การใช้ SEROTYPING เพื่อตรวจแยก HIV-1 SUBTYPES ในผู้ติดเชื้อเอดส์ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์กับความสัมพันธ์ทางคลินิก

นางสาวศศิวิมล อุบลแย้ม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-632-946-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17056986

SEROTYPING OF HIV-1 SUBTYPES IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS AT CHULALONGKORN HOSPITAL AND ITS CLINICAL CORRELATION

Miss Sasiwimol Ubolyam

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
1996

ISBN 974-632-946-4

Thesis Title	Serotyping of HIV-1 Subtypes in HIV-Infected Individuals at Chulalongkorn Hospital and Its Clinical Correlation
By	Miss Sasiwimol Ubolyam
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.
Thesis Co-advisor	Dr. Kiat Ruxrungtham, M.D.

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

Santi Thoongsuwan .....Dean of the Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis committee :

Vanna Punnaragsa, MD .....Chairman

(Associate Professor Vanna Punnaragsa, M.D.)

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

(Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.)

Kiat Ruxrungtham, M.D. .....Thesis Co-Advisor

(Dr. Kiat Ruxrungtham, M.D.)

.....Member

(Dr. Chaiyos Kunanusont, M.D., Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ศศิวิมล อุบลแย้ม : การใช้ SEROTYPING เพื่อตรวจแยก HIV-1 SUBTYPES ในผู้ติดเชื้อเอดส์ของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์กับความสัมพันธ์ทางคลินิก (SEROTYPING OF HIV-1 SUBTYPES IN HIV- INFECTED INDIVIDUALS AT CHULALONGKORN HOSPITAL AND ITS CLINICAL CORRELATION) อ.ที่ปรึกษา : ศ.นพ.ประพันธ์ ภานุภาค, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.นพ.เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 99 หน้า. ISBN 974-632-946-4

เพื่อศึกษา HIV-1 subtype ในผู้ติดเชื้อเอดส์ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจแยกชนิด (subtype) ของเชื้อ HIV-1 ขึ้นมาพร้อมๆกัน 2 วิธีคือวิธี serotyping ซึ่งอาศัยหลักการของ Indirect ELISA เปรียบเทียบกับวิธี genotyping โดยใช้เทคนิคของ nested PCR ซึ่งใช้หลักการของการใช้ selective primer ต่อแต่ละ subtype โดยใช้ตัวอย่างที่รู้สายพันธุ์แล้วจากการทำ sequencing analysis จำนวน 5 ตัวอย่างเป็นบรรทัดฐาน เมื่อวิเคราะห์ในผู้ติดเชื้อของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 60 ราย แยกตามกลุ่มเสี่ยงต่างๆคือ Heterosexual, IVDUs และ Homo/bisexual กลุ่มละ 20 ราย พบว่าวิธี serotyping มีความจำเพาะ 100% แต่มีความไวน้อยกว่าวิธี genotyping (sensitivity 70%) ดังนั้นในการตรวจหา HIV-1 subtype ควรใช้ serotyping เป็นวิธีแรกในการตรวจหาเนื่องจากเป็นวิธีที่เร็ว, ประหยัดค่าใช้จ่ายและสามารถตรวจหาได้หลายตัวอย่างในเวลาเดียวกัน ในรายที่ไม่สามารถบอก subtype ได้หรือให้ผลเป็น dual reactive ควรทำการทดสอบโดยวิธี genotyping ต่อไป ส่วนในรายที่ให้ผลลบทั้ง serotyping และ genotyping หรือผลของทั้ง 2 วิธีขัดแย้งกัน ควรทำการตรวจหาต่อโดยวิธี direct sequencing analysis จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HIV-1 subtypes กับการดำเนินโรคทางคลินิกของผู้ติดเชื้อเอดส์ที่มารับการรักษาที่ Immune clinic โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างปี 1989-1994 โดยศึกษาในกลุ่มผู้ติดเชื้อที่ยังไม่มีอาการและมีค่าเริ่มต้นของ CD4 มากกว่า 200 cells/cu.mm. และติดตามการเปลี่ยนแปลงทางคลินิกจากระยะไม่มีอาการไปเป็นระยะ ARC หรือ AIDS และติดตามอัตราการลดลงของ CD4 ในแต่ละปีเป็นเวลา 3 ปี พบว่าค่าเริ่มต้นของ CD4 ในกลุ่ม heterosexuals (n=64) มีค่าต่ำกว่าในกลุ่ม non-heterosexual (n=30) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างในระหว่าง subtype E และ subtype non-E ($p>0.05$) และเมื่อศึกษาอัตราการลดลงของจำนวน CD4 cells ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) จากการศึกษาอัตราการดำเนินโรคจากระยะที่ไม่มีอาการไปเป็นระยะ ARC หรือ AIDS ก็ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างกลุ่มเสี่ยงต่างๆ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเฉพาะในกลุ่ม heterosexual ซึ่งเป็นกลุ่มเสี่ยงที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทยพบว่าในปีที่ 3 ของการติดตาม subtype E มีอัตราการเลวลงของการดำเนินโรคมากกว่า subtype non-E อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเป็นที่น่าสังเกตว่าผลการศึกษานี้ยืนยันรายงานอื่นๆที่ว่าสายพันธุ์จะแพร่ระบาดต่างกันในกลุ่มเสี่ยงที่ต่างกันคือ subtype E พบแพร่ระบาดมากในกลุ่ม heterosexual และ subtype B_{Thai} พบมากในกลุ่มที่ติดยาเสพติด นอกจากนี้ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังเป็นรายงานแรกที่พบว่าในกลุ่ม homo/bisexual ส่วนใหญ่ติดเชื้อ HIV-1 สายพันธุ์ B_{MN} ซึ่งเหมือนกับสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดในแถบทวีปอเมริกาและยุโรป ผลการศึกษานี้ให้ข้อมูลพื้นฐานเพิ่มเติมเกี่ยวกับทางด้านระบาดวิทยาอณูชีวโมเลกุลของเชื้อ HIV-1 และความสัมพันธ์ของสายพันธุ์กับการดำเนินของโรคในผู้ติดเชื้อเอดส์ในประเทศไทย อันจะมีประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคเอดส์ตลอดจนการพัฒนาการรักษาและวัคซีนต่อไปในอนาคต.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C545368 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: SEROTYPING / HIV-1 SUBTYPE / CLINICAL CORRELATION
SASIWIMOL UBOLYAM : SEROTYPING OF HIV-1 SUBTYPES IN HIV-INFECTED INDIVIDUALS AT CHULALONGKORN HOSPITAL AND ITS CLINICAL CORRELATION. THESIS ADVISOR : PROF. PRAPHAN PHANUPHAK, M.D., Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : DR.KIAT RUXRUNGTHAM, M.D. 99 pp. ISBN 974-579-995-5

Studies of HIV-1 subtypes in Thai patients were carried out using 2 different techniques, namely serotyping with specific peptides and genotyping with nested PCR by using selective primer for each subtype. It was found that serotyping was highly specific (100% specificity) but was less sensitive than genotyping (70% sensitivity). Therefore, serotyping would be better suited as a screening test, while genotyping is more applicable in nontypable cases or dual reactive cases by serotyping. If a sample remains untypable after serotyping and genotyping, DNA sequencing anlysis is eventually required.

A cohort of HIV-1 infected individuals who had been followed at the Immune Clinic of Chulalongkorn Hospital between 1989-1994 was analysed to study the correlation between HIV-1 subtypes and natural history of the infection. Those patients with the initial staging of asymptomatic or PGL, a baseline CD4 cell count equal or greater than 200 cells/cu.mm. (n=94) were included. The patients were classified according to their risk factor into heterosexuals, IVDUs and homo/bisexuals. HIV-1 subtyping were done by the serotyping method from stored sera. The Natural history was determined by the clinical progression from asymptomatic or PGL staging to ARC or AIDS, and by the annual rate of CD4 decline. The baseline CD4 cell count in heterosexual group (n=64) was found to be significantly ($p<0.05$) lower than the non-heterosexual group (n=30), but there was no significant difference between the patients with HIV-1 subtype E and non-E ($p>0.05$). The rates of disease progression and CD4 decline was similar among all risk groups. When the heterosexual group, which was the major risk group, was analysed, the individuals carrying subtype E had a significantly higher rate of disease progression than those with subtype non-E in the third year of follow-up ($p<0.05$).

This observations suggests subtype E patients are more likely to progress faster than subtype non-E patients. Interestingly, our results also confirm the previous observed segregation in Thai patients of the HIV-1 subtypes by modes of transmission, i.e., subtype E being present in the majority of heterosexuals, and subtype B_{Thai} in the majority of IVDUs. In addition, this is the first time that subtype B_{MN} not subtype B_{Thai} was found to be the most common HIV variant in Thai homo/bisexuals. This study has provided further understanding of the HIV-1 molecular epidemiology and the correlation between HIV-1 subtypes and the clinical course of Thai HIV patients. This will lead to the future development of better therapeutic modalities and HIV-1 vaccine.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT

The present investigator wishes to express her deep gratitude to the following, who had helped in making this thesis possible.

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

Dr. Kiat Ruxrungtham, the lecturer of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor, for his invaluable advice and constructive criticisms.

Dr. Taweesak Tirawatnapong, the lecturer of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his supporting primers synthesis and guidance in PCR technology.

Dr. Chaiyos Kunanusont, AIDS division, Ministry of Public Health, for investigator's use of statistics and computer expertise.

All the staffs at HIV-AIDS clinic of Chulalongkorn Hospital, for their kind help in collecting the blood specimens and follow up the patients.

Sincere thanks are also given to all 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, the investigator is deeply indept to her advisory committee for their kindness and helpful suggestions for the completeness of this thesis and to her family for their understanding and support during her study period.

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGHLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xii

ABBREVIATIONS.....xiii

CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1

OBJECTIVES.....4

II. LITERATURE REVIEW.....5

HISTORY.....5

ETIOLOGY.....5

HIV-1 BIOLOGY.....6

HIV LIFE CYCLE.....8

Transmission.....8

Target cells.....8

Attachment and Entry.....9

Replication.....9

Genetic control of HIV.....10

Latency, Activation and Trigger factors.....11

IMMUNOPHATHOGENESIS OF HIV..... 12

Depletion of CD4+ T cells

during clinical latency.....14

CLINICAL MENIFESTATIONS OF HIV INFECTION....15

THERAPEUTIC STRATEGIES.....17
Combination therapy.....19
LABORATORY DIAGNOSIS OF HIV INFECTION.....19
ANTIGENIC VARIABILITY.....22
GENETIC DIVERSITY AND WORLDWIDE SUBTYPES.....24
SEGREGATION BY MODE OF TRANSMISSION.....26
III. MATERIALS AND METHODS.....28
PART I. OPTIMIZATION FOR SEROTYPING.....28
1. Study group.....28
2. Normal control.....29
3. Specimen collection.....29
4. Synthetic peptides.....29
5. Serotyping by ELISA.....30
5 Results Readings.....31
II. VALIDATION OF SUBTYPING BY GENOTYPING.....32
1. Sample preparation.....32
2. Primers.....32
3. Amplification technique.....33
4. Positive control group.....34
III. NATURAL HISTORY ANALYSIS.....34
Statistical analysis.....34
IV. RESULTS.....35
PART I. OPTIMIZATION OF SEROTYPING.....35
1. Patient population.....35

2. Setting up the optimal conditions for peptide serotyping by indirect ELISA test using 26 amino acid peptide.....35
3. Setting up the optimal conditions for peptide serotyping by in direct ELISA test using 16 amino acid peptide 37
II. VALIDATION BY GENOTYPING USING NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) 40
III. NATURAL HISTORY OF HIV-1 SUBTYPE....41
1. Patient population.....41
2. HIV-1 subtype analysis.....41
3. Analysis of CD4 cell counts in different HIV-1 subtypes and risk groups.....42
4. Analysis of disease progression 43
V. DISCUSSION.....66
CONCLUSIONS.....71
REFERENCES.....72
APPENDIX I.....88
APPENDIX II.....91
APPENDIX III.....94
CURRICULUM VITAE.....99

LIST OF TABLES

Table Page

I. Potential Mechanism of HIV-induced Cytopathicity.....14
II. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded AIDS surveillance case definition for adolescents and adults.....15
III. Summary of selected primer sequence for genotyping.....44
IV. Summary of pateints in the cross-sectional study of serotyping optimization.....45
V. Comparison of O.D. value between PND-A/PND-B and PND-E/ PND-B_{THAI} of the known sequence sera showing cross-reactivity of the 26 a.a. V3-peptide.....46
VI. Serotyping results by the use of peptide PND-E and PND-B_{THAI}.....47
VII. Comparison of the results between serotyping and genotyping..48
VIII. Comparison of Serotyping and Genotyping Results from 60 pateints.....49
IX. Summary of 18 sero-nontypable results by the subsequent genotyping.....50
X. Summary of pateint population at entry in natural history analysis.....51
XI. Summary of HIV-1 subtypes in the natural history cohort.....52
XII. Summary of CD4 cell counts in the natural history cohort.....53
XIII. Summary of CD4 changes in different risk groups.....54

XIV. Summary of cell counts in different subtypes in asymptomatic or PGL pateints with CD4 ≥ 200 cells/cumm. at entry (Heterosexual group).....55

XV. Summary of CD4 declining rate in different HIV-1 subtypes in asymptomatic or PGL pateints with CD4 ≥ 200 celss/cu.mm. (Heterosexual group).....56

XVI. Summary of cumulative progression in different HIV-1 subtypes from asymptomatic or PGL to ARC or AIDS (Heterosexual group).....57

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Principle of PCR-based genotyping analysis.....58
2. Example of known sequence sample by genotyping.....59
3. Example of non-serotypable sample by genotyping.....60
4. Means of CD4 cell counts of the natural history cohort....61
5. CD4 cell counts among the HIV-1 subtypes in the natural history cohort.....62
6. CD4 cell counts among the different subtypes in the heterosexual group (n=64) 63
7. Analysis of disease progression among the three risk groups.....64
8. Natural courses of HIV-1 infected heterosexuals.....65

ABBREVIATIONS

a.a	=	Amino acid
Ab	=	Antibody
ADCC	=	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
AIDS	=	Acquired Immune Deficiency Syndrome
Ag	=	Antigen
ARC	=	AIDS-related Complex
ARV	=	AIDS- associated retrovirus
B-cells	=	Bursa-derived lymphocytes
BNI	=	Bangkok Neuro Institute
BSA	=	Bovine Serum Albumin
°C	=	Degree Celcius
CD	=	Cluster of differentiation
CDC	=	Centers for Disease Control
cu.mm.	=	cubic millimeter
ddC	=	Dideoxycytidine
ddI	=	Dideoxyinosine
DDW	=	Deionized distilled water
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DW	=	Distilled water
EIA	=	Enzyme Immunoassay
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
env.	=	envelope
et al.	=	et alii

G	=	Relative gravitational force
gm	=	gram
gp	=	glycoprotein
GPGQ	=	Glycine-Proline-Glycine-Glutamine
GPGR	=	Glycine-Proline-Glycine-Arginine
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
HMA	=	Heteroduplex mobility assay
HTLV	=	Human T lymphotropic Virus
i.e	=	id est
Ig G	=	Immunoglobulin class G
IVDU	=	Intravenous drug user
LAS	=	Lymphadenopathy Syndrome
LAV	=	Lymphadenophathy Associated Virus
LTRs	=	Long terminal repeats
mg/l	=	milligram per liter
min(s)	=	minute(s)
ml	=	milliliter
nm	=	nanometer
NNRT	=	Non nucleoside analogue reverse transcriptase
NSI	=	Non Syncytium Inducing
O.D	=	Optical Density
OPD	=	O-Phenylenediamine
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	=	Phosphate buffer saline
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PGL	=	Persistent generalized lymphadenopathy
PND	=	Principal Neutralizing Domain

pol	=	polymerase
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	round per minute
RPMI 1640	=	Rosewell Park Memorial Institute formular 1640
RT	=	Reverese Transcriptase
S.E	=	Standard Error
SI	=	Syncytium Inducing
STD	=	Sexually transmitted disease
T-cells	=	Thymus-derived lymphocytes
µg/ml	=	microgram per milliliter
µl	=	microliter
V3	=	Third variable region
WB	=	Western blot
WHO	=	World Health Organization