Thesis Title Development, Evaluation, and Application of the Multi-region Subtype Specific PCR (MSSP) Assay to Genetically Identify HIV-1 Subtypes B, C, CRF01_AE, and Their Recombinant Forms.

Author Mr. Supachai Sakkhachornphop

Degree Master of Science (Health Sciences)

Thesis Advisory Committee

Professor Thira Sirisanthana	Chairperson
Dr. Sodsai Tovanabutra	Member
Dr. Chris Beyrer	Member
Dr. Jeerang Wongtrakul	Member

ABSTRACT

Co-circulation of HIV-1 subtype B, C and CRF01_AE in Southeast Asia, South Asia and China has led to the emergence of recombinant strains. Some of them (CRF07_BC, CRF08_BC and CRF15_01B) have already been recognized as circulating recombinant forms (CRF) while many unique recombinant forms (URF) have been found only in single individuals so far. For efficient discrimination of subtypes, CRF and URF where HIV-1 vaccines will be evaluated, in this study, the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

multi-region subtype specific PCR (MSSP) assay was developed for identifying subtypes B, C, CRF01_AE, recombinant forms, and dual infections. The principle of the assay is to separately amplify each of eight different target regions distributed along the HIV-1 genome with subtype specific primers in a nested PCR format. Products were visualized on ethidium bromide stained agarose gels. Primers were designed based on the available sequence data (http://hiv-web.lanl.gov). A panel of 41 clinical DNA samples primarily from HIV-1 infections among northern Thai drug users was used to test assay performance. These strains were previously characterized by full genome sequencing, included 33 CRF01_AE, 2 CRF15_01B and 6 unique CRF01_AE/B recombinants. MSSP showed 73-100 % sensitivity and 100 % specificity for the three subtypes in each genome region. The assay was then field tested on serum from 337 prevalent HIV-infected individuals identified among northern Thai drug users between 1999 to 2000. Subtype assignment was given when at least 4 regions were typeable. 315 samples (94%) were typed. Subtype distribution was 77.4% CRF01_AE, 3.3% subtype B, 12.2 % CRF01_AE/B recombinants, 0.6% CRF01_AE/C recombinant. In this study, MSSP assay discovered 4.1 % (n = 14) dual infections consisting of CRF01_AE/B duals 3.8% (n=13) and CRF01_AE/C duals 0.3 % (n=1) of detected recombinant strains. The MSSP is a simple, cost effective and accurate genotyping tool for laboratory settings with limited resources, and is sufficiently sensitive to capture recombinant genomes and dual infections in large populations. Defining of the incident and circulating prevalent and transmissible strains are critical for understanding the evolving HIV-1 epidemic and defining HIV-1 vaccine performance.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนา การประเมินและการประยุกต์ใช้วิธีพีซีอาร์ที่มีความจำเพาะแบบหลายตำแหน่ง สำหรับตรวจแยกชนิดสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี ชนิดบี ซี เออี และไวรัสลูกผสม

ผู้เขียน นายศุภชัย ศักดิ์ขจรภพ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศาสตราจารย์ ธีระ ศิริสันธนะ	ประธานกรรมการ
ดร.สดใส โตวณะบุตร	กรรมการ
ดร. คริส เบย์เรอร์	กรรมการ
ดร.จีรัง ว่องตระกูล	กรรมการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

การที่เชื้อเอชไอวี 1 สายพันธุ์ B, C และ CRF01_AE ระบาดอยู่ร่วมกันในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียใต้ และประเทศจีนทำให้เกิดเชื้อไวรัสลูกผสมสายพันธุ์ต่างๆ บางสายพันธุ์ (CRF07_BC, CRF08_BC และ CRF15_01B) ได้รับการยอมรับว่าเป็น Circulating Recombinant

Forms (CRF) ไปแล้ว ในขณะที่มี Unique Recombinant Forms (URF) มากมาย ที่แต่ละสายพันธุ์ พบในคนๆเดียวเท่านั้น เพื่อให้การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอชไอวี 1 เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพในพื้นที่ที่ทำการประเมินวัคซีน เอชไอวี 1 ในการศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาวิธีพีซีอาร์ Multi-region subtype specific PCR (MSSP) assay ที่สามารถแยกสายพันธุ์ของไวรัสได้อย่างเฉพาะเจาะจงที่ตำแหน่งต่าง ๆ บนสายของสารพันธุกรรมของไวรัส เพื่อนำมาตรวจเชื้อไวรัสสายพันธุ์ B, C และ CRF01_AE และสายพันธุ์ไวรัสลูกผสมต่างๆ รวมทั้งการติดเชื้อสองสายพันธุ์ในเวลาเดียวกัน หลักการของวิธีที่พัฒนาก็คือ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี 1 ด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ primers ที่มีความเฉพาะต่อไวรัสแต่ละสายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ บนสายของสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี 1 ทั้งหมด 8 ตำแหน่งด้วยกัน จากนั้นทำการตรวจหาสารพันธุกรรมที่ได้รับการเพิ่มปริมาณขึ้นด้วย agarose gel ที่ย้อมด้วย ethidium bromide ส่วน primers ที่ใช้ได้รับการออกแบบจากข้อมูลของสายพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี 1 ใน http://hiv-web.lanl.gov ประสิทธิภาพของ MSSP assay ได้ถูกทำการประเมินโดยการตรวจ DNA ของสายพันธุ์ไวรัสจากอาสาสมัครผู้ใช้สารเสพติดในเขตภาคเหนือของประเทศไทย 41 รายที่ทราบสายพันธุ์แล้วจากวิธีการหาลำดับเบส ซึ่งประกอบด้วย CRF01_AE 33 ราย CRF15_01B 2 ราย และสายพันธุ์ลูกผสมระหว่าง B กับ CRF01_AE ซึ่งเป็น URF 6 ราย MSSP assay มีความไวในการตรวจหาสายพันธุ์ ที่ตำแหน่งต่างๆ ของสารพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 73-100 % และมีความเฉพาะเจาะจงในการตรวจถึง 100 % วิธีการที่พัฒนาขึ้นได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจหาสายพันธุ์ไวรัสในซีรั่มของผู้ติดเชื้อ เอชไอวี 1 ในกลุ่มผู้ใช้สารเสพติดในเขตภาคเหนือของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2542 ถึง 2543 ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการจัดสายพันธุ์ให้กับไวรัสก็คือ การตรวจพบผลบวกของ PCR อย่างน้อย 4 ตำแหน่งบนสายพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี เมื่อใช้เกณฑ์นี้พบว่าตัวอย่าง จำนวน 315 ราย (94%) จาก 337 ราย สามารถถูกจัดสาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ได้ และพบว่ามีการกระจายของสายพันธุ์ของ CRF01_AE จำนวน 77.4% ตามด้วย CRF01_AE/B recombinants 12.2% ส่วน subtype B 3.3% และ CRF01_AE/C recombinant 0.6% ในการนี้ยังสามารถตรวจพบ dual infections คิดเป็น 4.1 % (n = 14) ของตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย CRF01_AE/B duals 3.8% (n=13) และ CRF01_AE/C duals 0.3 % (n=1) วิธี MSSP assay นี้สามารถทำได้ง่าย ราคาประหยัด และเป็นวิธีการตรวจหาสายพันธุ์เชื้อเอชไอวี 1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถทำได้ในตัวอย่างจำนวนมาก และเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการที่มีทรัพยากรจำกัด อีกทั้งวิธีนี้ยังมีความไวในการตรวจหาสายพันธุ์ลูกผสม และการติดเชื้อสองสายพันธุ์ในเวลาเดียวกัน การที่ทราบชนิดของเชื้อ เอชไอวี ในผู้ติดเชื้อใหม่ และเชื้อเอชไอวี ที่แพร่กระจายอยู่เป็นสิ่งสำคัญมากในเรื่องความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ เอชไอวี และการกำหนดความสามารถของวัคซีนที่จะนำมาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved