

**Thesis Title** Quantitative Detection of HIV-1 RNA in Plasma by Using In-House Real-Time Polymerase Chain Reaction

**Author** Mr Sirichai Sitthiprasert

**Degree** Master of Science (Medical Technology)

**Thesis Advisor** Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai

## ABSTRACT

**Background:** HIV-1 viral load assay represents an important tool monitoring virological status of HIV-1 infection and success of therapy. During recent the decade, the used of anti-retroviral drug treatment has been scaling up in most countries. Thus, the need for low-cost viral load assay is an urgent issue.

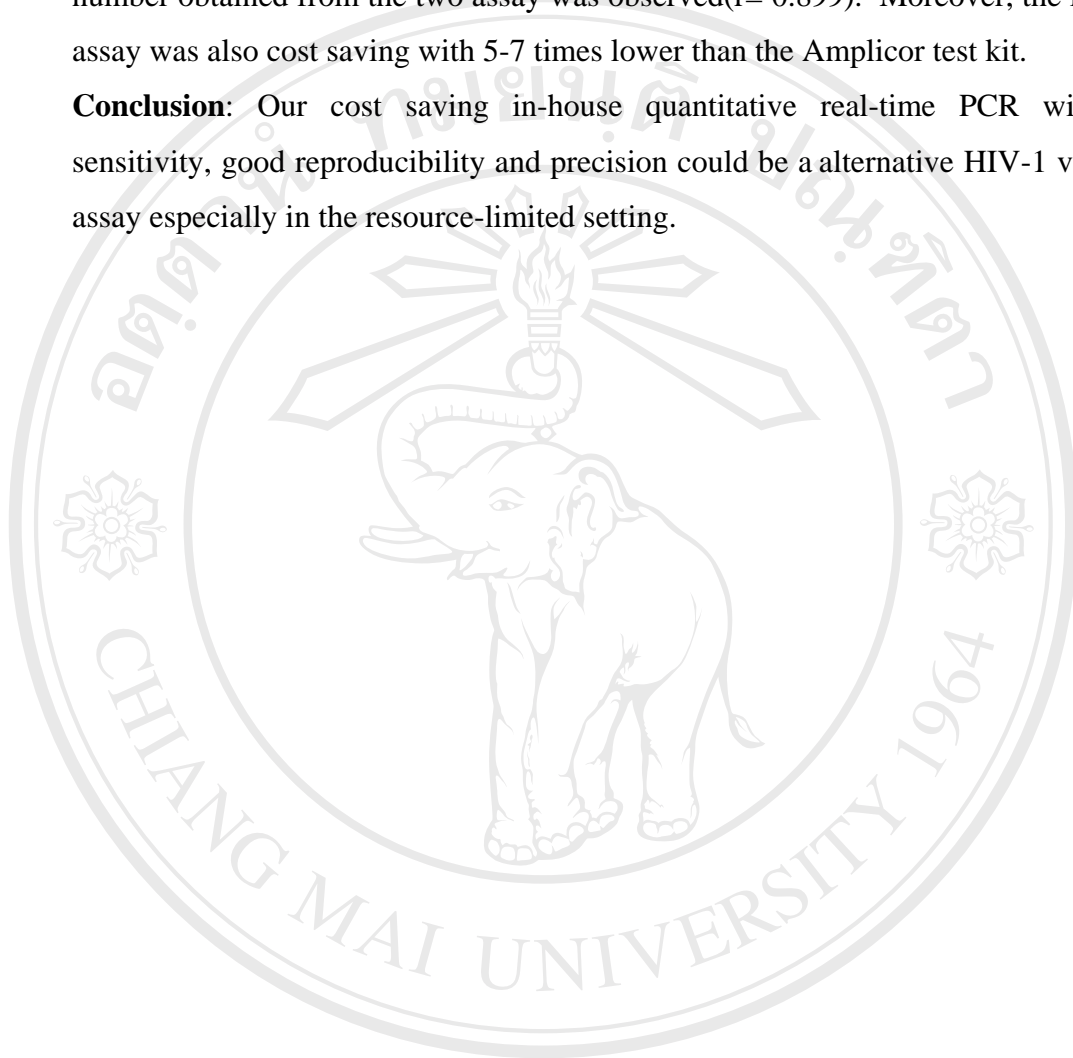
**Objectives:** To develop a low-cost quantitative real-time PCR assay for measuring HIV-1 viral load in plasma samples and validate the assay with the Amplicor™ HIV-1 Monitor test kit (Roche Diagnostic Inc., USA).

**Methods:** Quantitative in-house assay was performed by using real-time PCR technology on LightCycler™. Primers and TaqMan probe were design to amplify the *gag* region of HIV-1 RNA. Quantification of the viral RNA in plasma samples were based on the external standard curve prepared from HIV-1 positive pool plasma. Ninety-six HIV-1 positive and 10 HIV-1 negative plasma samples were assayed for HIV-1 viral load and compared with the Amplicor test kit.

**Results:** The in-house assay developed in this study has high sensitivity; 100% detection at 100 RNA copies/ml and 70% detection at 50 copies/ml, good reproducibility with a mean inter-assay variation of 4.5% and good precision with a

mean intra-assay variation of 0.94% on the cycle threshold ( $C_T$ ) basis. When compared with the Amplicor test kit, a high correlation between log<sub>10</sub> RNA copies number obtained from the two assay was observed ( $r= 0.899$ ). Moreover, the in-house assay was also cost saving with 5-7 times lower than the Amplicor test kit.

**Conclusion:** Our cost saving in-house quantitative real-time PCR with high sensitivity, good reproducibility and precision could be a alternative HIV-1 viral load assay especially in the resource-limited setting.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจหาปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ที่ 1 ในพลาสมาโดยวิธีเรียลไทม์โพลีเมอเรสเซนรีเอคชันที่พัฒนาขึ้นเอง
ผู้เขียน	นาย ศิริชัย สัทธประเสริฐ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. ปราณิ ลีชนะชัย
	<b>บทคัดย่อ</b>

**ที่มาและปัญหา:** การตรวจหาปริมาณไวรัส HIV-1 เป็นวิธีที่สำคัญที่ใช้ประเมินภาวะการติดเชื้อ และ ตรวจติดตามผู้ป่วยหลังการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ดังนั้นความต้องการวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัสต้นทุนต่ำจึงเป็นประเด็นที่เร่งด่วน ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา มีการใช้ยาต้านไวรัส HIV-1 เพิ่มขึ้นในหลายประเทศ

**วัตถุประสงค์:** เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณไวรัส HIV-1 ในน้ำเหลืองโดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ที่มีต้นทุนต่ำ และประเมินผลโดยเปรียบเทียบกับชุดตรวจสำเร็จรูป Amplacor™HIV-1 Monitor 1.5 test kit (Roche Diagnostic, Inc., USA)

**วิธีการ:** วิธีการตรวจปริมาณ HIV-1 ที่ผลิตขึ้นเอง ใช้หลักการการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HIV-1 โดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์ ด้วยเครื่อง LightCycler™ โดยการออกแบบ Primers และ TaqMan Probe ที่จำเพาะกับเชื้อ HIV-1 ที่ตำแหน่งของยีน gag และ กำหนดหาหาปริมาณ RNA โดยใช้ external standard curve เตรียมจากการผสมน้ำเหลืองของผู้ป่วยเอดส์ที่มีปริมาณไวรัสสูงรวมกัน ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบชุดตรวจที่ผลิตขึ้นเอง กับน้ำเหลืองของ

ผู้ป่วยที่ให้ผลบวกต่อ HIV-1 จำนวน 96 ราย และผู้ป่วยที่ให้ผลลบ จำนวน 10 ราย โดยเปรียบเทียบกับชุดตรวจ Amplicor™ HIV-1 Monitor test kit

**ผลการทดลอง:** ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าชุดตรวจที่พัฒนาขึ้นเองมีความไวสูงสามารถตรวจหาปริมาณ HIV-1 RNA ต่ำสุดที่ 50 ได้ 70% และ 100 copies/ml ได้ 100% และให้ความเที่ยงตรงในการตรวจวัด โดยค่าเฉลี่ยความแปรปรวนในระหว่างการทดสอบ (inter-assay variation) เท่ากับ 4.5% และความเที่ยงตรงในการทดสอบ (intra-assay variation) เท่ากับ 0.94% ในเมื่อคำนวณจากค่า  $C_T$  และเมื่อเปรียบเทียบค่า  $\log_{10}$  ของปริมาณ RNA ที่ตรวจวัดโดยวิธีที่พัฒนาขึ้นเองกับชุดตรวจสำเร็จรูป พบว่ามีความสัมพันธ์ที่สูง ( $r=0.899$ ) ยิ่งกว่านั้นพบว่า วิธีที่พัฒนาขึ้นเองมีราคาถูกกว่า 5-7 เท่าเมื่อเทียบกับชุดตรวจ Amplicor™ HIV-1 Monitor

**สรุปผลการทดลอง:** ชุดตรวจหาปริมาณไวรัสที่พัฒนาขึ้นเองโดยวิธีเรียลไทม์พีซีอาร์มีความไว, ความเที่ยงตรง และ แนนอนสูง สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาปริมาณไวรัส HIV-1 ได้โดยเฉพาะประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด