


**การพัฒนาและประเมินวิธีการตรวจวินิจฉัยแยก Genotype สำหรับ Dengue virus โดย  
Fluorogenic reverse transcriptase PCR (Hybridization probe)**



**นางสาว ณิชรา ตีระวัฒนพงษ์**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)**

**บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**ปีการศึกษา 2546**

**ISBN 974-17-4890-6**

**ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LABORATORY DIAGNOSIS AND  
GENOTYPING FOR DENGUE VIRUS BY  
FLUROGENIC REVERSE TRANSCRIPTASE PCR (HYBRIDIZATION PROBE)**



**Miss Nisra Teerawatanapong**

**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 974-17-4890-6**



ฉิสร่า ตีระวัฒนพงษ์: การพัฒนาและการประเมินวิธีการตรวจวินิจฉัยแยก GENOTYPE สำหรับ DENGUE VIRUS โดย FLUOROGENIC REVERSE TRANSCRIPTASE PCR (HYBRIDIZATION PROBE) (DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LABORATORY DIAGNOSIS AND GENOTYPING FOR DENGUE VIRUS BY FLUOROGENIC REVERSE TRANSCRIPTASE PCR (HYBRIDIZATION PROBE) อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ 73 หน้า ISBN 974-17-4890-6

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ Dengue virus ที่รวดเร็วมมีความสำคัญเพื่อการดูแลรักษาคนไข้ที่เหมาะสม เนื่องจากการพัฒนาวิธีการตรวจจำนวนมากสำหรับเชื้อ dengue virus แต่ยังไม่รวดเร็วพอ ดังนั้นการรวมเครื่อง LightCycler เข้ากับวิธีการวัดแบบ hybridization probe ด้วยหลักการของ Fluorescence resonance energy transfer (FRET) ได้นำมาพัฒนาในการศึกษาครั้งนี้เพื่อวินิจฉัยและจำแนก genotype ของ dengue virus โดยการออกแบบ hybridization probe 2 ชุดซึ่งจะจับกับลำดับเบสที่จำเพาะภายใน sequence ของ dengue virus

การศึกษานี้ใช้น้ำเหลืองจากผู้ป่วยด้วยไข้เลือดออก 100 รายมาประเมิน hybridization probe 2 ชุด แยก genotype โดย melting curve analysis dengue genotype 1 และ 3 สามารถจับกับ detection probe ที่ติดฉลากด้วย LC-Red 640  $T_m$  ที่ได้จาก genotype 1 มี  $T_m$  47.12°C ส่วน genotype 3 มี  $T_m$  48.59°C ส่วน genotype 2 และ 4 ใช้ detection probe ที่ติดฉลากด้วย LC-Red 705  $T_m$  ที่ได้จาก genotype 2 มี  $T_m$  54.24°C ส่วน genotype 4 มี  $T_m$  54.80°C ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกัน การแยก genotype 2 และ 4 ทำได้ยากในคนไข้บางราย ดังนั้นวิธีการนี้สามารถแยก genotype ของ dengue ได้ นอกจากนี้ได้พัฒนาการเตรียมน้ำยา in-house มาให้กับเครื่อง LightCycler ทำให้ค่าใช้จ่ายลดลง และสามารถตรวจวินิจฉัยแยก genotype ของ dengue virus ภายในเวลาที่เร็วขึ้นได้ และนำไปใช้ในการศึกษาแ่งระดับวิทยา

ศูนย์วิทยุทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์  
ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิสิต.....ฉิสร่า ตีระวัฒนพงษ์.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์.....



##448 90680 20: MAJOR: MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: DENGUE VIRUS/ GENOTYPING/ HYBRIDIZATION PROBE/REALTIME PCR

NISRA TEERAWATANAPONG: DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LABORATORY DIAGNOSIS AND GENOTYPING FOR DENGUE VIRUS BY FLUOROGENIC REVERSE TRANSCRIPTASE PCR (HYBRIDIZATION PROBE).

THESIS ADVISOR: THAWEESAK TIRAWATNAPONG, Ph.D. 73 pp

ISBN 974-17-4890-6

Rapid determination of dengue virus has become increasing important for clinician in order to provide proper care. Therefore, numerous different methods have been developed to enable dengue diagnosis. In this study, the LightCycler instrument combined with fluorescence resonance energy transfer (FRET) hybridization probe was developed and evaluated for rapid dengue diagnosis and genotyping simultaneously. Two colors multiplexing of hybridization probes are designed that recognize adjacent internal sequence within target sequences of dengue virus to identified dengue genotype.

Sera from 100 dengue infected patients were typing with two set of hybridization probes by melting curve analysis. The DEN-1 and DEN-3 were detected by the PDEN2 LC-Red 640 detection probe and identified based on melting temperature. The DEN-1 has a melting temperature about 47.12°C while the DEN-3 has 48.59°C. On the other hand, the DEN-2 and DEN-4 were detected by the PDEN4 LC-Red 705 detection probe. The melting temperature of the DEN-2 appeared to be approximately 54.21°C while the DEN-4 produces 54.80°C. In addition, the development of in-house master mix are used instead the commercial kit, which is decrease cost expenditure. The application of this study is useful in rapid diagnosis and epidemiology of dengue infection.

Inter-Department of Medical Microbiology  
Academic year 2003

Student's signature. Nisra...Teerawatanapong  
Advisor's signature.....Thaweesak Tirawatnpong

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude and deep appreciation to my supervisor, Dr. Thaweesak Tirawatnpong for his guidance, invaluable advice supervision and intelligential motivation throughout my study.

My sincere appreciation is express to Associated Professor Suranan Tirawatnpong at Department of Immunology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness in guidance throughout the laboratory work.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Dr. Sommatat Wongsawang and Associated Professor Dr.Wasan Chantratita, my thesis committee, for their valuable discussion and suggestions.

This study was supported by the Affairs Thesis grants for graduate students in public universities, Graduate school, and Chulalongkorn University.

I am extremely thankful Mr.Chanok Avirutdhakarn and Ms.Amaraporn Cheycharoen for excellent technical assistance about LightCycler instrument.

Special thank are also extended to all members in inter-department of Medical Microbiology, Chulalongkorn University, Biomolecular Laboratory (Thailand), and my friends for their help, kindness, sincerity and friendship.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family for their love, regard and encouragement throughout my study life. They are deserved to be mention as a part of my success.

# CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIVES.....	6
III. LITERATURE REVIEWS.....	7
I. DENGUE VIRUS.....	7
1. DENGUE VIRUS.....	7
2. THE VECTOR.....	8
3. TRANSMISSION OF DENGUE VIRUS.....	10
4. EPIDEMIOLOGY.....	11
5. PATHOGENESIS.....	14
6. CLINICAL MANIFESTATION.....	17
7. LABORATORY DIAGNOSIS.....	19
8. VACCINE DEVELOPMENT.....	25
II. LIGHTCYCLER SYSTEM.....	26
IV. MATERIAL AND METHODS.....	29
1. SUBJECTS, BLOOD SAMPLE, AND PLASMID.....	29
2. VIRAL RNA EXTRACTION.....	29
3. PRIMERS AND PROBES.....	30



## CONTENTS (continued)

	PAGE
4. RT-NESTED PCR OF DENGUE VIRAL RNA.....	33
5. REAL-TIME PCR WITH LIGHTCYCLER-FASTSTART DNA MASTER HYBRIDIZATION PROBE KIT.....	34
6. REAL-TIME PCR WITH IN-HOUSE HYBRIDIZATION PROBES REACTION.....	35
7. SENSITIVITY OF LIGHTCYCLER ASSAY.....	35
8. DETECTION OF PCR PRODUCTS.....	36
9. NUCLEOTIDE SEQUENCING.....	36
V. RESULTS.....	38
1. PRIMERS AND PROBES DESIGN.....	38
2. DETECTION AND TYPING OF DENGUE VIRUS BY MULTIPLEX NESTED RT-PCR.....	39
3. PRIMER DENLC.....	40
4. CATION TITRATION.....	41
5. COMPARATIVE TESTING.....	42
6. MELTING CURVE ANALYSIS FOR GENOTYPING DENGUE VIRUS.....	45
7. REPRODUCIBILITY OF $T_m$ FOR DENGUE VIRUS GENOTYPING....	49
8. THE SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF REAL-TIME PCR.....	50
9. THE SEQUENCING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS.....	53
VI. DISCUSSION.....	54
VII. CONCLUSION.....	59



**CONTENTS (continued)**

	PAGE
REFERENCES.....	60
APPENDICES.....	69
BIOGRAPHY.....	73



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
Table 1	Dengue protein and function.....	9
Table 2	Method for dengue virus isolation.....	22
Table 3	The sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR and Real-time PCR.....	32
Table 4	The melting temperature observed for dengue genotype 1-4.....	46
Table 5	Within- and between-run variation of melting temperature from dengue infected patients of indicated dengue genotypes by melting curve analysis...49	49
Table 6	Comparison of the sensitivity of detection of tenfold dilutions of plasmid pTT47 by conventional thermal cycler assay and LughtCycler system assay .....	51

  
 ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
Figure 1 Dengue virus genome.....	8
Figure 2 The position and sequences of the hybridization probes.....	31
Figure 3 Gel Electrophoresis of Dengue virus genotype 1-4.....	39
Figure 4 Gel Electrophoresis of DEN-1-4 with primer DENG-DENLC.....	40
Figure 5 Mg <sup>2+</sup> titration using recombinant plasmid.....	41
Figure 6(A-B) The melting temperature of dengue genotype 1-4 by using in-house master mix.....	43
Figure 7(A-D) The melting temperature of dengue genotype 1-4 by using LightCycler – FastStart Master DNA Hybridization Probe kit.....	44
Figure 8 The melting temperature of dengue infected patients.....	47
Figure 9(A-B) Sensitivity of real-time PCR and conventional nested PCR.....	52

  
 ศูนย์วิทยทรัพยากร  
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ABBREVIATIONS

DF	=	Dengue fever
DHF	=	Dengue hemorrhagic fever
DSS	=	Dengue shock syndrome
DEN-1	=	Dengue genotype 1
DEN-2	=	Dengue genotype 2
DEN-3	=	Dengue genotype 3
DEN-4	=	Dengue genotype 4
ER	=	endoplasmic reticulum
ADE	=	antibody-dependent enhancement
IgM	=	immunoglobulin M
IgG	=	immunoglobulin G
MAC-ELISA	=	IgM capture enzyme-linked immunosorbant assay
HI	=	Hemagglutination-inhibition test
CF	=	Complement fixation test
NT	=	Neutralization test
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbant assay
DFA	=	direct fluorescence assay
IFA	=	Indirect fluorescence assay
PCR	=	Polymerase chain reaction
RT-PCR	=	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	=	Double stranded DNA
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
MMLV RT	=	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
LED	=	Light emitting diode



**ABBREVIATIONS (continued)**

FRET	=	Fluorescent resonance energy transfer
dNTP	=	Deoxynucleotide triphosphate
Tris	=	Tris-(Hydroxyaminomethyl) aminomethane
kb	=	Kilo base pair
nm	=	Nanometer
°C	=	degree celsius
U	=	Unit
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
ml	=	Milliliter
µM	=	Micromolar
mM	=	Millimolar
pmole	=	Picomole
min	=	Minute
s	=	Second
T <sub>m</sub>	=	Melting temperature
rpm	=	revolution per minute

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย