



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การวิเคราะห์ระดับ T-cell receptor gene rearrangement excision circles ภายหลังได้รับ HAART ใน ผู้ติดเชื้อเอชไอวี-1 ที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส

โดย รศ. ดร. สาคร พรประเสริฐ

เดือนกันยายน พ.ศ. 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การวิเคราะห์ระดับ T-cell receptor gene rearrangement excision circles ภายหลังได้รับ HAART ใน ผู้ติดเชื้อเอชไอวี-1 ที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส

รศ. ดร. สาคร พรประเสริฐ
ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5380045

ชื่อโครงการ : การวิเคราะห์ระดับ T-cell receptor gene rearrangement excision circles ภายหลังได้รับ HAART ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส

ชื่อนักวิจัย : รศ. ดร. สาคร พรประเสริฐ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address: sakornmi001@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (มิถุนายน พ.ศ. 2553 – กันยายน 2555)

วัตถุประสงค์: T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) เป็นยีนผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการจัดเรียงยีนกำหนดการสร้าง T-cell receptor ระหว่างเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซต์ภายในต่อมไทมัส ระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการได้รับยาต้านไวรัสชนิด highly active antiretroviral therapy (HAART) เป็นดัชนีบ่งชี้การฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงผลกระทบของการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสด้วยยาต้านจุลชีพก่อนได้รับ HAART ต่อการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4 T-cell และ TRECs ภายหลังได้รับ HAART

วิธีการศึกษา: เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ติดเชื้อเอชไอวีจำนวน 44 ราย จำแนกเป็น 2 กลุ่มได้แก่กลุ่มที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสจำนวน 31 รายและกลุ่มผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพอยู่ก่อนรับ HAART จำนวน 13 ราย ตรวจวัดและเปรียบเทียบค่า CD4 T-cells และระดับ TRECs ณ เดือนที่ 0 (baseline) เดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART ระหว่างสองกลุ่ม นอกจากนี้วิเคราะห์หาปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART โดยวิธี Univariate และ multivariate logistic regression models

ผลการทดลอง: ภายหลังได้รับ HAART เป็นเวลา 6 เดือนพบว่าค่าการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4 T-cells ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่าในกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสก่อนได้รับ HAART (151 ต่อ 89 cells/ μ L; $p = 0.05$) อย่างไรก็ตามลักษณะแนวโน้มดังกล่าวไม่ปรากฏในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART (120 ต่อ 149 cells/ μ L; $p = 0.84$) นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสพบระดับ TRECs ใน

เดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ TRECs ในเดือนที่ 0 (baseline ก่อนการได้รับ HAART) สำหรับกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสก่อนได้รับ HAART พบมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs เฉพาะในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART เท่านั้น อย่างไรก็ตามระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้นทั้งในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART ระหว่างผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.90$ และ 0.66 , respectively) นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART ซึ่งเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 1 เท่าของระดับ TRECs ณ baseline มีความสัมพันธ์กับการมีค่า CD4⁺ T-cells ในเดือนที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART มากกว่า 200 cells/ μ L

สรุปผลการศึกษา: การรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสด้วยยาต้านจุลชีพก่อนได้รับ HAART ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4⁺ T-cells และการทำงานของต่อมไทมัส อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาในกลุ่มประชากรที่มีจำนวนมากขึ้นและเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4⁺ T-cells และ TRECs ในแต่ละชนิดของโรคติดเชื้อฉวยโอกาส พร้อมทั้งศึกษาระดับ TRECs ในกลุ่มประชากรย่อย CD45RO⁺ และ CD45RA⁺ ของทั้ง CD4 และ CD8 T-cells

คำหลัก: CD4⁺ T-cells; Highly Active Antiretroviral Therapy; HIV; Opportunistic infections; T-cell receptor rearrangement excision circles

Abstract

Project Code: MRG5380045

Project Title: T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) levels over one-year highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-infected patients with no or treated opportunistic infections at HAART initiation.

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Sakorn Pornprasert

E-mail Address: sakornmi001@yahoo.com

Project Period: 2 years (June 2010 – September 2012)

Background: T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) are byproducts of T-cell receptor gene rearrangements, generated during lymphocyte maturation in the thymus. An increase of TRECs levels after highly active antiretroviral therapy (HAART) initiation is an indicator of immune reconstitution. There is no report whether treating opportunistic infections (OIs) prior to HAART initiation affects immune reconstitution on HAART. The objective of this study was to assess whether treating opportunistic infections (OIs) prior to HAART initiation affects CD4 T-cells recovery and TRECs in patients on HAART.

Methods: Blood samples were collected from 44 HIV-infected patients, 31 presenting no OIs and 13 with treated OIs at HAART initiation. CD4 T-cells and TRECs were measured at baseline, 6 and 12 months HAART and compared between patients presenting no OIs and those with treated OIs. Univariate and multivariate logistic regression models were used to identify potential factors associated with low TREC increase after 12 months HAART.

Results: Patients presenting no OIs tended to have higher CD4 T-cell gain than those with treated OIs (151 vs. 89 cells/ μ L; $p = 0.05$) after 6 months HAART but not after 12 months HAART (120 vs 149 cells/ μ L; $p = 0.84$). Among patients presenting no OIs, TREC levels significantly increased from baseline through 12 months HAART while among those with treated OIs, there was a trend for increase only after 12 months. However, TREC increases were not significantly different between the two groups after 6 and 12 months

HAART ($p = 0.90$ and 0.66 , respectively). Moreover, there was a significantly low TREC increase when patients had CD4 T-cells $>200/\mu\text{L}$ after 6 months HAART (OR = 9.0; 95%CI: 0.9-88.2; $p = 0.03$).

Conclusions: Treatment of OIs prior to HAART does not lead to impaired CD4 T-cells recovery and thymic outputs. However, immune reconstitution may differ according to the type of OIs therefore the study in larger population with different type of OIs should be performed. Moreover, the levels of TREC in the memory or naïve sub-populations (CD45RO^+ and CD45RA^+) of both CD4 and CD8 T-cell should be also analyzed.

Key words: CD4 T-cells; Highly Active Antiretroviral Therapy; HIV; Opportunistic infections; T-cell receptor rearrangement excision circles

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการทำวิจัย

T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) คือเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการจัดเรียงยีนกำหนดการสร้าง T-cell receptor ของ progenitor T-cell ซึ่งเกิดขึ้นภายในต่อมไทมัสเท่านั้น และระดับ TRECs มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อเอชไอวี และการดำเนินของโรค จึงสามารถใช้ TRECs เป็นตัวชี้วัดร่วมในการประเมินผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัสในผู้ป่วยดังกล่าว การได้รับยาด้านจุลชีพฉวยโอกาสก่อนรักษาด้วย HAART ช่วยลดอัตราการเกิดการอักเสบเนื่องจากการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกัน (immune reconstitution inflammatory syndrome; IRIS) ในผู้ป่วยเอดส์จากเดิม 25% ลงเหลือประมาณ 2% อย่างไรก็ตามผลกระทบของยาด้านจุลชีพฉวยโอกาสต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ TRECs ยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจัง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสภายหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART ในระยะเวลา 1 ปี
2. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันระหว่างติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสภายหลังได้รับการรักษาด้วย HAART
3. วิเคราะห์ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs

ระเบียบวิธีวิจัย

1. เก็บตัวอย่างเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวีก่อนเข้ารับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART จาก 2 โรงพยาบาล ได้แก่ โรงพยาบาลสันป่าตองและโรงพยาบาลนครพิงค์ จ.เชียงใหม่ ซึ่งคุณสมบัติของผู้เข้าร่วมโครงการประกอบด้วย
 - เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่อายุมากกว่า 15 ปี
 - ไม่มีประวัติเคยได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสมาก่อน
 - เป็นผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสและได้รับการรักษาด้วยยาด้านจุลชีพมาแล้ว หรือเป็นผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อฉวยโอกาสมาก่อนได้รับ HAART
 - ไม่มีประวัติเป็นโรคพิษสุราเรื้อรังหรือการใช้สารเสพติด
 - ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

โดยเจาะเก็บตัวอย่างเลือดในเดือนที่ 0 (baseline ก่อนได้รับ HAART) เดือนที่ 6 และ 12 หลังได้รับ HAART

2. ตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยา การเพิ่มขึ้นของ CD4 T-cells และระดับ TRECs พร้อมทั้งเปรียบเทียบค่าการเพิ่มขึ้นของ CD4 T-cells และระดับ TRECs ในเดือนที่ 6 และ 12 เดือนของการได้รับ HAART ระหว่างผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดเชื้อฉวยโอกาสและได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพอยู่ก่อนได้รับ HAART กับผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่มีประวัติติดเชื้อฉวยโอกาส
3. วิเคราะห์ปัจจัยต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs

ผลงานวิจัยสามารถสรุปได้ดังนี้

1. มีการเพิ่มขึ้นของ CD4 T-cell counts ทั้งผู้ป่วยติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส ภายหลังได้รับยาต้านไวรัสชนิด HAART เป็นเวลา 6 และ 12 เดือน นอกจากนี้พบมีแนวโน้มของ CD4 T-cells ที่เพิ่มขึ้น (CD4 T-cells gain) ในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส สูงกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสในเดือนที่ 6 ภายหลังได้รับ HAART แต่ไม่มีความแตกต่างกันในเดือนที่ 12 อีกทั้งปริมาณไวรัสในพลาสมาของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มลดลงจนถึงระดับที่ตรวจวัดไม่ได้ (น้อยกว่า 50 copies/ml) ภายหลังการรักษาด้วย HAART เป็นเวลา 12 เดือน
2. ระดับ TRECs ในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเดือนที่ 0 (baseline) ต่อเนื่องไปจนถึงเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART ขณะที่ผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพอยู่ก่อนได้รับ HAART พบมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs เฉพาะในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART อย่างไรก็ตามระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสองทั้งในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART
3. การเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART ซึ่งเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 1 เท่าของระดับ TRECs ณ baseline มีความสัมพันธ์กับการมีค่า CD4 T-cells ในเดือนที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART มากกว่า 200 cells/ μ L

ผลที่ได้รับจากงานวิจัย

ผลงานวิจัยได้รับการตอบรับให้ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติจำนวน 1 เรื่อง และอยู่ในระหว่าง re-submission จำนวน 1 เรื่อง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	III
Abstract	V
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	VII
เนื้อหางานวิจัย:	1-19
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
วิธีทดลอง	2
ผลการทดลอง	5
บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	15
ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต	18
เอกสารอ้างอิง	18
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	20
ภาคผนวก	21

บทนำ

ยาต้านไวรัสชนิด HAART มีบทบาทในการลดอัตราการเสียชีวิตในผู้ติดเชื้อเอชไอวีลงอย่างมาก (1) เช่นเดียวกับการความสามารถในการควบคุมการเพิ่มจำนวนไวรัสในกระแสเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามประมาณร้อยละ 25 ของผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสแล้วจะแสดงอาการทางคลินิกที่ขัดแย้งกับผลสัมฤทธิ์ของการรักษา (paradoxical clinical deterioration) ที่ทราบต่อมาว่าเป็นภาวะอักเสบอันเนื่องมาจากการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกัน (immune reconstitution inflammatory syndrome; IRIS) (2, 3) โดยส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นภายในช่วงเวลา 2 เดือนแรกหลังเริ่มการรักษาด้วย HAART อาการอักเสบรุนแรงนี้เป็นผลจากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยที่เคยเสียไปเริ่มฟื้นกลับคืนทำหน้าที่ได้ จึงตอบสนองต่อการกระตุ้นจากตัวเชื้อหรือแอนติเจนของเชื้อจุลชีพฉวยโอกาสที่เคยรับมาและหลงเหลืออยู่ในร่างกายของผู้ป่วย นอกจากนี้ค่า CD4 T-cells ที่ลดต่ำลง ณ เวลาเริ่มรักษาด้วย HAART เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะทำให้เกิดการพัฒนาไปเป็น IRIS ในประเทศที่กำลังพัฒนาโดยมากผู้ติดเชื้อเอชไอวีมักแสดงอาการของโรคเอดส์ระยะเต็มขั้นและมีอาการของโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (OIs) ในระยะท้ายๆ ของการติดเชื้อเอชไอวี (4, 5) ดังนั้นการป้องกันไม่ให้เกิด IRIS ขึ้น ผู้ป่วยจะได้รับยาต้านจุลชีพเพื่อรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสก่อนเริ่มการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART (6, 7)

ต่อมไธมัสเป็นแหล่งกำเนิดแรกของเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวอ่อน (naïve T-cell) และยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างและรักษา T-cells ในกระแสเลือด (peripheral T-cell pool) (8) โดยต่อมไธมัสจะมีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเข้าสู่ช่วงวัยแรก หลังจากนั้นทั้งขนาดและการทำงานของต่อมจะค่อยๆ ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (9) กระนั้นแล้วต่อมไธมัสยังมีความสามารถในการผลิต T-cells ในผู้ใหญ่และเป็นองค์ประกอบสำคัญของการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาด้วย HAART (10) การประเมินอัตราการผลิต naïve T-cells จากต่อมไธมัสได้โดยมีสิ่งบ่งชี้คือการวัดระดับ T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการจัดเรียงยีนที่กำหนดการสร้าง T-cell receptor โดย TRECs เป็น DNA วงกลมที่ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มตามการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นเหตุให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวถูกเจือจางลงตามปริมาณเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (11) ในผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสพบว่ามีระดับ TRECs ใน T-cells และเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ต่ำลง (10, 12) โดยระดับ TRECs ที่ลดลงอย่างรวดเร็วที่พบในผู้ติดเชื้อเอชไอวีนี้น่าจะเกิดจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ memory T-cells อย่างมากภายหลังการกระตุ้นอย่างต่อเนื่องด้วยเชื้อก่อโรค และเกิดจากความบกพร่องของต่อมไธมัสที่มีอัตราการผลิตและปลดปล่อยเซลล์ออกมาได้ลดน้อยลง (13) การรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีด้วย HAART นั้นนอกจากสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว ยังสัมพันธ์กับการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันและการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ซึ่งคาดว่าเกิดจากการที่ต่อมไธมัสสามารถทำงานได้ดีขึ้น (10) อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่

ได้รับการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสอยู่ก่อนเริ่มรับ HAART มีผลต่อการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันหรือไม่อย่างไร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสภายหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART ในระยะเวลา 1 ปี
2. เพื่อเปรียบเทียบอัตราการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันระหว่างติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส ภายหลังได้รับการรักษาด้วย HAART
3. วิเคราะห์ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs

วิธีทดลอง

กลุ่มตัวอย่าง

ผู้เข้าร่วมโครงการที่เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากผู้เข้าร่วมโครงการจำนวน 44 รายจาก 2 โรงพยาบาลคือ โรงพยาบาลสันป่าตองและโรงพยาบาลนครพิงค์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยคุณสมบัติของผู้เข้าร่วมโครงการประกอบด้วย

- เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่อายุมากกว่า 15 ปี
- ไม่มีประวัติเคยได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสมาก่อน
- เป็นผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสและได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพมาแล้ว หรือเป็นผู้ที่ไม่เคยติดเชื้อฉวยโอกาสมาก่อนได้รับ HAART
- ไม่มีประวัติเป็นโรคพิษสุราเรื้อรังหรือการใช้สารเสพติด
- ยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

ผู้เข้าร่วมโครงการได้ลงนามในหนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมโครงการวิจัยก่อนเข้าเป็นอาสาสมัคร และการศึกษาครั้งนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้ป่วยจะได้รับการติดตามการรักษาตลอด 12 เดือนแรกของการรักษาด้วย HAART ข้อมูลเบื้องต้นที่เก็บรวบรวมประกอบด้วย เพศ อายุ ค่า CD4 T-cells ที่ baseline การติดเชื้อฉวยโอกาส ยาและระยะเวลาที่ใช้ในการรักษาเชื้อฉวยโอกาส ชนิดของยาต้านไวรัสที่ได้รับ แพทย์ได้ทำการตรวจติดตามอาการและตรวจร่างกายผู้ป่วยเป็นระยะ การตรวจวัดระดับ CD4 T-cells ทำในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART โดยใช้เครื่อง flow cytometry ของทั้งสองโรงพยาบาล การคำนวณค่าการเพิ่มขึ้นของ CD4 T-cells (CD4 T-cell gain) ในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART ทำโดยนำค่า CD4 T-cells ในเดือนที่ 6 และ 12 ลบด้วย CD4 T-cells ในเดือนที่ 0 (baseline) ขณะที่การหาปริมาณไวรัสใน

กระแสเลือด (viral load) ทำในเดือนที่ 12 หลังจากเริ่ม HAART โดยวิธี Cobas[®] Ampliprep/Cobas[®] TaqMan[®] test (Roche Molecular Systems, NJ, USA)

การเตรียมตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากผู้ร่วมโครงการที่ติดและไม่ติดเชื้อมาเก็บก่อนได้รับ HAART ในหลอดบรรจุสารกันเลือดแข็งชนิด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (BD Vacutainer[™], Franklin Lakes, NJ, USA) ทุกๆ visit และนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) ด้วย Ficoll-Hypaque gradient (IsoPrep, Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) และแบ่งเซลล์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ในรูปของตะกอนเซลล์จนกว่านำมาใช้งาน

การแยก CD4⁺ และ CD8⁺ T-cells จาก PBMCs

สุ่มเลือก PBMCs ของผู้ป่วยติดเชื้อมาเก็บก่อนได้รับ HAART กลุ่มละ 3 ราย มาแยก CD4⁺ และ CD8⁺ T-cells ด้วยวิธี magnetic cell separator (EasySep[®], STEMCELL Technologies, USA) ตามกรรมวิธีที่ระบุในคู่มือที่แนบมากับชุดน้ำยา นับจำนวนเซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ T-cells ที่แยกได้ โดยใช้ชุดน้ำยา Turk's solution และนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การสกัด DNA

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวเคลียสเดี่ยว (PBMCs) และจาก CD4⁺ และ CD8⁺ T-cells ที่แยกได้ ด้วยชุดน้ำยาสกัด NucleoSpin[®] kit (Macherey-Nagel, KG., Duren, Germany) ตามกรรมวิธีที่ระบุในคู่มือที่แนบมากับชุดน้ำยา เก็บ DNA ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การวัดระดับ TRECs โดยวิธีการ quantitative real-time PCR

การตรวจวัดระดับ TRECs ด้วยวิธี quantitative real-time PCR ได้ดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Ometto และคณะ (14) โดยมีรายละเอียดดังนี้ ในแต่ละหลอดปฏิกิริยาจะประกอบด้วย DNA ตัวอย่างปริมาตร 5 µL และ reaction mixture 20 µL ซึ่งประกอบด้วย 1x real-time PCR Master Mix (Thermo Scientific ABsolute[™] QPCR ROX Mix, Surrey, UK), forward และ reverse primers ความเข้มข้น 400 nM (5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT- 3' และ 5'- GCCAGCTGCAGGGTTTAGG- 3'ตามลำดับ) (GenBank sequence accession number DQ858179.1) และ fluorogenic probe ความเข้มข้น 200 nM (5'- ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCAC T-3') ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสงชนิด FAM

(6-carboxyfluorescein) ที่ปลายด้าน 5' และ TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) ที่ปลายด้าน 3' ทั้งนี้ primers และ probes ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจะถูกออกแบบมาอย่างจำเพาะเพื่อการตรวจหา TRECs ในมนุษย์ นอกจากนี้ภายในหลอดปฏิกิริยาเดียวกันยังมีการทำ normalization โดยใช้ยีน β -actin ที่ถูกเพิ่มปริมาณได้เช่นเดียวกันกับ TRECs โดยมี primers ที่จำเพาะกับ endogenous β -actin คือ forward primer ความเข้มข้น 300 nM (5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'), reverse primer ความเข้มข้น 600 nM (5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3') และ fluorogenic probe ความเข้มข้น 200 nM (5'-ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT-3') ที่ติดฉลากด้วย hexachlorofluorescein (HEX), (Human β -actin gene GenBank sequence accession number DQ858179.1) ทำให้ได้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาทั้งหมดเป็น 25 μ L สำหรับในหลอดปฏิกิริยาที่เป็น non-template control ใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนการเติมตัวอย่าง DNA การทำปฏิกิริยาใช้เครื่อง Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research; Mortlake, New South Wales, Australia) ที่สภาวะ preheat ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลานาน 15 นาที ตามด้วยขั้นตอนของ real-time PCR จำนวน 50 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลานาน 15 วินาที และ annealing/extension ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลานาน 1 นาที ตัวอย่างแต่ละรายทำรายละสามซ้ำ (triplicate) ผลบวกของปฏิกิริยาหาได้จากค่า cycle threshold (C_T) ซึ่งแปรผกผันกับจำนวนชุด (copy number) ของ DNA เป้าหมาย ระดับ TRECs ในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART ในตัวอย่างแต่ละรายจะรายงานออกมาในรูปจำนวนเท่าของระดับ TRECs ในเดือนที่ 0 (baseline) สำหรับระดับ TRECs ใน $CD4^+$ และ $CD8^+$ T-cells จะรายงานเป็นความเข้มข้นในหน่วย pg/ 10^6 cells โดยความเข้มข้นดังกล่าวสามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของ TRECs plasmid ที่มีการทำควบคู่ไปกับการตรวจ DNA ตัวอย่าง

สถิติวิเคราะห์

ข้อมูลจากการศึกษาทั้งหมดนำเสนอในรูปค่ามัธยฐาน (median) หรือ ค่าเฉลี่ย (mean) และ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) การวิเคราะห์ข้อมูลของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสกระทำโดย STATA software package version 10 (College Station, TX) การทดสอบ Mann-Whitney หรือ Fisher's exact test ใช้เพื่อเปรียบเทียบค่า $CD4$ T-cells ระดับ TRECs เพศของกลุ่มตัวอย่าง และสูตรยาต้านไวรัสชนิด HAART ระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสอง การวิเคราะห์ด้วย Pearson's correlation เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน $CD4^+$ T-cells ที่เพิ่มขึ้นกับระดับ TRECs การวิเคราะห์ถดถอยแบบโลจิสติกทั้ง univariate และ multivariate logistic regression models นำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในเดือนที่ 0 (baseline) และค่า $CD4$ T-cells ในเดือนที่ 6 ของการได้รับ HAART ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับระดับ TRECs ในเดือนที่ 12 ซึ่งในการทดลองนี้ได้แบ่งข้อมูลของระดับ TRECs ออกเป็นสองกลุ่มคือ ค่าต่ำและสูง

(≤ 1 และ >1) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสองที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.2$) ที่ได้จากการวิเคราะห์ถดถอยแบบ univariate logistic regression จะนำมาวิเคราะห์ถดถอยแบบ multivariate logistic regression ระดับนัยสำคัญทางสถิติสำหรับการทดสอบกำหนดให้ที่ 0.05

ผลการทดลอง

ข้อมูลเกี่ยวกับผู้เข้าร่วมโครงการและข้อมูลทางคลินิก

ข้อมูลทางคลินิกของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสในเดือนที่ 0 (baseline) แสดงในตารางที่ 1 ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสจำนวน 31 ราย และผู้ป่วยติดเชื้อฉวยโอกาสที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพก่อนได้รับ HAART จำนวน 13 ราย ซึ่งจำแนกเป็น ผู้ป่วย *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) จำนวน 5 ราย pulmonary tuberculosis 1 ราย oral candidiasis จำนวน 4 ราย และ cryptococcal meningitis จำนวน 3 ราย การได้รับยาต้านจุลชีพและระยะเวลาในการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพก่อนเริ่มรับ HAART แสดงในตารางที่ 2 ผู้ป่วยทุกรายได้รับยาต้านไวรัสสูตรผสมชนิด HAART ที่ประกอบด้วย nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) 2 ชนิด และ non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) 1 ชนิด และพบว่า CD4 T-cells ในเดือนที่ 0 (baseline) ของผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีจำนวนมากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตามความแตกต่างดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (แสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 1)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและไวรัสวิทยาภายหลังได้รับ HAART

หลังจากการได้รับยาต้านไวรัสชนิด HAART เป็นเวลานาน 6 และ 12 เดือนพบว่าการเพิ่มขึ้นของ CD4 T-cells ในทั้งสองกลุ่มตัวอย่าง (รูปที่ 1) นอกจากนี้นักกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีจำนวน CD4 T-cells มากกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (255 vs 158 และ 269 vs 172 cells/ μ L; $p = 0.003$ และ 0.03 ตามลำดับ) (รูปที่ 1) นอกจากนี้ระดับ CD4 T-cells ในเดือนที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART ที่เพิ่มขึ้นจาก baseline (CD4 T-cell gain) ในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีแนวโน้มสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับในผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาส (151 vs 89 cells/ μ L; $p = 0.05$) อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4⁺ T-cells (CD4 T-cell gain) ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART ระหว่างทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (120 vs 149 cells/ μ L; $p = 0.84$)

ปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (viral load) ซึ่งตรวจวัดในเดือนที่ 12 ภายหลังได้รับ HAART พบว่ามีผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสจำนวน 29 รายจากทั้งหมด 31 ราย (คิดเป็นร้อยละ 94) และผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสทุกราย (คิดเป็นร้อยละ 100) มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดลดลงจนไม่สามารถตรวจวัดได้ (น้อยกว่า 50 copies/mL)

ระดับ TRECs ภายหลังได้รับ HAART

ระดับ TRECs ณ เดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART เพิ่มขึ้นจากเดือนที่ 0 (baseline) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส ขณะที่ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs เฉพาะในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART (รูปที่ 2) อย่างไรก็ตามระดับการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART ระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 2)

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ TRECs และจำนวน CD4⁺ T-cells ที่เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4⁺ T-cells (CD4 T-cell gain) กับระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้น พบว่าในเดือนที่ 6 ของการได้รับ HAART การเพิ่มขึ้นของระดับ CD4⁺ T-cells ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้นทั้งในกลุ่มผู้ติดและกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส (รูปที่ 3A และ B) ขณะที่ความสัมพันธ์ทางบวกระหว่างการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4⁺ T-cells และ ระดับ TRECs พบได้ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส แต่ไม่พบลักษณะความสัมพันธ์ดังกล่าวในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาส (รูปที่ 3C และ D)

ในการประเมินผลกระทบของปัจจัยร่วมต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART ที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 เท่าของ TRECs ณ baseline นั้น โดยจากการวิเคราะห์ด้วย univariate regression analysis พบว่าผู้ป่วยที่มี CD4 T-cells ในเดือนที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART มากกว่า 200 cells/ μ L มีอัตราเสี่ยงที่ทำให้ระดับ TRECs เพิ่มขึ้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 เท่าของ TRECs ณ baseline มากกว่าผู้ป่วยที่มี CD4 T-cells น้อยกว่าหรือเท่ากับ 200 cells/ μ L ถึง 9 เท่า (OR = 9.0; 95%CI: 0.9-88.2; p = 0.06) เช่นเดียวกับการที่ผู้ป่วยเป็นเพศหญิงพบว่ามีอัตราเสี่ยงที่ทำให้ระดับ TRECs เพิ่มขึ้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 เท่าของ TRECs ณ baseline มากกว่าผู้ป่วยเพศชาย ถึง 3.3 เท่า (OR = 3.3; 95%CI: 0.6-20.2; p = 0.19) (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามเมื่อนำทั้งสองปัจจัยมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยร่วมหลายปัจจัยกับระดับ TRECs ด้วย multivariate regression analysis พบว่าเฉพาะผู้ป่วยที่มี CD4 T-cells ในเดือนที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART มากกว่า 200 cells/ μ L เท่านั้นที่มีอัตราเสี่ยงที่ทำให้ระดับ TRECs เพิ่มขึ้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 เท่าของ TRECs ณ baseline (OR = 9.0; 95%CI: 0.9-88.2; p = 0.03) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1. ข้อมูลทางคลินิกของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่ามัธยฐาน (interquartile range) หรือ n

ลักษณะทางคลินิก	ผู้ติดเชื้อเอชไอวี		
	ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส (n = 31)	ติดเชื้อฉวยโอกาส (n = 13)	P-value
อายุ (ปี)	39 (33-45)	36 (34-42)	0.72*
เพศ: ชาย/หญิง	19/12	5/8	0.20 [#]
CD4 T-cells เดือนที่ 0 (Baseline) (cells/ μ L)	135 (6-200)	36 (24-68)	0.13*
HAART regimens :			
d4T + 3TC + (NVP or EFV)	17	12	0.02 [#]
Truvada (TDF + FTC) + (NVP or EFV)	14	1	

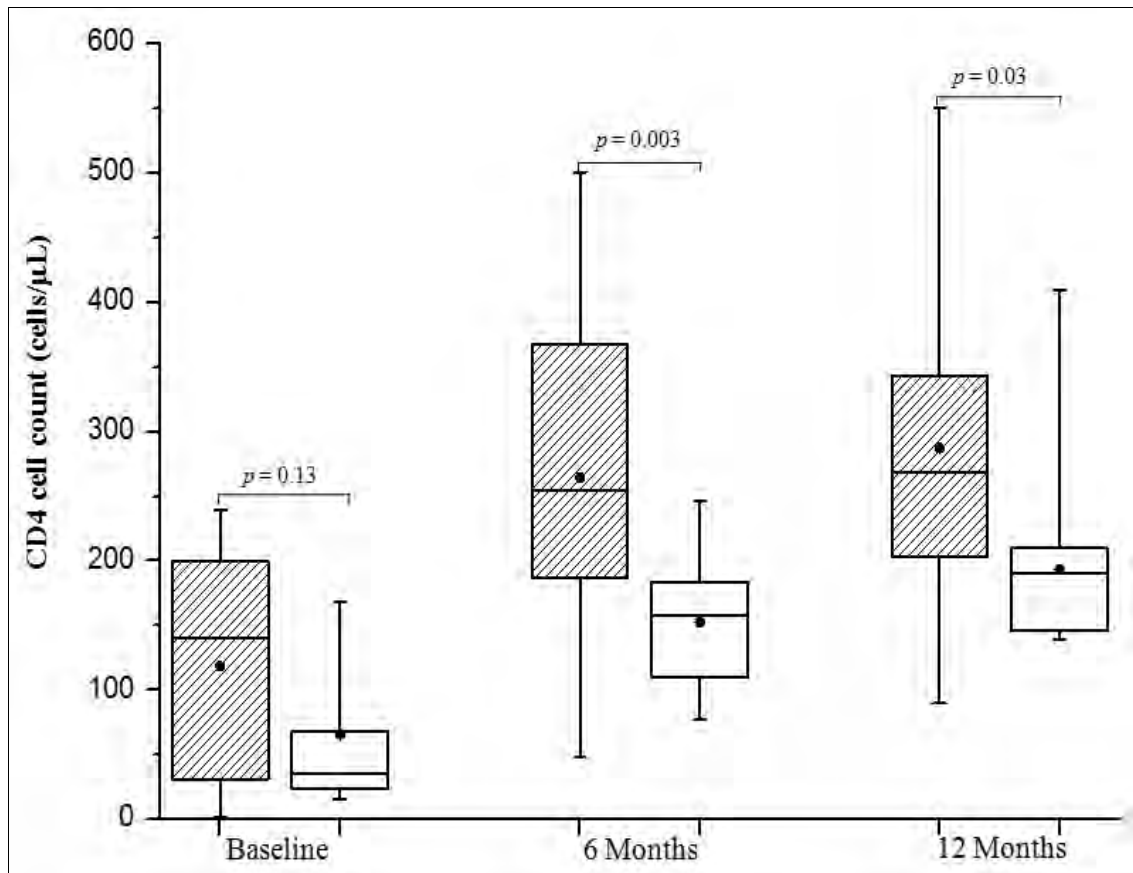
d4T, stavudine; EFV, efavirenz; FTC, emtricitabine; HAART, highly active antiretroviral therapy; NVP, nevirapine; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; 3TC, lamivudine.

*Mann-Whitney *U* test

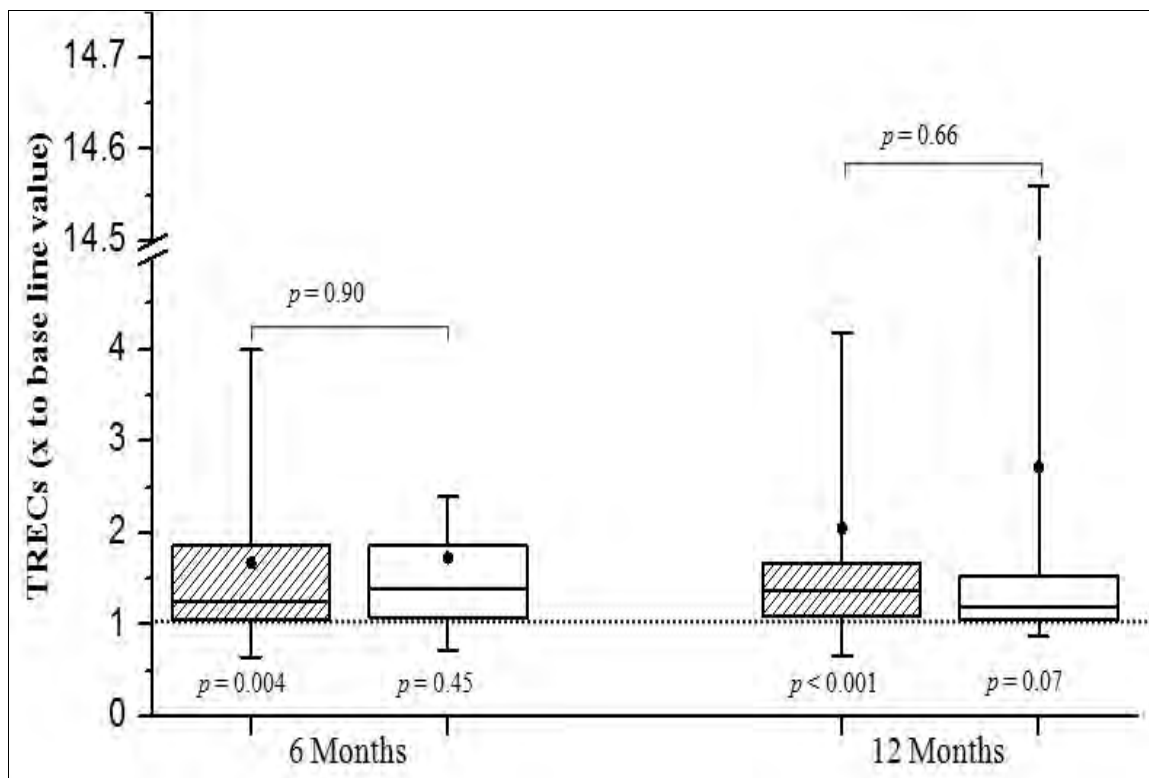
[#]Fisher's exact test

ตารางที่ 2. โรคติดเชื้อฉวยโอกาสและระยะเวลาในการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพก่อนได้รับ HAART

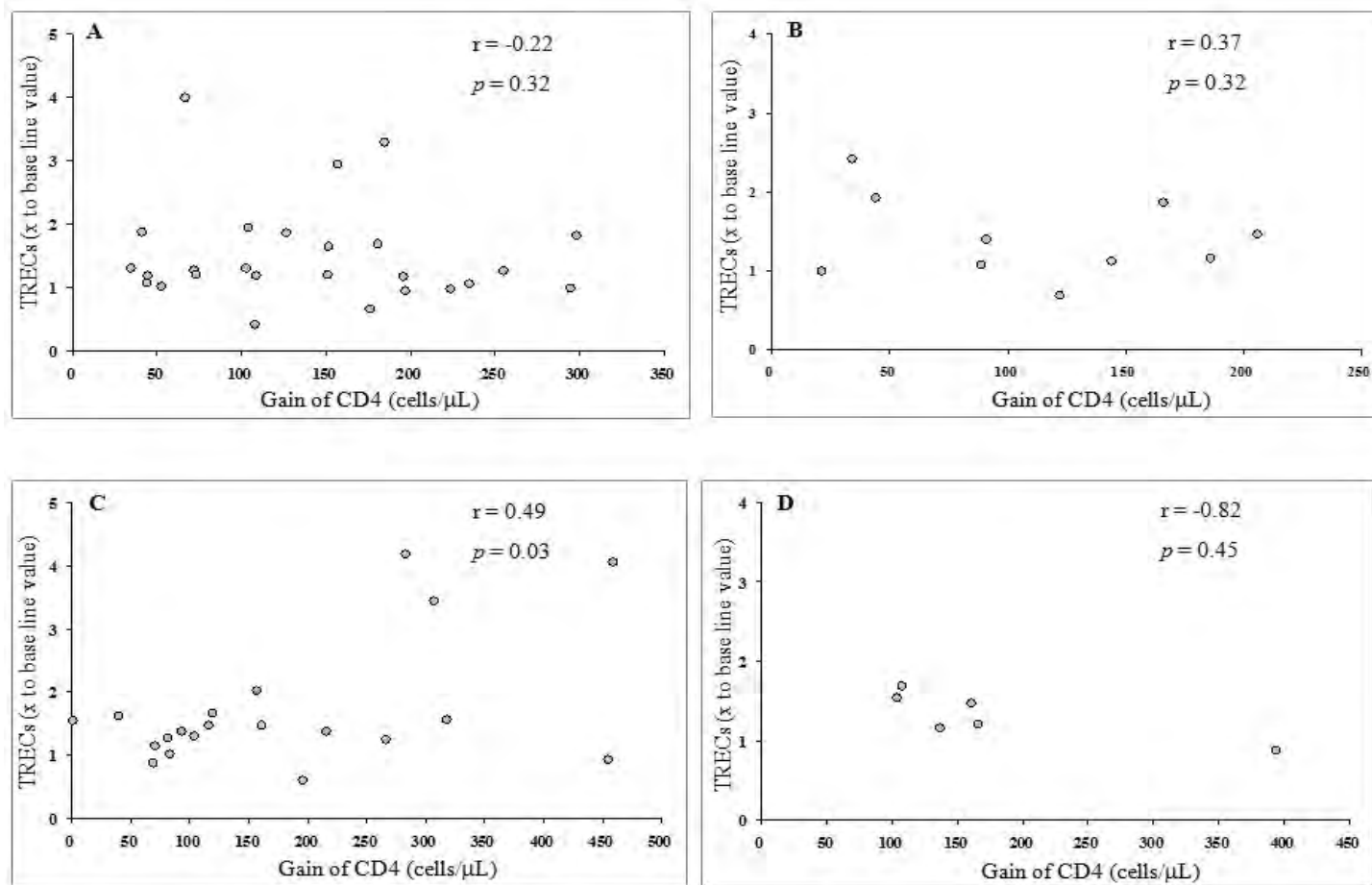
โรคติดเชื้อฉวยโอกาส	ยาต้านจุลชีพ	ระยะเวลาที่รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพก่อนเริ่มรับ HAART (Mean $\pm$ SD) (วัน)
PCP (n = 5)	Cotrimoxazole or Dapsone	24.2 $\pm$ 5.3 (16-30)
<i>M. tuberculosis</i> (n = 1)	Isoniazid + Rifampicin + Pyrazinamide + Ethambutol.	270
Candidiasis (n = 4)	Fluconazole or Ketoconazole or Cotrimazole	16.5 $\pm$ 6.0 (11-16)
Cryptococcosis (n = 3)	Amphotericin B and/or Fluconazole	19.3 $\pm$ 1.2 (18-20)



รูปที่ 1. การเปลี่ยนแปลงจำนวน CD4 T-cells ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส ในช่วงเวลา 1 ปีแรกหลังการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (จุด) ค่ามัธยฐาน (เส้นแนวนาง) ข้อมูลในตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25, 75 (กล่อง) และ 5, 95 (เส้น หนวดแมว) โดยผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสแทนด้วยรูปกล่องทึบและผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาส แทนด้วยกล่องสีขาว



รูปที่ 2. การเปลี่ยนแปลงระดับ TRECs ที่ 6 และ 12 เดือนหลังการรักษาด้วย HAART เปรียบเทียบกับเดือนที่ 0 (baseline) ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส ข้อมูลแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (จุด) ค่ามัธยฐาน (เส้นแนวนาง) ข้อมูลในตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทล์ที่ 25, 75 (กล่อง) และ 5, 95 (เส้นขอบเขต) โดยผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสแทนด้วยรูปกล่องทึบและผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสแทนด้วยกล่องสีขาว และเส้นประแสดงค่าอ้างอิงของระดับ TRECs ในเดือนที่ 0 (baseline)



รูปที่ 3. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน CD4 T-cells ที่เพิ่มขึ้น (CD4 T-cells gain) กับระดับ TRECs ในเดือนที่ 6 และ 12 ของการรักษาด้วย HAART ในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส (A และ C) และในผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาส (B และ D)

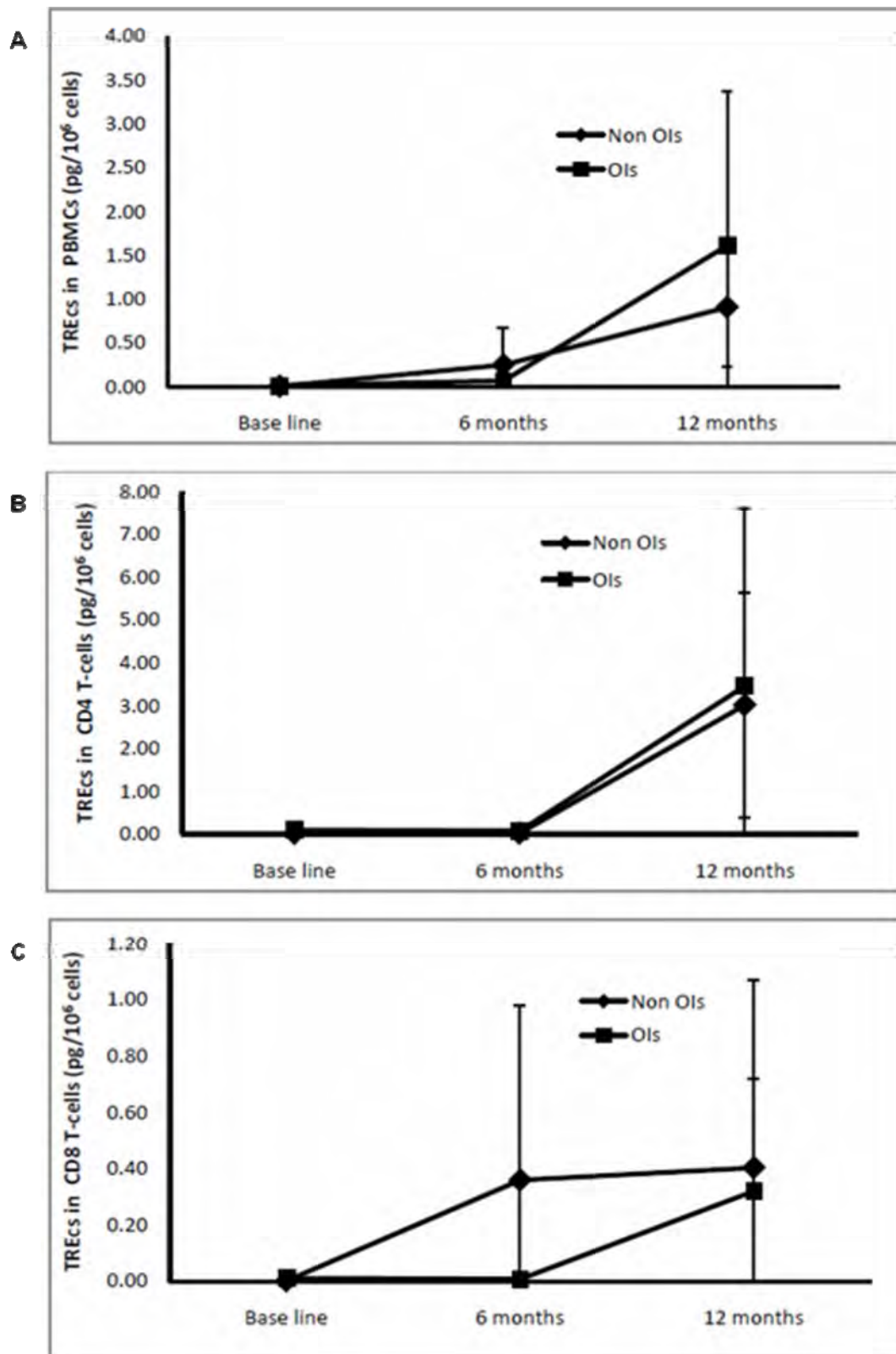
ตารางที่3. การวิเคราะห์ถดถอยแบบโลจิสติกทั้ง univariate และ multivariate regression เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยร่วมต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มระดับ TRECs ที่ ≤ 1 ที่ช่วงความเชื่อมั่นเป็นร้อยละ 95 ภายหลังได้รับการรักษาด้วย HAART เป็นเวลานาน 12 เดือน

ปัจจัย	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Odds ratio (95%CI)	p-value	Odds ratio (95%CI)	P-value
กลุ่มผู้ป่วย No opportunistic infection Treated opportunistic infections	1.0 1.5 (0.2-9.5)	0.69		
อายุ ≤ 40 years > 40 years	1.0 0.5 (0.1-2.8)	0.40		
HAART regimens Truvada + (NVP or EFV) d4T + 3TC + (NVP or EFV)	1.0 1.4 (0.2-8.5)	0.72		
เพศ ชาย หญิง	1.0 3.3 (0.6-20.2)	0.19	3.2 (0.4-23.7)	0.25
CD4 counts ในเดือนที่ 0(baseline) ≤ 40 cells/ μ L > 40 cells/ μ L	1.0 2.0 (0.3-12.2)	0.45		
CD4 counts หลังรับ HAART 6เดือน ≤ 200 cells/ μ L > 200 cells/ μ L	1.0 9.0 (0.9-88.2)	0.06	9.0 (0.9-88.2)	0.03

95%CI = ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 (95%Confidence Interval)

ระดับ TRECs ใน PBMCs, CD4 และ CD8 T-cells

เมื่อทำการตรวจวัดระดับ TRECs ทั้งใน PBMCs, CD4 และ CD8 T-cells จากการสุ่มเลือกตัวอย่างจากกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสจำนวน 3 ราย และกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสจำนวน 3 ราย พบว่าระดับ TRECs ใน PBMC และ CD4 T-cells ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีลักษณะรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกันคือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยในเดือนที่ 6 และมีการเพิ่มขึ้นมากในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART (รูปที่ 4A และ B) ขณะที่ระดับ TRECs ใน CD8 T-cells ของกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสเพิ่มขึ้นมากตั้งแต่เดือนที่ 6 ไปจนกระทั่งถึงเดือนที่ 12 ของการได้รับ HAART ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบการเพิ่มขึ้นของ TRECs ใน CD8 T-cells เพียงเล็กน้อยในเดือนที่ 6 และเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART (รูปที่ 4C)



รูปที่ 4. การเปลี่ยนแปลงระดับ TRECs ใน PBMCs (A), CD4 T-cells (B) และ CD8 T-cells (C) ของผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส ($n = 3$) และผู้ป่วยติดเชื้อฉวยโอกาส ($n = 3$)

บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ต่อมไรมัสเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART (10, 15, 16) จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจว่า การรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสด้วยยาต้านจุลชีพก่อนให้ HAART มีผลกระทบต่อการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4 T-cells และการทำงานของต่อมไรมัส (TRECs) หรือไม่และอย่างไร จากการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับ CD4 T-cells และระดับ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสซึ่งในผู้ที่ติดเชื้อฉวยโอกาสนั้นจะได้รับการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพก่อนได้รับ HAART ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการฟื้นกลับคืนของระบบภูมิคุ้มกันในผู้ที่ได้รับการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสมาก่อนได้รับ HAART ไม่มีความแตกต่างไปจากผู้ที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสโดยแท้จริงแล้วแม้ว่าผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสจะมี CD4 T-cells สูงกว่าผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งเดือนที่ 6 และ 12 ของการรับ HAART แต่ค่า CD4⁺ T-cells ที่เพิ่มขึ้น (CD4 T-cell gain) กลับไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสองภายหลังรับ HAART เป็นเวลานาน 12 เดือน (120 ต่อ 149 cells/ μ L; $p = 0.84$) นอกจากนี้ระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างทั้งสองภายหลังการรับ HAART เป็นเวลานาน 6 และ 12 เดือน (รูปที่ 2) อีกทั้งรูปแบบการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ใน PBMCs และใน CD4 T-cells ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มยังมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 4A และ B) และถึงแม้ระดับ TRECs ใน CD8 T-cells ของผู้ที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีการเพิ่มขึ้นมากตั้งแต่วันที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART ซึ่งต่างจากในกลุ่มผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบมีการเพิ่มขึ้นของ TRECs ใน CD8 T-cells ในเดือนที่ 12 ของการได้รับ HAART อย่างไรก็ตามระดับ TRECs ใน CD8 T-cells ของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีปริมาณที่น้อยกว่าที่ตรวจพบใน PBMCs และ CD4 T-cells ดังนั้นการตรวจวัดระดับ TRECs ใน CD8 T-cells อาจสะท้อนถึงการทำงานของต่อมไรมัสได้ไม่ดีเท่าการตรวจวัดระดับ TRECs ใน PBMCs และ CD4 T-cells การเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ทั้งในผู้ป่วยที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้โดย Lewin และคณะ (17) ที่ทำการศึกษาระดับ CD4 T-cells และ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ได้รับการรักษาด้วย HAART เป็นเวลานาน 2 ปี นอกจากนี้ยังพบร้อยละ 18 ของผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาส และร้อยละ 11 ของผู้ติดเชื้อฉวยโอกาสมีการเพิ่มขึ้นของระดับ TRECs ในเดือนที่ 12 ของการรักษาด้วย HAART เป็น 2 เท่าของระดับ TRECs ณ baseline ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ การศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีภายหลังได้รับ HAART เป็นเวลานาน 12 เดือน มีสองรูปแบบคือมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและเพิ่มขึ้นมากกว่า 2 ของ baseline (ก่อนการได้รับ HAART) (12, 18-

20) และในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า HAART ที่ให้กับผู้ติดเชื้อเอชไอวีทั้งสองกลุ่มสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยร้อยละ 94 ของผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสและจำนวนทั้งหมดของผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสมีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดน้อยกว่า 50 copies/mL นอกจากนี้ไม่มีผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสรายใดที่พัฒนาไปเป็น IRIS

การไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4 T-cells (CD4 cell gain) และ TRECs ในเดือนที่ 6 ของการรักษาด้วย HAART ทั้งในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสอาจเนื่องมาจากมีสร้างและปลดปล่อย CD4 T-cells ออกจากอวัยวะน้ำเหลืองมากกว่าการสร้างขึ้นมาใหม่ (de novo) จากต่อมไทมัส ซึ่งข้อสันนิษฐานดังกล่าวสามารถสนับสนุนได้จากการที่พบว่าผู้ป่วยที่มี CD4 T-cells มากกว่า 200 cells/ μ L มีอัตราเสี่ยงที่ระดับ TRECs เพิ่มขึ้นน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 เท่าของ TRECs ณ baseline มากกว่าผู้ป่วยที่มี CD4 T-cells น้อยกว่าหรือเท่ากับ 200 cells/ μ L ถึง 9 เท่า (OR = 9.0; 95%CI: 0.9-88.2; p = 0.06) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pakker และคณะ (21) ที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ CD4 T-cells หลังได้รับยาต้านไวรัสแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือระยะแรก CD4 T-cells เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากการสร้าง CD4 T-cells ใหม่จากอวัยวะน้ำเหลือง และในระยะต่อมาเป็นการเพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ จนเข้าสู่สภาวะการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ทั้ง naïve และ memory CD4 T-cells ซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างอวัยวะน้ำเหลืองและต่อมไทมัสอย่างไรก็ตามพบว่า CD4 T-cells ที่เพิ่มขึ้น (CD4 cell gain) ในผู้ป่วยที่ไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสนี้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับ TRECs หลังรับ HAART ในเดือนที่ 12 ทั้งนี้อาจเกิดจากกระบวนการสร้าง CD4 T-cells (de novo) จากต่อมไทมัสเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาดังกล่าว และการที่ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวในผู้ที่ติดเชื้อฉวยโอกาสอาจเนื่องมาจากการที่กลุ่มตัวอย่างมีขนาดเล็ก หรือเกิดจากการที่ memory CD4 T-cells ที่มีอยู่ก่อนได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนของเชื้อจุลชีพฉวยโอกาสที่ผู้ป่วยเคยติดเชื้อและได้รับการรักษาจนเริ่มรับ HAART จึงทำให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นซึ่งจะส่งผลให้มีการเจือจาง (dilute) ปริมาณ TRECs ให้ลดน้อยลง ทั้งนี้ข้อสันนิษฐานแรกมีความเป็นไปได้มากกว่าเนื่องจากระดับ TRECs ที่เพิ่มขึ้นในเดือนที่ 6 และ 12 ของการได้รับ HAART ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อจำกัดบางประการสำหรับการศึกษานี้ได้แก่การที่ไม่สามารถวิเคราะห์ระดับ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดเชื้อฉวยโอกาสและยังไม่ได้รับการรักษาต้านจุลชีพก่อนได้รับ HAART เนื่องจากข้อกำหนดในคู่มือการรักษาด้วยยาต้านไวรัสในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่เป็นผู้ใหญ่และวัยรุ่นฉบับปี พ. ศ. 2553 (Thai National Guidelines for Antiretroviral Therapy in HIV-1 Infected Adults and Adolescents 2010) (6) กำหนดไว้ว่าควรรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสควรกระทำก่อนเริ่มให้ยาต้านไวรัส และเนื่องจากจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อฉวยโอกาสมีไม่มากพอจึงไม่สามารถวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4 T-cells และระดับ TRECs ในแต่ละชนิดของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสได้ พร้อมกันนี้เนื่องจากปริมาณของ

ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มีจำกัดจึงไม่สามารถตรวจวัดระดับ TRECs ใน CD4 และ CD8 T-cells ในผู้ป่วยทุกรายได้ อีกทั้งไม่สามารถศึกษาระดับ TRECs ในประชากรย่อยของเซลล์ทั้งสองชนิดที่แสดงลักษณะ naive หรือ memory phenotypes ($CD45RA^+$ และ $CD45RO^+$) ซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้ อาจต้องทำการศึกษาต่อไปในจำนวนกลุ่มตัวอย่างที่มากขึ้น

โดยสรุปจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ TRECs ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ติดและไม่ติดเชื้อฉวยโอกาสภายหลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสชนิด HAART ในระยะเวลา 1 ปี ไม่มีความแตกต่างกัน และการรักษาโรคติดเชื้อฉวยโอกาสก่อนให้ HAART ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและการทำงานของต่อมไทมัส

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน ขอขอบคุณแพทย์ พยาบาล นักเทคนิคการแพทย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการประจำโรงพยาบาลสันป่าตอง และโรงพยาบาล นครพิงค์ จ. เชียงใหม่ ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการเก็บข้อมูล เก็บตัวอย่างเลือด ดูแลและติดตามอาการทางคลินิกของผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่ภายใต้กำกับของ สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาประเทศไทย และ ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากงบประมาณโครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (ไทยเข้มแข็ง) พ.ศ. 2553-2555

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ตามที่ได้กล่าวไว้แล้วว่าการศึกษาวิจัยครั้งนี้มีข้อจำกัดด้านจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อฉวยโอกาสที่เข้าร่วมโครงการมีจำนวนน้อยจึงทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของระดับ CD4 T-cells และ ระดับ TRECs ในแต่ละชนิดของโรคติดเชื้อฉวยโอกาสได้อีกทั้งปริมาณตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ไม่พอที่จะนำมาตรวจวิเคราะห์หาระดับ TRECs ใน CD4 และ CD8 T-cells รวมทั้งในประชากรย่อยของเซลล์ทั้งสองชนิดที่แสดงลักษณะ naive หรือ memory phenotypes (CD45RA⁺ และ CD45RO⁺) ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ถูกต้องแม่นยำและครอบคลุมมากที่สุดจึงควรทำการศึกษาในกลุ่มประชากรตัวอย่างที่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, *et al.* CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med.* 2003;163(18):2187-95.
2. French MA, Lenzo N, John M, *et al.* Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2000;1(2):107-15.
3. French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS.* 2004;18(12):1615-27.
4. Ruxrungtham K, Phanuphak P. Update on HIV/AIDS in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 2001;84 Suppl 1:S1-17.
5. Williams BG, Dye C. Antiretroviral drugs for tuberculosis control in the era of HIV/AIDS. *Science.* 2003;301(5639):1535-7.
6. Sungkanuparph S. Thai national guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents 2010. *Asian Biomedicine.* 2010;4:515-28.
7. World Health Organization. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infections in infants. Recommendations for a public health approach. 2010 version; 2010.
8. Bains I, Thiebaut R, Yates AJ, Callard R. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output. *J Immunol.* 2009;183(7):4329-36.

9. Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol.* 1985;22(5):563-75.
10. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):690-5.
11. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol.* 1996;16(2):609-18.
12. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, *et al.* Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med.* 1999;190(5):725-32.
13. Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, *et al.* Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med.* 2000;6(9):1036-42.
14. Ometto L, De Forni D, Patiri F, *et al.* Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS.* 2002;16(6):839-49.
15. Ho Tsong Fang R, Colantonio AD, Uittenbogaart CH. The role of the thymus in HIV infection: a 10 year perspective. *AIDS.* 2008;22(2):171-84.
16. Kolte L, Ryder LP, Albrecht-Beste E, Jensen FK, Nielsen SD. HIV-infected patients with a large thymus maintain higher CD4 counts in a 5-year follow-up study of patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Scand J Immunol.* 2009;70(6):608-13.
17. Lewin SR, Ribeiro RM, Kaufmann GR, *et al.* Dynamics of T cells and TCR excision circles differ after treatment of acute and chronic HIV infection. *J Immunol.* 2002;169(8):4657-66.
18. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, *et al.* Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol.* 2001 Dec 1;167(11):6663-8.
19. Ribeiro RM, de Boer RJ. The contribution of the thymus to the recovery of peripheral naive T-cell numbers during antiretroviral treatment for HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;49(1):1-8.
20. Harris JM, Hazenberg MD, Poulin JF, *et al.* Multiparameter evaluation of human thymic function: interpretations and caveats. *Clin Immunol.* 2005;115(2):138-46.

21. Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, *et al.* Biphase kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med.* 1998;4(2):208-14.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

- 1.1 **Pornprasert S**, Traisathit P, Singboottra P, Ngo-Giang-Huong N. Treatment of Opportunistic Infections Prior to HAART Initiation Does Not Affect Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients. *Curr HIV Res.* 2012 Sep 6. (Epub ahead of print).
- 1.2 Wongnoi R, Penvieng N, Singboottra P, Kingkeow D, Oberdorfer P, Sirivatanapa P, **Pornprasert S**. Hematological Alterations and Impaired Thymic Function in Newborns of HIV-Infected Mothers Receiving Antiretroviral Drugs. **Manuscript was re-submitted to Indian Pediatrics Journal** (On 18th September 2012)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ :

1. ผลิตนักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์ จำนวน 1 คน คือนางสาวโรจน์ วงศ์น้อย รหัสนักศึกษา 521131006
2. ได้นำความรู้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ไปบรรยายเผยแพร่ให้กับบุคลากรการแพทย์ รับทราบ โดยเป็นวิทยากรบรรยายในหัวข้อเรื่อง "Treatment of opportunistic infection prior to HAART initiation does not affect innate immune reconstitution in HIV-infected patients" ในงานเสวนาวิชาการของการประชุมศูนย์ชีวโมเลกุลและเซลล์ วิทยาโรคติดเชื้อ ประจำเดือนกันยายน 2555 ในวันที่ 4 กันยายน 2555 เวลา 08.00 - 10.00 น. ณ ห้องประชุม Donald Jeffrey Gibon ชั้น 2 อาคารสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาคผนวก

Treatment of Opportunistic Infections Prior to HAART Initiation Does Not Affect Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients

Sakorn Pornprasert^{*1}, Patrinee Traisathit², Panthong Singboottra¹ and Nicole Ngo-Giang-Huong^{1,3,4}

¹Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand; ²Department of Statistics, Faculty of Science, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand; ³Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMI 174- Program for HIV Prevention and Treatment (PHPT), Marseille, France; ⁴Department of Immunology & Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA

Abstract: In patients receiving highly active antiretroviral therapy (HAART), increase of naïve T-cell production, as measured by T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs), is an indicator of immune reconstitution. Our objective was to assess whether treating opportunistic infections (OIs) prior to HAART initiation affects CD4 T-cells recovery and TRECs in patients on HAART. HIV-infected patients presenting no OIs or treated OIs were prospectively enrolled prior to HAART initiation and followed-up over 12 months of HAART. CD4 T-cells and TRECs were measured at baseline, 6 and 12 months HAART and compared between patients presenting no OIs and those with treated OIs. Univariate and multivariate logistic regression models were used to identify potential factors associated with low TREC increase after 12 months HAART. Forty-four HIV-infected patients, 31 presenting no OIs and 13 with treated OIs at HAART initiation were enrolled. Patients presenting no OIs tended to have higher CD4 T-cell gain than those with treated OIs (151 vs 89 cells/ μ L; $p = 0.05$) after 6 months HAART but not after 12 months HAART (120 vs 149 cells/ μ L; $p = 0.84$). Among patients presenting no OIs, TREC levels significantly increased from baseline through 12 months HAART while among those with treated OIs, there was a trend for increase only after 12 months. Our study indicates that treatment of OIs prior to HAART does not lead to impaired CD4 T-cells recovery and thymic outputs.

Keywords: T-cell receptor rearrangement excision circle; HIV; Opportunistic infections; Highly Active Antiretroviral Therapy; CD4 T-cells.

INTRODUCTION

Highly active antiretroviral therapy (HAART) has dramatically reduced the morbidity and mortality of HIV-infected patients [1] through effective control of viral replication and immune restoration. However, up to 25% of AIDS treated patients exhibit paradoxical clinical deterioration known as the immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) [2, 3]. This overwhelming inflammatory response results from restored immunity to antigens associated with previously acquired opportunistic infections (OIs) and has been associated with lower CD4 T-cell counts at initiation of HAART. In limited-resource countries, HIV-infected patients often present late with advanced AIDS and OIs [4, 5] and in order to prevent the occurrence of IRIS, usually receive antimicrobial agents against OIs before starting HAART [6, 7].

Thymus is the primary source of naïve T-cells and plays a key role in establishing and maintaining the peripheral T-cell pool [8]. It reaches its maximum volume by one year of age; thereafter, its size as well as its function decrease with age [9]. The thymus production of naïve T-cells can be quantified by measuring the T-cell receptor rearrangement excision circles (TRECs) formed during the T-cell receptor gene rearrangement. These thymic outputs are episomal and

diluted during cell division [10]. Low TREC contents in T-cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) have been observed in a large percentage of untreated HIV-infected individuals [11, 12]. The rapid decline in TRECs observed during HIV infection may result from the expansion of memory T-cells following chronic activation by pathogens [13]. Effective suppression of viral replication in HIV-infected patients on HAART has been associated with immune reconstitution and an increase of TRECs, suggesting an improvement of thymic function [11].

Several studies analyzing the optimal time to start HAART in HIV-infected patients presenting OIs have shown an improved survival when initiating HAART during the first 2 weeks of treatment of OIs [14-16]. Although immune reconstitution in tuberculosis-HIV co-infected patients treated before antiretroviral drugs initiation has been reported in different studies [17-19], limited data are available on CD4 T-cells recovery and thymic output or TRECs in patients on HAART who previously treated for other OIs prior to HAART initiation. The aims of this study were to measure TREC levels over one-year HAART among patients presenting no OIs and patients with treated OIs before HAART initiation and analyze TREC levels in relation with the increase of CD4 T-cells.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Forty-four HIV-infected patients, 31 presenting no OIs and 13 treated for OIs, were enrolled at 2 hospitals,

*Address correspondence to this author at the Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang-Mai University, 110 Intawaroros Road, Chiang-Mai, 50200, Thailand; Tel: 66-53-945078; Fax: 66-53-946042; E-mail: sakornmi001@gmail.com

Sanpatong and Nakornping, in Chiang-Mai, Thailand prior to HAART initiation. Inclusion criteria were: (1) HIV-infected patients >15 years of age; (2) antiretroviral naïve; (3) no history of alcoholism or IV drug use. All HIV-infected patients participating in this study provided written informed consent before enrolment. This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang-Mai University. The patients were followed over the first 12 months of HAART. Baseline data collected included patient demographics, CD4 T-cells, diagnosis and OIs treatment. During the follow-up, according to the Thai guidelines for monitoring HIV treatment, CD4 T-cell enumeration was performed at 6 and 12 months using flow cytometry at Sanpatong and Nakornping hospitals. CD4 T-cell gain at 6 and 12 months of HAART was analyzed by subtracting CD4 T-cell counts at baseline from those at 6 or 12 months of HAART. Plasma HIV RNA load was performed at 12 months of HAART using Cobas® Ampliprep/Cobas® TaqMan® test (Roche Molecular Systems, NJ, USA).

Blood Preparation

Blood samples were collected in EDTA tubes at each visit and shipped to the microbiology laboratory of the Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang-Mai University, within 3 hours. Upon arrival peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll-Hypaque gradient (IsoPrep, Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Cells were aliquoted and stored frozen at -20°C as dried pellets until use.

DNA Preparation and Quantification of TRECs

DNA was extracted from one million PBMCs using the NucleoSpin® kit (Macherey-Nagel, KG, Duren, Germany) according to manufacturers' instructions. DNA extracts were stored at -20°C until use. TREC analysis was performed as described by Ometto *et al.* [20] with slight changes. The real-time PCR amplification was carried out in a 25 µL reaction mixture containing 5 µL DNA sample or sterile distilled water as a no template control, 1x real-time PCR Master Mix (Thermo Scientific ABsolute™ QPCR ROX Mix, Surrey, UK), 400 nM each primer (forward, 5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'; reverse, 5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3' : GenBank sequence accession number DQ858179.1) and 200 nM of the fluorogenic probe (5'-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCCAC T-3') conjugated with FAM (6-carboxyfluorescein) at the 5'-end, and TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) at the 3'-end. To normalize for cell equivalents, the β-actin gene was quantified in the same reaction tube for TREC quantification. The β-actin primer and probe concentrations were as follows: 300 nM of forward primer (5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'), 600 nM of reverse primer (5'-CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG-3') and 200 nM of the fluorogenic probe (5'-ATGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGT-3') conjugated with the hexachlorofluorescein (HEX), (Human β-actin gene Gen Bank sequence accession number DQ858179.1). The real-time PCR reaction was performed using Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research; Mortlake, New South Wales, Australia). The mixture was preheated at 95°C for 15 min, followed by

50 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. Each sample was run in triplicate. For each sample, the TREC level was reported as fold change as compared to level before HAART initiation.

Statistical Analysis

The data are presented as median or mean and standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using STATA software package version 10 (College Station, TX). CD4 T-cells, TREC levels, gender and HAART regimens were compared between groups using Mann-Whitney test or Fisher's exact test. Levels of TREC were dichotomized into two categories, low or high (≤ 1 or > 1) and possible factors associated with low TREC levels after 12 months HAART were analyzed using univariate and multivariate logistic regression models. Baseline characteristics as well as CD4 T-cells after 6 months HAART were included in the analysis. Interactions between significant variables (p -value equal or lower than 0.2) were tested in univariate logistic regression analysis. Multivariate logistic regressions models were constructed following a forward-backward variable inclusion scheme. Significance was determined as $p < 0.05$. All reported p -values were two-sided.

RESULTS

The baseline characteristics of the 2 groups of patients are shown in Table 1. Thirty-one patients presented no OIs and 13 patients were treated for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia (PCP) ($n=5$), pulmonary tuberculosis ($n=1$), oral candidiasis ($n=4$) and cryptococcal meningitis ($n=3$). Mean duration of antimicrobial treatment for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia, oral candidiasis and cryptococcal meningitis was 20 ± 4 days prior to HAART initiation while duration of pulmonary tuberculosis treatment was 270 days prior to HAART initiation. All started HAART combinations with 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI). Patients with no OIs had higher baseline CD4 T-cells than patients with treated OIs though not significantly different (Table 1). There was a trend for higher CD4 T-cell gain after 6 months of HAART in the no OIs group as compared to the treated OIs group (151 vs 89 cells/ μ L; $p = 0.05$) but not after 12 months HAART (120 vs 149 cells/ μ L; $p = 0.84$). Plasma HIV RNA load was undetectable (< 50 copies/mL) after 12 months HAART in 29 of 31 (94%) no OIs patients and in all treated OIs patients.

There was a significant increase of TRECs in the no OIs group from baseline through 12 months of HAART ($p = 0.004$ at 6 months and $p < 0.001$ at 12 months) while there was a trend for higher increase only after 12 months HAART in the treated OIs group ($p = 0.07$) (Fig. 1). The median TREC increase was not significantly different between the two groups after 6 ($p = 0.90$) and 12 months ($p = 0.66$) HAART (Fig. 1).

Univariate logistic regression analysis of factors associated with low TREC level after 12 month HAART showed that there was a trend for low TREC increase when patients had CD4 T-cells $> 200/\mu$ L after 6 months HAART (OR = 9.0; 95%CI: 0.9-88.2; $p = 0.06$) or in women (OR = 3.3; 95%CI: 0.6-20.2; $p = 0.19$). In the multivariate model,

Table 1. Baseline Characteristics

Characteristics	HIV-Infected Patients		
	No Opportunistic Infections (n = 31) Median (Interquartile Range) or n	Treated Opportunistic Infections (n = 13) Median (Interquartile Range) or n	p Value
Age (years)	39 (33-45)	36 (34-42)	0.72*
Male/Female gender	19/12	5/8	0.20 [#]
Baseline CD4 T-cells (cells/ μ L)	135 (6-200)	36 (24-68)	0.13*
HAART regimens :			
d4T + 3TC + (NVP or EFV)	17	12	0.02 [#]
Truvada (TDF + FTC) + (NVP or EFV)	14	1	

d4T, stavudine; EFV, efavirenz; FTC, emtricitabine; HAART, highly active antiretroviral therapy; NVP, nevirapine; TDF, tenofovir disoproxil fumarate; 3TC, lamivudine.

*Mann-Whitney U test.

[#]Fisher's exact test.

remained only CD4 T-cells >200 cells/ μ L after 6 months HAART (OR = 9.0; 95%CI: 0.9-88.2; $p = 0.03$) (Table 2).

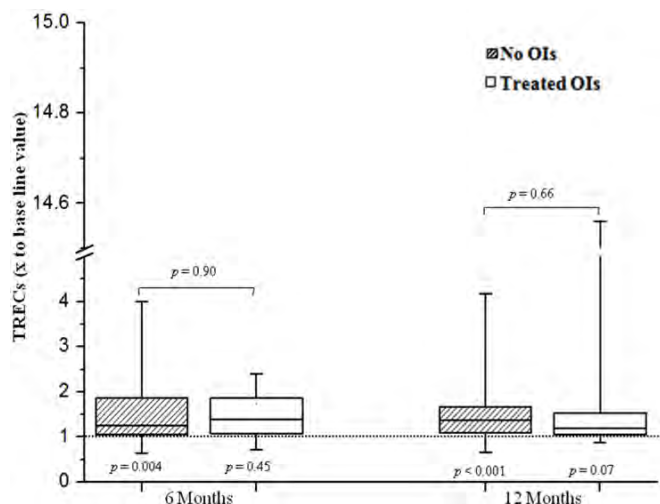


Fig. (1). Changes in the levels of TREC are expressed relative to baseline level among HIV-infected patients with no OIs and those with treated OIs during the first 12 months of HAART. Data are presented as median (horizontal line), 25th and 75th (box) and 5th and 95th percentile (whisker lines). Dot line represents the reference TREC level at baseline before HAART initiation.

DISCUSSION

Thymus has been shown to play a role in the immune reconstitution of HIV-infected patients receiving HAART [11, 21, 22]. We have investigated whether treating OIs prior to HAART initiation has an effect on CD4 T-cells recovery and thymic output or TRECs. Our results indicate that treating OIs before HAART initiation leads to immune reconstitution on HAART similar to that observed in patients with no OIs. The CD4 T-cell gain was not different between the 2 groups after 12 months HAART (120 vs 149 cells/ μ L; $p = 0.84$). Although TRECs levels were significantly increased at 6 and 12 months HAART in the no OIs group and at 12 months of HAART in the OIs group, the TREC increase was not significantly different between the two groups either after 6 or 12 months HAART suggesting a

similar level of thymic function on HAART in the two groups. In both groups, the increase of TRECs after 12 months HAART (Fig. 1) was consistent with the increase reported by Lewin *et al.* [23] in patients receiving over 2 years HAART. As described by others, we also observed a fraction of the patients on HAART, 18% of no OIs and 11% of treated OIs patients, who exhibited at least a 2-fold increase in TREC levels after 12 months HAART [12, 24-26]. Furthermore in both groups, HIV replication was well suppressed in the majority of patients and none of the treated OI patients developed IRIS.

A trend for a lower TREC increase in patients who achieved >200 CD4 cells after 6 months HAART was consistent with the findings of Pakker *et al.* [27] who showed a bi-phasic CD4-cell increase on HAART; a rapid increase in CD4 T-cells due to the redistribution of CD4 T-cells from lymphoid tissues followed by a slow and steady increase of both naïve and memory CD4 T-cells.

Our study has some limitations. First the number of patients and the heterogeneity of opportunistic infections; the level of immune reconstitution may differ according to the type of OIs however we could not answer this due to the number of patients presenting a particular OI type. Second, it was not possible to analyze the TREC levels in HIV-infected patients with untreated OIs at HAART initiation since treatment of OIs before starting HAART is recommended in the “Thai National Guidelines for Antiretroviral Therapy in HIV-1 Infected Adults and Adolescents 2010” [6]. Third, due to the limited volume of blood collected it was not possible to analyze the levels of TREC in the CD4 and CD8 T-cell population as well as in the memory or naïve sub-populations (CD45RO⁺ and CD45RA⁺), which are immune resources, and also measure the levels of IL-7 and IL-7R, which are both involved in homeostatic regulation. Indeed previous studies have demonstrated that these two markers influence immune reconstitution of T-cell compartment after HAART, independently of the thymus [28, 29].

In summary, our study indicates that patients with treated OIs at HAART initiation have comparable immune reconstitution to that of patients presenting no OIs after 12 months HAART. Further studies in a larger population with different types of OIs are needed to confirm our findings.

Table 2. Univariate and Multivariate Analysis for Association with Low TREC Increase (≤ 1) After 12 Months of HAART

Characteristics	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	Odds Ratio (95% CI)	p Value	Odds Ratio (95% CI)	p Value
Group				
No opportunistic infections	1.0	0.69		
Treated opportunistic infections	1.5 (0.2-9.5)			
Age				
≤ 40 years	1.0	0.40		
> 40 years	0.5 (0.1-2.8)			
HAART regimens				
Truvada + (NVP or EFV)	1.0	0.72		
d4T + 3TC + (NVP or EFV)	1.4 (0.2-8.5)			
Gender				
Male	1.0	0.19	3.2 (0.4-23.7)	0.25
Female	3.3 (0.6-20.2)			
Baseline CD4 T-cells				
≤ 40 cells/ μ L	1.0	0.45		
> 40 cells/ μ L	2.0 (0.3-12.2)			
6 months HAART CD4 T-cells				
≤ 200 cells/ μ L	1.0	0.06	9.0 (0.9-88.2)	0.03
> 200 cells/ μ L	9.0 (0.9-88.2)			

95%CI = 95% Confidence Interval.

PATIENT CONSENT

Declared none.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully appreciate the help and assistance of physicians, nurses and technicians of Sanpatong and Nakornping Hospital, Chiang-Mai, Thailand.

This study was supported by grants from the Thailand Research Fund and the Commission on Higher Education. This study was also supported in part by grants from the National Research University Project under Thailand's Office of the Higher Education Commission.

CONFLICT OF INTEREST

The author confirms that this article content has no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Kaufmann GR, Perrin L, Pantaleo G, *et al.* CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med* 2003; 163: 2187-95.
- [2] French MA, Lenzo N, John M, *et al.* Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med* 2000; 1: 107-15.
- [3] French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18: 1615-27.
- [4] Ruxrungtham K, Phanuphak P. Update on HIV/AIDS in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2001; 84 (Suppl 1): S1-17.
- [5] Williams BG, Dye C. Antiretroviral drugs for tuberculosis control in the era of HIV/AIDS. *Science* 2003; 301: 1535-7.
- [6] Sungkanuparph S. Thai national guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents 2010. *Asian Biomedicine* 2010; 4: 515-28.
- [7] World Health Organization. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infections in infants. Recommendations for a public health approach. 2010 version In; 2010.
- [8] Bains I, Thiebaut R, Yates AJ, Callard R. Quantifying thymic export: combining models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an explicit measure of thymic output. *J Immunol* 2009; 183: 4329-36.
- [9] Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 1985; 22: 563-75.
- [10] Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 609-18.
- [11] Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; 396: 690-5.
- [12] Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, *et al.* Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med* 1999; 190: 725-32.
- [13] Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JW, *et al.* Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med* 2000; 6: 1036-42.
- [14] Lawn SD, Torok ME, Wood R. Optimum time to start antiretroviral therapy during HIV-associated opportunistic infections. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 34-42.
- [15] Seddon J, Bhagani S. Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. *HIV AIDS (Auckl)* 2011; 3: 19-33.
- [16] Zolopa A, Andersen J, Powderly W, *et al.* Early antiretroviral therapy reduces AIDS progression/death in individuals with acute opportunistic infections: a multicenter randomized strategy trial. *PLoS One* 2009; 4: e5575.
- [17] Havlir DV, Kendall MA, Ive P, *et al.* Timing of antiretroviral therapy for HIV-1 infection and tuberculosis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1482-91.

- [18] Manosuthi W, Mankatitham W, Lueangniyomkul A, *et al.* Time to Initiate Antiretroviral Therapy Between 4 Weeks and 12 Weeks of Tuberculosis Treatment in HIV-Infected Patients: Results From the TIME Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 60: 377-83.
- [19] Schiffer JT, Sterling TR. Timing of antiretroviral therapy initiation in tuberculosis patients with AIDS: a decision analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 44: 229-34.
- [20] Ometto L, De Forni D, Patiri F, *et al.* Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS* 2002; 16: 839-49.
- [21] Ho Tsong Fang R, Colantonio AD, Uittenbogaart CH. The role of the thymus in HIV infection: a 10 year perspective. *AIDS* 2008; 22: 171-84.
- [22] Kolte L, Ryder LP, Albrecht-Beste E, Jensen FK, Nielsen SD. HIV-infected patients with a large thymus maintain higher CD4 counts in a 5-year follow-up study of patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Scand J Immunol* 2009; 70: 608-13.
- [23] Lewin SR, Ribeiro RM, Kaufmann GR, *et al.* Dynamics of T cells and TCR excision circles differ after treatment of acute and chronic HIV infection. *J Immunol* 2002; 169: 4657-66.
- [24] Douek DC, Betts MR, Hill BJ, *et al.* Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol* 2001; 167: 6663-8.
- [25] Harris JM, Hazenberg MD, Poulin JF, *et al.* Multiparameter evaluation of human thymic function: interpretations and caveats. *Clin Immunol* 2005; 115: 138-46.
- [26] Ribeiro RM, de Boer RJ. The contribution of the thymus to the recovery of peripheral naive T-cell numbers during antiretroviral treatment for HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 49: 1-8.
- [27] Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, *et al.* Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998; 4: 208-14.
- [28] Appay V, Fastenackels S, Katlama C, *et al.* Old age and anti-cytomegalovirus immunity are associated with altered T-cell reconstitution in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2011; 25: 1813-22.
- [29] Mussini C, Pinti M, Borghi V, *et al.* Features of 'CD4-exploders', HIV-positive patients with an optimal immune reconstitution after potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16: 1609-16.

Received: May 2, 2012

Revised: September 1, 2012

Accepted: September 5, 2012

Indian Pediatrics

Hematological Alterations and Impaired Thymic Function in Newborns of HIV-Infected Mothers Receiving Antiretroviral Drugs --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	INPE-D-12-00623R1
Full Title:	Hematological Alterations and Impaired Thymic Function in Newborns of HIV-Infected Mothers Receiving Antiretroviral Drugs
Article Type:	Research Paper
Corresponding Author:	Sakorn Pornprasert, Ph.D. Chiang-Mai University Muang, Chiang-Mai THAILAND
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Chiang-Mai University
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Rotjane Wongnoi, B.SC.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Rotjane Wongnoi, B.SC. Nawaporn Penvieng, B.Sc. Panthong Singboottra, Ph.D. Dounnapa Kingkeow, Ph.D. Peninnah Oberdorfer, MD. Ph.D. Pannee Sirivatanapa, MD. Sakorn Pornprasert, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Objectives: To investigate the effects of antiretroviral (ARV) drugs on hematological parameters and thymic function in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers. Study design: Cross sectional study. Setting: Chiang-Mai University Hospital, Chiang-Mai, Thailand. Participants/Patients: 49 HIV-uninfected and 26 HIV-infected pregnancies. Methods: Cord blood samples of newborns from HIV-uninfected and HIV-infected mothers were collected. Hematological parameters were measured using automatic blood cell count. T-cell receptor excision circles (TRECs) levels in cord blood mononuclear cells (CBMCs), CD4+ and CD8+ T-cells were quantified using real-time PCR. Main Outcome Measures: Effect of ARV drugs used for prevention of HIV-mother-to-child transmission (MTCT) on hemotological parameters and thymic function. Results: Newborn of HIV-infected mother tended to have lower mean levels of hemoglobin than those of HIV-uninfected mother (137 ± 22 vs 146 ± 17 g/L, $P = 0.05$). Furthermore, mean of red blood cell (RBC) counts and hematocrit and median of TRECs in CD4+ T-cells in the newborns of the former were significantly lower than those of the latter [3.6 ± 0.7 vs $4.8 \pm 0.6 \times 10^{12}$ cells/L, $P < 0.001$; 0.40 ± 0.07 vs 0.46 ± 0.05 L/L, $P < 0.001$ and 0.53 (IQR: 0.03-5.76) vs 13.20 (IQR: 2.77-27.51) $\times 10^{-3}$ pg/μL, $P = 0.02$, respectively]. Conclusion: The finding suggested that the ARV drugs altered hematological parameters and impaired thymic function (TRECs CD4+ T-cells) in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers.
Response to Reviewers:	Dear Editor Indian Pediatrics Journal,

We would like to thank the reviewers for the constructive comments which allowed us to improve the paper. We have revised the manuscript accordingly and would like to resubmit our revised manuscript for your consideration.

Please find the revised manuscript entitled "Hematological alterations and impaired thymic function in newborns of HIV-infected mothers receiving antiretroviral drugs" attached.

We have copied below the comments from the reviewers and provided our explanations and answers in indented paragraphs. The changes made appear in red in the manuscript.

Reviewer comments

Reviewer #1:

General Comments

1. The study topic is interesting and relevant.
2. The use of English language needs improvement.
 - The manuscript has been edited by an English instructor.
3. The contents of the article are too technical, and might be confusing to the reader. I suggest to simplify the technical part to make it interesting for the reader. The authors may also wish to present some 'technical' part as supplementary files.
 - We have changed language in the technical part to improve understanding and to make it more interesting. The changes are in red.

Specific comments

Title and abstract

1. The authors have indicated the study's design as prospective cohort study in abstract. Only one time cord blood samples were taken and compared with controls. Hence I feel it should be cross sectional study.
 - The "prospective cohort study" was changed to "cross sectional study" as suggested by the reviewer.

2. Language of objective can be simplified to improve understanding.
 - The objective was modified as shown below:
"To investigate the effects of antiretroviral (ARV) drugs on hematological parameters and thymic function in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers."

3. Mean/median and SD/IQR should be provided for main outcomes.
 - Mean/median and SD/IQR have been added.

4. Conclusions should be restricted to what you have found; implications should be removed.
 - The conclusion was shortened as shown below:
"The finding suggested that the ARV drugs altered hematological parameters and impaired thymic function (TREC⁺ CD4⁺ T-cells) in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers."

Methods and results

1. Study design needs attention

- The study design has been changed as recommended.
2. The sources and methods of selection of participants should be elaborated. How the controls were selected?
 - We have added methods of participants' selection in the paper as follow: "To obtain the subjects, the exclusion criteria for the study were set as follow: women with twin or multiple births, infected with other microorganisms, used of psychopharmaceutical drugs, illicit drugs, alcohol and tobacco during gestation."
 - Moreover, only 12 out of control newborns were used in TRECs in CD4⁺ and CD8⁺

T-cells analyses due to the limited volume of cord blood samples which is described in "Discussion".

3. What was the Cord clamping protocol during the study. Was there any difference in the two groups as this can affect haematological parameters?

- The cord blood sample collection method of both groups is the same and was described in more detail under "Isolation of cord blood mononuclear cells (CBMCs)" as read below:

"Cord blood samples were drawn from clamped umbilical vein within 5-10 minutes after deliveries into ethylenediamine tetraacetic acid anticoagulation (EDTA) tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA)."

4. What was the method of taking cord blood for analysis is not described by the authors.

- Method of taking cord blood was answered for the previous comment (#3).

5. Certain other baseline characteristics should be provided which can affect the haemoglobin status at birth and hence introduce bias in the study. For example maternal and cord ferritin levels.

- Other parameters that may affect the hemoglobin status at birth were used as the exclusion criteria for the enrolment. In addition, the information regarding iron and folate supplementation given to all pregnancies has been added in the " Study population" section as shown below:

"All women in our study were given iron and folate supplementation as recommended by the Thai National Guidelines for Pregnancies. [20]."

6. Overall haemoglobin is less in the population. In controls the HCT was 46% which is less than the standard literature. Any specific reason for that observation.

- The reasons for the lower Hb and Hct found in studied population were described under "Discussion" as the following:

"Although, the hemoglobin and hematocrit in newborns of HIV-infected mothers were significantly lower than those of HIV-uninfected mothers. We also found that, mean levels of these two hematological parameters in both groups were lower than normal range levels (hemoglobin 165-215 g/L and hematocrit 0.48-0.68 L/L). These lower levels might have caused from the hematologic genetic disorders such as thalassemia and G-6-PD deficiency frequently found in Thai population [28]. However, the hematologic genetic disorders were not used as a variable factor in our study."

7. The difference in the hematocrit is highly significant. However after drawing the Gaussian curve according to the dispersion, there is lot of overlap in the controls and cases. Is the calculation accurate.

- We have rechecked and reanalysed the hematocrit levels, and found that the previous calculation was accurate.

8. While the authors have found less hematocrit in cases, their MCHC is higher than controls. How do the authors explain this paradox?

- The MCHC is measured in percentage and calculated by using the following formula: $MCHC = (Hb/Hct) \times 100$

Since the Hb levels between two groups were slightly different, whereas the Hct levels of the cases were significantly lower than the controls. Therefore, MCHC of the former was higher than the latter.

9. Neonates born to HIV positive mothers were 150 gram lighter than controls. As the mothers had HIV they are predisposed to other STDs. Certain viral infections may also affect hematopoiesis. Did the authors check for clinical/ lab features of other viral infections?

- The weight different between 2 groups was not significantly different ($2,873 \pm 461$ vs $3,029 \pm 412$, $p = 0.18$)

- The clinical features (see-the exclusion criteria) were used to screen all participants.

10. How did the authors decide sample size?

- The authors enrolled all pregnant women who have all designated criteria and consent to participate in our study and gave birth from March to December 2011.

Reviewer #2:

1. There could have been a comparison between the mothers' parameters with those of the infants' cord blood parameters as that would have added more credibility to the comparison between babies born to HIV-infected and uninfected mothers.

- The study of hematological parameters in mothers would certainly provide interesting results. However, the authors did not have the informed consent from the mothers for collecting their blood at delivery.

2. Except for a spelling mistake in the abstract, no other changes required - 'later' to be replaced with 'latter'.

- "later" was corrected to "latter".

We hope that we have responded adequately to the comments.

Thank you for your consideration of this revised paper.

Sakorn Pornprasert (Ph.D.)

Title page

Title: Hematological Alterations and Impaired Thymic Function in Newborns of HIV-Infected Mothers Receiving Antiretroviral Drugs

Authors: ROTJANEE WONGNOI, NAWAPORN PENVIENG, PANTHONG SINGBOOTTRA, *DOUNGNAPA KINGKEOW, †PENINNAH OBERDORFER, \$PANNEE SIRIVATANAPA AND SAKORN PORNPRASERT

Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand

*Research Institute for Health Sciences, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand

†Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand

\$Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand

Short running title : ARVs alter hematology and thymic function

Corresponding author:

Dr. Sakorn Pornprasert

Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences,

Chiang-Mai University, 110 Intawaroros Road, Chiang-Mai, Thailand, 50200

Tel : 66-53-945078 Fax : 66-53-946042 E-mail : sakornmi.001@gmail.com

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

Word count : 2,296

Acknowledgements

The authors thank all HIV-infected and uninfected mothers who participated in this study. We gratefully appreciate the help and assistance of physicians, nurses and technicians of Maharaj Nakorn Chiang-Mai Hospital, Chiang-Mai, Thailand.

This study was supported by the Thailand Research Fund and the Commission on Higher Education. It was also supported in part by the National Research University Project under Thailand's Office of the Higher Education Commission.

Abstract

Objectives: To investigate the effects of antiretroviral (ARV) drugs on hematological parameters and thymic function in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers.

Study design: Cross sectional study.

Setting: Chiang-Mai University Hospital, Chiang-Mai, Thailand.

Participants/Patients: 49 HIV-uninfected and 26 HIV-infected pregnancies.

Methods: Cord blood samples of newborns from HIV-uninfected and HIV-infected mothers were collected. Hematological parameters were measured using automatic blood cell count. T-cell receptor excision circles (TRECs) levels in cord blood mononuclear cells (CBMCs), CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were quantified using real-time PCR.

Main Outcome Measures: Effect of ARV drugs used for prevention of HIV-mother-to-child transmission (MTCT) on hemotological parameters and thymic function.

Results: Newborn of HIV-infected mother tended to have lower mean levels of hemoglobin than those of HIV-uninfected mother (137 ± 22 vs 146 ± 17 g/L, $P = 0.05$). Furthermore, mean of red blood cell (RBC) counts and hematocrit and median of TRECs in CD4⁺ T-cells in the newborns of the former were significantly lower than those of the latter [3.6 ± 0.7 vs $4.8 \pm 0.6 \times 10^{12}$ cells/L, $P < 0.001$; 0.40 ± 0.07 vs 0.46 ± 0.05 L/L, $P < 0.001$ and 0.53 (IQR: 0.03-5.76) vs 13.20 (IQR: 2.77-27.51) $\times 10^{-3}$ pg/ μ L, $P = 0.02$, respectively].

Conclusion: The finding suggested that the ARV drugs altered hematological parameters and impaired thymic function (TRECs CD4⁺ T-cells) in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers.

Key Words: Antiretroviral drugs, Hematology, HIV, Newborn, Thymic function

Introduction

Almost half of the estimated 40 million people living with HIV are women of childbearing age [1]. The risk of these women to transmit HIV to their infants is 15-25% when no precautions are taken [2]. The HIV-mother-to-child transmission (MTCT) rate has dramatically reduced to be less than 2% if antiretroviral (ARV) drugs of highly active antiretroviral therapy (HAART) regimen were administrated to the HIV-infected woman during pregnancy and labor as well as to her infants [3, 4]. The previous studies showed that Zidovudine (ZDV) which is a potent inhibitor of bone marrow function is associated with hematological abnormalities not only in mothers, but also in newborns, because this drug can cross the placental barrier and negatively affect fetal erythropoiesis [5-8]. Moreover, ZDV-based HAART commonly associated with a greater negative impact on hematologic parameters than ZDV-free regimens [9]. The adverse hematologic effects of ARV drugs have been reported in HIV-uninfected infants, especially in their early life [10]. The frequently adverse hematologic effects found are anemia, neutropenia, lymphocytopenia and thrombocytopenia [7, 11-13].

The thymus is a primary source of naïve T-cells and plays a key role in establishing and maintaining a peripheral T-cell pool [14]. Thymus reaches its maximum volume by one year of age. After that its size as well as its function decline [15]. A production of naïve T-cells by the thymus can be quantified by measuring T-cell receptor excision circles (TRECs), **a DNA fragment formed during T-cell development**. These DNA fragments do not replicate during mitosis and are thus diluted during cell division [16]. Previous studies demonstrated that both HIV-proteins and some antiretroviral drugs inhibited progenitor cells and thymic functions, as indicated by the frequency of TRECs [17-19]. However, an evaluation of hematological and immunological toxicity in newborn exposed to maternal ARV drugs administered during pregnancy has been limited. The aims of this study were to measure and

compare hematological parameters and TRECs levels in HIV-uninfected newborn of HIV-infected mother receiving ARV drugs for prevention of HIV-MTCT with those of normal control newborn.

Materials and methods

Study population

This study was conducted at Chiang-Mai University Hospital, Chiang-Mai, Thailand. The protocol was approved by the Faculty of Medicine Ethics Committee, Chiang-Mai University, Chiang-Mai, Thailand. All pregnant women participated in this study had signed a written informed consent. To obtain the subjects, the exclusion criteria for the study were set as follow: women with twin or multiple births, infected with other microorganisms, used of psychopharmaceutical drugs, illicit drugs, alcohol and tobacco during gestation. From March to December 2011, 26 HIV-infected and 49 HIV-uninfected pregnant women were enrolled. These HIV-infected women received ARV drugs [ZDV plus Lamivudine (3TC) and Lopinavir/Ritonavir (LPV/r)] during pregnancy and labor every 12 hours with adding of ZDV every 3 hours during labor and delivered vaginally or elective caesarean section. The following data were collected from all women: age, gestational age at delivery and mode of delivery. For the HIV-1 infected women, the following additional data were collected: antiretroviral prophylaxis (type and timing), CD4⁺ T-cell counts (cells/ μ L) during pregnancy and plasma HIV-1 RNA viral load measured in a week before delivery (log₁₀ copies/mL). All women in our study were given iron and folate supplementation as recommended by the Thai National Guidelines for Pregnancies [20]. Diagnosis for HIV-1 infection in infants born to HIV-1 infected mothers was performed at one and four months of age using DNA PCR (Amplicor[®] HIV-1 DNA assay version 1.5, Roche Molecular Systems Inc., USA).

Isolation of cord blood mononuclear cells (CBMCs)

Cord blood samples were drawn from clamped umbilical vein within 5-10 minutes after delivery into ethylenediamine tetraacetic acid anticoagulation (EDTA) tubes (BD Vacutainer™, Franklin Lakes, NJ, USA). The sample tubes were then shipped to the hematology laboratory, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang-Mai University within 3 hours. Upon arrival, hematological parameters were measured using an automated blood counter (Sysmex KX-21; Sysmex Corporation, Kobe, Japan). Cord blood mononuclear cells (CBMCs) were isolated using Ficoll-Hypaque gradient (IsoPrep, Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA). Cells were then aliquoted and stored in liquid nitrogen until used.

Separation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells

CD4⁺ and CD8⁺ T-cell separation was performed from CBMCs of the 15 HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers and only 12 HIV-uninfected newborns of HIV-uninfected mothers. Frozen CBMCs were thawed and washed twice in cold phosphate-buffered saline solution. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were separated using a magnetic cell separator (EasySep®, STEMCELL Technologies, USA) according to manufacturers' instructions. The separated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells cells were count on hemacytometer under light microscope using Turk's solution.

DNA preparation and quantification of TRECs

DNA was extracted from 1.5×10^6 cells of CBMCs, separated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells using the NucleoSpin® kit (Macherey-Nagel, KG., Duren, Germany) according to manufacturers' instructions and was stored at -20°C until used. TRECs analysis was performed by quantitative real-time PCR as described by Ometto *et al.* [21] with slightly modification. The DNA amplification was carried out in a 25 µL reaction mixture containing

5 μ L DNA sample or sterile distilled water as a no template control, 1x real-time PCR Master Mix (Thermo Scientific ABsolute™ QPCR ROX Mix, Surrey, UK), 400 nM each primer (forward, 5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'; reverse, 5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3' : GenBank sequence accession number DQ858179.1) and 200 nM of the fluorogenic probe (5'-ACACCTCTGGTTTTTGTAAGGTGCCCCAC T-3') conjugated with FAM (6-carboxyfluorescein) at the 5'-end, and TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) at the 3'-end. The PCR primers and the fluorogenic probe were specifically designed for the detection of human TRECs. The amplification was performed in a Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research; Mortlake, New South Wales, Australia). The mixture was preheated at 95°C for 15 min, followed by 50 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. A cycle threshold (C_T) is defined as the PCR cycle at which an increase in the fluorescence above the baseline signal is first detected. The C_T value is inversely related to the copy number of the target sequence. TRECs concentrations were calculated from a standard curve of a plasmid clone containing TRECs which run in parallel with the test. All samples and TRECs plasmid were run in duplicate. TRECs level in CBMCs was presented as concentration of TRECs per 1.5×10^6 CBMCs while those in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell was presented as concentration of TRECs per cell.

Statistical analysis

The data are presented as median, mean and standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using SPSS software package (Statistical Package for the Social Sciences 11.0, Chicago, IL, USA). Characteristics and hematological parameters were compared between 2 groups of newborns of HIV-infected and uninfected mothers using Compare Means with Independent Samples *t* test and Fisher's exact test while levels of

TRECs between the two groups were compared using Mann-Whitney test. The level of significance for all analyses was set at 0.05.

Results

Participants and clinical data

The clinical data of participants are shown in Table I. Mean of maternal ages and gestational ages at delivery were similar between HIV-infected and uninfected women. All HIV-infected mothers received ZDV plus 3TC and LPV/r starting at the average of gestational age at 21 weeks. Most of HIV-infected and uninfected women delivered vaginally (65% and 85%, respectively). Means of birth weight of the two groups have no significantly differences. Mean CD4⁺ T- cell count of HIV-infected mother was 517 cells/ μ L. The HIV RNA viral loads measured at one week before delivery of HIV-infected women were less than 40 copies/mL and none of all newborns born to HIV-1 infected mothers were HIV-infection.

Hematological alterations in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers

Mean levels of white blood cell (WBC) counts, absolute neutrophil counts, absolute lymphocyte counts and platelet counts in newborns of HIV-infected and uninfected mothers did not differ significantly (Table II). There was a trend of lower hemoglobin levels in newborns of HIV-infected mothers than those of HIV-uninfected mothers. Moreover, means of red blood cell (RBC) counts and hematocrit in newborns of HIV-infected mothers were significantly lower than those of HIV-uninfected mothers. On the other hand, newborns of HIV-infected mothers showed higher mean levels of red cell indices including mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) than those of HIV-uninfected mothers (Table II).

Decrease of TRECs CD4⁺ T-cell in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers

No significant difference in median of TRECs levels in CBMCs (Fig. 1a) and in CD8⁺ T-cell (Fig. 1b) between newborns of HIV-infected mothers and uninfected mothers. However, TRECs levels in CD4⁺ T-cell (Fig. 1c) in newborns of HIV-infected mothers were significantly lower than those of HIV-uninfected mothers.

Discussion

Antiretroviral drugs administered to HIV-infected mothers and their offspring diminished the risk of HIV-MTCT to lower than 2% [3, 4]. Despite the fact that infant born to HIV-infected mother receiving ARV drugs remain uninfected, hematological parameters have been shown to be impaired [11, 12]. The current study showed that ARV drugs (ZDV plus 3TC and LPV/r) administered to HIV-infected mother for prevention of HIV-MTCT altered the hematological parameters of newborns as indicated in the decrease of RBC counts, hemoglobin and hematocrit levels and the increase of MCV, MCH and MCHC. Furthermore, the thymic function of these newborns was also impaired as indicated in the decrease of TRECs CD4⁺ T-cell. The previous study showed that maternal derived HIV-proteins diffusing across the placental barrier during pregnancy could reduce thymic function [19, 22]. In addition, both HIV-proteins and ARV drugs are known to inhibit progenitor cell function [17, 18]. However, in present study, the effects of HIV-proteins on thymic function might be less than those of ARV drugs since maternal viral loads in all HIV-infected mothers measured at one week before delivery were less than 40 copies/mL.

Our data are reassuring, ARV prophylaxis dose seem to significantly reduce hematological indices because the mean MCV in newborns of HIV-infected mother was significantly higher than those of HIV-uninfected mothers. Moreover, some newborns (31%) of HIV-infected mother had MCV higher than the normal upper limit value (120 fL). In

present study, all HIV-infected mother received ZDV and 3TC which have been report for the induction of macrocytic anemia [10, 23]. Antiretroviral drugs are routinely prescribed during the second trimester, in which hematopoiesis and lymphopoiesis are active, i.e., hepatic hematopoiesis and lymphopoiesis, spleen development, thymic education and bone marrow development. The administration of ARV drugs during the critical window of hematopoiesis and lymphopoiesis may affect the generation of these precursors [12]. Therefore, an impaired of hematopoiesis and lymphopoiesis may have contributed to the hematopoietic alteration and the reduction of thymic output, respectively. The decrease of CD4⁺-TRECs levels observed in the present study was consistent with the previous study by Clerici *et al.* that showed CD4⁺/45RA/62⁺ (naïve lymphocytes) in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers received ZDV for prevention of HIV-MTCT were significantly lower than those of newborns of HIV-uninfected mothers [22]. In contrast, Kolte *et al.* showed that thymic size but not thymic function (TRECs CD4⁺ T-cell) in HIV-uninfected newborns of HIV-infected mothers received ARV drugs [ZDV/ plus 3TC and LPV/r or Nevirapine (NVP)] for prevention of HIV-MTCT was significantly lower than those of HIV-uninfected mothers [24]. These two different observational results can be explained that there was a difference in the study populations. While our cohorts were newborns, Kolte's cohorts were children with age of 15 months, that was probably when the side effect of ARV drugs resolved. Moreover, the maternal ethnicities between the two groups of children were different [24]. There are many parameters that have been shown to be associated with the hematologic variables such as maternal ethnicity, drug use, maternal CD4⁺ T-cell count at delivery, mode of delivery and also infant gestation age, birth weight and sex [25, 26]. In a current study, these factors are controlled by matching of maternal ethnicity, maternal age at delivery, gestational age, mode of delivery, fetal sex and birth weight between the test group and control group.

WBC counts, absolute neutrophil counts, absolute lymphocyte counts and platelet counts in newborns of HIV-infected mothers were similar to those of HIV-uninfected mothers (Table II). These results were consistent with the previous study by Bunders *et al.* that showed the levels of WBC counts, absolute neutrophil counts, absolute lymphocyte counts and platelet counts measured at birth in HIV-1/ARV-exposed infants were not different from those in matched comparison group. However, a lower WBC counts, absolute neutrophil counts in HIV-1/ARV-exposed infants were observed at 5 weeks of age while a lower level of hemoglobin in these infants were observed at birth and 5 weeks of age [27]. Thus, further studies are needed to evaluate how long the hematological alteration and impaired thymic function persist.

The present study has a limitation in the limited volume of cord blood collected thus levels of TRECs in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells could be analyzed in only 12 and 15 samples of newborns of HIV-uninfected and infected mothers, respectively. Moreover, it was impossible to analyze the levels of TRECs in memory or naïve CD4⁺ and CD8⁺ T-cell sub-populations (CD45RO⁺ and CD45RA⁺), which are the immune resources. Although, the hemoglobin and hematocrit in newborns of HIV-infected mothers were significantly lower than those of HIV-uninfected mothers. We also found that, mean levels of these two hematological parameters in both groups were lower than normal range levels (hemoglobin 165-215 g/L and hematocrit 0.48-0.68 L/L). These lower levels might have caused from the hematologic genetic disorders such as thalassemia and G-6-PD deficiency frequently found in Thai population [28]. However, the hematologic genetic disorders were not used as a variable factor in our study.

In summary, our study indicates that ARV drugs (ZDV plus 3TC and LPV/r) for prevention of HIV-MTCH altered the hematological parameters and impaired thymic function (TRECs CD4⁺ T-cell) in newborns of HIV-infected mothers. These phenomena may impact the quality of life including growth, development, vaccination responses and susceptibility to

infections of infants. Therefore the long-term effects of these drugs in larger population are
needed to be clarified.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

1. Quinn TC, Overbaugh J. HIV/AIDS in women: an expanding epidemic. *Science*. 2005;308:1582-83.
2. Burns DN, Mofenson LM. Paediatric HIV-1 infection. *Lancet*. 1999;354 Suppl 2:SII1-6.
3. European Collaborative Study. Mother-to-child transmission of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2005;40:458-65.
4. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, *et al*. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;29:484-94.
5. Baroncelli S, Pinnetti C, Genovese O, Tamburrini E, Floridia M. Hematological effects of zidovudine prophylaxis in newborn infants with and without prenatal exposure to zidovudine. *J Med Virol*. 2011;83:551-6.
6. El Beitune P, Duarte G. Antiretroviral agents during pregnancy: consequences on hematologic parameters in HIV-exposed, uninfected newborn infant. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006;128:59-63.
7. Feiterna-Sperling C, Weizsaecker K, Buhrer C, Casteleyn S, Loui A, Schmitz T, *et al*. Hematologic effects of maternal antiretroviral therapy and transmission prophylaxis in HIV-1-exposed uninfected newborn infants. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45:43-51.
8. Gribaldo L, Malerba I, Collotta A, Casati S, Pessina A. Inhibition of CFU-E/BFU-E by 3'-azido-3'-deoxythymidine, chlorpropamide, and protoporphirin IX zinc (II): a comparison between direct exposure of progenitor cells and long-term exposure of bone marrow cultures. *Toxicol Sci*. 2000;58:96-101.

9. Pinnetti C, Baroncelli S, Molinari A, Nardini G, Genovese O, Ricerca BM, *et al.*
Common occurrence of anaemia at the end of pregnancy following exposure to
zidovudine-free regimens. *J Infect.* 2011;63:144-50.
10. Moyle G, Sawyer W, Law M, Amin J, Hill A. Changes in hematologic parameters and
efficacy of thymidine analogue-based, highly active antiretroviral therapy: a meta-
analysis of six prospective, randomized, comparative studies. *Clin Ther.* 2004;26:92-7.
11. Le Chenadec J, Mayaux MJ, Guihenneuc-Jouyaux C, Blanche S. Perinatal
antiretroviral treatment and hematopoiesis in HIV-uninfected infants. *AIDS.*
2003;17:2053-61.
12. Pacheco SE, McIntosh K, Lu M, Mofenson LM, Diaz C, Foca M, *et al.* Effect of
perinatal antiretroviral drug exposure on hematologic values in HIV-uninfected
children: An analysis of the women and infants transmission study. *J Infect Dis.*
2006;194:1089-97.
13. Watson WJ, Stevens TP, Weinberg GA. Profound anemia in a newborn infant of a
mother receiving antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:435-6.
14. Bains I, Thiebaut R, Yates AJ, Callard R. Quantifying thymic export: combining
models of naive T cell proliferation and TCR excision circle dynamics gives an
explicit measure of thymic output. *J Immunol.* 2009;183:4329-36.
15. Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human
thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J*
Immunol. 1985;22:563-75.
16. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are
abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol.* 1996;16:609-18.

17. Clark DR, Repping S, Pakker NG, Prins JM, Notermans DW, Wit FW, *et al.* T-cell progenitor function during progressive human immunodeficiency virus-1 infection and after antiretroviral therapy. *Blood*. 2000;96:242-9.
18. Dam Nielsen S, Kjaer Ersboll A, Mathiesen L, Nielsen JO, Hansen JE. Highly active antiretroviral therapy normalizes the function of progenitor cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis*. 1998;178:1299-305.
19. Nielsen SD, Jeppesen DL, Kolte L, Clark DR, Sorensen TU, Dreves AM, *et al.* Impaired progenitor cell function in HIV-negative infants of HIV-positive mothers results in decreased thymic output and low CD4 counts. *Blood*. 2001;98:398-404.
20. Winichagoon P. Prevention and control of anemia: Thailand experiences. *J Nutr*. 2002;132:862-6.
21. Ometto L, De Forni D, Patiri F, Trouplin V, Mammano F, Giacomet V, *et al.* Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS*. 2002;16:839-49.
22. Clerici M, Saresella M, Colombo F, Fossati S, Sala N, Bricalli D, *et al.* T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood*. 2000;96:3866-71.
23. Eyer-Silva WA, Arabe J, Pinto JF, Morais-De-Sa CA. Macrocytosis in patients on stavudine. *Scand J Infect Dis* 2001;33:239-40.
24. Kolte L, Ryder LP, Albrecht-Beste E, Jensen FK, Nielsen SD. HIV-infected patients with a large thymus maintain higher CD4 counts in a 5-year follow-up study of patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Scand J Immunol*. 2009;70:608-13.

25. Bunders M, Thorne C, Newell ML. Maternal and infant factors and lymphocyte, CD4 and CD8 cell counts in uninfected children of HIV-1-infected mothers. *AIDS*. 2005;19:1071-9.
26. Rodriguez EM, Mofenson LM, Chang BH, Rich KC, Fowler MG, Smeriglio V, *et al*. Association of maternal drug use during pregnancy with maternal HIV culture positivity and perinatal HIV transmission. *AIDS*. 1996;10:273-82.
27. Bunders MJ, Bekker V, Scherpbier HJ, Boer K, Godfried M, Kuijpers TW. Haematological parameters of HIV-1-uninfected infants born to HIV-1-infected mothers. *Acta Paediatr*. 2005;94:1571-7.
28. Tanphaichitr VS, Mahasandana C, Suvatte V, Yodthong S, Pung-amritt P, Seeloem J. Prevalence of hemoglobin E, alpha-thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in 1,000 cord bloods studied in Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1995; 26:271-4.

Figure legends:

FIG. 1 T-cell receptor excision circles (TRECs) levels of newborns of HIV-infected and uninfected mothers. (a) TRECs in CBMCs, (b) TRECs CD8⁺ T-cell, (c) TRECs CD4⁺ T-cell. Data are presented median (horizontal line), 25th and 75th (box) and 5th and 95th percentile (whisker lines). TRECs levels in CBMCs were analyzed from 26 and 49 newborns of HIV-infected and uninfected mothers, respectively while TRECs CD8⁺ and CD4⁺ T-cell were analyzed from 15 and 12 newborns of HIV-infected and uninfected mothers, respectively.

TABLE I Characteristics of HIV-infected and uninfected mother and their newborns. The data are expressed as Mean $\pm$ SD (ranges).

Characteristics :	HIV-infected mother (n = 26)	HIV-uninfected mother (n = 49)	P-Value
Age at delivery (years)	30 $\pm$ 7 (17-42)	27 $\pm$ 6 (15-42)	0.08*
Gestational age at delivery (weeks)	38 $\pm$ 2 (33-40)	38 $\pm$ 1 (34-41)	0.58*
Gestational age at ARV prophylaxis initiation (weeks)	21 $\pm$ 5 (14-27)	Not Relevant	
CD4 ⁺ T-cell count during pregnancy (cells/ μ L)	517 $\pm$ 188 (186-859)	Not Relevant	
HIV RNA load measured at one week before delivery (copies/mL)	<40	Not Relevant	
Mode of delivery VD : CS	17 : 9	39 : 10	0.24 [#]
Gender of newborn Male : Female	18 : 8	24 : 25	0.08 [#]
Birth weight of newborn (g)	2,873 $\pm$ 461 (2,050-3,910)	3,029 $\pm$ 412 (2,250-3,950)	0.18*

VD = Vaginal delivery, CS = caesarean section

*Compare Means with Independent Samples *t* test

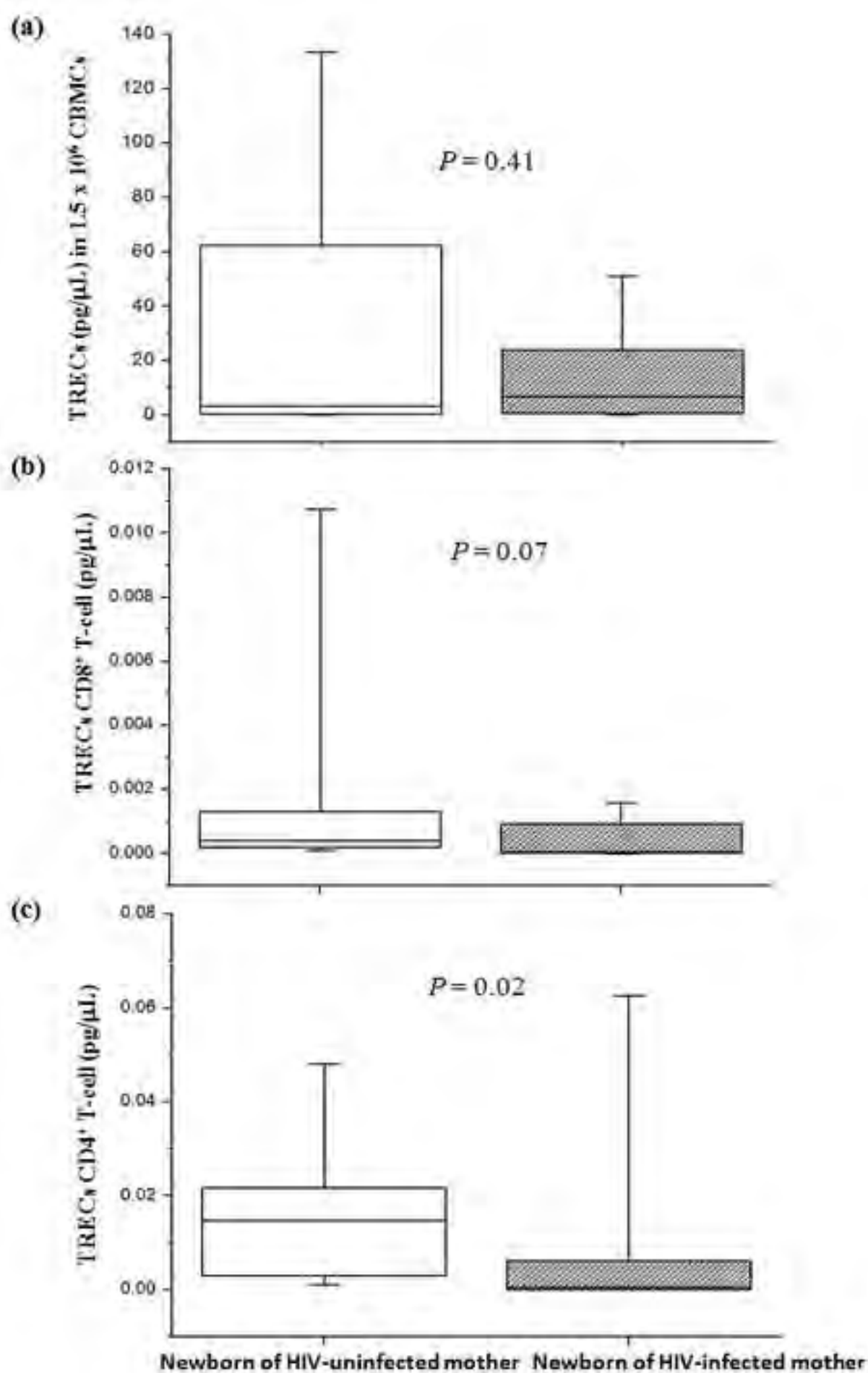
[#]Fisher's exact test

TABLE II Hematological parameters of newborns of HIV-infected and uninfected mothers. The results are shown by Mean $\pm$ SD (range).

Hematological parameters	Newborn of HIV-infected mother (n = 26)	Newborn of HIV-uninfected mother (n = 49)	P-Value
WBC ($\times 10^9$ cells/L)	13.0 $\pm$ 5.0 (3.5-24.3)	14.6 $\pm$ 5.6 (5.3-35.1)	0.24
Absolute neutrophils ($\times 10^9$ cells/L)	7.4 $\pm$ 2.6 (2.4-12.3)	6.5 $\pm$ 2.7 (0.8-11.5)	0.27
Absolute lymphocytes ($\times 10^9$ cells/L)	4.8 $\pm$ 2.9 (2.1-12.8)	5.8 $\pm$ 3.1 (2.8-21.2)	0.19
RBC ($\times 10^{12}$ cells/L)	3.6 $\pm$ 0.7 (1.7-4.9)	4.8 $\pm$ 0.6 (3.7-6.2)	<0.001
Hemoglobin (g/L)	137 $\pm$ 22 (71-166)	146 $\pm$ 17 (104-180)	0.05
Hematocrit (L/L)	0.40 $\pm$ 0.07 (0.21-0.51)	0.46 $\pm$ 0.05 (0.36-0.54)	<0.001
MCV (fL)	113 $\pm$ 10 (95-130)	95 $\pm$ 9 (75-110)	<0.001
MCH (pg)	38.4 $\pm$ 4.3 (30.7-49.4)	30.48 $\pm$ 4.1 (21.2-36.4)	<0.001
MCHC (g/L)	339 $\pm$ 16 (305-380)	319 $\pm$ 20 (271-356)	<0.001
Platelet counts ($\times 10^9$ /L)	318 $\pm$ 92 (157-511)	287 $\pm$ 64 (181-422)	0.12

Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Annexure I

Authorship Criteria and Responsibility, Financial Disclosure, Acknowledgment, and Copyright Transfer Form

Manuscript no. *INPE - D - 12 - 00623*

Manuscript Title *Hematological Alterations and Impaired Thymic Function in Newborns of HIV-Infected Mothers Receiving Antiretroviral Drugs*

I/We certify that the manuscript represents valid work and that neither this manuscript nor one with substantially similar content under my/our authorship has been published or is being considered for publication elsewhere. For papers with more than 1 author, We agree to allow the corresponding author to serve as the primary correspondent with the editorial office, to review the edited typescript and proof.

I/We have seen and approved the submitted manuscript. All of us have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the contents. All the authors have made substantial contributions to the intellectual content of the paper and fulfil at least 1 condition for each of the 3 categories of contributions: i.e., Category 1 (conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data), Category 2 (drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript for important intellectual content) and Category 3 (final approval of the version to be published).

I/We also certify that all my/our affiliations with or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript are completely disclosed on the title page of the manuscript. My/our right to examine, analyze, and publish the data is not infringed upon by any contractual agreement.

I/We certify that all persons who have made substantial contributions to the work reported in this manuscript (e.g., data collection, writing or editing assistance) but who do not fulfil the authorship criteria are named along with their specific contributions in an acknowledgment section in the manuscript. If an acknowledgment section is not included, no other persons have made substantial contributions to this manuscript. I/We also certify that all persons named in the acknowledgment section have provided written permission to be named.

The author(s) undersigned hereby transfer(s), assign(s), or otherwise convey(s) all copyright ownership, including any and all rights incidental thereto, exclusively to the Indian Pediatrics, in the event that such work is published in Indian Pediatrics.

We warrant that the work is original and it contains no libellous statements, that it contains nothing unlawful, and does not infringe upon any copyright, trademark, patent, statutory right, proprietary right of others and that I shall indemnify the editors against any costs, expenses and damages arising from any breach of this warranty.

Authors' name(s) in order of appearance in the manuscript Signatures (date)

1. *Rotjane Wongnoi*

Rotjane Wongnoi

2. *Nawaporn Penvieng*

N. Pui

3. *Panthong Singbootra*

Panthong Singbootra

4. *Doungnapa Kingkeow*

Doungnapa Kingkeow

5. *Peninnah Oberdorfer*

P. Oberdorfer

6. *Panee Sirivatanapa*

Panee Sirivatanapa

7. *Sakorn Pomprasert*

Sakorn Pomprasert