Thesis Title	Development of an Oligonucleotide Ligation Assay (OLA) for the Detection of HIV-1 Drug-Resistant Mutation
Author	Miss Sirikwan Dokuta
Degree	Master of Science (Health Sciences)
Thesis Advisory Committee	Professor Thira Sirisanthana — Advisor Professor Dr. Niwat Maneekarn — Co-advisor Dr. Utaiwan Utaipat — Co-advisor

ABSTRACT

HIV/AIDS remains a public health problem worldwide including Thailand. Antiretroviral therapy (ART) has been a major factor contributing to the reduction of HIV-related morbidity and mortality in the past decade, where drugs were available. However, the emergence of viral resistant strains to ART and the transmission of HIV-1 drug resistance variants have been a cause of treatment failure and limit options for alternative antiretroviral regimens. In these situations, HIV-1 drug resistant (HIV-1 DR) screening and monitoring may be useful in guiding the choice of therapeutic regimens by identifying drugs that are unlikely to suppress viral replication. At present, HIV-1 DR variants can be identified based on the phenotypic and/or genotypic determination. However, due to the requirement of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

expensive equipments, infrastructure, and skilled personnel of both assays, it is difficult to implement these assays to resource-limited areas.

In this study, the probe-based oligonucleotide ligation assay (OLA) has been proposed as an alternative method to the sequence-based method of HIV-1 drug resistance detection. The OLA is a rapid, specific and sensitive tool for the detection of known point mutations. The assay principle is based on the covalent joining of two adjacent oligonucleotide probes, at the position where mutation has occurred, by a thermostable DNA ligase when they are hybridized to a DNA template, usually a PCR product. In our study, we developed an OLA for detecting M184V variant associated with Lamivudine (3TC) and Emtricitabine (FTC) resistance of Human Immunodeficiency Virus type 1(HIV-1) subtype CRF01_AE, the predominant subtype circulating in the Thai population.

The mixture of the amplified PCR products derived from the plasmid control representing the wild-type (184M) and mutant (184V) were used to assess the low detection limit that the presence of 3-5% of mutant in the wild-type background were detected, or as low as 1% of some variant in the PCR products could be detected by OLA ($p<0.005$). The performance was assessed on the archival plasma specimens (N = 40) from HIV-1 infected patients who were diagnosed as treatment failure and received genotyping by the standard sequencing method. The results by the sequencing method indicated that 30 samples were exclusively 184V-mutant genotype, 7 samples were 184M-wild-type, 1 sample was the mix of wild-type and 184V-mutant and 2 samples were exclusively 184I-mutant. The results of the HIV-1 M184V OLA revealed that, of 40 clinical specimens, 28 samples were 184V-mutant genotype, 9 samples were 184M-wild-type genotype, 1 sample was the mix of wild-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

type and mutant and 2 samples were indeterminate result. Because our current OLA was not designed for 184I detection, thus, the 2 samples with 184I were removed from the analysis. Therefore, in this study, a concordance of 90%, the overall sensitivity of 93.5%, and the overall specificity of 100% by OLA compared with the standard sequencing were achieved. The application of OLA with the reference plasmids control was proved reliable to detect HIV-1 M184V mutation with high sensitivity. In conclusion, the HIV-1 DR detection using OLA was successfully developed for M184V variants emergence in the Thai population and may adopt to use in resource-poor settings.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธี Oligonucleotide Ligation Assay (OLA) สำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อไวรัสเอชไอวี 1

ผู้เขียน นางสาวศิริขวัญ ดอกอุทา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์สุขภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. นพ. ธีระ ศิริสันธนะ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. อุทัยวรรณ อุทัยพัฒน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคเอดส์และการติดเชื้อไวรัสเอชไอวียังคงเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านสาธารณสุขที่พบได้ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย การใช้ยาต้านไวรัสเอชไอวีในพื้นที่ที่มีการเข้าถึงยาถือว่าเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้อัตราการป่วยและตายจากโรคเอดส์ลดลงในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา อย่างไรก็ตามปัญหาเรื่องการเกิดเชื้อไวรัสที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสและการได้รับเชื้อหรือการแพร่กระจายของเชื้อที่ดื้อยาถือว่าเป็นปัญหาหลักและปัญหารองที่ทำให้การรักษาด้วยยาล้มเหลวและจำกัดทางเลือกใช้ยาต้านไวรัสสูตรต่างๆ ในสถานการณ์เช่นนี้การตรวจเบื้องต้นและการตรวจติดตามหาเชื้อไวรัสเอชไววีที่ดื้อยาจึงเป็นประโยชน์ต่อการเลือกสูตรยาต้านไวรัสที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเอชไอวีได้อย่างเหมาะสม ปัจจุบันการตรวจหาเชื้อไวรัสเอชไอวีที่ดื้อยาจะใช้การตรวจทางด้านฟีโนทัยป์และจีโนทัยป์เป็นหลัก อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดของทั้งสองวิธีทั้งในเรื่องของเครื่องมือที่มีราคาแพง ความยากของขั้นตอนการตรวจ รวมถึงต้องมีบุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจ ทำให้การตรวจทั้งสองวิธียากต่อการนำไปใช้ในพื้นที่ที่มีความจำกัดทางด้านต่างๆ

ในการศึกษาครั้งนี้วิธี Oligonucleotide Ligation Assay (OLA) เป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้เป็นวิธีทางเลือกสำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสเอชไอวีที่กลายพันธุ์และดื้อต่อยาต้านไวรัสเอชไอวีนอกเหนือจากวิธีมาตรฐานที่ต้องตรวจการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของเชื้อไวรัสเอชไอวี หลักการของวิธี OLA จะเป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสเอชไอวีที่ทราบตำแหน่งของการกลายพันธุ์แล้ว โดยอาศัยการเชื่อมต่อกันของ Oligonucleotide probes 2 ชนิด ที่ถูกออกแบบมาเพื่อจับแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำเพาะกับสายดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสที่เกิดการกลายพันธุ์ โดยตำแหน่งที่ probe เชื่อมต่อกันนั้นจะตรงกับตำแหน่งของ codon บนสายดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์พอดี การเชื่อมต่อกันของ probes ที่จับกับสายดีเอ็นเอที่ส่วนใหญ่เป็นผลิตผลของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (พีซีอาร์) นั้น จะต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ thermostable DNA ligase ในการเชื่อมต่อ probes ดังกล่าว วิธี OLA นี้เป็นวิธีที่ทำได้อย่างรวดเร็ว รวมถึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะในการตรวจสูง ในการศึกษานี้ได้พัฒนาวิธี OLA เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส HIV-1 สายพันธุ์ CRF01_AE ที่กลายพันธุ์ชนิด M184V และดื้อต่อยาต้านไวรัสลามิวูดีนหรือสามทีซี (Lamivudine, 3TC) และยาเอ็มทริซิตาบีนหรือเอฟทีซี (Emtricitabine, FTC)

ในการใช้วิธี OLA เพื่อตรวจหาเชื้อเอชไอวีที่กลายพันธุ์ชนิด M184V ในตัวอย่างตรวจที่มีส่วนผสมระหว่าง Plasmid controls ของเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ดั้งเดิมชนิด 184M และเชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์ชนิด 184V ที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมาแล้ว ผลที่ได้พบว่าวิธี OLA ที่ถูกพัฒนาขึ้นมานี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสเอชไอวีที่ดื้อยาและกลายพันธุ์ชนิด 184V ได้ในระดับต่ำสุดคืออย่างน้อย 3-5% ท่ามกลางเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ดั้งเดิม หรือตรวจพบได้ในระดับต่ำสุดที่ 1% ของเชื้อบางสายพันธุ์ ($p<0.005$) ในการประเมินความสามารถของวิธี OLA ในการตรวจหาเชื้อ HIV-1 ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง M184V โดยการทดสอบในตัวอย่างตรวจที่เป็นพลาสมาของผู้ป่วยที่ถูกวินิจฉัยว่ามีภาวะของการรักษาด้วยยาต้านไวรัสล้มเหลว ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 40 ตัวอย่างและเป็นตัวอย่างที่ทราบผลการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสเอชไอวีด้วยวิธีหาลำดับนิวคลีโอไทด์วิธีมาตรฐานแล้ว พบว่ามี 30 ตัวอย่างที่พบเชื้อไวรัสเอชไอวีที่กลายพันธุ์ชนิด 184V, มี 7 ตัวอย่างที่พบเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ดั้งเดิมชนิด 184M และมี 1 ตัวอย่างตรวจที่พบทั้งเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อที่กลายพันธุ์ชนิด 184V และอีก 2 ตัวอย่างตรวจที่พบเชื้อไวรัสเอชไอวีที่กลายพันธุ์ชนิด 184I ในขณะที่ผลการตรวจด้วยวิธี OLA จากจำนวนตัวอย่างตรวจทั้งหมดพบว่ามี 28 ตัวอย่างที่พบเชื้อไวรัสเอชไอวีที่กลายพันธุ์ชนิด 184V, มี 9 ตัวอย่างที่พบเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ดั้งเดิมชนิด 184M, มี 1 ตัวอย่างตรวจที่พบทั้งเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์ดั้งเดิมและเชื้อที่กลายพันธุ์ นอกจากนั้นมีตัวอย่างตรวจอีก 2 ตัวอย่างที่ไม่สามารถแปลผลได้ แต่เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้วิธี OLA ไม่ได้ถูกออกแบบมาเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสที่กลายพันธุ์ชนิด M184I ดังนั้นข้อมูลของตัวอย่างตรวจทั้ง 2 ตัวอย่างที่มีการกลายพันธุ์ชนิด M184I จึงไม่ถูกนำมาใช้ในการประเมินผล ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่าผลการประเมินความสามารถของวิธี OLA เปรียบเทียบกับวิธีการหาลำดับด้วยวิธีมาตรฐานมีความสอดคล้องกัน 90% มีความไวในการตรวจ 93.5% และมีความจำเพาะในการตรวจ 100% นอกจากนั้นยังพบว่าวิธี OLA มีความไวสูงในการตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง M184V ใน Plasmid controls ของเชื้อไวรัสเอชไอวีสายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อ้างอิง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าวิธี OLA ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นมานี้เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อ HIV-1 ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง M184V ที่พบได้มากในประชากรไทยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพื้นที่ที่ขาดแคลนอุปกรณ์ทางการแพทย์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved