotypic Resistance to Nucleoside and Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors in HIV-1 Infected Patients by Duplex Selective Polymerase Chain Reaction) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม; 68 หน้า. ISBN 974-03-1735-9.

การดื้อยาเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้การรักษาด้วยยาต้านไวรัสไม่ได้ผล โดยเฉพาะการพัฒนาการดื้อยาข้ามชนิดในระดับสูงในยากลุ่มเดียวกัน ส่งผลให้การรักษาเป็นไปได้ด้วยความยุ่งยาก ในประเทศไทยผู้ติดเชื้อส่วนมากมักติดเชื้อ HIV -1 subtype A/E มีรายงานการดื้อยามากมายในอเมริกาเหนือและยุโรป ซึ่งมักติดเชื้อ HIV -1 subtype B อย่างไรก็ตามรายงานการดื้อยาในส่วนอื่นๆของโลก ซึ่งติดเชื้อคนละ subtype ยังมีอยู่น้อย

ปัจจุบันได้มีการแนะนำให้ติดตามการรักษาด้วยการทดสอบการดื้อยา การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing analysis) เป็นวิธีการมาตรฐานในการทดสอบการดื้อยาในระดับยีน แต่มีค่าใช้จ่ายสูง และยังพัฒนาใช้อย่างกว้างขวางได้ยาก ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการทดสอบการดื้อยาที่ทำได้ง่ายและราคาถูก วิธี Amplification refractory mutation system (ARMS) จึงได้ถูกนำมาประยุกต์ในการพัฒนาวิธี K103N/Y181C และ Q151M/T215Y/F duplex selective PCR ในครั้งนี้ และนำมาใช้ในการเปรียบเทียบการดื้อยาระหว่างกลุ่มผู้ป่วยคนไทยที่ยังไม่เคยได้รับยา (กลุ่มที่ 1 จำนวน 20 ราย) กับผู้ป่วยที่ได้รับยามาแล้วมากกว่า 6 เดือน (กลุ่มที่ 2 จำนวน 25 ราย)

การพัฒนาวิธีการ duplex selective PCR ให้สำเร็จนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญ คือการออกแบบ primer ที่เหมาะสม ซึ่งได้แก่ความแรง และตำแหน่งของ mismatches ใน primer อย่างไรก็ตามลำดับเบสและตำแหน่งการกลายพันธุ์ในแต่ละ subtype ก็เป็นสิ่งสำคัญในการออกแบบด้วย

การประเมินการเกิดเชื้อดื้อยาในคนไทยโดยวิธี duplex selective PCR ให้ผลสอดคล้องกับวิธี sequencing analysis สูงถึง 94% พบว่ามีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับยา กับผู้ป่วยที่ได้รับยามาแล้วมากกว่า 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$, Chi-square test) โดยไม่พบการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเลยในผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับยา ขณะที่ 23 ใน 25 (92%) รายของผู้ป่วยที่ได้รับยานั้นพบว่ามีเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น การกลายพันธุ์ของตำแหน่ง T215Y/F เป็นตำแหน่งการดื้อยาที่พบบ่อยที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ (80%) การกลายพันธุ์ที่พบรองลงมา คือ การกลายพันธุ์ที่ส่งผลให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่มที่ไม่ใช่นิวคลีโอไซด์ (K103N, Y181C) (ซึ่งคิดเป็น 24% ของทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบสูงถึง 67% (6/9) ของผู้ป่วยที่รักษาด้วยในกลุ่มที่ไม่ใช่นิวคลีโอไซด์ไม่ได้ผล) การดื้อต่อยาในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ทั้งกลุ่ม Q151M พบเพียง 4% เท่านั้น ผลการทดลองครั้งนี้สนับสนุนข้อสันนิษฐานที่ว่าเชื้อดื้อยานั้น เกิดจากการคัดเลือกโดยยาที่ได้รับ การทดสอบหาการดื้อยา จึงเป็นประโยชน์ในการพิจารณาเปลี่ยนยาในผู้ป่วยที่รักษาไม่ได้ผล

ด้วยความไว (96%) และความจำเพาะที่สูง (98%) ประกอบกับราคาที่ถูก duplex selective PCR จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับการศึกษาระบาดวิทยาการดื้อยาในประเทศที่ยากจน สำหรับการนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกในการทดสอบการดื้อยาในกลุ่มนิวคลีโอไซด์ และการดื้อต่อยาในกลุ่มที่ไม่ใช่นิวคลีโอไซด์นั้น ยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มตัวอย่างที่เพิ่มขึ้นต่อไป

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....ชุติธร เกตุลอย.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544

4275212430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEY WORD : HIV-1 / RESISTANCE / DUPLEX SELECTIVE PCR / MNR / NAMs / NNRTIs / K103N / Y181C / Q151M / T215Y/F

CHUTITORN KETLOY: GENOTYPIC RESISTANCE TO NUCLEOSIDE ANALOG AND NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS IN HIV-1 INFECTED PATIENTS BY DUPLEX SELECTIVE POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, 68 pp. ISBN 974-03-1735-9.

Drug resistance is a major contributing factor to the failure of antiretroviral therapy. The development of drug resistance further complicates clinical management because of the high level of cross-resistance within the drug classes. In Thailand, most individuals are infected with HIV-1 subtype A/E. Much have been reported for genotypic resistance of HIV-1 in North America and Europe where HIV-1 subtype B predominates. However, little is known about the HIV-1 genotypic resistance in other part of the world, particularly in regards to other subtypes.

Resistance testing has recently been recommended as a helpful monitoring assay for management of HIV-1 infection. Sequencing analysis is a standard genotypic resistance assay. However, it is expensive and is not widely accessible. Simpler and cheaper assays are needed. The amplification refractory mutation system (ARMS) have been applied for development of the K103N/Y181C and Q151M/T215Y/F duplex selective PCR. These assays were used for comparison of genotypic resistance between antiretroviral-naïve (group I; n=20) and antiretroviral-experienced (> 6 months) (group II; n=25) HIV-1 infected Thais.

To develop a successful duplex selective PCR, several factors need to be considered. The most important factor is the good primer design including the strength and position of nucleotide mismatches in the primer. Moreover, subtype specific sequences and mutations should also be considered in primer design.

By using duplex selective PCR assay for genotypic resistance evaluation in HIV-1 infected Thais, more than 94% showed concordant results with the sequencing analysis. There was a significant difference of genotypic resistance between ART-naïve patients (group I) and ART-experienced (> 6 months) HIV-1 infected patients (group II) ($p< 0.01$, Chi-square test). No mutations were observed in the ART-naïve, while 23 of the 25 (92%) ART-experienced patients harbored drug-resistant mutant viruses. T215Y/F mutation is the most common genotypic resistance found in this study (80%). The second most common mutation found was NNRTI associated mutations (K103N, Y181C) (overall=24%, however in NNRTI failure was 67% (6/9)). The MDR Q151M was found only 4%. These findings suggest that HIV resistance occurs under selective pressure of antiretroviral drugs and also emphasize that resistance testing is helpful to guide switching regimens in patients who fail therapy.

With the high sensitivity (96%) and specificity (98%), as well as lower cost, these duplex selective PCR assays are thus valid for further cost-effective HIV drug resistance surveillance study in resource limited countries. For clinical uses in detection of multi-nucleoside and NNRTIs resistances however needs further investigation in a larger scale study.

Program - Student's signature.....Chutitorn Ketloy.....

Field of study Medical Science Advisor's signature.....

Academic year 2001

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitude and deep appreciation for his guidance, invaluable advice, supervision and encouragement to my advisor, Assistant Professor Kiat Ruxrungtham and also to my supervisor, Ms. Sunee Sirivichayakul for her supervision and everything although she work hard and especially her inexhaustible patience. They were always kind and helpful.

I would like to give special thanks to Associate Professor Vilai Chintanez, Associate Professor Apiwat Mutirangura and Assistant Professor Issarang Nuchprayoon for their criticism and valuable suggestions and also for their serving committee.

I would like to thank to Mr. Somboon Nookhai at the Anonymous Clinic, Thai Red Cross Research Centre, for his assistance in collection of samples for this study, and to the staff of the Graduate Department of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

This thesis was partially supported by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).

Finally, I will not forget to give the special thank for my willpower of my life especially during of doing this thesis from my parents who stood by me all the time, thanks you very much.

Chutitorn Ketloy

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv
ABSTRACT (ENGLISH) v
ACKNOWNLEDGEMENT vi
TABLE OF CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES x
LIST OF ABBREVIATIONS xi
CHAPTER

I INTRODUCTION
- Background and Rationale 1
- Research Questions 4
- Limitation 4
- Objectives of this research 4
- Conceptual Framework 5
- Key words 5
- Operational and Definition 6
- Expected Benefit and Application 6
- Research Methodology 6
- Administration and Time Schedule 8

II LITERATURE REVIEW
- Antiretroviral Therapy 9
- Antiretrovirals Available in Thailand 14
- Gold of Antiretroviral Therapy 15
- Mechanisms of Resistance 16
  Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance 17
  Non-Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance 20
- Antiretroviral Drug Resistance Testing 22
  Phenotypic assays 22
  Genotypic assays 24

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

Page

- Advantages and disadvantages of resistance testing 25
- Clinical uses of drug resistance testing 27

III MATERIALS AND METHODS
- Part I : Development of duplex selective PCR for genotypic analysis 28
- Part II : Genotypic resistance study in HIV-1 infected patients 32

IV RESULTS
- Part I : Development of duplex selective PCR for genotypic analysis 35
- Part II : Genotypic resistance study in HIV-1 infected patients 42

V DISCUSSION AND CONCLUSION 49
REFERENCES 53
APPENDICES 64
BIOGRAPHY 68

LIST OF TABLES

Page

I Mutations in *RT* gene associated with reduced susceptibility to NRTIs 17
II Most common mutations in HIV selected by NNRTIs 21
III Comparison of Genotypic and Phenotypic HIV Resistance Assays 26
IV Condition of K103N/Y181C and Q151M/T215Y/F duplex selective PCR 30
V Evaluation of specificity of mutant specific primer of each codons with WT template (WT plasmid and WT virus stocks) 36
VI Details of the primers for codon 215 (2^{nd} and 3^{rd} generation) with nucleotide specific sequence for subtype B and A/E 38
VII Summary of the successful primers design and development 40
VIII Summary of the failure primers design and development 41
IX Demographic of characteristic of patients 42
X Frequency of mutations associated with resistance to antiretroviral drugs by duplex selective PCR in HIV infected patients 47
XI Comparison of duplex selective PCR with sequencing analysis 52
XII The primers for duplex selective PCR analysis 65

LIST OF FIGURES

Page

1 Diagram for the duplex selective PCR patterns in agarose gel electrophoresis.... 31

2 Comparison of the three generation mutant specific primers of codon 215 for T215Y/F mutation detection in known mutant isolates as proven by sequencing analysis 37

3 Determination of sensitivity and specificity of Q151M / T215Y/F duplex selective PCR with serial dilutions of wild type virus stocks. 39

4 Analysis of RT codon 103 and 181 in selected HIV-1 infected patients by duplex selective PCR 43

5 Analysis of RT codon 151 and 215 in selected HIV-1 infected patients by duplex selective PCR 44

6 Comparison of frequency of RT mutation codons between ARV-naïve patients and ARV-experienced of more than 6 month patients..... 46

7 Comparison of discordant results between duplex selective PCR and sequencing analysis 47

8 Frequency of RT mutation at designated codons in ART-experienced patients according to antiretroviral drug treatment using duplex selective PCR analysis..... 48

LIST OF ABBREVIATIONS

AIDS	=	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
ARMS	=	Amplification Refractory Mutation System
ARV	=	AIDS-related retrovirus
ART	=	Antiretroviral Therapy
bp	=	base pair
°C	=	Degree Celcius
DDW	=	Deionized distilled water
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxynitrogentriphosphates
et al.	=	et alii
FDA	=	Food and Drug Administration
g	=	gram
gp	=	glycoprotein
HCl	=	hydrochloric acid
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
i.e.	=	id est
LiPA	=	Line Probe Assay
M	=	Molar
mg/L	=	milligram per liter
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
min (s)	=	minute (s)
mL	=	milliliter
mm^3	=	cubic millimeter
MNR	=	multi-nucleoside resistance
MT	=	Mutant-type
NAMs	=	Nucleoside analog mutations
nm	=	nanometer
NRTI	=	Nucleotide analog reverse transcriptase inhibitor
NNRTI	=	Non nucleotide analog reverse transcriptase inhibitor
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PI	=	Protease inhibitor
RNA	=	Ribonucleic acid

rpm	=	round per minute
RT	=	Reverse Transcriptase
TAMs	=	Thymidine analog resistance mutations
Tris	=	Tris-(hydroxymethy)-aminoethane
U	=	Unit
μg	=	microgram
μL	=	microliter
WT	=	Wide-type
UV	=	Ultraviolet