Thesis Title The Development of Cost Effective and Reliable Real-time PCR for Quantitation of HIV-1RNA in Plasma

Author Miss Kanittapon Supadej

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Dr. Sorasak Intorasoot

ABSTRACT

Background: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection has been an important problem in global pandemic. It was implied that active viral replication was directly correlated with disease progression and patient survival. Several viral monitoring test kits were commercially available in Thailand, but a cost per test is expensive.

Objective: To establish the cost effective and reliable real-time PCR for quantitation of HIV-1 RNA from plasma sample and compare with the reference kit. .

Materials and methods: Previously analyzed 192 HIV-1 positive plasma samples with viral load ranging from less than 40 to approximately $1.7x10^6$ copies/ml

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and 40 sero-negative plasma samples were included in this study. HIV-1 RNA standard encoded for *gag* gene and scrambled sequence-constructed internal system control (IC) was performed. Standard curve was plotted using *in vitro* transcribed HIV-1 RNA and utilized for viral quantitation. The correlation coefficient and Bland-Altman plot were applied for statistical analysis of the two methods.

Results: The limit of quantitation of the validation assay was 10^3 copies/ml and the linear range was approximate 10^3-10^{10} copies/ml. After reproducibility determination by using intra-and inter-run assay, it was implied that the coefficient of variation (%CV) was significantly increased while the low copy number of RNA was determined. About 2.6% of samples indicated false negative result obtained from validated assay. More than seventy percent of the result less than 1 log difference was observed in the samples with copy number over 10^3 copies/ml. The statistical data showed a relation with highly correlated (r^2=0.9032) and represent a good agreement between the two assays.

Conclusion: Developed real-time PCR was inexpensive and reliable for quantitation of HIV-1 viral load in plasma and useful for applying in several countries including Thailand.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ที่คุ้มค่าและเชื่อถือได้เพื่อตรวจหาปริมาณเอชไอวี-1 อาร์เอ็นเอในพลาสมา

ผู้เขียน นางสาวคณิตาพร สุภาเดช

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. สรศักดิ์ อินทรสูต

บทคัดย่อ

ภูมิหลัง การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 ยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทั่วโลก โดยพบว่าการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสนั้นมีความสอดคล้องโดยตรงกับการดำเนินโรคและการรอดชีวิตของผู้ป่วย ในประเทศไทยมีการนำเข้าชุดตรวจติดตามการติดเชื้อไวรัสสำเร็จรูปจำนวนมาก แต่พบว่าราคาต่อรายยังคงมีราคาแพง

วัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ที่มีราคาถูกและน่าเชื่อถือ สำหรับการตรวจหาปริมาณเอชไอวี-1 อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพลาสมาและเปรียบเทียบผลการตรวจวัดที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับวิธีมาตรฐาน

วัสดุและวิธีการ ทำการศึกษาตัวอย่างพลาสมาจำนวน 192 ตัวอย่างที่ได้รับการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 แล้วและมีปริมาณเชื้อไวรัสตั้งแต่น้อยกว่า 40 ถึงประมาณ $1.7x10^6$ copies/ml และตัวอย่างพลาสมาจำนวน 40 ตัวอย่าง ที่ให้ผลลบจากการตรวจแอนติเจน-แอนติบอดี โดยสร้าง เอชไอวี-1 อาร์เอ็นเอมาตรฐานจากยีน *gag* และสำหรับควบคุมระบบด้วยเทคนิค *in vitro* transcription จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานจากอาร์เอ็นเอมาตรฐานที่สร้างขึ้น และใช้ในการตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัส ค่าสถิติที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของวิธีที่พัฒนาขึ้นและวิธีการมาตรฐานคือค่าสัมประสิทธ์ความสัมพันธ์ และ Bland-Altman plot

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาปริมาณเอชไอวี-1 อาร์เอ็นเอได้ตั้งแต่ 10^3 ถึง 10^{10} copies/ml จากการศึกษา reproducibility พบว่าค่า %CV (Coefficient of variation) ที่ได้มีค่าสูงขึ้นเมื่อปริมาณอาร์เอ็นเอลดลงเมื่อทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นพบผลลบปลอมประมาณ 2.6% จากตัวอย่างทั้งหมด การทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานพบว่า 70 % ของตัวอย่างทดสอบที่มีปริมาณเอชไอวี-1 อาร์เอ็นเอมากกว่า 10^3 copies/ml มีความแตกต่างกันของผลการทดสอบน้อยกว่า 1 log วิธีที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความความจำเพาะ และสอดคล้องด้วยค่าสถิติสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2=0.9032) และ สถิติ Bland-Altman plot

สรุปผลการทดลอง วิธีการตรวจหาปริมาณเอชไอวี-1 อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพลาสมาด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ที่ได้พัฒนาขึ้น มีราคาถูก ผลการตรวจวัดมีความถูกต้อง และเชื่อถือได้ สามารถนำไปใช้ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved