การจำแนก Type และความไวรับต่อยา Acyclovir ของ Herpes Simplex Viruses

นางสาวอัจฉริยรัช แสงดารา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546
ISBN 974-17-3421-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TYPING AND ACYCLOVIR SUSCEPTIBILITY OF HERPES SIMPLEX VIRUSES

Miss Ajchariyarat Sangdara

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3421-2

Thesis Title	Typing and Acyclovir Susceptibility of Herpes Simplex Viruses
By	Miss Ajchariyarat Sangdara
Field of study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Suchada Kiranandana

.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis committee:

Somatat Wongsawang .....Chairman

(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)

Parvapan Bhattarakosol .....Thesis Advisor

(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

Vimolmas Lipipun .....Member

(Associate Professor Vimolmas Lipipun, Ph.D)

Wasun Chantratita .....Member

(Associate Professor Wasun Chantratita, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัจฉริยรัช แสงดารา : การจำแนก Type และความไวรับต่อยา Acyclovir ของ Herpes Simplex Viruses (Typing and Acyclovir Susceptibility of Herpes Simplex Viruses) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล; 90 หน้า ISBN 974-17-3421-2.

HSV เป็นไวรัสก่อโรคเริม การติดเชื้อไวรัสสามารถเกิดขึ้นที่บริเวณต่างๆ ของร่างกายได้ตั้งแต่ ปาก ผิวหนัง อวัยวะสืบพันธุ์ ตา และสมอง เป็นต้น ไวรัสชนิดนี้มี 2 ไทป์ คือ HSV-1 และ HSV-2 ทั้งสองชนิดเป็นสาเหตุก่อโรคหลายโรคได้แก่ herpes labialis, eczema herpeticum, genital herpes, neonatal herpes, herpes keratoconjunctivitis และ herpes encephalitis เป็นต้น โดยทั่วไปการติดเชื้อ HSV ในคนที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติมักจะไม่ก่ออาการรุนแรง แต่พบว่าการติดเชื้อในผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจะเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะรุนแรง และอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ ปัจจุบันมียารักษาโรคติดเชื้อ HSV หลายชนิด แต่ acyclovir (ACV) เป็นยาที่นิยมใช้รักษาโรคติดเชื้อ HSV มากที่สุด เนื่องจาก ACV เป็นยาต้านไวรัสชนิดแรกที่ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรคเริมสูง และมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ยา ACVมีกลไกการออกฤทธิ์ที่จำเพาะต่อเอ็นไซม์ของไวรัสคือ viral thymidine kinase (TK) enzyme ซึ่งจะเปลี่ยน ACV เป็นรูป active และเข้าไปยับยั้งขบวนการสร้างสารพันธุกรรม (DNA) ของไวรัสภายในเซลล์โดยผ่านเอ็นไซม์ DNA polymerase ของไวรัส แต่เนื่องจาก HSV มีคุณสมบัติสำคัญคือ การติดเชื้อแอบแฝง (latent infection) ทำให้ไวรัสหลบซ่อนอยู่ในปมประสาท และสามารถกลับมาก่อโรคได้อีก (recurrent infection) ทำให้มีการใช้ยา ACV บ่อยครั้ง และระยะเวลานาน ขึ้นกับอาการโรค จึงกลายเป็นปัจจัยสำคัญให้ไวรัสพัฒนาความสามารถในการดื้อยา ปัจจุบันมีรายงานพบ HSV ที่ดื้อต่อยา ACV (ACV^r HSV) มากขึ้น โดยเฉพาะพบมากในผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องเป็นผลให้การรักษาด้วยยา ACV ไม่ได้ผล สาเหตุของการเกิด ACV^r HSV มาจากการกลายพันธุ์ที่ยีนสำคัญสองชนิด ได้แก่ ยีน *TK* และ DNA polymerase (*pol*) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าโอกาสจะพบ ACV^r HSV ที่มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของ *TK* gene มีสูงกว่า *pol* gene

การวิจัยนี้จึงสนใจตรวจหาไทป์ของ HSV ที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2541 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ.2545 ด้วยวิธี indirect immunofluorescence assay (IFA) โดยใช้ mouse monoclonal antibody (MAb) HSV – type specific และการตรวจหาความไวรับของ HSV ต่อยา ACV ด้วยวิธี plaque reduction assay (PRA) เพื่อหาความชุก (prevalence) ของ ACV^r HSV กรณีที่ตรวจพบภาวะการดื้อยาดังกล่าว จะทำการศึกษาลำดับเบส (DNA sequencing) ของ *TK* gene เพื่อทราบลักษณะทาง genotype และตำแหน่งของการกลายพันธุ์ใน *TK* gene

ผลการศึกษาจากจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 121 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มจำนวนไวรัสได้ทั้งหมด 86 ตัวอย่าง คิดเป็น 71.01% เป็นตัวอย่างจากผู้ชาย 18.60% และผู้หญิง 81.40% และเมื่อนำมาตรวจหาไทป์ด้วยวิธี indirect IFA โดยใช้ MAb HSV-type specific พบว่าผู้ป่วยติดเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 คิดเป็น 62.79% และ 34.88 % ตามลำดับ ซึ่งพบตัวอย่าง HSV ที่ติดเชื้อร่วมกันสองไทป์เพียง 2.32% เท่านั้น จากการแบ่งตัวอย่างสิ่งส่งตรวจตามบริเวณที่มีการติดเชื้อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (74.42%) และบริเวณอื่นๆ (25.58%) พบว่าสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากบริเวณอื่นนอกเหนือจากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์พบ HSV-1 และ HSV-2 คิดเป็น 90.91% และ 9.09 % ตามลำดับ ซึ่งบริเวณนี้ไม่พบว่ามี HSV ทั้งสองไทป์ที่ติดเชื้อร่วมกัน ผลการตรวจหาไทป์ของสิ่งส่งตรวจที่เก็บจากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์พบว่า HSV-1 สูงถึง 53.12% ขณะที่ HSV-2 และ HSV ที่ติดเชื้อร่วมกันทั้งสองไทป์พบ 43.75% และ 3.12% ตามลำดับ เมื่อนำสิ่งส่งตรวจของ HSV-1 จำนวน 52 ตัวอย่าง และ HSV-2 จำนวน 28 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง มาทดสอบความไวรับต่อยา ACV โดยวิธี PRA พบว่า HSV-1 และ HSV-2 มีช่วงค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 0.07-0.97 μg/ml และ 0.17-1.66 μg/ml ตามลำดับ เมื่อนำค่า IC_{50} ของแต่ละไทป์มาหาค่าเฉลี่ยพบว่า HSV-1 และ HSV-2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.36 μg/ml (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน : 0.23) และ 0.54 μg/ml (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน : 0.36) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่พบ HSV ที่ดื้อยา ACV

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผู้หญิงมีอัตราการติดเชื้อ HSV สูงกว่าผู้ชาย (81.40%) และพบว่าส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างที่เก็บได้จากรอยโรคบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ สิ่งที่น่าสนใจคือ การติดเชื้อ HSV-1 เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในบริเวณดังกล่าว และผลจากการศึกษาความไวรับของ HSV ที่มีต่อยา ACV พบว่าทั้งสองไทป์มีช่วงค่า IC_{50} สูงและกว้าง (0.07-1.66) และพบว่า HSV-1 มีค่าความไวต่อยา ACV สูงกว่า HSV-2 ซึ่ง ทั้งสองไทป์มีค่าเฉลี่ยของ IC_{50} แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.02$)

สหสาขาวิชา สหสาขาวุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่อนิสิต**.....

สาขาวิชา วุลชีววิทยาทางการแพทย์ **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา**.....

ปีการศึกษา 2546 **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม**.....

4389126620 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: HERPES SIMPLEX VIRUS/ TYPING/ ACYCLOVIR/ PLAQUE REDUCTION ASSAY

AJCHARIYARAT SANGDARA : THESIS TITLE : TYPING AND ACYCLOVIR SUSCEPTIBILITY OF HERPES SIMPLEX VIRUSES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D. 90 pp. ISBN 974-17-3421-2.

HSV infection can occur at various parts of human body site such as mouth, skin, genital, eyes, and brain. Both types, HSV-1 and HSV-2, can cause many diseases such as herpes labialis, genital herpes, herpes keratoconjunctivitis, and herpes encephalitis, etc. Normally, in immunocompetent patients, HSV infection is less severe and extensive but HSV causes a variety of infections with significant morbidity and mortality among immunocompromised persons. Nowadays, many medications are available for treatment of HSV. However, acyclovir (ACV) is the drug of choice for the treatment of HSV infections. It has been proven to have a high efficacy in suppressing HSV replication and an excellent safety profile to host. Virus-specified thymidine kinase (TK) phosphorylates ACV to its monophosphate derivation. ACV is further phosphorylated by cellular enzymes to its triphosphate derivative. ACV triphosphate binds viral DNA polymerase, active as a DNA chain terminator. ACV is only effective against actively replicating viruses and does not affect viruses in persistent or latent state. Since HSV is specifically characterized by its ability to establish and maintain latent infection in sensory nerve ganglion that can be reactivated to become reinfection. Repeated therapy of ACV is common and long term treatment in some cases is recommended. These are the possible factors to induce the ACV resistant HSV strain (ACV^r HSV). Recently, detection of ACV^r HSV has been reported. Occasionally, ACV resistance can be due to an alteration of the TK protein as a result of mutation in genes that codes for TK (*TK* gene) or more rarely, a mutation may occur in the viral DNA polymerase (*pol*) gene.

In this study, all HSV isolates collected from January 1998 to June 2002 were typed by using indirect immunofluorescent (IFA) method with a fluorescence isothiocyanate-conjugated (FITC) monoclonal (MAb) HSV-type specific antibodies and determined the susceptibility to ACV by PRA in order to estimate the prevalence of ACV^r HSV in Thai patients. And characterization of *TK*-mutation in ACV^r HSV by DNA sequencing method will be performed, if ACV^r HSV was detected.

Only 86 isolates (71.07%) from 121 specimens were successfully propagated. They were from male 18.60% and female 81.40%. They were typed by indirect IFA using MAb HSV-type specific. Among these clinical samples, HSV-1 was found predominately 62.79%, followed by HSV-2 34.88% and only 2.32% were mixed infection. When the samples were divided according to the site of infection, specimens from the non-genital lesion (25.58%) were 90.91% of HSV-1, and 9.09% of HSV-2. No mixed infection was found. In genital specimens (74.42%), HSV-1 was detected 53.12%, 43.75 % of HSV-2, and 3.12% of mixed infection. Only 80 HSV isolates were assayed for ACV susceptibilities. The range of IC_{50} of 52 HSV-1 isolates was 0.07-0.97 μg/ml and 28 HSV-2 isolates were 0.17-1.66 μg/ml. The mean IC_{50} of ACV for HSV-1 and HSV-2 isolates were 0.36 μg/ml (SD: 0.23) and 0.54 μg/ml (SD: 0.36). No ACV^r HSV was detected in this study.

The study showed that genital specimens were from female more than those from male (81.40%). Moreover, they were mostly collected from suspected genital herpetic lesion. Interestingly, a prevalence of HSV-1 infection in genital lesion was 53.12%. That indicated a trend of genital HSV-1 infection was increasing in Thailand. The ACV susceptibility of HSV isolates exhibited a wide spectrum from the range of IC_{50} both types, were 0.07-1.66 μg/ml. HSV-1 isolates were more susceptible to ACV than HSV-2 isolates and the mean IC_{50} of HSV-1 isolates, 0.36 (SD=0.23), and that of HSV-2 isolates, 0.54 (SD=0.36), were statistically significant difference (p= 0.02).

Inter-Department Medical Microbiology Student's signature... Ajchariyarat Sangdara

Field of study Medical Microbiology Advisor's signature... Parvapan Bhattarakosol

Academic year 2003 Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest to the following individuals who have helped in making this thesis possible:

My sincere gratitude and appreciation to Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her excellent supervision, valuable guidance, kindness, devotion which has enabled me to carry out my study successfully.

I am indebted to the Ratchadapisek Sompoj China Medical, for funding of my study.

I am greatly indebted to the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for giving the opportunity of my study.

I am also very grateful to the members of the thesis committee for their kindness, constructive criticisms and helpful suggestions for completeness and correction of this thesis.

I would like to extend my appreciation to the staff and my friends of the Microbiology Department for their help and friendship.

I also would like to thanks my pa-pa" for encouragement, cheers up and all supports.

Finally, I am extremely grateful to my parents for their love, understanding and encouragement throughout my life.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

page

ABSTRACT (THAI).....iv
ABSTRACT (ENGLISH).....v
ACKNOWLEDGEMENTS.....vi
CONTENTS.....vii
LIST OF TABLES.....ix
LIST OF FIGURES.....x
ABBREVIATIONS.....xii
CHAPTER

I. INTRODUCTION.....1
II. OBJECTIVES.....6
III. REVIEW OF LITERATURE.....7
History.....7
Properties of herpes simplex viruses.....9
Viral replication.....11
Latency.....15
Pathogenesis and diseases of HSV infection.....16
Epidemiology.....19
Antiviral drug.....20
Acyclovir.....21
(i) Mode of infection.....21
(ii) Mechanism of resistance.....22
(iii) Susceptibility.....23
(iv) Surveillance in the immunocompetent Population.....23
(v) Surveillance in the immunocompromised Population.....24

CONTENTS (continued)

page

IV. MATERIALS AND METHODS.....26
1. Cell culture.....26
2. Viruses.....27
(2.1) HSV standard strain.....27
(2.2) Clinical HSV specimens.....27
(2.2.1) HSV isolation.....27
(2.2.2) Propagation of HSV positive samples.....28
3.Plaque titration assay.....28
4. Typing of clinical HSV specimens by an indirect immunofluorescence assay (IFA) using monoclonal (MAb) HSV type-specific antibodies.....30
(4.1) Preparation of viral infected cells.....30
(4.2) An indirect immunofluorescent staining.....31
(4.3) Interpretation of results.....32
5. Antiviral susceptibility testing.....32
Interpretation of results.....33
V. RESULTS.....35
Propagation of virus from clinical isolates.....35
Typing of HSV isolates.....35
Antiviral susceptibility testing.....45
VI.DISCUSSION.....57
REFERENCES.....61
APPENDICES.....82
APPENDIX I.....83
APPENDIX II.....86
BIOGRAPHY.....89

LIST OF TABLES

Table page

1. Members of the family *Herpesviridae* that infect humans 8

2. Three distinct classes of mRNAs are made.....13

3. HSV infection causes the various of diseases which are different lesions.....18

4. The number of HSV propagation which were positive for HSV isolating during January 1998 to June 2002.....36

5. The data of 86 tested clinical specimens typing by indirect IFA using MAb HSV–type specific antibodies.....38

6. Summarized typing data of clinical specimens in each years (January 1998-June 2002). The information of gender was indicated.....43

7. The distribution of HSV type due to site of infection and gender.....44

8. The IC_{50} values of HSV-1 isolates and standard HSV-1 (strain KOS).....47

9. The IC_{50} values of HSV-2 isolates and standard HSV-2 (strain Baylor 186).....52

10. The susceptibility results of either HSV-1 or HSV-2 isolates to ACV.....55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure page

1. A typical HSV particle that the outer membrane is derived from the host cells nuclear membrane.....9

2. The prototype of the HSV has been consisted of two covalently linked components, designated as L (long) and S (short).....10

3. Schematic representiation of the initial steps in HSV infection -HSV entry.....12

4. Structure of ACV that is an analogue of the natural nucleoside.....21

5. Determination of the IC_{50} value of ACV by plotting of relation between the percent of viral plaque remaining after incubation and each concentration of ACV.....33

6. Immunofluorescence staining patterns of HSV-infected cells. Standard HSV-1 (KOS), standard HSV-2 (Baylor 186), and 3 clinical isolates were shown (magnification 40x).....37

7. Assay of sensitivity to ACV of HSV isolates by PRA in 96 well-plate. Various concentrations of ACV were tested i.e. 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16, 0.08, and 0 ug/ml and done in quadruplicated wells for each concentration.....46

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES (continued)

Figure page

8. Scatter plot of IC_{50} value of HSV-1 isolates and standard HSV-1 strain KOS.....51

9. Scatter plot of IC_{50} value of HSV-2 isolates and standard HSV-2 strain Baylor 186.....54

10. Mean±SD of IC_{50} of HSV-1 and HSV-2 viruses.....56

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A	=	Adenine base
ACV	=	Acyclovir
ACV^r HSV	=	Acyclovir resistant herpes simplex virus
Alpha-TIF	=	Alpha-trans-inducing factor
ATP	=	Adenosine triphosphate
bp	=	Base pair
C	=	Cytosine base
CNS	=	Central nervous system
CPE	=	Cytopathic effect
^0C	=	Degree celsius
DDW	=	Double-deionized distilled water
dGTP	=	2',3'– dideoxy guanosine-5'-triphosphate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ds	=	Double-stranded
DW	=	Distilled water
E	=	Early
EBV	=	Epstein-Barr virus
ED_{50}	=	Effective dose 50%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

e.g.	=	example gratia
et al	=	et alii
FBS	=	Fetal bovine serum
FITC	=	Fluorescence isothiocyanate
g	=	Gram
G	=	Guanine base
gB	=	Glycoprotein B
GM	=	Growth medium
GUD	=	Genital ulcer disease
HCMV	=	Human cytomegalovirus
HEPES	=	N_2-hydroxyethylpiperazine-N'_2-ethanesulphonic acid
HHV-6	=	Human herpesvirus-6
HHV-7	=	Human herpesvirus-7
HHV-8	=	Human herpesvirus-8
HSV	=	Herpes simplex virus
HSV-1	=	Herpes simplex virus type-1
HSV-2	=	Herpes simplex virus type-2
Hve A	=	Herpes virus entry mediator A

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

Hve B	=	Herpes virus entry mediator B
Hve C	=	Herpes virus entry mediator C
IC_{50}	=	Inhibitory concentration fifty percent
ICP	=	Infected cell protein
ICTV	=	International Committee on Taxonomy of Virus
IE	=	Immediate early
IFA	=	Immunofluorescence assay
IgG	=	Immunoglobulin G
I_L	=	Inversion of the L component
I_{SL}	=	Inversion of the SL component
Kbp	=	Kilo base pair
KSHV	=	Kaposi's sarcoma associated herpesvirus
LAT	=	Latent associated transcript
M	=	Molar
MAb	=	Monoclonal antibody
µL	=	Microliter
mL	=	Milliliter
MM	=	Maintenance medium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

MOI	=	Multiplicity of infection
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
N	=	Number of sample
NCCLS	=	National Committee for Clinical Laboratory Standard
nm	=	Nanometer
ori L	=	Origin of replication in the long region
ori S	=	Origin of replication in the short region
%	=	Percent
p	=	P value
P	=	Prototype
PBS	=	Phosphate buffer saline
PFU	=	Plaque forming unit
pol	=	Polymerase gene
PRA	=	Plaque reduction assay
SD	=	Standard deviation value
STD	=	Sexually transmitted disease
SVC	=	Shell vial centrifugation cell culture

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

T	=	Thymine base
TK	=	Thymidine kinase enzyme
TK	=	Thymidine kinase gene
TK^A	=	*TK*-altered mutant
TK^N	=	*TK*-negative mutant
TK^P	=	*TK*-partial mutant
U_L	=	Long unique sequence
U_S	=	Short unique sequence
U.S.A.	=	United States of America
V/V	=	Volumn by volumn
VZV	=	Varicella-zoster virus

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย