

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MUCOSAL TROPIC HIV-1

การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อเอชไอวีที่มีความ
จำเพาะต่อเซลล์เยื่อบุ

เสนอ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง รวงผึ้ง สุทเธนทร์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

1. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

The author would like to express gratitude to all of subjects enrolling in the project. Also, I would like to thank nursing staff at STD clinic, Department of Obstetrics-Gynecology, Siriraj Hospital. This work can't be done without Ms. Kwonchid Samrangsurp, Ms. Piyanot Wirachsilp, and Dr. Suporn Foongladda, who are my graduate students.

2. บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

The uneven expansion of HIV-1 subtypes in each transmitted group raises the possibility that some viruses have less/more potential by qualitative/quantitative for heterosexual transmission compared to others. In Thailand, HIV-1 subtype E is mainly spread via heterosexual route and accounts for about 95 percent of the infected cases. To determine whether high sexual infectivity of HIV-1 subtype E is due to the presence of a virus in genital fluid, we conducted a study to characterize molecularly and biologically of HIV-1 in seminal and cervico-vaginal fluids of 30 HIV-1 subtype E infected Thai couples. All subjects had no HIV-associated diseases and other sexually transmitted diseases.

The isolation rate of HIV-1 from semen and cervico-vaginal fluid was 36.67% and 16.67%, respectively. Seven HIV-1 isolates from blood and genital secretions obtained by coculture method were used to study their infectivity assay. Cell-free virus (CFV) at concentration of p24 antigen 2 ng/ml 100 μ l and 10^5 infected cells (CAV) from each isolates were used to infect HeLa, ME180, HT29, SW837, SupT1, MT2, and primary macrophage separately in six-well plates. The culture was kept for 4 weeks and p24 antigen was assayed for virus propagation every week. HIV-1 subtype E isolated from genital fluid can grow more efficiently in primary macrophage than those isolated from blood. These results suggest that unique property of HIV-1 subtype E in genital fluid might be relevant to the efficiency of subtype E heterosexual transmission.

HIV-1 subtype E proviral DNA was detected in all peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples of both male and female subjects whereas only 73.33% (22/30) of proviral DNA was detected in seminal cell and cell from cervico-vaginal fluid by PCR. The amount of proviral DNA in PBMC samples of male and female subjects quantified by dot blot hybridization with external standard was 29 copies per 2.5×10^5 cells and 23 copies per 2.5×10^5 cells, respectively. Seminal cell was found to contain 17 copies per 2.5×10^5 cells but cell from cervico-vaginal fluid contained less than 5 copies per 2.5×10^5 cells.

HIV-1 subtype E viral RNA was detected in 70.00% of male plasma samples and 30.00% of female plasma samples by in house RT-PCR method. In genital fluid, 79.31% of 30 seminal plasma samples and 39.29% of 30 cervico-vaginal fluid samples were found to

contain HIV-1 RNA genome by RT-PCR. The amount of HIV-1 RNA in plasma of male and female subjects quantified by dot blot hybridization were 1×10^8 copies/ml and $1 \times 10^{7.5}$ copies/ml, respectively. By dot blot hybridization method, both seminal plasma and cervico-vaginal fluid contained $1 \times 10^{7.6}$ copies/ml.

Plasma samples from 24 male subjects were found to contain $1 \times 10^{4.5}$ copies/ml by ROCHE AMPLICOR HIV-1 MONITOR test, and viral RNA $1 \times 10^{3.8}$ copies/ml were found in plasma from sixteen female subjects. HIV-1 RNA genome in seminal plasma and cervico-vaginal fluid were $1 \times 10^{3.8}$ copies/ml and $1 \times 10^{3.4}$ copies/ml, respectively. There was no correlation between two HIV-1 RNA quantification methods.

Number of proviral DNA in blood and genital fluid were reversely correlated with the number of blood CD4+ T cells, while only number of viral RNA genome in blood was related with CD4+ T cell count.

An increasing in shedding of HIV-1 subtype E in genital tract together with its ability to infect macrophage more efficient might be reasons to explain the rapid spread of subtype E by heterosexual transmission in Thailand.

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

การกระจายของเชื้อเอชไอวี สับทียป์ อี ในกลุ่มผู้ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์แบบรักต่างเพศ ในประเทศไทย และสับทียป์ บี ในกลุ่มผู้ติดเชื้อจากการฉีดสารเสพติด และรักร่วมเพศ อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของเชื้อไวรัสในแต่ละสับทียป์ ที่พบในน้ำอสุจิหรือสารหลั่งในช่องคลอด ทั้งด้านปริมาณหรือความสามารถในการติดเชื้อเยื่อ หรือเซลล์แมโครฟาจบริเวณช่องทางที่ได้รับเชื้อ ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาเชื้อไวรัสเอชไอวี สับทียป์ อี ทั้งปริมาณ และคุณสมบัติทางโมเลกุล และชีวภาพ เปรียบเทียบเชื้อที่พบในเลือดและในน้ำอสุจิ กับสารหลั่งของคลอดของคู่สามีภรรยา 30 คู่ ที่ติดเชื้อเอชไอวี โดยไม่มีการรักษาของโรคเอดส์ หรือโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์อื่นๆ ที่มาตรวจที่โรงพยาบาลศิริราช

เชื้อเอชไอวีถูกแยกและเพาะเลี้ยงจากน้ำอสุจิและสารหลั่งช่องคลอด ได้ 36.67% และ 16.67%, ตามลำดับ ผู้วิจัยได้คัดเลือกเชื้อเอชไอวีที่แยกได้จากเลือดและน้ำอสุจิ/สารหลั่งช่องคลอด จำนวน 7 เชื้อ นำมาศึกษาความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์ต่างๆ ได้แก่ HeLa, ME180, HT29, SW837, SupT1, MT2, และ primary macrophage โดยแยกใช้เชื้อไวรัสชนิด Cell-free virus (CFV) ความเข้มข้นของแอนติเจน p24 จำนวน 2 ng/ml ใน 100 μ l และเชื้อไวรัสในเซลล์จำนวน 10^5 infected cells (CAV) ทดสอบหาปริมาณ แอนติเจน p24 ในน้ำเลี้ยงเซลล์ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เชื้อเอชไอวีที่แยกจากน้ำอสุจิ/สารหลั่งช่องคลอด สามารถเพิ่มจำนวนได้ดีใน primary macrophage ดีกว่าเชื้อไวรัสที่แยกได้จากเลือดของผู้ติดเชื้อรายเดียวกัน แสดงว่าเชื้อเอชไอวี สับทียป์ อี ที่พบในน้ำอสุจิ/สารหลั่งช่องคลอดที่มีความจำเพาะกับเซลล์แมโครฟาจ อาจมีความสัมพันธ์กับการแพร่ระบาดของเชื้อสับทียป์ อี ทางเพศสัมพันธ์

เชื้อเอชไอวี ชนิด proviral DNA ถูกตรวจพบด้วยวิธีพีซีอาร์ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเซลล์เดียว (PBMC) จากเลือดทุกรายของผู้ติดเชื้อ แต่สามารถตรวจพบ proviral DNA ในเซลล์ที่พบในน้ำอสุจิ และสารหลั่งช่องคลอด เพียง 73.33% (22/30) เมื่อใช้วิธี dot blot hybridization with external standard ตรวจหาปริมาณ proviral DNA ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเซลล์เดียว (PBMC) จากเลือดทุกรายของผู้ติดเชื้อ จำนวน 29 copies/ 2.5×10^5 cells จากสามี และจำนวน 23 copies per 2.5×10^5 cells จากเลือดของภรรยาที่ติดเชื้อ และพบไวรัสจำนวน 17 copies/ 2.5×10^5 cells ใน seminal cells ที่ได้มาจากน้ำอสุจิ และพบไวรัสจำนวน น้อยกว่า 5 copies/ 2.5×10^5 cells ในสารหลั่งช่องคลอด

เชื้อเอชไอวี ชนิด อาร์เอ็นเอเอนิเม ในพลาสมาของสามีและภรรยาที่ติดเชื้อ ถูกพบ 70.00% และ 30.00% ตามลำดับ ส่วนใน seminal plasma และ cervico-vaginal fluid เชื้อเอชไอวี ชนิด อาร์เอ็นเอเอนิเมถูกพบ 79.31% และ 39.29% ตามลำดับด้วยวิธี in house RT-PCR ปริมาณของ CFV ในพลาสมาของสามีและภรรยาที่ติดเชื้อ คือ 1×10^8 copies/ml และ $1 \times 10^{7.5}$ copies/ml ตามลำดับ ส่วน CFV ใน seminal plasma และ cervico-vaginal fluid พบว่ามีค่าเท่ากันคือ $1 \times 10^{7.5}$ copies/ml ด้วยการทดสอบของวิธี dot blot hybridization method

เมื่อใช้วิธี commercial ROCHE AMPLICOR HIV-1 MONITOR test สามารถตรวจพบ CFV $1 \times 10^{4.5}$ copies/ml ในพลาสมาของสามีที่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 24 คน และพบจำนวน $1 \times$

$10^{3.8}$ copies/ml ในพลาสมาของภรรยาที่ติดเชื้อจำนวน 16 ราย ส่วนปริมาณของ CFV ใน seminal plasma และ cervico-vaginal fluid มีปริมาณเท่ากับ $1 \times 10^{3.8}$ copies/ml และ $1 \times 10^{3.4}$ copies/ml ตามลำดับ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณไวรัสที่ตรวจด้วยวิธี in house RT-PCR/dot blot hybridization และ commercial AMPLICOR HIV MONITOR TEST.

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไวรัสชนิด proviral DNA ในเลือดและ น้ำอสุจิ/สารหลังช่องคลอด และเซลล์ CD4 พบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผัน เช่นเดียวกับปริมาณไวรัสแบบ CFV (อาร์เอ็นเออีโนม) ในเลือด ส่วนปริมาณไวรัสแบบ CFV ใน น้ำอสุจิ/สารหลังช่องคลอด ไม่พบความเกี่ยวข้องกับปริมาณเซลล์ CD4

การตรวจพบปริมาณไวรัสที่มากในน้ำอสุจิและสารหลังช่องคลอด ร่วมกับความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์แมโครฟาจของเชื้อไวรัสที่แยกได้จากน้ำอสุจิและสารหลังช่องคลอด อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการระบาดของเชื้อเอชไอวี สับท้ายปี อี ทางเพศสัมพันธ์ แบบรักต่างเพศ อย่างรวดเร็วในประเทศไทย

3. สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. กิตติกรรมประกาศ	1
2. บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	2
3. บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	3
3. สารบัญ	5
4. บทนำ	6
5. วิธีการทดลอง	7
6. ผลการทดลอง	13
7. บทวิจารณ์	16
8. หนังสืออ้างอิง	17
9. Output ที่ได้	20
10. รายงานการเงินพร้อมสำเนาสมุดบัญชีเงินฝาก	20
11. ภาคผนวก	27

4. บทนำ

การแพร่กระจายของเชื้อเอชไอวี แบ่งเป็น 3 ประเภท ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ทางเข็มฉีดยาที่ปนเปื้อนเชื้อในกลุ่มผู้ฉีดสารเสพติดและทางเพศสัมพันธ์แบบรักร่วมเพศ กลุ่มที่ 2 ทางเพศสัมพันธ์แบบรักต่างเพศ และกลุ่มที่ 3 จากมารดาสู่ทารกในครรภ์ ทั่วโลกพบการติดต่อของเชื้อเอชไอวี ทางเพศสัมพันธ์แบบรักต่างเพศ มากที่สุดคิดเป็น 75% ของจำนวนผู้ติดเชื้อทั่วโลก และมากกว่า 95% ในกลุ่มผู้ติดเชื้อในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทย ส่วนในประเทศที่พัฒนาแล้วจะพบผู้ติดเชื้อในกลุ่มที่ 1 มากกว่ากลุ่มที่ 2 แสดงว่ามีความแตกต่างทางระบาดวิทยาของการแพร่กระจายเชื้อเอชไอวีในประเทศที่พัฒนาแล้ว และประเทศที่กำลังพัฒนา

เชื้อเอชไอวี ถูกแบ่งเป็นสับtypป์ต่างกัน 11 สับtypป์ A-J และ O ตามความแตกต่างและเหมือนของการเรียงตัวลำดับเบสของยีน env และ gag จากเชื้อที่รวบรวมได้ทั่วโลก สับtypป์ อี ที่ระบาดในไทยในกลุ่มที่ 2 แบบรักต่างเพศ ถูกพบแค่ 10% ของเชื้อเอชไอวีที่ทำการพบทั่วโลก และมากกว่า 90% ของเชื้อเอชไอวี สับtypป์ อี ที่พบนั้นมาจากประเทศไทย ในประเทศไทยนั้นพบว่ากลุ่มที่ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์แบบรักต่างเพศ ประมาณ 95% จะเกิดจากสับtypป์ อี ขณะที่สับtypป์ บี จะถูกพบในกลุ่มที่ติดจากการฉีดสารเสพติดมากกว่า แสดงว่าการแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวีในไทยมีการแบ่งแยกชัดเจนในช่องทางการติดต่อ ระหว่างสับtypป์ บี และ อี

มีรายงานเบื้องต้นกล่าวถึง เชื้อเอชไอวี ต่างสับtypป์ อาจมีความสามารถในการแพร่กระจายในแต่ละช่องทางต่างกัน และความรุนแรงในการก่อโรคต่างกัน มีรายงานจากการศึกษาในประเทศไทยว่า ชายไทยมีโอกาสติดเชื้อเอชไอวีจากหญิงไทยที่ติดเชื้อ มากกว่าชายอเมริกัน ถึง 10 เท่า และเชื้อเอชไอวีสับtypป์ อี มีความสามารถเพิ่มจำนวนใน Langerhan cell ได้ดีกว่าสับtypป์ บี ดังนั้นเชื้อเอชไอวี ต่างสับtypป์ อาจมีการแพร่กระจายทางเพศสัมพันธ์ในอัตราที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจาก ปริมาณไวรัสที่ต่างกันใน genital fluid ความจำเพาะต่อเซลล์ต่างๆ และโอกาสที่จะพบเชื้อเอชไอวีใน genital fluid มีการศึกษารายงานถึงการตรวจหาเชื้อเอชไอวี สับtypป์ บี ในน้ำอสุจิ และสารหลังช่องคลอด พบ 70-80% และ 30-50% ตามลำดับ

การวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะตรวจหาเชื้อเอชไอวี สับtypป์ อี ใน น้ำอสุจิ และสารหลังช่องคลอด และเลือดของคู่สามี ภรรยา ชาวไทยที่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 30 คู่ เพื่อเป็นการศึกษาแบบ cross-sectional โดยจะตรวจหาเชื้อเอชไอวีด้วยวิธี พีซีอาร์ การแยกเพาะเลี้ยง การหาปริมาณไวรัสทั้งที่อยู่ในเซลล์แบบ proviral DNA และชนิด cell free virus ในพลาสมา และส่วนน้ำของน้ำอสุจิ และสารหลังช่องคลอด และศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพในการเพิ่มจำนวนในเซลล์ต่าง เปรียบเทียบระหว่างเชื้อที่พบในเลือดและใน genital fluid ของคนๆเดียวกัน และดูการเรียงตัวลำดับเบสของยีน env เพื่อหา signature sequence ของเชื้อใน genital fluid

5. วิธีการทดลอง

5.1 Subjects

คู่สามี ภรรยา ที่ติดเชื้อ HIV-1 ที่มาโรงพยาบาลศิริราช ตั้งแต่ เดือน ตุลาคม 2538 ถึง เดือน กุมภาพันธ์ 2540 จำนวน 30 คู่ โดยที่ภรรยามีอายุตั้งแต่ 18-37 ปี และสามีมีอายุตั้งแต่ 21-40 ปี มีการลงนามในหนังสือยินยอม ชักประวัติ ตรวจร่างกาย คัดเลือกเฉพาะกลุ่ม asymptomatic HIV infection และไม่มีโรคติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์อย่างอื่น ตัวอย่างตรวจที่เก็บจากผู้ติดเชื้อเอชไอวี ได้แก่ เลือดไม่แข็งตัว (EDTA blood) 20 มล. เก็บน้ำอสุจิจากสามีด้วยวิธี masturbation และเก็บสารหลั่งในช่องคลอดจากภรรยาโดยใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อป้ายจาก endocervix และ vaginal walls และนำมาใส่ในหลอดที่มี RPMI 1640 medium จำนวน 5 มล.

5.2 การจัดการกับตัวอย่างตรวจ

ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดเซลล์เดี่ยว (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) จาก EDTA blood จาก subjects ทุกราย ด้วยวิธี Ficoll-Hypaque gradient (Lymphoprep, Becton-Dickenson) โดยแบ่งเซลล์ที่ได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1-- เก็บไว้ทำ PCR เพื่อตรวจหาทั้งด้านปริมาณ และ ลำดับเบสของยีน *env* ของ HIV-1 โดยแช่แข็งที่ freezer -70°C ส่วนที่ 2-- เก็บแช่แข็งใน DMSO เพื่อเป็น stock สำหรับการทำให้ HIV-1 culture and isolation และส่วนที่ 3-- ทำ coculture กับ donor PBMC เพื่อแยกเชื้อ HIV-1

พลาสมาของทุกรายถูกนำมาตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ด้วยวิธี ELISA (Vironostika HIV Uniform II, Organon and Genelavia Mixt, Sanofi) ที่เหลือเก็บไว้ใน freezer -70°C เพื่อหาปริมาณ HIV-1 RNA genome ด้วยวิธี in house quantitative RT PCR และ ROCHE AMPLICOR HIV-1 MONITOR test

น้ำอสุจิที่ได้หลังจากถูกเจือจาง 1:1 ด้วย Phosphate buffered saline (PBS) จะถูกนำมาปั่นแยกเซลล์ภายใน 2 ชม. ที่ความเร็ว $2,940 \times g$ นาน 2 นาที นับจำนวนเซลล์ แยกส่วนเซลล์ (seminal cells) จากส่วนน้ำ (seminal plasma) ที่ถูกกรองผ่าน $0.45 \mu\text{m}$ filter โดยแบ่งทั้งเซลล์และส่วนน้ำออกเป็น 3 ส่วน เก็บแช่แข็งเพื่อทำ PCR , แช่แข็งใน DMSO เป็น stock ของการ culture, และส่วนสุดท้ายนำไปทำ coculture กับ donor PBMC

สารหลั่งในช่องคลอด จะถูกนำมาปั่น นับจำนวนเซลล์ แยกส่วนเซลล์ จากส่วนน้ำ เช่นเดียวกับน้ำอสุจิ และแบ่งทั้งเซลล์และส่วนน้ำออกเป็น 3 ส่วน เก็บแช่แข็งเพื่อทำ PCR , แช่แข็งใน DMSO เป็น stock ของการ culture, และส่วนสุดท้ายนำไปทำ coculture กับ donor PBMC

5.3 การเพาะเลี้ยงแยกเชื้อเอชไอวี

เชื้อเอชไอวีถูกแยกและเพาะเลี้ยงจาก PBMC, seminal cells, และเซลล์จาก C-V fluid ด้วยวิธี coculture กับ PBMCs (ถูกกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin, PHA เป็นเวลา 3 วัน) ที่ได้จากผู้ป่วยโรคที่ไม่ติดเชื้อ HIV-1 ผสมในอัตรา 1:5 ใน RPMI 1640 medium ที่มี 15% fetal calf serum (FCS) และ 10 units/ml recombinant human interleukin-2 (IL-2) จำนวน 10 มล. การพบแอนติเจน p24 ด้วยวิธี p24 antigen ELISA assay (Coulter, U.S.A.) ติดต่อกัน 2 ครั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์ใด ถือว่าให้ผลบวกในการแยกเชื้อ HIV-1

5.4 การทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในเซลล์ต่างๆ (Infectivity assay)

เชื้อเอชไอวีจำนวน 7 isolates (ตารางที่ 1) ที่แยกได้จากเลือด น้ำอสุจิและสารหลังช่องคลอดถูกเลือกมาศึกษา infectivity assay กับเซลล์ต่างๆ ได้แก่ cervical cell lines (HeLa, ME180), colonic cell line (HT29), rectal cell line (SW837), lymphocyte cell line (SupT1), monocyte/ macrophage cell line (MT2) and primary macrophage (เตรียมด้วยวิธี plastic adherence)

ใช้เซลล์จำนวน 2×10^5 cells of each monolayer cell line (HeLa, ME180, HT29, SW837) เลี้ยงใน six-well plate ที่มี DMEM +10%FCS สำหรับ HeLa cell, McCoy's5a + 10%FCS สำหรับ ME180 และ HT-29 cell lines, L-15 +10% FCS สำหรับ SW837 และใช้เซลล์จำนวน 2×10^6 cells of each suspension cell (SupT1, MT2, H9) เลี้ยงใน six-well plate ที่มี RPMI 1640 +10% FCS ส่วน primary macrophage ถูกเตรียมด้วยวิธี plastic adherence ของ PBMC จำนวน 25×10^6 เซลล์ เลี้ยงใน T25 flask ที่มี RPMI 1640 + 15% human serum + 20% FCS จำนวน 8 มล. เก็บเซลล์ไว้ในตู้เย็น 37°C with 5% CO_2 เป็นเวลา 4-7 วันจนกระทั่งเห็นมี adherent monolayer cells จึงดูดส่วนน้ำทั้งหมด และล้างเซลล์ที่เหลือด้วย PBS 6 ครั้ง เพื่อกำจัด lymphocytes เป็น suspension cell ให้หมด primary macrophage ที่ได้จะถูกเลี้ยงใน RPMI 1640 +15% FCS

เชื้อเอชไอวีที่ใช้มีความเข้มข้น $\text{p24} = 20 \text{ ng/ml}$ (Coulter, U.S.A) สำหรับ cell free virus (CFV) จำนวน 100 ?l และ cell associated virus (CAV) จำนวน 1×10^5 infected PBMC ถูกใส่ในเซลล์ต่างๆที่เตรียมไว้ ทุกครั้งที่ทำการทดสอบจะมี mock virus control หลังจากใส่ไวรัสแล้วจะเข้าตู้เย็นที่ไว้ค้างคืน จึงนำมาล้างด้วย PBS 6 ครั้ง และเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ใหม่ ตรวจสอบเชื้อเอชไอวีที่เพิ่มจำนวนในแต่ละเซลล์ ด้วยการตรวจหา p24 antigen ในน้ำเลี้ยงเซลล์นั้นทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Table1. HIV-1 isolates to test infectivity

No.	Code	Subtype	Isolated from
1	M32PC	B	Blood of husband #32
2	M33PC	E	Blood of husband #33
3	F33PC	E	Blood of wife #33
4	F36PC	E	Blood of wife #36
5	F36VC	E	C-V fluid of wife #36
6	M46SC	E	Blood of husband #46
7	M46PC	E	Semen of husband #46
8	HTLV-III ^B	B	Lab-strain

Table2. Cell lines used for infectivity test*

No.	Cell line	Originated from
1	HeLa	cervical carcinoma
2	ME180	cervical carcinoma
3	HT29	colonic adenocarcinoma
4	SW837	rectal cacinoma
5	SupT1	lymphocyte cell line
6	MT2	monocyte/macrophage cell line
7	Primary macrophage	plastic adherence PBMCs
8	H9	lymphocyte cell line

SK sequence derived from HIV-1 isolate SF2, GenBank Accession number K02007

ED sequence correspond to those from the IIB isolate BH10 sequence.

Primers for sequencing and probe

Primer	Sequence (5'-3')
AO1	AGA AAG AGC AGA AGA CAG TGG CAA
AO2	G <u>GAA TTC</u> AAA GGT GAG TAT CCC TG , EcoRI site
AI1	<u>GGGATCC</u> TTA TTA TGG GGT TCC TGT GTG G, BamHI site
ED12	AGTGCTTCCTGCTCCCAAGAACCCAAG
DO1	CTT CAG ACC TGG AGG AGG
DO2	CCA CCT CCT TCT TCG ATT CTT TCG
DI1	GCTG CAG GAT CTT TGG GTT CTT AGG AG
DI2	AO2
M 1 3 (- 2 1) forward	G TAA AAC GAC GGC CAG
M13 reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
ENV3	TAA GAG ATA AGA AGCAGA AGG
CI1	<u>GGATTG</u> GGCAGTCTA GCA, BamHI site

Amplification

ปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอเรสสำหรับการขยาย env gene ประกอบด้วย 3 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min ตามด้วย 31 cycles of 94°C for 15 sec, 55°C for 45 sec, 72°C for 1.30 sec at 72°C for 7 min และการทำปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอเรสสำหรับการขยาย env gene ขั้นสอง เหมือนกับขั้นแรก ตรวจสอบ amplified product ใน gel electrophoresis ที่ถูก stain ด้วย ethidium bromide ซึ่งจะถู clone ใส่ TA cloning kit (Invitrogen, USA) และนำไปตรวจหาการเรียงตัวลำดับเบสด้วย automated sequencer (ABI prism collection 373, Perkin Elmer) ด้วย primers ต่อไปนี้คือ M13(-21) forward, M13 reverse, ED5, ENV3 and CI2.

5.6 การตรวจหาปริมาณ HIV-1 proviral DNA ในเม็ดเลือดขาวในเลือด น้ำอสุจิ และสารหลังในช่องคลอด

Dot Blot Hybridization (รูปที่ 1, 2)

amplified DNA ที่ถูกขยายด้วยวิธี PCR จำนวน 10 μ l จะถูก denature และ blot ลง nylon membrane Hybond N+ membrane (Amersham, Buckinghamshire, England) ด้วยเครื่อง Hybri-dot manifold equipment (GIBCO BRL, NY, USA) และ membrane จะถูกนำไป fixed ด้วย UV for 7 min. และ hybridized กับ ECL 3' end labelling SK19 ด้วยชุด ECL 3'-oligolabelling end and detection system (Amersham, Buckinghamshire, England) ใน hybridization bag (GIBCO BRL, NY, USA) ที่อุณหภูมิ 42°C ซ้ำมคืน และล้างด้วย 5x SSC with 0.1% SDS นาน 5 นาที 3 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ anti-fluorescein-HRP conjugate was diluted to 1:1000 ร่วมกับ 0.5% bovine serum albumin นาน 30 นาที จึงล้างส่วนเกินออก และทำการ detection โดยการใส่ H_2O_2 และ luminal นาน 1 นาที แล้วจึง expose membrane กับ Hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, England) ซึ่งจะเห็น hybridization signal

5.7 การตรวจหา HIV-1 RNA ในพลาสมา และสารน้ำของน้ำอสุจิและ สารหลังช่องคลอด

RT-PCR

HIV-1 RNA ถูกแยกจาก พลาสมาหรือส่วนน้ำของ genital fluid จำนวน 140 μ l ด้วย QIAamp spin columns (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) และถูกเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย AMV reverse transcriptase (Promega, WI, USA) และใช้ anti-sense primer, SK390 เปลี่ยนตรง gag gene ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 4.0 μ l of 10 mM each of dNTP, 8.0 μ l of 5x AMV-RT buffer (supplied), 1.0 μ l of 40 units Rnase inhibitor (Promega, WI, USA), 1.0 μ l of 10 units of AMV-RT, 5.0 μ l of 10 pmol/ml of SK390 anti-sense primer, 12 μ l of Rnase-free water (Ameresco, OH, USA) and 20.0 μ l of eluted RNA. RT-PCR ถูกทำใน Gene Amp PCR System 9700 Thermal Cycler: 48°C for 45 min และ 99°C for 5 min

CDNA ของ gag gene ที่ได้จะถูกนำไปทำ PCR ขยายส่วน gag gene เหมือนกับที่ทำกับ proviral DNA ดังอธิบายข้างต้น Dot Blot Hybridization (รูปที่ 3, 4)

Amplicor HIV-1 Monitor Test

AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test (Roche Diagnostic System, NJ, USA.) เป็นชุดทดสอบสำเร็จ ที่ใช้ตรวจหาปริมาณ HIV-1 RNA ในพลาสมาด้วยวิธี RT-PCR และมี Quantitation Standard (QS) RNA ซึ่งเป็น non-infectious RNA transcript ที่มี primer binding site เหมือนกับ HIV-1 target ร่วมกับ unique probe binding region โดยที่ QS RNA นี้จะถูกทำ RT-PCR พร้อมกับ HIV-1 target RNA

HIV-1 viral RNA ถูกแยกจาก plasma และ genital fluid samples ด้วย lytic reagent containing guanidine thiocyanate (GuSCN) ร่วมกับ known amount of quantification standard (QS) ใช้ isopropanol (Sigma, MO, USA) ตกตะกอน HIV-1 viral RNA และ QS RNA molecules หลังจากนั้นนำไปผสมกับ carrier RNA และ 142 bp sequence primer SK431 and SK462 ที่ติดฉลากด้วย biotin ปฏิบัติ

RT และ PCR ถูกทำพร้อมกันในหลอดเดียวกันด้วยเอนไซม์ rTth DNA polymerase ทำการเจือจาง fivefold serial dilution กับ amplified product และ biotinylated HIV-1 and QS amplicons จะถูกจับใน wells ของ microtiter plate ที่เคลือบด้วย HIV-1 specific and QS-specific oligonucleotide probes ส่วนของ bound biotinylated amplicons จับกับ avidin-horseradish peroxidase conjugate ที่ใส่เข้าไป และเกิดสีเมื่อใส่ substrate วัดค่า absorbance ที่ 450 nm และปริมาณ HIV-1 RNA copy number ถูกคำนวณจาก known input copy number ของ QS RNA

5.8 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ HIV-1

ตรวจหา subtype ของเชื้อ HIV-1 ด้วยวิธี heteroduplex mobility assay

นำ DNA lysate ที่ได้จาก PBMCs และเซลล์จากน้ำอสุจิและสารหลังช่องคลอด มาผ่านวิธี nested PCR โดยใช้ primers 2 คู่ที่มีความจำเพาะต่อยีน env ของเชื้อ HIV-1 ชื่อ และ และใช้ primers ทั้ง 2 คู่นี้เพิ่มขยายยีนจาก DNA ที่เป็นของ prototype HIV-1 subtype B และ E ทำ duplex ระหว่าง PCR product ที่ได้จากตัวอย่างตรวจ (unknown sample) กับ product ที่ได้จาก prototype B และ E และนำไปผ่าน 5% polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่า proviral DNA ที่ขยายได้เป็น subtypeใด การหาการเรียงตัวลำดับเบสของยีน env (nucleotide sequencing analysis) ของเชื้อเอชไอวี

ยีน env ขนาด 2,100 เบส ถูกขยายจากเชื้อเอชไอวี ทัยปี 1 ที่แยกได้จาก เลือด (F36 PC และ M46PC) และจากน้ำอสุจิ (M46SC) และน้ำล้างช่องคลอด (F36VC) ด้วยการทำ nested PCR และ clone ใส่ pCRII vector (Invitrogen, USA) และนำไปทำ sequencing reaction และหาการเรียงตัวของลำดับเบสด้วย Automated DNA sequencer ผลที่ได้ถูกนำมา analysis ด้วย DNASIS และหา nucleotide distance ด้วยวิธี ESEE และ MEGA

5.9 การศึกษา ultrastructure ของเชื้อ เอช ไอ วี ในเซลล์ชนิดต่างๆกัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ได้ทำการตรวจดูเชื้อเอชไอวี ในเซลล์ที่ติดเชื้อทั้งเซลล์เยื่อ ฟิล์ม เซลล์ลิ้มโพไซท์ และแมคโครฟาจ

6. ผลการทดลอง (รูปและตารางอยู่ในภาคผนวก)

6.1 การตรวจพบเชื้อเอชไอวีใน genital fluid

HIV-1 proviral DNA ถูกพบด้วยวิธี PCR ในเลือดและน้ำอสุจิของสามีที่ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 30 คน เท่ากับ 100.0% และ 73.33% ตามลำดับ และในเลือดกับน้ำล้างช่องคลอดของภรรยา จำนวน 30 คน เท่ากับ 100.0% และ 73.33% ตามลำดับ (ตารางที่ 1-7)

ได้ใช้วิธี dot blot hybridization ร่วมกับ PCR วัดปริมาณ proviral DNA ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของสามีและภรรยา มีค่าเท่ากับ $29 \text{ copies}/2.5 \times 10^5$ เซลล์ และ $23 \text{ copies}/2.5 \times 10^5$ เซลล์ ตามลำดับ เมื่อวัดปริมาณ proviral DNA ในเซลล์ที่อยู่ในน้ำอสุจิและสารหลังช่องคลอด พบว่ามีปริมาณ $17 \text{ copies}/2.5 \times 10^5$ เซลล์ และ $<5 \text{ copies}/2.5 \times 10^5$ เซลล์ ปริมาณ proviral DNA ของเชื้อเอชไอวีที่พบในเลือดและสารหลังของระบบสืบพันธุ์ แปรผกผันกับปริมาณเซลล์ CD4+ ในเลือด (รูปที่ 5, 6)

6.2 ตรวจหา HIV-1 RNA genome ในพลาสมา น้ำอสุจิ และสารหลังในช่องคลอด

ใช้วิธี in-house RT-PCR ตรวจหา HIV-1 RNA genome ในพลาสมา ส่วนน้ำของน้ำอสุจิและสารหลังในช่องคลอด พบ RNA ของเชื้อเอชไอวี 70.0%, 79.31%, และ 39.29% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และวัดปริมาณ HIV-1 RNA genome ด้วยวิธี dot blot hybridization และ RT-PCR พบปริมาณไวรัสในพลาสมาของสามี และภรรยา ส่วนน้ำของน้ำอสุจิและสารหลังในช่องคลอด เท่ากับ 1×10^8 copies/ml, $1 \times 10^{7.8}$ copies/ml, $1 \times 10^{7.6}$ copies/ml, $1 \times 10^{7.6}$ copies/ml ตามลำดับ (รูปที่ 7)

เมื่อใช้วิธี quantitative RNA PCR ของ Roche Amplicor HIV-1 Monitor test พบปริมาณ RNA ในพลาสมาของสามี และภรรยา ส่วนน้ำของน้ำอสุจิและสารหลังในช่องคลอด เท่ากับ $1 \times 10^{4.5}$ copies/ml, $1 \times 10^{3.8}$ copies/ml, $1 \times 10^{3.8}$ copies/ml, $1 \times 10^{3.4}$ copies/ml ตามลำดับ ปริมาณ HIV-1 RNA genome ที่พบในพลาสมาเท่านั้นที่แปรผกผันกับปริมาณเซลล์ CD4+ ในเลือด (รูปที่ 7, 8)

6.3 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของเชื้อเอชไอวี

แยกเม็ดเลือดขาว เซลล์ที่ปั่นล้างจากน้ำอสุจิ และน้ำล้างช่องคลอด นำมาแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี coculture กับ PBMCs (ถูกกระตุ้นด้วย PHA เป็นเวลา 3 วัน) ที่ได้จากผู้บริจาคที่ไม่ติดเชื้อ HIV-1 ผสมในอัตรา 1:5 การพบแอนติเจน p24 ติดต่อกัน 2 ครั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์ใด ถือว่าให้ผลบวกในการแยกเชื้อ HIV-1

ทำการทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ เอช ไอ วี (M32PC, M33PC, F33PC, F36PC, F36VC, M46PC, M46VC) ทั้งชนิด cell-free virus (CFV) และ cell-associated virus (CAV) กับเซลล์ต่างๆ โดยมีรายละเอียดและผลดังนี้ จำนวนเซลล์ที่ใช้ ชนิด monolayer cell (HeLa, ME180, HT29, primary macrophage) ใน 6-well plate และ suspension cells (SupT1, MT2) จำนวน 10 ล้านเซลล์ ต่อ infectivity test กับ แต่ละ isolate ปริมาณ เชื้อเอช ไอ วี ชนิด CFV ที่ใช้ เท่ากับ p24 antigen 20ng/100 ml และ CAV เท่ากับ 10^5 infected

Code	Subtype	Isolated from
1. M32PC	B	blood
2. M33PC	E	blood
3. F33PC	E	blood
4. F36 PC	E	blood
5. F36VC	E	cervico-vaginal fluid
6. M46 PC	E	blood
7. M46 SC	E	semen

เซลล์จำนวน 6 ชนิด (สั่งซื้อจาก ATCC) ที่ใช้ทดสอบ infectivity assay ได้แก่

Cell culture name	Cell type	Originated from
1. HeLa cell line	cervical epithelial cell line	cancer cell
2. ME180 cell line	cervical epithelial cell line	HPV transformed cell
3. HT29 cell line	rectal epithelial cell line	cancer cell
4. Sup T1 cell line	lymphocyte cell line	cancer cell
5. MT2 cell line	monocyte/macrophage cell line	HTLV-1 transformed cell
6. Primary macrophage cell	macrophage	plastic adherence of PBMC

ทำการทดสอบความสามารถในการติดเชื้อ เชื้อ ไซโต (M32PC, M33PC, F33PC, F36PC, F36VC, M46PC, M46VC) ทั้งชนิด cell-free virus (CFV) และ cell-associated virus (CAV) กับเซลล์ต่างๆ โดยมีรายละเอียดและผลดังนี้ จำนวนเซลล์ที่ใช้ ชนิด monolayer cell (HeLa, ME180, HT29, primary macrophage) ใน 6-well plate และ suspension cells (SupT1, MT2) จำนวน 10 ล้านเซลล์ ต่อ infectivity test กับ แต่ละ isolate ปริมาณ เชื้อไซโต ชนิด CFV ที่ใช้ เท่ากับ p24 antigen 20ng/100 ml และ CAV เท่ากับ 10^5 infected cells หลังจากใส่เชื้อไซโต ลงในเซลล์ที่ทดสอบ ทิ้งไว้ 24 ชม. จึงล้างออก และเก็บไว้ในตู้เย็น โดยติดตามการเพิ่มจำนวนของเชื้อไซโต โดยการตรวจหา p24 antigen ในน้ำเลี้ยงเซลล์ทุก 7 วัน และ monolayer cell จะถูก trypsinize สัปดาห์ละสองครั้ง (ทุกครั้งที่ทำการทดสอบจะมี negative control) เก็บเซลล์ที่ทำการทดสอบและตรวจหา p24 antigen เป็นเวลา 4 -5 สัปดาห์

พบว่า เชื้อ ไซโต สามารถเพิ่มจำนวนใน epithelial cells ต่างๆได้น้อยกว่า เซลล์ lymphocyte/monocyte/macrophage ประมาณ 100-1,000 เท่า และ CAV ทำให้เกิดการติดเชื้อใน epithelial cells ได้ดีกว่า CFV ไม่พบความแตกต่างในการติดเชื้อ epithelial cells ของเชื้อ ไซโต subtype E และ B และ ใน subtype E ที่แยกได้จากเลือดและ genital fluid

ในการทดสอบกับเซลล์ monocyte/macrophage (MT2 cell line กับ primary macrophage)พบว่า CFV ของแต่ละ isolate ทำให้เกิดการติดเชื้อ และมีการเพิ่มจำนวนได้มากกว่า CAV ได้แก่ F36VC-CFV ซึ่งเป็น isolate จาก C-V fluid สามารถเพิ่มจำนวนใน macrophage ได้มากกว่า F36PC-CFV (เป็น isolate จากผู้ติดเชื้อคนเดียวกัน แต่แยกเชื้อได้จากเม็ดเลือดขาวในเลือด) 200 เท่า เมื่อเปรียบเทียบ ระหว่าง subtype B & E ไม่พบความแตกต่างในการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์ monocyte/macrophage นี้ สำหรับ M46SC-CFV ซึ่งเป็น isolate ที่แยกได้จาก semen พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage ดีกว่า M46PC-CFV (เป็น isolate แยกจากเลือดของผู้ติดเชื้อคนเดียวกัน) ประมาณ 5 เท่า โดยที่ปริมาณ p24 ที่ผลิตได้น้อยกว่า F36VC ถึง 100 เท่า ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า F36VC

ประมาณ 5 เท่า โดยที่ปริมาณ p24 ที่ผลิตได้น้อยกว่า F36VC ถึง 100 เท่า ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า F36VC และ M46SC เป็น macrophage tropic viruses มากกว่า F36PC และ M46PC (รูปที่ 9-13)

6.4 การศึกษา ultrastructure ของเชื้อ เอช ไอ วี เมื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์ต่างๆ

หลังจากใช้เชื้อเอชไอวีใส่ลงในเซลล์ที่ศึกษา ได้แก่ PBMC, macrophage และ epithelial cell line นาน 15 นาที ล้างออก หลังทิ้งไว้ค้างคืน จะทำการปั่น ย้อม ตัด section และนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ได้เริ่มทำการตัด section เพื่อศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของ CFV จาก isolates subtype E: F36VC กับเซลล์ HeLa (cervical epithelial cell line (รูปที่ 14)

6.5 การหาการเรียงตัวลำดับเบสของ *env* gene

ได้ทำ nucleotide sequencing ของ *env* gene ขนาด 2000 เบส ของเชื้อเอชไอวี M46PE (เชื้อเอชไอวีที่แยกจากเลือดของ M46), M46SE (เชื้อเอชไอวีที่แยกจากน้ำอสุจิของ M46), F36PE (เชื้อเอชไอวีที่แยกจากเลือดของ F36), F36VE (เชื้อเอชไอวีที่แยกจากสารหลังในช่องคลอดของ F36) (รูปที่ 15)

7. บทวิจารณ์

การศึกษานี้ทำให้ทราบอัตราและปริมาณของเชื้อ HIV-1 subtype E ที่ปรากฏอยู่ในน้ำอสุจิและน้ำล้างช่องคลอด (ซึ่งยังไม่เคยทราบมาก่อน มีแต่รายงานของ HIV-1 subtype B) การพบเชื้อ HIV-1 subtype E ในน้ำหลังช่องคลอด (73.3%) ในอัตราที่มากกว่า subtype B (30-50%) อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้ HIV-1 subtype E ระบาดในกลุ่มรักต่างเพศ

ปริมาณของยีนของเชื้อ เอช ไอ วี ทั้งที่เป็น proviral DNA และ RNA ในอนุภาคไวรัส ในเลือดแปรผกผันกับปริมาณเซลล์ CD4 เช่นเดียวกับปริมาณของยีนของเชื้อ เอช ไอ วี (proviral DNA) ในน้ำอสุจิ และสารคัดหลั่งในช่องคลอดและปากมดลูก แต่ปริมาณของ HIV-1 RNA genome ในจะไม่ขึ้นกับปริมาณเซลล์ CD4 ของผู้ติดเชื้อ เอช ไอ วี ระยะไม่มีอาการ

เชื้อเอช ไอ วี ทั้ง subtype B และ E (ทั้งที่แยกได้จากเลือด และ genital fluid) มีความสามารถในการติดเชื้อเซลล์เยื่อได้ไม่ต่างกัน และเพิ่มจำนวนได้ในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับการติดเชื้อในเซลล์กลุ่ม monocyte/macrophage (น้อยกว่า 100-1,000 เท่า) และพบว่าเชื้อเอช ไอ วี subtype E ที่แยกจาก genital fluid มีความสามารถในการติดเชื้อ เพิ่มจำนวนในเซลล์ macrophage ได้ดีกว่า isolates ที่แยกจากเลือด (100-200 เท่า) โดยที่ไวรัสจากสารคัดหลั่งช่องคลอดและปากมดลูก (F36VC) เพิ่มจำนวนในเซลล์ macrophage ได้ดีกว่าไวรัสที่แยกได้จากน้ำอสุจิ (M46SC) ถึง 100 เท่า

ในการทดสอบกับเซลล์ monocyte/macrophage (MT2 cell line กับ primary macrophage) พบว่า CFV ของแต่ละ isolate ทำให้เกิดการติดเชื้อ และมีการเพิ่มจำนวนได้มากกว่า CAV ได้แก่ F36VC-CFV

ในการทดสอบกับเซลล์ monocyte/macrophage (MT2 cell line กับ primary macrophage) พบว่า CFV ของแต่ละ isolate ทำให้เกิดการติดเชื้อ และมีการเพิ่มจำนวนได้มากกว่า CAV ได้แก่ F36VC-CFV ซึ่งเป็น isolate จาก C-V fluid สามารถเพิ่มจำนวนใน macrophage ได้มากกว่า F36PC-CFV (เป็น isolate จากผู้ติดเชื้อคนเดียวกัน แต่แยกเชื้อได้จากเม็ดเลือดขาวในเลือด) 200 เท่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง subtype B & E ไม่พบความแตกต่างในการติดเชื้อและเพิ่มจำนวนในเซลล์ monocyte/macrophage นี้ สำหรับ M46SC-CFV ซึ่งเป็น isolate ที่แยกได้จาก semen พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน macrophage ดีกว่า M46PC-CFV (เป็น isolate แยกจากเลือดของผู้ติดเชื้อคนเดียวกัน) ประมาณ 5 เท่า โดยที่ปริมาณ p24 ที่ผลิตได้น้อยกว่า F36VC ถึง 100 เท่า ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า F36VC และ M46SC เป็น macrophage tropic viruses มากกว่า F36PC และ M46PC

การหาการเรียงลำดับเบสของยีน env (nucleotide sequencing analysis) ของเชื้อเอชไอวี

ยีน env ขนาด 2,100 เบส ถูกขยายจากเชื้อเอชไอวี ropy 1 ที่แยกได้จาก เลือด (F36 PC และ M46PC) และจากน้ำอสุจิ (M46SC) และน้ำล้างช่องคลอด (F36VC) ด้วยการทำ nested PCR และ clone ใส่ pCRII vector (Invitrogen, USA) และนำไปทำ sequencing reaction และหาการเรียงตัวของลำดับเบสด้วย Automated DNA sequencer ผลที่ได้ถูกนำมา analysis ด้วย DNASIS และหา nucleotide distance ด้วยวิธี ESEE และ MEGA พบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนในยีน env ของเชื้อเอชไอวี ที่แยกได้จาก M46PC, M46SC, F36PC, F36VC มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับ subtype E consensus และพบ insertion sequence ที่บริเวณ C4 ของยีน env

เชื้อเอชไอวีทั้ง 4 isolates นี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน epithelial cell มีประสิทธิภาพไม่ต่างกัน แต่จะเพิ่มจำนวนได้น้อยกว่าในเซลล์ lymphocyte/monocyte/macrophage 100-1,000 เท่า และพบว่า isolates ที่แยกได้จาก genital fluid (F36VC, M46SC) จะเพิ่มจำนวนในเซลล์ macrophage ได้ดีกว่า isolates ที่แยกจากเลือดของผู้ติดเชื้อคนเดียวกัน (F36PC, M46PC) รูปที่ 1 แสดงการเรียงตัวของกรดอะมิโนในยีน env ของเชื้อเอชไอวี ที่แยกได้จาก M46PC, M46SC, F36PC, F36VC พบว่า ทั้ง 4 isolates มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับ subtype E consensus และพบ insertion sequence ที่บริเวณ C4 ของยีน env

เกี่ยวกับที่มาของเชื้อไวรัสใน genital secretion (น้ำอสุจิ และสารคัดหลั่งช่องคลอด) ว่าจะมีความเหมือนกับ เชื้อไวรัสที่เป็น cell free virus ในพลาสมา หรือ proviral DNA ใน PBMC ผู้วิจัยจึงยังคงศึกษาต่อด้วยการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน env ใน proviral DNA ของ PBMC, RNA genome ของ cell free virus ในพลาสมา เปรียบเทียบกับ ลำดับเบสของยีน env ใน proviral DNA ของ seminal cells, RNA genome ของ cell free virus ใน seminal fluid

นอกจากนี้ผู้วิจัยกำลังศึกษาถึง signature nucleotide sequence ของยีน env ของเชื้อเอชไอวี ที่พบใน genital secretion เพื่อหา B- และ T- cell epitope ว่ามีความแตกต่างกับที่พบในเลือดหรือไม่ ถ้ามีจะได้มีการนำไปเป็น prototype เพื่อพัฒนาวัคซีนป้องกันรักษาโรคเอดส์ต่อไป

8. หนังสืออ้างอิง

1. Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immunodeficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *J Infect Dis* 1983;148:339-45.
2. Stoneburner RL, Chiasson J, Weisfuse IB, Thomas PA. The epidemic of AIDS and HIV-1 infection among heterosexuals in New York City. *AIDS* 1990;4:99-106.
3. Mertens T, Belsey E, Stoneburner RL, et al. Global estimates and epidemiology of HIV-1 infection and AIDS: further heterogeneity in spread and impact. *AIDS* 1995; 9 (Suppl A0: S259-72.
4. Myers G, Korber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Parlakis GN. Human retroviruses and AIDS, 1994. Los Alamos, NM: Los Alamos National Laboratory, 1994.
5. Weniger BG, Takebe Y, Ou C-Y, Yamazaki S. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* 1994; 8 (Suppl. 2):S1-9.
6. Wolinsky SM, Wike CM, Korber BTM, et al. Selective transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants from mothers to infants. *Science* 1992;255:1134-7.
7. Kunanusont C, Foy HM, Kreiss JK, et al. HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand. *Lancet* 1995;345:1078-83.
8. Mastro T, Satten GA, Nopkesorn T, Sangkharomya S, Longini Jr. Im. Probability of female to male transmission of HIV-1 in Thailand. *Lancet* 1994;343:204-7.
9. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, et al. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission. *Science* 1996; 271:1291-3.
10. Mostad S, Welch M, Chohan B, et al. Cervical and vaginal HIV-1 DNA shedding in female STD clinic attenders. Oral presentation at Xith AIDS conference in Vancouver, July 1996 (Abstract no. We.C.333).
11. Grace J, Nduatai R, Mbori-Ngacha D, et al. Cervicovaginal HIV DNA in pregnancy. Oral presentation at Xith AIDS conference in Vancouver, July 1996 (Abstract No. We.C.331).
12. Henin Y, Mandelbrot L, Henrion R, Pradinaud R, Coulaud JP, Montagnier L. Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and non-pregnant HIV-infected women. *J of AIDS*. 1993;6:72-5.
13. Speck CE, Coombs R, Koutsky L, et al. Rates and determinants of HIV sheeding in semen. Oral presentation at XITH AIDS conference in Vancouver, July 1996 (Abstract no. We.C.334).
14. Dyer JR, Gilliam BL, Eron JJ, Fiscus SA, Vemazza P, Cohen MS. Effects of disease stage and CD4+ lymphocyte count of shedding of HIV-1 in semen. Oral presentation at XITH AIDS conference in Vancouver, July 1996 (Abstract no. We.C.335).
15. Krieger JN, Coombs RW, Collier AC, et al. Fertility parameters in men infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1991;164:464-7.

16. Jackson JB, Coombs RW, Sannerud K, Rhame FS, Balfour HH Jr. Rapid and sensitive viral culture method for human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 1988;26:1416-8.
17. Krieger JN, Coombs RW, Collier AC, et al. Intermittent shedding of human immunodeficiency virus in semen: implications for sexual transmission. *J Urol* 1995;154:1035-40.
18. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, et al. DNA amplification for direct detection of HIV-1 DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Sciences* 1988; 239:295-7.
19. Youmo J, Conroy J. A novel polymerase chain reaction method for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filter paper. *J Clin Microbiol* 1992;30:2887-92.
20. Delwart EL, Shaper EG, Louwagie J, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993;262:1257-61.
21. Sutthent R, Foondladda S, Likanonskul S, et al. Detection of HIV-1 proviral DNA by polymerase chain reaction: a preliminary study in Bangkok. *J Med Assoc Thai* 1996;79:142-8.
22. Bush CE, Donovan RM, Smerreck SM, Stand D, Markowitz N, Saravolatz LD. Quantitation of unintegrated HIV-1 DNA in asymptomatic patients in the presence or absence of antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:183-7.
23. Pau C-P, Lee-Thomas S, Auwanit W, et al. Highly specific V-3 peptide enzyme immunoassay for serotyping HIV-1 specimens from Thailand. *AIDS* 1993;7:337-40.
24. Yerly S, Chamot E, Hirschel B, Perrin H. Quantitation of human immunodeficiency virus provirus and circulating virus: relationship with immunologic parameters. *J Infect Dis* 1992;166:269-76.
25. Gupta P, Ding M, Cottrill M, et al. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 DNA and RNA by a novel internally controlled PCR assay. *J Clin Microbiol* 1995;33:1670-3.
26. Dickover RE, Donovan EM, Goldstein E, Dandekar S, Bush CE, Carlson JR. Quantitation of human immunodeficiency virus DNA by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28:2130-3.
27. Genesca J, Wang RYH, Alter HJ, Shih JWK. Clinical correlation and genetic polymorphism of human immunodeficiency virus proviral DNA obtained after polymerase chain reaction amplification. *J Infect Dis* 1990;162:1025-30.
28. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Leigh Brown AJ. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol* 1990;64:864-72.
29. Joint United Nations Program on HIV/AIDS. HIV/AIDS figure and trends. UNICEF UNDP UNESCO WHO World Bank, Berlin, Germany, March 1996.
30. Cann AJ, Churoher MJ, Boyd M, et al. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type1 responsible for determination of cell tropism. *J Virol* 1992;66:305-9.

31. Chesebro B, Wehry K, Nishio J, Perryman S. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolated from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence heterogeneity in comparison with T-cell tropic isolates : definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol* 1992;66:6547-54.
32. de Jong J, de Ronde A, Keulen W, Termette M, Goudsmit S. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium inducing phenotype : analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1992;66:6777-80.
33. Milich L, Margolin B, Swanstrom R. V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* 1993;67:5623-34.
34. Donaldson YK, Bell JE, Holmes EC, Hughes ES, Brown HK, Simonds P. In vitro distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J Virol* 1994;68:591-6005.
35. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLance MF, et al. HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 1996;271:1291-3.
36. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA : molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0 University Park, PA: Pennsylvania State University, 1993.
37. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. 1994 Revised classification system for human immunodeficiency virus in children less than 13 years of age. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1994;43:1-10.
38. Mastro TD, Kunansont C, Dondero TJ, Wasi C. Why do HIV-1 subtypes segregate among persons with different risk behavior's in South Africa and Thailand, *AIDS* 1997;11:113-6.
39. Ichimura H, Kliks S, Visrutaratna S, Ou CY, Kalish M, Lavery J. Biological, serological, and genetic characterization of HIV-1 subtype E isolates from North Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:263-9.
40. McCutchan F, Hegerich P, Brennan T, et al. Genetic variation of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retrovirus* 1992;8:1887-95.
41. Ivanoff LA, Dubay JW, Morris JF, et al. V3 Loop region off the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *J Virol* 1992;187:423-32.
42. Ezekowitz AB, Kuhlman M, Groopman JE, Bym RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 1989;169:185-96.
43. Goudsmit J. Determinants of HIV-1 virulence in vitro and in vivo localized in the envelope V3 domain. In Montanier L, Gougeon M-L, eds. New concept in AIDS pathogenesis. New York: Marcel Dekker, 1993:27-39.

44. de Wolf F, Hogervorst E, Goudsmit J, et al. Syncytium-inducing (SI) and non-syncytium-inducing (NSI) capacity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV) subtype other than B; phenotype and genotypic characteristics. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10:1387-400.
45. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 1990;345:356-9.

9. Output ที่ได้ (อยู่ในภาคผนวก)

- 9.1 Sutthent R., Chaisilwattana P., Roongpisuthipong A. et al. Shedding of HIV-1 subtype E in semen and cervico-vaginal fluid. *J Med Assoc Thai* 1997; 80:348-57.
- 9.2 Sutthent R, Foongladda S, Chearskul S. et al., V3 sequence diversity of HIV-1 subtype E in infected mothers and their infants. *J of Acquir Immun Def Syndr* 1998; 18:323-31.

10. รายงานการเงินพร้อมสำเนาสมุดบัญชีเงินฝาก

จำนวนเงินที่ได้รับและเงินคงเหลือ

ปีที่ 1 : 1 กันยายน 2538-31 สิงหาคม 2539

งวดที่ 1 ได้รับจากสกว.	360,000.00	บาท
อื่นๆ ได้แก่ ดอกเบี้ย	3281.94	บาท
รวม	543,281.94	บาท
รายจ่าย	332,373.39	บาท
เหลือ	30,908.55	บาท

งวดที่ 2 ได้รับจาก สกว.(คงเหลือจากงวดที่1) 30,908.55
บาท

ได้รับจากมหาวิทยาลัย	180,000.00	บาท
อื่นๆ ได้แก่ ดอกเบี้ย	2437.91	บาท
รวม	213,346.46	บาท
รายจ่าย	191,825.50	บาท
เหลือ	21,520.96	บาท

ปีที่ 2 : 1 กันยายน 2539-31 สิงหาคม 2540

งวดที่ 3 ได้รับจาก สกว.	360,000.00	บาท
ได้รับจากมหาวิทยาลัย	180,000.00	บาท
อื่นๆ ได้แก่ ดอกเบี้ย , ยกมาจากงวดก่อน	21,520.96	บาท
รวม	561,520.96	บาท
รายจ่าย	474,138.87	บาท
เหลือ	87,382.09	บาท

งวดที่ 4 ได้รับจาก สกว.(คงเหลือจากงวดที่3)	87,382.09	บาท
ได้รับจากมหาวิทยาลัย	-	บาท
อื่นๆ ได้แก่ ดอกเบี้ย	-	บาท
รวม	87,382.09	บาท
รายจ่าย	85,183.55	บาท
เหลือ	2198.54	บาท

ปีที่ 3 : 1 กันยายน 2540-31 สิงหาคม 2541

งวดที่ 5 ได้รับจาก สกว.	360,000.00	บาท
ได้รับจากมหาวิทยาลัย	-	บาท
อื่นๆ ได้แก่ ดอกเบี้ย , ยกมาจากงวดก่อน	2198.54	บาท
รวม	362,198.54	
บาท		
รายจ่าย	298,587.1	บาท
เหลือ	63,611.44	บาท
งวดที่ 6 ได้รับจาก สกว.(คงเหลือจากงวดที่5)	63,611.44	บาท
ได้รับจากมหาวิทยาลัย	-	บาท
อื่นๆ ได้แก่ ดอกเบี้ย	-	บาท
รวม	63,611.44	บาท
รายจ่าย	63,000.00	บาท
เหลือ	611.44	บาท

62855-8

บัญชีธนาคารออมสินที่หมดระยะเวลา ธนาคารได้ตัดชำระเงินในกรณีบัญชีนี้		บัญชีออมสิน 1 ปี	
ดอกเบี้ย	500.00	เงินต้น	2,000.00
ดอกเบี้ย	50.00	เงินต้น	50.00

24/08/95 14:53 0187M*2350 016-262855
NEW P/B NO.-00006436560

ด. ทอฉิ่ง สภาหอการค้า
ด. จิโรจน์ ทรัพย์ทวี
นางสาววิมลวรรณ จันทน

ได้นำเงินไปฝากออมสินที่ ด. ทอฉิ่ง

TRF Research Scholar - Ruengprung Suthont

ชื่อบัญชี 62855-8 เมธีวิจัย ชก. - รวงผึ้ง สุธาเทว
NAME

ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน)
THE SIAM COMMERCIAL BANK PUBLIC COMPANY LIMITED

สาขาศิริราช

บัญชีเงินฝากออมทรัพย์
SAVINGS ACCOUNT

เลขที่บัญชี 016-2 62855-8
ACCOUNT NO.



ผู้มีอำนาจลงนาม
Authorized Signature

ฝาก - ออม





วันที่ DATE	TRANS CODE	ถอน WITHDRAWAL	ฝาก DEPOSIT	คงเหลือ BALANCE	หมายเลข M T NO	ลายเซ็น SIGNATURE
24/08/95	CDC/		*****100.00	*****100.00	0187M	
26/09/95	QDN/	ถอนฝาก	*****360,000.00	*****360,100.00	0324K	
10/10/95	CWD/	1 *****45,076.00		*****315,024.00	0118	
11/10/95	XWD/	2 *****27,215.00		*****287,809.00	0178C	
31/10/95	CWD/	3 *****21,970.00		*****265,839.00	0180C	
13/11/95	CWD/	4 *****20,000.00		*****245,839.00	0180C	
14/11/95	CWD/	5 *****36,375.00		*****209,464.00	0182	
30/11/95	CWD/	6 *****16,016.50		*****193,447.50	01780	
28/12/95	CWD/	7 *****100,200.00		*****93,242.43	01779	
31/12/95	T/I	*****0.00	*****3,281.91	*****96,524.37	0000R	
31/01/96	CWD	8 *****39,615.82		*****56,908.55	0186C	
28/02/96	CWD	9 *****26,000.00		*****30,908.55	01860	
22/03/96	XOP	ถอนฝาก	*****180,000.00	*****10,908.55	0187	
29/03/96	CWD	10 *****58,562.30		*****152,346.25	01770	
30/04/96	CWD	11 *****21,766.00		*****130,580.25	01781	
30/05/96	CWD	12 *****53,443.20		*****77,137.05	01810	
26/06/96	CWD	13 *****28,054.00		*****49,083.05	01810	
30/06/96	T/I	*****0.00	*****2,437.91	*****51,520.96	0000R	
17/07/96	CWD	14 *****15,000.00		*****36,520.96	01810	
02/09/96	CWD	15 *****15,000.00		*****21,520.96	01780	
30/09/96	CWD	16 *****15,000.00		*****6,520.96	01810	
14/11/96	XOP	ถอนฝาก	*****360,000.00	*****366,520.96	08460	

รหัสรายการ
 CDP, CDN ฝากเงินสด
 ODP, ODN ฝากเงินเช็ค
 XDP, XDN ฝากเงินโอน
 ODP, ODN ฝากเงินหักบัญชี
 CWD, CWN ถอนเงินสด
 XWD, XWN ถอนเงินโอน
 CDP ฝากเงินโอน
 HT ฝากเงิน
 HT ฝากเงิน
 TAS ฝากเงิน

1

วันที่ DATE	ประเภท TRANS CODE	ยอด WITHDRAWAL	ยอด DEPOSIT	ยอด BALANCE	หมายเลข MT.O	ลายเซ็น SIGNATURE
26/11/96	XWD	12 *****354,845.10		*****11,675.86	0178	
25/12/96	CWD	18 *****10,000.00		*****1,675.86	0177	
31/12/96	T/I	*****0.00	*****1,121.23	*****2,797.09	0000	
17/01/97	XDN		*****180,000.00	*****182,797.09	0182	
31/01/97	CWD	19 *****95,415.00		*****87,382.09	0177	
21/03/97	CWD	20 *****14,922.00		*****72,460.09	0181	
24/04/97	XWD	21 *****43,153.10		*****29,306.99	0184	
02/05/97	QDN	*****50,000.00		*****79,306.99	0180	
07/05/97	CWD	*****29,306.99		*****29,306.99	0844	
13/05/97	CDP	*****2,140.00		*****31,446.99	0188	
27/05/97	CWD	22 *****29,248.45		*****2,198.54	0845	
	INT	*****1,462.04				
30/06/97	TAX	*****0.00	*****3,660.58	0000A		
26/09/97	QDP	*****270,000.00	*****273,660.58	0183C		
04/11/97	CWD	23 *****139,512.50	*****134,148.08	0844L		
24/11/97	CWD	24 *****18,000.00	*****116,148.08	0845C		
25/12/97	CWD	*****15,000.00	*****101,148.08	0845C		
	INT	*****2,463.36				
31/12/97	TAX	*****0.00	*****103,611.44	0000A		
07/01/98	CWD	25 *****10,000.00	*****93,611.44	0179C		
02/02/98	XWD	26 *****15,000.00	*****78,611.44	0181C		
09/02/98	CWD	27 *****15,000.00	*****63,611.44	0180C		

หมายเหตุ (M.T. NO)

0000 - รายการฝากเงินอัตโนมัติ

0010-9999 - รายการฝากเงิน TERMINAL อัตโนมัติ

7000-9999 - รายการฝากเงิน ATM อัตโนมัติ

8000-9999 - รายการถอนเงินอัตโนมัติ

800A - รายการฝากเงินอัตโนมัติ

801A - รายการถอนเงินอัตโนมัติ

802A - รายการฝากเงินอัตโนมัติ

803A - รายการถอนเงินอัตโนมัติ

804A - รายการฝากเงินอัตโนมัติ

805A - รายการถอนเงินอัตโนมัติ

806A - รายการฝากเงินอัตโนมัติ

807A - รายการถอนเงินอัตโนมัติ

808A - รายการฝากเงินอัตโนมัติ

809A - รายการถอนเงินอัตโนมัติ

2

000000

วันที่ DATE	รหัส TRANS CODE	ถอน WITHDRAWAL	ฝาก DEPOSIT	คงเหลือ BALANCE	หมายเลข M T M D	ลายเซ็น (ชื่อ) SIGNATURE
03/03/98	CWD 71	*****40,000.00	*****23	611.44 0188C		1
01/04/98	XWD 30	*****15,000.00	*****8	611.44 0846C		2
13/05/98	CWD 31	*****8,000.00	*****	611.44 0844C		3
11/06/98	QDN	*****50,000.00	*****50	611.44 0180D		4
15/06/98	XWD	*****50,000.00	*****	611.44 0185C		5
						6
						7
						8
						9
						10
						11
						12
						13
						14
						15
						16
						17
						18
						19
						20
						21
						22

บริการฝาก-ถอนต่างสำนักงาน และบริการอิเล็กทรอนิกส์

ธนาคารไทยพาณิชย์ จำกัด (มหาชน) เป็นผู้นำในด้านธนาคารอิเล็กทรอนิกส์ ช่วยให้ท่านฝากถอน โอนเงิน สอบถามยอดคงเหลือใบบัญชี
ข้อมูลธุรกิจธนาคาร และดูบัญชีได้ตลอดเวลาทั้ง ON LINE และด้วยตนเอง จากบริการอิเล็กทรอนิกส์ในสาขาต่าง ๆ ได้แก่ บริการเงินด่วน

ATM บริการธนาคารทางโทรศัพท์ (TELE BANKING) บริการโทรเลข
(TELE CASH)

000000

3

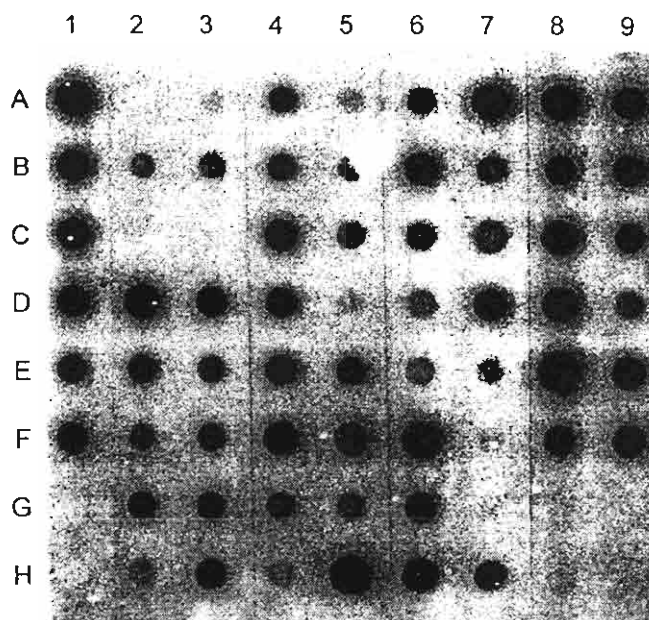


Figure 1 Autoradiogram of dot blot hybridization with fluorescein labeled SK19 probe of nested PCR product.

The 8E5 cell line was 2-fold diluted from 100 to 5 copies/ 2.5×10^5 cells with seronegative plasma. Then the dilution of 25 to 5 copies/ 2.5×10^5 cells were further diluted to make the dilution of 20, 15, 10 copies/ 2.5×10^5 cells.

Column 1 serially dilution of 8E5 cells

1A=50 copies/ 2.5×10^5 cells, 1B= 25 copies/ 2.5×10^5 cells,
 1C=20 copies/ 2.5×10^5 cells, 1D=15 copies/ 2.5×10^5 cells,
 1E=10 copies/ 2.5×10^5 cells, 1F=5 copies/ 2.5×10^5 cells, 1G,
 1H=negative control.

Column 2-9 amplified DNA from PBMC sample

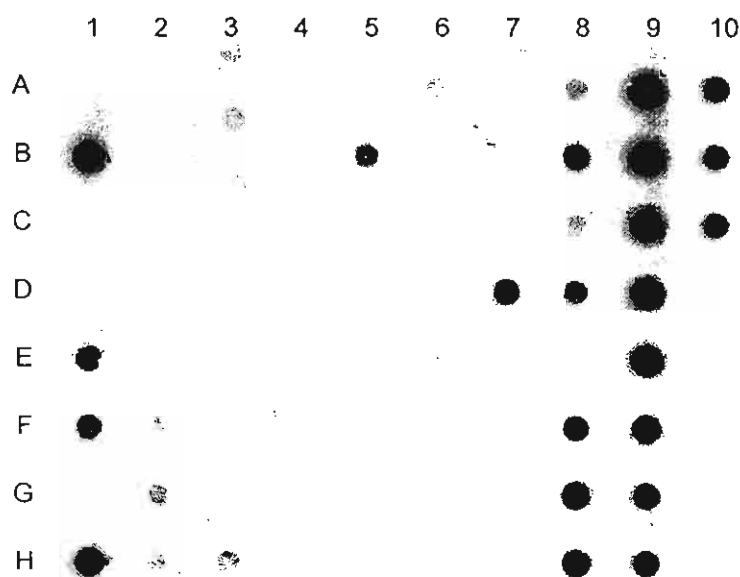


Figure 2 Autoradiogram of dot blot hybridization with fluorescein labeled SK19 probe of nested PCR product.

The 8E5 cell line was 2-fold diluted from 100 to 5 copies/ 2.5×10^5 cells with seronegative plasma. Then the dilution of 25 to 5 copies/ 2.5×10^5 cells were further diluted to make the dilution of 20, 15, 10 copies/ 2.5×10^5 cells.

Column 1-8 amplified DNA from cells from genital fluid

Column 9-10 serially dilution of 8E5 cells

9A=100 copies/ 2.5×10^5 cells, 9B=50 copies/ 2.5×10^5 cells,
 9C=25 copies/ 2.5×10^5 cells, 9D=20 copies/ 2.5×10^5 cells,
 9E=15 copies/ 2.5×10^5 cells, 9F=10 copies/ 2.5×10^5 cells, 9G=5
 copies/ 2.5×10^5 cells, 9H=4 copies/ 2.5×10^5 cells, 10A=3
 copies/ 2.5×10^5 cells, 10B=2 copies/ 2.5×10^5 cells, 10C=1
 copies/ 2.5×10^5 cells, 10D, 10E= negative control.

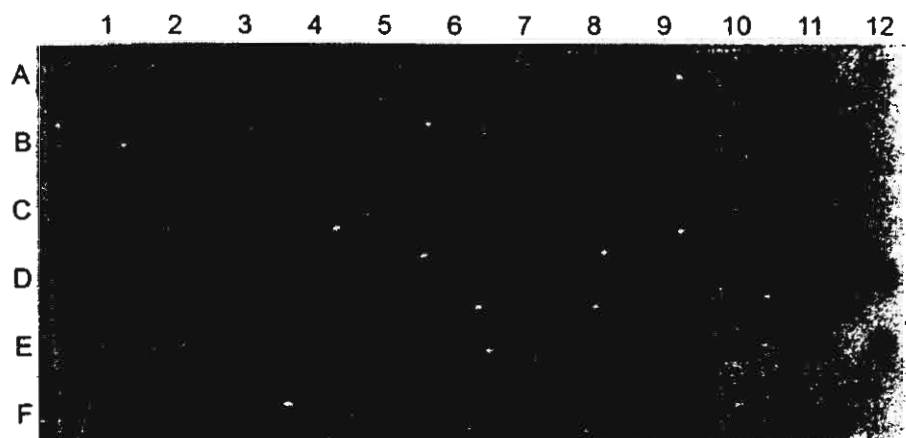


Figure 3 Autoradiogram of dot blot hybridization with fluorescein labeled SK19 probe of RT-PCR product.

- Row A-E RT-PCR product of male plasma and seminal plasma sample
- Row F 5-fold serially dilution of viral culture supernatant from undiluted to 1:125
- F1, F2=negative control, F3=undiluted extracted RNA from HIV-1 culture supernatant, F4=1:5, F5=1:25, F6=1:125,

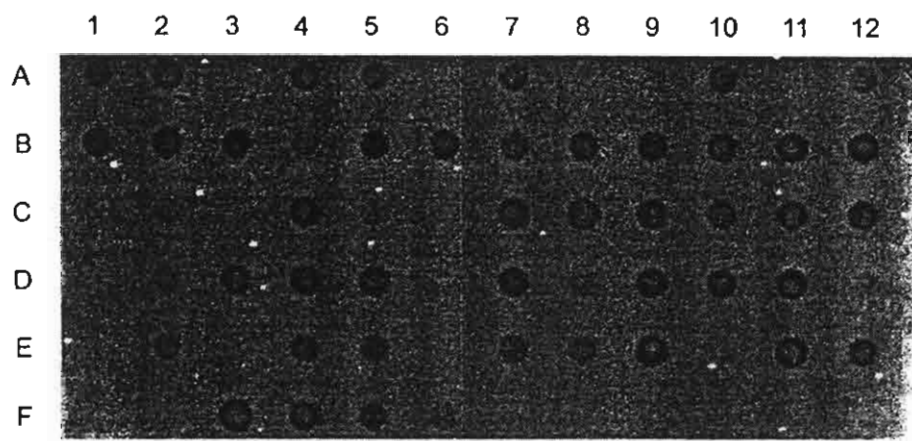


Figure 4. Autoradiogram of dot blot hybridization with fluorescein labeled SK19 probe of RT-PCR product.

Row A-E RT-PCR product of female plasma and cervico-vaginal fluid sample

Row F 5-fold serially dilution of viral culture supernatant from undiluted to 1:125

F1, F2=negative control, F3=undiluted extracted RNA from HIV-1 culture supernatant, F4=1:5, F5=1:25, F6=1:125

Table 1 Quantification of HIV-1 viral genome

ccouples	Male					Female						
	CD4	subtype	PBMC (copies/ 2.5x10 ⁷)	DNA Seminal cell (copies)	RNA Plasma (copies/ml)	Seminal plasma (copies/ml)	CD4	Subtype	PBMC (copies/ 2.5x10 ⁷)	DNA C-V cell (copies)	Plasma (copies/ml)	C-V fluid (copies/ml)
1	274	E	<5	UD	2.73X10 ⁰⁷	5.42X10 ⁰⁴	136	E	<5	UD	NA	NA
2	162	E	<5	21	3.31X10 ⁰⁷	1.35X10 ⁰⁴	245	E	<5	UD	NA	NA
3	504	E	<5	UD	NA	1.25X10 ⁰⁴	125	E	<5	<5	NA	1.58X10 ⁰⁷
4	604	E	39	UD	NA	2.51X10 ⁰⁴	534	E	19	UD	NA	4.97X10 ⁰⁷
5	438	E	<5	<5	NA	5.00X10 ⁰⁴	339	E	<5	NA	NA	NA
6	245	E	<5	<5	NA	1.83X10 ⁰⁴	162	E	<5	<5	NA	NA
7	376	E	9	NA	3.69X10 ⁰⁷	1.12X10 ⁰⁴	256	E	10	<5	NA	1.01X10 ⁰⁴
8	228	E	<5	13	NA	3.19X10 ⁰⁴	155	E	26	<5	NA	4.48X10 ⁰⁴
9	159	E	<5	<5	1.62X10 ⁰⁴	4.77X10 ⁰⁴	382	E	<5	UD	NA	ND
10	402	E	<5	<5	NA	4.07X10 ⁰⁷	489	E	<5	NA	NA	NA
11	108	B/E	20	UD	1.71X10 ⁰⁷	NA	389	E	<5	<5	1.17X10 ⁰⁴	NA
12	267	E	9	<5	2.77X10 ⁰⁷	7.41X10 ⁰⁷	725	E	<5	NA	2.75X10 ⁰⁷	ND
13	301	E	20	<5	NA	ND	606	E	6	NA	NA	NA
14	203	E	32	<5	3.40X10 ⁰⁴	NA	264	E	28	UD	1.48X10 ⁰⁴	1.01X10 ⁰⁴
15	525	E	<5	NA	1.69X10 ⁰⁷	NA	359	E	<5	NA	NA	NA
16	135	E	<5	<5	3.82X10 ⁰⁷	NA	437	E	<5	NA	NA	NA
17	448	E	<5	NA	2.93X10 ⁰⁷	1.58X10 ⁰⁴	447	E	43	<5	NA	NA
18	122	E	28	<5	5.18X10 ⁰⁴	5.32X10 ⁰⁴	246	E	<5	UD	NA	NA
19	366	E	<5	UD	1.59X10 ⁰⁴	1.17X10 ⁰⁴	307	E	<5	UD	NA	NA
20	558	NA	<5	UD	3.57X10 ⁰⁷	1.88X10 ⁰⁷	416	NA	24	NA	NA	3.03X10 ⁰⁷
21	633	E	<5	NA	NA	1.02X10 ⁰⁴	468	E	<5	<5	6.18X10 ⁰⁷	1.60X10 ⁰⁴
22	55	E	60	NA	1.88X10 ⁰⁴	1.37X10 ⁰⁴	373	E	<5	<5	NA	1.52X10 ⁰⁷
23	251	NA	22	UD	1.66X10 ⁰⁴	5.35X10 ⁰⁷	600	NA	<5	NA	4.79X10 ⁰⁷	NA
24	471	E	43	NA	3.09X10 ⁰⁴	7.19X10 ⁰⁷	244	E	9	NA	NA	1.04X10 ⁰⁷
25	253	E	43	NA	4.11X10 ⁰⁴	NA	497	E	34	<5	NA	7.65X10 ⁰⁴
26	229	E	12	NA	NA	1.48X10 ⁰⁷	439	E	28	<5	7.76X10 ⁰⁴	NA
27	34	E	34	NA	1.50X10 ⁰⁴	1.13X10 ⁰⁴	363	E	15	<5	NA	NA
28	274	E	44	<5	1.12X10 ⁰⁴	7.02X10 ⁰⁷	136	E	<5	<5	1.21X10 ⁰⁴	NA
29	422	E	<5	NA	1.98X10 ⁰⁴	NA	430	E	34	NA	1.57X10 ⁰⁴	3.05X10 ⁰⁷
30	504	NA	15	<5	1.49X10 ⁰⁴	2.18X10 ⁰⁷	589	NA	27	<5	1.07X10 ⁰⁴	NA

* not confirmed by nucleotide sequencing

NA Not amplifiable

UD Undetectable by dot blot hybridization

ND Not determined

Table 2 Quantification of HIV-1 viral RNA

copies	Male				Female							
	CD4	subtype	Plasma (copies/ml)	Roche RNA Seminal plasma (copies/ml)	Plasma (copies/ml)	Seminal plasma (copies/ml)	CD4	Subtype	Plasma (copies/ml)	Roche RNA C-V fluid (copies/ml)	Plasma (copies/ml)	Dot RNA C-V fluid (copies/ml)
1	274	E	812	350,278	2.73X10 ⁰⁷	5.42X10 ⁰⁶	136	E	406	1,277	NA	NA
2	162	E	ND	ND	3.31X10 ⁰⁷	1.35X10 ⁰⁶	245	E	ND	ND	NA	NA
3	504	E	18,140	12,372	NA	1.25X10 ⁰⁶	125	E	15,041	259	NA	1.58X10 ⁰⁷
4	604	E	4,449	ND	NA	2.51X10 ⁰⁶	534	E	ND	ND	NA	4.97X10 ⁰⁷
5	438	E	94,545	ND	NA	5.00X10 ⁰⁶	339	E	ND	ND	NA	NA
6	245	E	75,958	ND	NA	1.83X10 ⁰⁶	162	E	ND	ND	NA	NA
7	378	E	159,250	1,316	3.69X10 ⁰⁷	1.12X10 ⁰⁶	256	E	26,474	2,888	NA	1.01X10 ⁰⁶
8	228	E	148,168	70,763	NA	3.19X10 ⁰⁶	155	E	265,859	1,818	NA	4.48X10 ⁰⁶
9	159	E	73,108	ND	1.62X10 ⁰⁶	4.77X10 ⁰⁶	382	E	514	ND	NA	ND
10	402	E	537,432	3,367	NA	4.07X10 ⁰⁷	469	E	18,039	985	NA	NA
11	108	B/E *	98,909	8,971	1.71X10 ⁰⁷	NA	389	E	19,979	608	1.17X10 ⁰⁶	NA
12	267	E	41,892	ND	2.77X10 ⁰⁷	7.41X10 ⁰⁷	725	E	27,281	ND	2.75X10 ⁰⁷	ND
13	301	E	41,914	ND	NA	ND	508	E	ND	ND	NA	NA
14	203	E	156,316	19,961	3.40X10 ⁰⁶	NA	264	E	82,756	63,477	1.46X10 ⁰⁶	1.01X10 ⁰⁶
15	525	E	27,282	ND	1.59X10 ⁰⁷	NA	359	E	ND	ND	NA	NA
16	135	E	165,298	ND	3.82X10 ⁰⁷	NA	437	E	ND	ND	NA	NA
17	448	E	924	ND	2.93X10 ⁰⁷	1.58X10 ⁰⁶	447	E	ND	ND	NA	NA
18	122	E	ND	ND	5.18X10 ⁰⁶	5.32X10 ⁰⁶	246	E	ND	ND	NA	NA
19	388	E	ND	ND	1.59X10 ⁰⁶	1.17X10 ⁰⁶	307	E	ND	ND	NA	NA
20	558	NA	481	ND	3.57X10 ⁰⁷	1.88X10 ⁰⁷	415	NA	560	ND	NA	3.03X10 ⁰⁷
21	633	E	71,185	3,596	NA	1.02X10 ⁰⁶	468	E	5,085	2,355	6.18X10 ⁰⁷	1.60X10 ⁰⁶
22	55	E	ND	3034	1.68X10 ⁰⁶	1.37X10 ⁰⁶	373	E	ND	6129	NA	1.52X10 ⁰⁷
23	251	NA	18,200	4,888	1.66X10 ⁰⁶	6.35X10 ⁰⁷	600	NA	468	185	4.79X10 ⁰⁷	NA
24	471	E	2,094	ND	3.09X10 ⁰⁶	7.18X10 ⁰⁷	244	E	439	ND	NA	1.04X10 ⁰⁷
25	253	E	ND	ND	4.11X10 ⁰⁶	NA	487	E	ND	ND	NA	7.65X10 ⁰⁶
26	229	E	ND	ND	NA	1.46X10 ⁰⁷	439	E	ND	ND	7.76X10 ⁰⁶	NA
27	34	E	37,733	ND	1.50X10 ⁰⁶	1.13X10 ⁰⁶	363	E	ND	ND	NA	NA
28	274	E	103,235	4,110,674	1.12X10 ⁰⁶	7.02X10 ⁰⁷	136	E	1,947	35,053	1.21X10 ⁰⁶	NA
29	422	E	42,326	793	1.98X10 ⁰⁶	NA	430	E	8,722	13,458	1.57X10 ⁰⁶	3.05X10 ⁰⁷
30	504	NA	11,042	15,542	1.49X10 ⁰⁶	2.18X10 ⁰⁷	589	NA	68,955	3,098	1.07X10 ⁰⁶	NA

* not confirmed by nucleotide sequencing

NA Not amplifiable

UD Undetectable by dot blot hybridization.

ND Not determined

Table 3 Shedding of HIV-1 subtype E genome in blood and genital fluid of infected couples.

	PBMC	Plasma		Genital cell	Genital fluid	
		RT-PCR	ROCHE		RT-PCR	ROCHE
Male	30/30 (100)	21/30 (70)	24/24 (100)	20/30 (66.67)	23/29 (79.31)	11/13 (84.62)
Female	30/30 (100)	9/30 (30)	16/16 (100)	20/30 (66.67)	11/28 (39.29)	13/13 (100)

HIV-1 proviral DNA was detected PBMC and genital cell form infected couples by nested-PCR.

HIV-1 viral RNA was detected in plasma and genital fluid from infected couples by RT-PCR and ROCHE AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test.

Number of positive percentage was in parenthesis.

Table 4 Detection of HIV-1 proviral DNA and viral RNA in genital fluid of infected male and female subjects

Group	Detection of HIV-1 DNA/RNA	Male individual (%)	Female individual (%)
1	+/+	16/29 (55.17)	8/28 (28.57)
2	+/-	3/29 (10.34)	11/28 (39.29)
3	-/+	7/29 (24.15)	3/28 (10.71)
4	-/-	3/29 (10.34)	6/28 (21.43)

Group1 Both HIV-1 proviral DNA and viral RNA found in genital fluid of infected individual.

Group2 Only HIV-1 proviral DNA found in genital fluid of infected individual.

Group3 Only HIV-1 viral RNA found in genital fluid of infected individual.

Group4 No HIV-1 genome found in genital fluid of infected individual.

HIV-1 proviral DNA was detected by nested-PCR

HIV-1 viral RNA was detected by RT-PCR

Table 5 Detection of HIV-1 subtype E proviral DNA and viral RNA genome in blood of infected male and female

Group	Detection of HIV-1 DNA/RNA	Male subject (%)	Female subject (%)
1	+/+	21/30 (70)	9/30 (30)
2	+/-	9/30 (30)	21/30 (70)
3	-/+	0/30	0/30
4	-/-	0/30	0/30

Group1 Both proviral DNA and RNA found in blood of infected individual.

Group2 Only proviral DNA found in blood of infected individual.

Group3 Only viral RNA found in blood of infected individual.

Group4 No HIV-1 genome found in blood of infected individual.

HIV-1 proviral DNA was detected by nested-PCR

HIV-1 viral RNA was detected by RT-PCR

Table 6 HIV-1 RNA in seminal plasma and cervico-vaginal fluid of husband-wife pair from corresponding couples.

Group	RT-PCR result and seminal plasma/c-v fluid	Pair (%)
1	+/+	8/27 (29.63)
2	+/-	13/27 (48.15)
3	-/+	3/27 (11.11)
4	-/-	3/27 (11.11)
Group 1	HIV-1 viral RNA found in both seminal plasma and cervico-vaginal fluid of corresponding couples	
Group 2	HIV-1 viral RNA found in only seminal plasma but not cervico-vaginal fluid of corresponding couples	
Group 3	HIV-1 viral RNA found in only cervico-vaginal but not fluid seminal plasma of corresponding couples	
Group 4	No HIV-1 viral RNA found in both seminal plasma and cervico-vaginal fluid of corresponding couples	

Table 7 HIV-1 RNA in male plasma and female plasma of husband-wife pair from corresponding couples.

Group	RT-PCR result in plasma from husband/from wife	Pair (%)	
1	+/+	7/30	(23.33)
2	+/-	14/30	(46.67)
3	-/+	2/30	(6.67)
4	-/-	7/30	(22.33)
Group 1	HIV-1 viral RNA found in both male and female plasma of corresponding couples		
Group 2	HIV-1 viral RNA found only in male plasma but not female plasma of corresponding couples		
Group 3	HIV-1 viral RNA found only in female plasma but not male plasma of corresponding couples		
Group 4	No HIV-1 viral RNA found in both male and female plasma of corresponding couples		

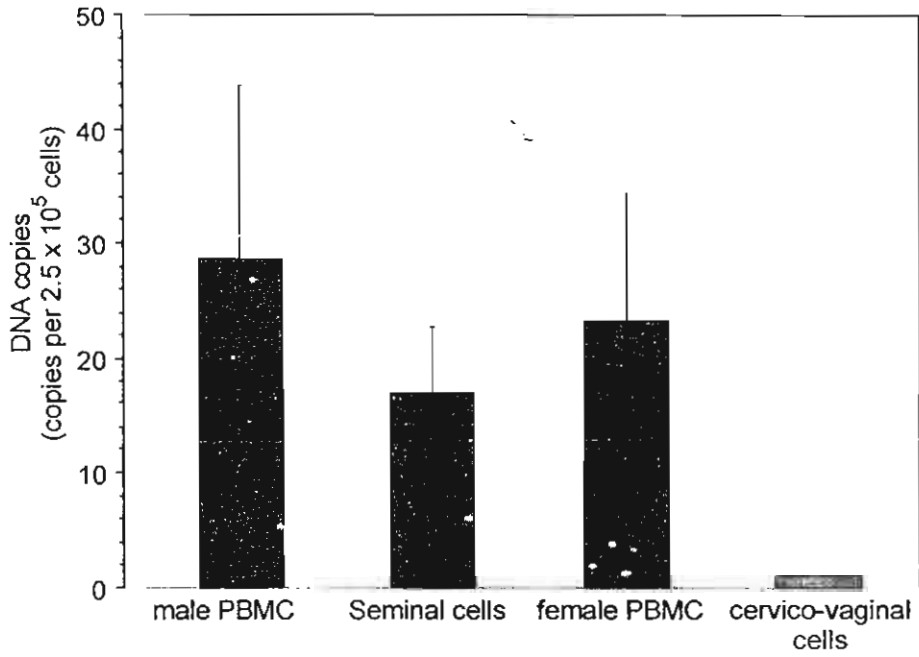


Figure 5 HIV-1 proviral DNA copy number quantified by dot blot hybridization.

HIV-1 proviral DNA in PBMC and cell from genital secretion from infected couples were quantified for proviral DNA copy number. The detection limit of the test was 5 copies per 2.5×10^5 cells. PBMC from male subject contain highest mean proviral DNA copy number of 29 copies per 2.5×10^5 cells, while all amplifiable cervico-vaginal cell samples contain less than 5 copies per 2.5×10^5 cells.

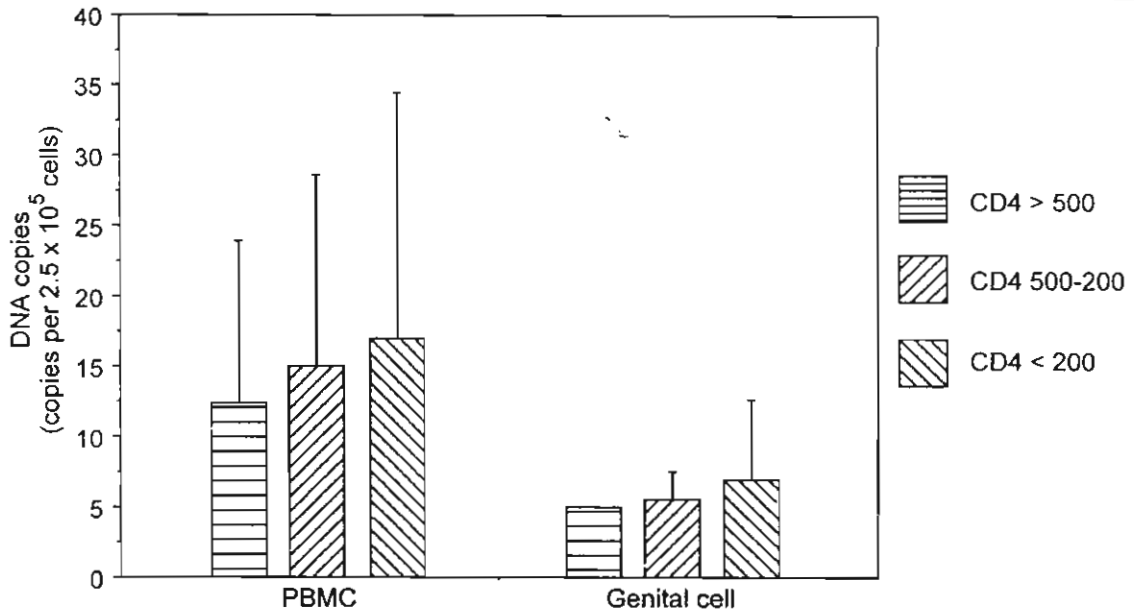


Figure 6 HIV-1 proviral DNA copy number quantified by dot blot hybridization in relation with blood CD4 lymphocyte count.

Blood CD4 lymphocyte count was classified into 3 groups. The lowest proviral DNA copy number was found in CD4 >500 cells/mm³ in both PBMC and cell from genital secretion.

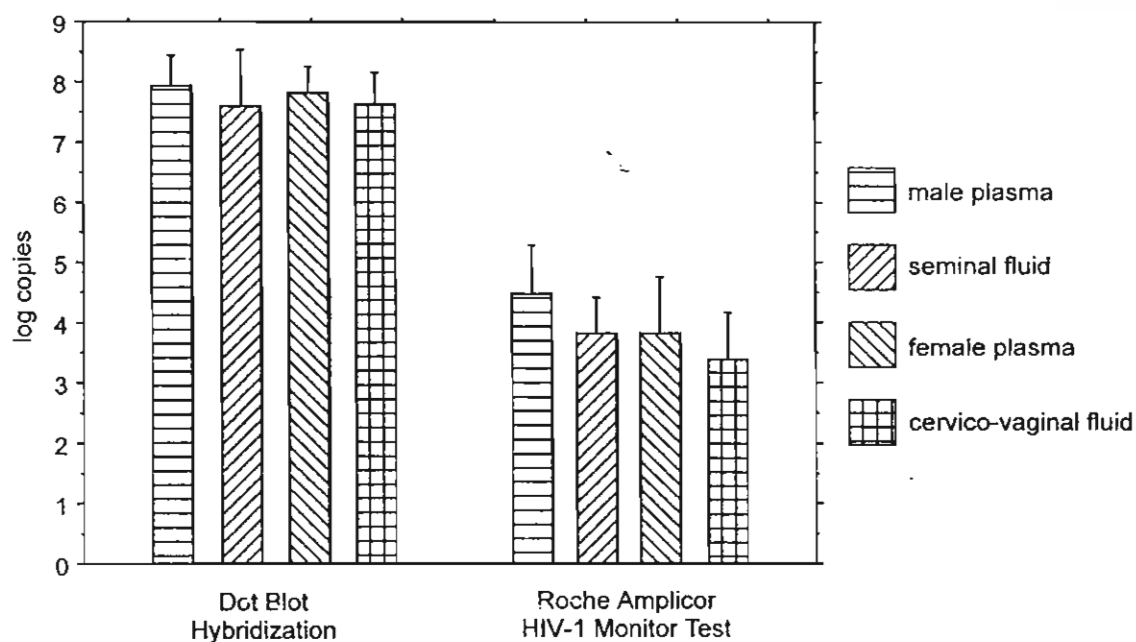


Figure 7 HIV-1 viral RNA-copy number

HIV-1 viral RNA in plasma and genital fluid from infected couples were quantified for viral RNA copy by two methods: dot blot hybridization and ROCHE AMPLICOR HIV-1 MONITOR TEST.

Male plasma samples contain highest mean RNA copy by both methods.