

**A NEW APPROACH TO ASSESSING THE REVERSE  
TRANSCRIPTASE INHIBITOR SUSCEPTIBILITY OF HUMAN  
IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 USING  
ULTRASENSITIVE REVERSE TRANSCRIPTASE ASSAYS AND  
REAL TIME PCR**

**DUMRONG SAKULPONGYUENYONG**

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

**ISBN 974-04-5026-1  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

**A NEW APPROACH TO ASSESSING THE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR SUSCEPTIBILITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 USING ULTRASENSITIVE REVERSE TRANSCRIPTASE ASSAY AND REAL TIME PCR**

**DUMRONG SAKULPONGYUENYONG 4437289 SCMI/M**

**M.Sc.(MICROBIOLOGY)**

**THESIS ADVISORS: ARUNEE THITITHANYANONT, M.D., WASUN CHANTRATITA, Ph.D., JIRAPORN UNGWITAYADHORN, Ph.D.**

**ABSTRACT**

The potential for drug resistance among HIV-1 viruses has led to the development of drug susceptibility assays. Currently, an ultrasensitive assay has been developed to aid in determining drug susceptibility. This involves obtaining HIV positive supernatant and utilizing an ultrasensitive reverse transcriptase (RT) assay to measure the RT activity. The RT product is then amplified using PCR and post PCR manipulation, such as an Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA). A new approach has been introduced as an alternative assay. The new approach is similar to the current ultrasensitive assay, however, real time PCR is substituted over conventional PCR and post PCR manipulation. In this project, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT) and the wild type HIV-1 virus (HXB2) will be used to simulate and observe benefits from the new approach. Initial observation of this new alternative assay showed increased sensitivity by at least three log fold as compared to the conventional PCR. The alternative approach consumed at least half the amount of time (4 hours) compared to the conventional method. Quantification of the samples was more precise when sample runs were repeated, expenditures were less costly, and the new approach offered a safer procedure with less toxic chemicals used such as Ethidium Bromide. And preliminary results indicate that clinical applications on HIV patients are possible. Overall the new approach offers an alternative method which is comparable if not advantageous to conventional means.

**KEY WORDS: HIV-1 / DRUG SUSCEPTIBILITY / REAL TIME PCR**

78 pp.ISBN 974-04-5026-1

วิธีการใหม่ในการตรวจสอบการดื้อยาต้านไวรัสกลุ่ม reverse transcriptase inhibitor ต่อเชื้อ HIV-1 โดยใช้ Ultrasensitive reverse transcriptase assay ร่วมกับ Real-time PCR (A NEW APPROACH TO ASSESSING THE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR SUSCEPTIBILITY OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 USING ULTRASENSITIVE REVERSE TRANSCRIPTASE ASSAY AND REAL TIME PCR)

คำรงค์ สกุลพงษ์ชัยนง 4437289 SCMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อรุณี ธิดิษฐ์ญานนท์, MD., วสันต์ จันทราพิศย์, Ph.D.,  
จิรภรณ์ อังวิทยาธร, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

อัตราการเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อ HIV-1 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเริ่มใช้ยาต้านไวรัส แต่เนื่องจากความสามารถในการดื้อยาของเชื้อไวรัส ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจวัดความไวต่อยาของเชื้อไวรัสจึงเกิดขึ้น ในการวิจัยนี้ได้มีการพัฒนาวิธีตรวจวัดความไวของเชื้อไวรัสต่อยาที่มีความไวสูง (Ultrasensitive assay) โดยการนำของเหลวที่มีเชื้อ HIV มาตรวจวัดโดยวิธี Ultrasensitive reverse transcriptase assay โดยเริ่มต้นจะใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะถูกนำไปเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR และขบวนการหลังจากทำ PCR เช่น วิธี ELISA สำหรับการวิจัยครั้งนี้ได้เสนอทางเลือกใหม่ที่คล้ายกับวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน แต่ใช้ Real time PCR แทนที่วิธี PCR ปกติและขบวนการหลังจากทำ PCR การวิจัยนี้ใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase จาก avian myeloblastosis virus ในการทดลองและสังเกตผล การทดสอบเบื้องต้นพบว่าวิธีใหม่นี้สามารถเพิ่มความไวในการตรวจสอบขึ้นอย่างต่ำ 3 เท่าในมาตรา log และใช้เวลาการตรวจสอบลดลงจากเดิมครึ่งหนึ่งโดยเปรียบเทียบกับวิธี PCR ปกติ และการทดลองซ้ำพบว่าความแม่นยำของการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะเพิ่มขึ้น วิธีการตรวจสอบใหม่นี้จะลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบต่อหนึ่งตัวอย่างลงอย่างมากทั้งเป็นวิธีที่ปลอดภัยจากสารเคมีอันตราย เช่น Ethidium Bromide โดยสรุปแล้ววิธีใหม่นี้เสนอทางเลือกใหม่ในการตรวจสอบการดื้อยาของเชื้อไวรัสซึ่งมีผลไม่ด้อยไปกว่าวิธีเดิมเลย