

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของตัวชี้บ่ง
ทางระบบภูมิคุ้มกันกับการดำเนินโรคทางคลินิก
ของการติดเชื้อโรค เอคส์ในผู้ป่วยไทย



นางสาวสุณี ศิริวิชัยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-103-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017233

117314057

THE STUDY OF THE CORRELATION BETWEEN THE CHANGES
IN THE IMMUNOLOGIC MARKERS
AND
THE CLINICAL PROGRESSION OF HIV INFECTIONS
IN THAI PATIENTS

Miss Sunee Sirivichayakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1991
ISBN 974-579-103-2



Thesis Title The Study of the Correlation between the
 Changes in the Immunologic Markers and the
 Clinical Progression of HIV Infections in Thai
 Patients

By Miss Sunee Sirivichayakul

Inter-Department Medical Microbiology

Thesis Advisor Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.

Co-Adivisor Mr. Wattana Panmoung

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

Thavorn Vajrabhaya
Dean of the Graduate School
 (Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis committee :

.....*Reutai Sakulramrung*.....Chairman
 (Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.)

.....*Praphan Phanuphak, M.D.*.....Thesis Advisor
 (Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.)

.....*Wattana Panmoung*.....Co-Advisor
 (Mr. Wattana Panmoung, M.Sc.)

.....*Mattana Hanvanich*.....Member
 (Assistant Professor Mattana Hanvanich, M.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

สุณี ศิริวิชัยกุล : การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของตัวชี้บ่งทางระบบภูมิคุ้มกันกับการดำเนินโรคทางคลินิกของการติดเชื้อโรคเอดส์ในผู้ป่วยไทย, อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ นพ. ประพันธ์ ภาณุภาค, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ วัณณะ พันธุ์ม่วง, 102 หน้า

จากการศึกษาถึงตัวชี้บ่งทางระบบภูมิคุ้มกัน 6 ตัว ซึ่งแบ่งออกเป็นตัวชี้บ่งทางระบบภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ 3 ตัว คือ CD_4^+ T cell, CD_8^+ T cell, total T cell และตัวชี้บ่งทางระบบภูมิคุ้มกันทางด้านน้ำเหลือง 3 ตัว คือ β_2 -microglobulin, ปริมาณของ p24 antigen และ anti-p24 เพื่อประเมินประสิทธิภาพของตัวชี้บ่งทางระบบภูมิคุ้มกันเหล่านี้ ในการบอกระยะของโรค และในการทำนายการดำเนินโรคทางคลินิกของการติดเชื้อโรคเอดส์ ในผู้ป่วยที่เป็นคนไทย 61 ราย พบว่าการลดลงของ CD_4^+ T cells, การเพิ่มขึ้นของ β_2 -microglobulin, การลดลงของ anti-p24 และการเพิ่มขึ้นของ p24 antigen มีความสัมพันธ์กับระยะของการติดเชื้อโรคเอดส์ กล่าวคือ ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะเอดส์เต็มขั้นจะมีความผิดปกติของตัวชี้บ่งทางระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าวมากที่สุด ตามด้วยผู้ป่วยที่อยู่ในระยะสัมพันธ์กับเอดส์ ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะต่อมา น้ำเหลืองโตทั่วตัว และ/หรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ไม่มีอาการตามลำดับ จากการติดตามการดำเนินโรคของผู้ป่วยเป็นระยะๆ เป็นเวลา 2 ปี พบว่า ทั้งปริมาณสัมบูรณ์ และเปอร์เซ็นต์ของ CD_4^+ T cells, ปริมาณสัมบูรณ์ของ CD_8^+ T cells, การเพิ่มขึ้นของ β_2 -microglobulin ปริมาณ p24 antigen และ anti-p24 ที่ตรวจได้จากผู้ที่ผู้ป่วยมาหาเป็นครั้งแรกสามารถใช้เป็นตัวชี้บ่งการดำเนินโรคในทางที่เลวลงของการติดเชื้อเอดส์ได้ นอกจากนี้การรวม p24 antigen กับการวัดปริมาณของ CD_4^+ T cells ยังช่วยเพิ่มความแม่นยำในการทำนายการดำเนินไปทางที่เลวลงของโรคได้ดีขึ้นกว่าการใช้ตัวชี้บ่งเพียงตัวใดตัวหนึ่ง ปริมาณของ β_2 -microglobulin และสัดส่วนของ CD_4/CD_8 ในตอนเริ่มต้นของผู้ป่วย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีการดำเนินไปของโรคในทางที่เลวลง และกลุ่มที่ไม่มีอาการเลวลงของโรคภายใน 2 ปี มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนตัวชี้บ่งอื่นๆ กว่าจะจำแนกได้ว่าใครจะเลวลง หรือไม่นั้นจะต้องใช้เวลาติดตามอย่างน้อย 1 ปีขึ้นไป จึงจะปรากฏชัดเจน นอกจากนี้ ผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างกันของอายุ, เพศ หรือ พฤติกรรมที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อ จากการศึกษาพบว่า อัตราการดำเนินไปทางที่เลวลงของโรคเอดส์ ในผู้ป่วยไทยมีค่าประมาณ 6.8 % ต่อปี ซึ่งผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ยิ่งต่อการวางแผน และประเมินผลของการใช้ยาต่างๆ ในการรักษาพยาบาลผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอดส์ และการวางแผนเกี่ยวกับงานให้บริการสาธารณสุขของประเทศเกี่ยวกับโรคเอดส์ต่อไปในอนาคต



ภาควิชา สหสาขาวิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์.....

สาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์.....

ปีการศึกษา 2533.....

ลายมือชื่อนิสิต สุณี ศิริวิชัยกุล.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประพันธ์ ภาณุภาค.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วัณณะ พันธุ์ม่วง.....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

SUNEE SIRIVICHAYAKUL : THE STUDY OF THE CORRELATION BETWEEN THE CHANGES IN THE IMMUNOLOGIC MARKERS AND THE CLINICAL PROGRESSION OF HIV INFECTIONS IN THAI PATIENTS. THESIS ADVISOR : PROFESSOR PRAPHAN PHANUPHAK, M.D., Ph.D. CO-ADVISOR : MR.WATTANA PANMOUNG. 102 pp.

Three cellular and three serologic markers were evaluated in 61 Thai HIV-infected patients. These included CD₄⁺ T cells , CD₈⁺ T cells , total T cells, serum β_2 -microglobulin level, p24 antigen level and anti-p24. They were evaluated for their correlations with the clinical staging and as predictors for clinical progression. The decreased CD₄⁺ T cells, increased β_2 -microglobulin level, decreased anti-p24 titer and increased p24 antigen level correlated well with the stages of HIV infection in Thai patients. The abnormalities were most marked in AIDS, followed successively by ARC and PGL or asymptomatic HIV infection. In our sequential 2 year follow-up , the absolute number and percentage of CD₄⁺ T cells, the absolute number of CD₈⁺ T cells, the elevated β_2 -microglobulin level, p24 antigen level and anti-p24 at entry could be reliably used as prognostic markers for HIV progression. The combinations of p24 Ag with the measurement of CD₄⁺ T cells substantially increased the prognostic value than either was used alone. Furthermore, the initial values of β_2 -microglobulin level and CD₄/CD₈ ratio of the progressors and non-progressors were significantly different. The other markers would become discriminatory only after 1 or more years of follow-up. The progressors, however, could not be differentiated from the non-progressors based on age, sex or risk behaviors. The annual rate of clinical progression in Thai patients from our study was approximately 6.8% . The results obtained in our study of the natural course of HIV infection in Thai patients are essential baseline data for future therapeutic interventions or health policy planning of the country.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิติต สุนี สิริวิชญกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา พรพาน พานูปภาค
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วตนา พนมมุง



ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to the followings, who have helped for the completeness of this thesis.

Professor Praphan Phanuphak of Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for his excellent advice, guidance and encouragement throughout the period of this study.

Mr. Wattana Panmoung, the lecturer of Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for his advice and constructive criticisms.

All the staffs at the HIV-AIDS Clinic of Chulalongkorn Hospital, particularly Dr. Mattana Hanvanich for their kind help in collecting the blood specimens and following the patients.

Special thanks are also given to all my colleagues in the Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine and in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their help and encouragement.

Finally, I am also indebt to my advisory committee for their kindness and helpful suggestions for the completeness of this thesis and to my family for their understanding and support during my study period.



CONTENT

| | Page |
|--|------|
| THAI ABSTRACT..... | iv |
| ENGLISH ABSTRACT..... | v |
| ACKNOWLEDGEMENT..... | vi |
| LIST OF TABLES..... | ix |
| LIST OF FIGURES..... | x |
| ABBREVIATIONS..... | xiii |
| OBJECTIVES..... | xv |
| CHAPTER | |
| I. INTRODUCTION..... | 1 |
| II. LITERATURE REVIEW..... | 5 |
| HISTORY..... | 5 |
| ETIOLOGY..... | 5 |
| HIV-I Biology..... | 6 |
| Life cycle of HIV..... | 9 |
| MODES OF TRANSMISSION..... | 9 |
| PATHOGENESIS..... | 10 |
| Mechanisms of T ₄ cell depletion..... | 11 |
| CLINICAL MANIFESTATIONS..... | 13 |
| Staging of HIV infection..... | 13 |
| IMMUNOLOGIC ABNORMALITIES..... | 16 |
| LABORATORY DIAGNOSIS..... | 17 |
| Antibody tests..... | 18 |
| Tests for virus and viral antigens..... | 19 |
| Tests for viral DNA..... | 20 |
| PROGNOSTIC MARKERS..... | 21 |
| III. MATERIALS AND METHODS..... | 24 |
| 1. Study group..... | 24 |
| 2. Specimen collection..... | 25 |

| | |
|--|-----|
| 3. Separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)..... | 25 |
| 4. Spontaneous E-rosette formation..... | 26 |
| 5. Enumeration of CD ₄ ⁺ and CD ₈ ⁺ T cells..... | 27 |
| 6. Determination of β_2 -microglobulin level..... | 29 |
| 7. Determination of p24 antigen..... | 30 |
| 8. Determination of anti-p24..... | 30 |
| 9. Statistical analysis..... | 32 |
| IV. RESULTS..... | 34 |
| I. Patient population..... | 34 |
| II. Comparing immunologic parameters of HIV patients under the study at entry and at the end of 2-year follow-up or just before death..... | 35 |
| III. Immunologic parameters of progressors and non-progressors..... | 36 |
| IV. Predictive value of individual immunologic marker..... | 37 |
| V. Correlation between variables..... | 41 |
| VI. Combined predictive value..... | 42 |
| V. DISCUSSION..... | 68 |
| Conclusions..... | 75 |
| REFERENCES..... | 77 |
| APPENDIX I..... | 91 |
| APPENDIX II..... | 93 |
| APPENDIX III..... | 97 |
| CURRICULUM VITAE..... | 102 |

LIST OF TABLES

| Table | Page |
|--|------|
| I. Yearly incidence of AIDS, ARC and asymptomatic HIV infection in Thailand from 1984 to December 31,1990..... | 2 |
| II. Summary of HIV proteins..... | 7 |
| III. Factors that influence HIV pathogenesis..... | 11 |
| IV. Immunologic abnormalities in AIDS..... | 16 |
| V. Patients population at entry into the study..... | 60 |
| VI. Status of the patients at the end of the 2 year follow-up (n=61)..... | 61 |
| VII. Comparing immunologic parameters of HIV patients at entry and at 2 years or near death..... | 62 |
| VIII. Comparing of biographic data between progressors and non-progressors as compared to the entire patient group..... | 63 |
| IX. Comparison of immunologic parameters between progressors and non-progressors during the 2 year follow-up..... | 64 |
| X. Relative hazard characteristics of different levels of each immunologic marker..... | 65 |
| XI. Correlations among markers in 61 HIV-infected patient..... | 66 |
| XII. Relative hazard characteristics of various combinations of CD ₄ measurements and β_2 -microglobulin, p24 antigen and anti-p24..... | 67 |
| XIII. Calculated annual reduction of CD ₄ ⁺ T cell numbers in patients with various stages of HIV infection..... | 70 |

LIST OF FIGURES

| Figure | Page |
|--|------|
| 1. Correlation between antigen and antibody of HIV infection..... | 22 |
| 2. Ficoll-Hypaque density gradient separation of PBMC..... | 26 |
| 3. E-rosette forming cells..... | 27 |
| 4. The fluorescein-stained CD ₄ ⁺ or CD ₈ ⁺ lymphocytes..... | 28 |
| 5. Principle of competitive ELISA for β_2 -microglobulin..... | 29 |
| 6. Grading of anti-p24 level by Western blot assay..... | 31 |
| 7. Pattern of anti-HIV positive by Western blot assay..... | 32 |
| 8. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the percentage of CD ₄ ⁺ T cell were measured..... | 45 |
| 9. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the number of CD ₄ ⁺ T cell were measured..... | 46 |
| 10. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the percentage of CD ₈ ⁺ T cell were measured..... | 47 |
| 11. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the number of CD ₈ ⁺ T cell were measured..... | 48 |
| 12. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the CD ₄ / CD ₈ ratio were measured..... | 49 |
| 13. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the serum β_2 -microglobulin level were measured..... | 50 |

14. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the p24 antigen were measured.....51
15. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the anti-p24 were measured.....52
16. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the percentage of CD₄⁺ T cell were combined with β_2 -microglobulin level.....53
17. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the total number of CD₄⁺ T cell were combined with β_2 -microglobulin level.....54
18. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the percentage of CD₄⁺ T cell were combined with p24 antigen.....55
19. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the total number of CD₄⁺ T cell were combined with p24 antigen.....56
20. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the percentage of CD₄⁺ T cell were combined with anti-p24.....57
21. Kaplan-Meier plots of the proportion without AIDS of 61 HIV-infected patients in whom the total number of CD₄⁺ T cell were combined with anti-p24.....58
22. Kaplan-Meier plots of death free events of 61 HIV-infected patients in whom the absolute number of CD₄⁺ T cell were measured.....59

23. Sequential follow-up of absolute number of CD₄⁺ T cell in 2 HIV-infected patients who progressed from asymptomatic infection to full-blown AIDS in 2 years to illustrate the correlation of decreasing CD₄⁺ cell count and clinical progression of disease.....76

ABBREVIATIONS

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| Ab | = | Antibody |
| ADCC | = | Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity |
| AIDS | = | Acquired immune deficiency syndrome |
| Ag | = | Antigen |
| ARC | = | AIDS Related Complex |
| B-cells | = | Bursa-derived lymphocytes |
| °C | = | degree celcius |
| cu.mm | = | cubic millimeter |
| DW | = | distillated water |
| E-RFC | = | E-rosette forming cells |
| et al. | = | et alii |
| G | = | relative gravitational force |
| gm | = | gram |
| gp | = | glycoprotein |
| HEPES | = | (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid) |
| HIV | = | Human Immunodeficiency Virus |
| HTLV | = | Human T Lymphotropic Virus |
| i.e. | = | id est |
| Ig G,A,M,D | = | Immunoglobulin class G, A, M or D |
| IVDU | = | Intravenous drug user |
| LAV | = | Lymphadenopathy Associated Virus |
| mg/L | = | milligram per liter |
| min(s) | = | minute(s) |
| ml | = | milliliter |
| nm | = | nanometer |
| OKT ₄ or OKT ₈ | = | Ortho Kung T-cell surface antigen type 4 or type 8 |

| | | |
|------------------|---|--|
| PBMC | = | Peripheral blood mononuclear cells |
| PGL | = | Persistent generalized lymphadenopathy |
| pg/ml | = | picogram per milliliter |
| rpm | = | round per minute |
| RPMI 1640 | = | Rosewell Park Memorial Institute formular 1640 |
| SRBC | = | sheep red blood cell |
| T-cells | = | Thymus-derived lymphocytes |
| $\mu\text{g/ml}$ | = | microgram per milliliter |
| μm | = | micrometer |
| μl | = | microliter |

OBJECTIVES

1. To study the correlation between the following immunologic markers and the disease status of Thai HIV patients
 - CD₄⁺ T cells
 - CD₈⁺ T cells
 - total T cells
 - β₂-microglobulin level
 - anti-p24
 - p24 antigen
2. To study the sequential changes of the above immunologic markers in relationship to the clinical course of the disease.
3. To evaluate the reliability of these immunologic markers, either singly or in combination in predicting disease progression.
4. To characterize the subset of patients who progressed within 2 years from the ones who did not progress.