QUANTIFICATION OF HIV-1 BY REAL-TIME PCR ASSAY USING SELF-QUENCHED FLUOROGENIC PRIMERS

SOMYING PROMSO

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(CLINICAL PATHOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004**

ISBN 974-04-4819-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจหาปริมาณไวรัส HIV-1 โดยเทคนิค Real-Time PCR ซึ่งใช้ Self -quenched fluorogenic primers เป็นตัวติดตาม (QUANTIFICATION OF HIV-1 BY REAL-TIME PCR ASSAY USING SELF-QUENCHED FLUOROGENIC PRIMERS)

สมหญิง พรหมโส 4436410 RACP/M

วท.ม. (พยาธิวิทยาคลินิก)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วสันต์ จันทราทิตย์, ปร.ด. (จุลชีววิทยา), วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

บทคัดย่อ

ปริมาณ ไวรัส HIV-1 ในกระแสเลือด เป็นค่าพื้นฐานหลักในการประเมินถึงความรุนแรงของโรค นอกจากนี้ยังสามารถใช้ติดตามผลการรักษาได้ การหา ปริมาณ ไวรัส HIV-1 ด้วยเทคโนโลยีของ LightCycler โดย real-time RT-PCR ซึ่งใช้ self-quenched fluorogenic primer หรือ LUX™ primer เป็นตัวติดตามได้ถูกพัฒนาขึ้น ซึ่ง primer เหล่านี้ได้ถูกออกแบบมาให้จำเพาะกับตำแหน่ง *gag* ยีน ของ subtype E and B เป็นหลัก ความจำเพาะจะถูกตรวจสอบโดยการวิเคราะห์จาก melting temperatures กราฟของ external standard ถูกสร้างขึ้นโดยการใช้ค่า serial 10 fold dilutions ของ HIV – gag RNA สังเคราะห์ ในการติดตามจำนวน RNA ในแต่ละรอบของปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นการตรวจวัดสัญญาณของ fluorescent นั้นพบค่าความสัมพันธ์แบบ wide range linear relationship (1 ถึง 10^6 copies / mL) ค่า coefficients of variation ของช่วงเวลาในรอบ PCR ขณะทดสอบตัวอย่าง (intra -) และช่วงการทดสอบระหว่างตัวอย่าง (inter – assay) เป็นร้อยละ 0.72 ถึง 2.54 และ ร้อยละ 3.14 ถึง 8.83 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ว่าวิธีนี้มีความแม่นยำในการทดสอบซ้ำ (reproducibility) ที่ดี

จากพลาสมาของผู้ติดเชื้อ HIV 50 ตัวอย่าง พบว่าวิธี real-time RT-PCR สามารถตรวจวัดปริมาณของ RNA ได้ 30 ตัวอย่าง โดยได้ทำการเปรียบเทียบกับวิธีของ AMPLICOR® HIV-1 Monitor ซึ่งเป็นวิธีที่มีการนำมาใช้เป็นวิธีอ้างอิงอย่างแพร่หลาย

ผลการทดลองพบว่าวิธี AMPLICOR® HIV-1 Monitor และวิธี real-time RT-PCR โดยใช้ LUX™ primer ให้ผลที่สอดคล้องกันดี (good agreement) โดยมีค่า mean difference in log10 copies / mL ± 2 SD เป็น 0.21 ± 1.34

107 หน้า ISBN 974-04-4819-4

QUANTIFICATION OF HIV-1 BY REAL-TIME PCR ASSAY USING SELF-QUENCHED FLUOROGENIC PRIMERS

SOMYING PROMSO 4436410 RACP/M

M.Sc. (CLINICAL PATHOLOGY)

THESIS ADVISORS: WASUN CHANTRATITA, Ph.D., VIRAPHONG LULITANOND, Ph.D.

ABSTRACT

HIV-1 viral load represents a basic marker for evaluation of the severity of HIV-1 related diseases and to monitor the effectiveness of treatment. A method based on real-time RT-PCR technology has been developed for quantification of HIV-1 RNA by using self-quenched fluorogenic primers known as LUX™ primers. In this study they were used to recognize a low variable *gag* region of subtype E and B consensus sequence. Specificity was verified by amplicon melting temperatures. An external standard curve was constructed with serial 10 fold dilutions of a synthetic HIV-gag RNA. A wide range linear relationship (1 up to 10^6 copies/mL) was observed between the number of PCR cycles needed to detect a fluorescent signal and the number of RNA copies. Intra and inter-assay coefficients of variation were 0.72 to 2.54 % and 3.14 to 8.83 % respectively, thus indicating good reproducibility of the method. Thirty out of fifty HIV-infected individual plasma samples were quantified by this method and compared with the AMPLICOR® HIV-1 Monitor assay, which is widely considered a reference technique for HIV-RNA viral load measurement. The results indicated that the AMPLICOR® HIV-1 Monitor assay and real-time RT-PCR using LUX™ primers were in good agreement (mean difference in log10 copies/mL ± 2 standard deviations = 0.21 ± 1.34).

KEY WORDS: HIV VIRAL LOAD/ HIV QUANTIFICATION/ LUX PRIMERS/ REAL TIME RT-PCR/ SELF – QUENCHED FLUOROGENIC PRIMERS

107 pp. ISBN 974-04-4819-4