

การตรวจหา HIV RNA โดยวิธี One-Step RT Real-Time  
Polymerase Chain Reaction (PCR)



นางสาวปิยมาศ จินโนภาส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6778-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

, - 6 ก.ย. 2549

I 220A3834

QUANTITATION OF HIV-RNA BY ONE-STEP RT REAL-TIME  
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Miss Piyamat Jinnopat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements  
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6778-1




ปริญญาดุษฎีบัณฑิตกิตติมศักดิ์ : การตรวจหา HIV RNA โดยวิธี One-Step RT Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ เกียรติ รักรุ่งธรรม, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: สุณี ศิริวิชัยกุล; 96 หน้า. ISBN 974-17-6778-1

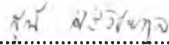
ปริมาณ RNA ของเชื้อ HIV-1 ในกระแสเลือดเป็นตัวที่ใช้บ่งบอกถึงอาการของโรคในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HIV-1 อีกทั้งยังเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพในการรักษา ด้วยเหตุผลนี้ ในปัจจุบันนี้ มีบริษัทต่างๆ ได้ผลิตชุดน้ำยาตรวจหาปริมาณเชื้อ HIV-1 ในกระแสเลือดหลายบริษัทด้วยกัน ตัวอย่างเช่น The HIV-1 Quantiplex Assay, The AMPLICOR HIV-1 MORNITOR Assay และ The NucliSens HIV-1 Assay แต่ราคาค่าชุดน้ำยาตรวจเหล่านี้ ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ และมีราคาแพง (1,500-2,000 บาท) ด้วยเหตุผลนี้ จึงได้มีการพัฒนาชุดน้ำยาตรวจขึ้นมาเพื่อให้มีราคาถูกลง (1,000 บาท)

ชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นนี้ (One-Step Real-Time RT-PCR) ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน The Bayer® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) เพื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์กันของทั้งสองวิธี พบว่าทั้งสองวิธีนี้มีความสัมพันธ์กัน (ค่าความสัมพันธ์ทางสถิติ = 0.787), อัตราความแปรปรวน (coefficient of variation) ของชุดน้ำยาตรวจต่ำกว่า 7% แสดงถึงชุดน้ำยาที่พัฒนาขึ้นมานี้ มีความถูกต้อง แม่นยำสูง แม้จะทำการตรวจในเวลาต่างๆ กัน โดยค่าทางสถิติในการวิเคราะห์ ความไว ความจำเพาะ และ ความถูกต้อง ของชุดน้ำยาตรวจนี้อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (มากกว่า 90%)

โดยสรุปแล้ว ชุดน้ำยา One-Step RT Real-Time PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำมาใช้ได้จริง แต่อย่างไรก็ตาม ยังจำเป็นต้องทำการพัฒนาเพิ่มเติมในส่วนของตัวควบคุมการทดลอง ซึ่งจะทำให้ชุดน้ำยานี้ มีความถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2547.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# 4489087920: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: ONE-STEP RT REAL-TIME PCR / QUANTIFICATION / HIV

PIYAMAT JINNOPAT: THESIS TITLE: QUANTITATION OF HIV RNA  
BY ONE-STEP RT REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. KIAT RUXRUNGTHUM,

THESIS CO-ADVISOR: SUNEE SIRIVICHAYAKUL, 96 pp. ISBN 974-17-  
6778-1

The quantitative evaluation of HIV-1 viral load in plasma is a pivotal marker for the diagnosis and prognosis of HIV-1 infection. In addition, the viral load yields basis information for therapy monitoring allowing a concrete analysis of treatment failure caused by emerging resistance to a specific antiretroviral compound. For these reasons, studies on molecular procedures to determine viral load quantitatively have increased in recent years. Approaches such as The HIV-1 Quantiplex Assay, The AMPLICOR HIV-1 MORNITOR Assay and The NucliSens HIV-1 Assay are employed widely as reference techniques for diagnostic laboratories. But the cost of the tests still remains expensive (1,500 - 2,000 bath). For this reason the One-Step RT Real-Time PCR was developed and the cost of this One-Step RT Real-Time PCR is less expensive (1,000 bath).

In house One-Step RT Real-Time PCR was compared with The Bayer<sup>®</sup> HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) reference standard technique for the quantitative determination of HIV-1 viral load. Our approach presented a good correlation between two methods ( $r = 0.787$ ). To evaluate the reproducibility of assay, the intra-inter-assay coefficient of variation (CV) were determined. The %CV was low, <7% for both intra-inter assays, indicating that our assay has a high reproducibility. The specificity is 90.62%. The One-Step RT Real-Time PCR assay detected in 66 out of 73 as sensitivity is 90.41%. The accuracy of the in house the One-Step RT Real-Time PCR method is 90.47%.

In conclusion, our in-house One-Step RT Real-Time PCR assay has a good correlation, reproducible, practical, high sensitive and cost-effective and will be even more improved in the future studies.

Field of study.....Medical Microbiology...Student's signature.....  
*Pot Pot*

Academic year.....2004.....Advisor's signature.....  
*Keel Pan*

Co-advisor's signature.....  
*Sune Sirivichayakul*

## AKNOWLEDGEMENTS

The present investigator wishes to express her deep gratitude to the followings, who help in making this thesis possible.

Associate Professor Kiat Ruxrungthum, of the Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his excellent and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and encouragement through the period of this study;

Ministry of University Affairs, Program on AIDS Research Fund, for funding of my study.

Department of Enteric Disease, Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS) for providing the ABI7700 machine.

CHULA-MRC for providing the facility of laboratory.

Dr. Sunee Sirivichayakul for her kindness, constructive criticism and helpful suggestions for completeness and correction of this thesis.

The member of the thesis committee for their kindness, constructive criticism and helpful suggestions for completeness and correction of this thesis

All the staffs at The Thai Red Cross National Blood Center, for providing the blood samples.

All the staffs at Vaccine Cellular Immunology (VCI) laboratory, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and my friends of the Microbiology Department for their helpful and friendship.

Finally, I am extremely grateful to my family for their love, understanding, patience, supporting and encouragement throughout my life.

# CONTENTS

	page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLE.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I    INTRODUCTION.....	1
II   OBJECTIVES.....	4
III  LITERATURE	
REVIEWS.....	5
1    HIV background .....	5
2    The Immunopathogenesis of HIV Infection.....	9
3    The HIV-1 Quantiplex (bDNA) Assay.....	15
4    The AMPLICOR HIV-1 MONITORY Assay.....	16
5    The NucliSens HIV-1 Assay.....	16
6    Performance characteristics of assay for HIV viral load.....	17
7    Principle of real-time PCR.....	18
8    Techniques for real-time PCR.....	20
IV  MATERIALS AND METHODS.....	29
Part I. Development of the HIV-1 integrase RNA templates for standard curve.....	29
1. Recombinant pCI-HIV-1 integrase plasmid purification.....	30
2. Recombinant pCI-HIV-1 integrase plasmid quantitation .....	31
3. Linearized Recombinant pCI-HIV-1 integrase plasmid.....	32
4. <i>In vitro</i> transcription .....	33
5. HIV-1 integrase RNA standard purification.....	33
6. Determination of HIV-1 integrase RNA standard.....	33

## CONTENTS (continued)

	Page
Part II. Development of One-Step Real-Time RT-PCR.....	34
1. PCR primer and labeled TaqMan probe design.....	34
2. One-Step Real-Time RT-PCR optimization.....	36
3. Analysis of One-Step Real-Time RT-PCR Assay.....	37
Part III. Validation of assay.....	38
1. Specificity.....	38
2. Sensitivity.....	38
3. Intra-Inter assay.....	38
Part IV. Assays comparison.....	39
1. Study group.....	39
2. Specimen collection.....	39
3. HIV-1 RNA preparation.....	39
4. cDNA synthesis.....	40
5. PCR amplification.....	40
6. Analysis of amplification plot.....	40
7. Assays comparison.....	41
V. RESULTS.....	42
Part I. Development of the HIV-1 integrase RNA templates.....	42
Part II. Development of One-Step Real-Time RT-PCR.....	42
Part III. Assay validation.....	46
Part IV. Assay comparison.....	50
Part V. Overall cost comparison.....	60
VI DISCUSSION.....	62
REFERENCES.....	68
APPENDICES.....	77
APPENDIX I.....	78
APPENDIX II.....	80
BIOGRAPHY.....	84



## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Absorbance of nucleic acids and protein.....	31
2. T7 reaction component <i>in vitro</i> transcription system.....	32
3. Sequence of primer and sized of PCR products.....	35
4. Sequence of TaqMan probe.....	35
5. Condition of One-Step Real-Time RT-PCR.....	37
6. Viral load of 25 HIV-1 negative samples.....	47
7. Comparison of the threshold cycle (Ct) values of standard curves and the results of intra-assay analyses.....	48
8. Comparison of the threshold cycle (Ct) values of standard curves and the results of inter-assay analyses.....	48
9. Intra-assay validation (4 replicates) results of serial 10-fold dilution of HIV-1 <sub>IIIB</sub> viral particles.....	49
10. Inter-assay validation (2 runs) results of serial 10-fold dilution of HIV-1 <sub>IIIB</sub> viral particles.....	49
11. Parallel testing of 105 plasma samples by using The Bayer®HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) and in-house One-Step Real-Time RT-PCR.....	53
12. The correlation between the results of log <sub>10</sub> -transformed quantification values obtained with The Bayer®HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) and in-house One-Step Real-Time RT-PCR .....	58
13. The sensitivity and specificity of in-house One-Step RT Real-Time PCR as compared to The Bayer®HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) at cut-off of HIV-1 RNA as 50 copies/ml.....	58
14. Cost comparison between The Bayer®HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) and One-Step Real-Time RT-PCR.....	61

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Hypothetical course of HIV infection in adults.....	13
2. DNA-binding dyes assay.....	21
3. TaqMan probe assay.....	23
4. Hybridization probe assay.....	24
5. The molecular beacon assay.....	25
6. Scorpion probe assay.....	26
7. Establishment of quantification of HIV-1 RNA by in-house One-Step Real-Time RT-PCR assay.....	29
8. Diagram for determining the sized of the RNA product band directly in the gel electrophoresis.....	34
9. Model of a single amplification plot, showing terms commonly used in real-time PCR.....	37
10. Diagram for the 111 bp of RT-PCR product patterns directly in the gel electrophoresis.....	41
11. High quality of transcribed 386 bp HIV-1 integrase RNA was obtained to be used for the standard curve generating when performing the real-time PCR assay.....	43
12. the result confirmed that there was no DNA contamination in the <i>in vitro</i> transcribed HIV-1 integrase RNA.....	44
13. Amplification plot of 10-fold serial dilution of the transcribed HIV-1 integrase RNA transcribed as a standard curve for HIV-1 RNA measurement by One-Step Real-Time RT-PCR.....	45
14. Median comparison of both assays.....	51
15. Scatter plot of 105 HIV-1 RNA plasma samples.....	52
16. Bland Altman plot determined as The Bayer <sup>®</sup> HIV-1 RNA 3.0 Assay and One-Step Real-Time RT-PCR.....	59

**ABBREVIATIONS**

AIDS	=	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BMV	=	Brome Mosaic Virus
bp	=	base pair
°C	=	Degree Celsius
CD	=	Cluster of Differentiation
CI	=	Confidence interval
CTL	=	Cytotoxic T-lymphocytes
DNA	=	Deoxynucleic acid
dNTPs	=	Deoxynucleotidetriphosphate
rNTPs	=	Deoxyribonucleotidetriphosphate
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacetic acid
env	=	envelope
et al.	=	et alii
g	=	gram
gp	=	glycoprotein
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
i.e.	=	id est
IFN- $\gamma$	=	Interferon gamma
Ig	=	Immunoglobulin
IL-2	=	Interleukin 2
KCl	=	Potassium chloride
LTRs	=	Long Terminal Repeats
LAV	=	Lymphadenopathy-associated virus
M	=	Molar
Mg/ml	=	Milligram per milliliter
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesium chloride
Min	=	Minute
$\mu$ g	=	Microgram
mg	=	Milligram
$\mu$ l	=	Microliter
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar

**ABBREVIATIONS (continued)**

ng	=	nanogram
NK cell	=	Natural killer cells
nt	=	nucleotide
OD	=	Optical Density
PBMCs	=	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
pol	=	Polymerase
pmole	=	Picomole
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	Round per minute
RT	=	Reverse Transcriptase
T-cells	=	Thymus-derived lymphocytes
UV	=	Ultraviolet
WHO	=	World Health Organization