การตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบซี พร้อมกัน โดยวิธี MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

นางสาวสิณีนาฏ ถนอมชาติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-955-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19CC9C57

SIMULTANEOUS DETECTION OF BOTH HEPATITIS B VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS USING MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE

Miss Sineenart Thanomchat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-955-3

Thesis Title	**SIMULTANEOUS DETECTION OF BOTH HEPATITIS B VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS USING MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE**
By	**Miss Sineenart Thanomchat**
Inter-Department	**Medical Microbiology**
Thesis Advisor	**Dr. Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.**
Co-Advisor	**Dr. Srivilai Tanprasert, M.D.**

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

.....**Dean of Graduate School**

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis committee:

.....**Chairman**

(Assistant Professor Kiat Rukrungtham, M.D.)

.....**Thesis Advisor**

(Dr. Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

.....**Co-Advisor**

(Dr. Srivilai Tanprasert, M.D.)

.....**Member**

(Assistant Professor Pa- thai Yenchitsomanus, Ph.D.)

สิณีนาฏ ถนอมชาติ: การตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบซี พร้อมกันโดยวิธี MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION
อ. ที่ปรึกษา: ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: แพทย์หญิงศรีวิไล ตันประเสริฐ, 78 หน้า. ISBN 974-334-955-3.

การตรวจ HBV DNA PCR ของไวรัสตับอักเสบบี และการตรวจ HCV RNA PCR ของไวรัสตับอักเสบซี โดยทั่วไปใช้เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อและประเมินผลการรักษา ข้อจำกัดในการตรวจ PCR คือ ต้องการผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจ, ใช้เวลานานในการทดสอบ และโอกาสเกิดการปนเปื้อนสูง การศึกษานี้ได้พัฒนาการตรวจหาไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบซีพร้อมกันโดยวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างรวม (pooled specimen) ซึ่ง primers ที่ใช้ในส่วนของ HBV คือ precore และ core gene และส่วนของ HCV คือ 5′ noncoding region เนื่องจากยีโนมของไวรัสตับอักเสบบีเป็น DNA และยีโนมของไวรัสตับอักเสบซีเป็น RNA จึงต้องรวมวิธีการ PCR และ RT-PCR เข้าด้วยกันโดยการสร้าง cDNA ของ HCV ก่อนที่จะใช้ primer ของทั้ง HBV และ HCV ในการขยายเพิ่มจำนวน การทดสอบความไวของ multiplex PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ พบว่าสามารถตรวจวัด HBV DNA ได้ประมาณ 19,629 copies/ml (392 copies/assay) และ HCV RNA ได้ประมาณ 4,506 copies/ml (90 copies/assay) ในการศึกษาได้สร้าง HBV internal control เพื่อตรวจหาผลลบปลอมซึ่งอาจเกิดจากมี inhibitor ใน PCR โดย internal control นี้มีส่วนของ primer recognition sequences ร่วมกับ target template หลังจาก amplification แล้วได้ product 200 bp ในขณะที่ของ target template มีขนาดเท่ากับ 266 bp และปริมาณ internal control ที่เหมาะสมซึ่งใช้ในแต่ละครั้งพบว่า เท่ากับ 25 copies เทคนิค multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR นี้อาจสามารถนำไปใช้เป็นการตรวจกรองหา HBV และ HCV ในธนาคารเลือดทางระบาดวิทยาและช่วยในการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและไวรัสตับอักเสบซีอย่างใดอย่างหนึ่งหรือที่เกิดร่วมกันทั้งนี้ต้องมีการศึกษาทางคลินิคต่อไป

ภาควิชา...สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

3972055030 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: HEPATITIS B VIRUS / HEPATITIS C VIRUS/ MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION.

SINEENART THANOMCHAT: SIMULTANEOUS DETECTION OF BOTH HEPATITIS B VIRUS AND HEPATITIS C VIRUS USING MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE. THESIS ADVISOR: DR. TAWEESAK TERAWATANAPONG, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : DR. SRIVILAI TANPRASERT, M.D. 78 pp. ISBN 974-334-955-3.

The hepatitis B virus (HBV) DNA polymerase chain reaction (PCR) and hepatitis C virus (HCV) RNA PCR is widely used for diagnosis of infection and evaluation of therapy. Application of both PCR techniques is limited by labor-intensity, potential for contamination, and substantial time required for analysis. In this study, a multiplex PCR method was developed to detect HBV DNA and HCV RNA in pooled specimen using primers from the HBV precore and core gene and the HCV 5′ noncoding region. The method was performed for both RT-PCR and PCR in single tube. HCV RNA required prior reverse transcription into cDNA and then amplified with both HBV and HCV primers. From the various known standard dilution analysis of 10 replications of each showed that sensitivity of the multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR for detecting HBV DNA was approximately 19,629 copies/ml (392 copies/assay), while HCV RNA was approximately 4,506 copies/ml (90 copies/assay). In this study, internal control template for nested primer PCR of HBV DNA was constructed and co-amplified with clinical specimen for excluding of false negative result. The internal control construct shares the primer recognition sequences with the target template and yields a 200-bp in length of the fragmented amplified product whereas the product of the target template yields 266-bp. The optimal copy numbers of internal control in PCR run were 25 copies. The potential clinical and epidemological applications of this candidate multiplex HBV DNA/ HCV RNA PCR assay are warranted for further evaluation.

ภาควิชา.....สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.. ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to the followings, who have helped for the completeness of this thesis.

Instructor Dr. Thaweesak Tirawatnapong of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for his excellent advisor guidance and indispensable help throughout the period of this study.

Dr. Srivilai Tanprasert, the director of the National Blood Center, Thai Red Cross Society, my co-advisor, for her kindness, advice and encouragement.

All the staff of the blood collection section and the routine laboratory section at the National Blood Center, Thai Red Cross Society for their kindness in collecting the blood samples.

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and National Blood Center, Thai Red Cross Society, for using the instrument, glassware, chemical reagents and the laboratory rooms through the thesis.

Finally, I am also indebted to my advisory committee for their kindness and helpful suggesting for the completeness of this thesis and to my family for their understanding and support during the period of my study.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv
ENGLISH ABSTRACT..... v
ACKNOWLEDGEMENTS..... vi
CONTENTS..... vii
LIST OF TABLES..... x
LIST OF FIGURES..... xi
ABBREVIATION..... xii
CHAPTER
I. INTRODUCTION..... 1
II. OBJECTIVES..... 3
III. LITERATURE REVEIWS
HEPATITIS B VIRUS..... 4
HISTORY..... 4
BIOLOGY..... 5
REPLICATION OF HBV 9
HBV VARIANTS..... 12
pre-core mutant HBV 12
surface antigen HBV mutants..... 13
HBV polymerase variants..... 13
low-level HBV infection..... 14
PATHOGENESIS OF HEPTITIS B VIRUS..... 14
CLINICAL FEATURES..... 14
Acute infection..... 14
Chronic infection..... 17
Extrahepatic manifestations..... 17
Viral persistence and hepatic carcinogenesis..... 17
HBV WINDOW PERIOD..... 18

LABORATORY DIAGNOSIS.....19

Serology.....19

HBV DNA detection..... 19

Dot or southern blot hybridization techniques.....20

Branched – DNA amplification assay.....20

Polymerase chain reaction.....21

EPIDIMOLOGY OF HBV INFECTION.....22

HEPATITIS C VIRUS.....23

HISTORY..... 23

PROPERTIES OF HEPATITIS C VIRUS.....24

THE GENETIC ORGANIZATION OF HCV.....24

REPLICATION OF HCV..... 26

HCV HETEROGENEITY.....26

CLINICL FEATURES..... 27

CHRONIC HEPATITS C.....28

COURSE OF HCV INFECTION.....29

HCV WINDOW PERIOD.....30

LABORATORY DIAGNOSIS OF HCV INFECTION.....31

SEROLOGICAL DIAGNOSIS.....31

Antibodies to HCV.....31

MOLECULAR DIAGNOSIS.....32

HCV polymerase chain reaction..... 32

EPIDIMOLOGY OF HCV INFECTION..... 35

MULTIPLEX PCR.....39

IV. MATERIALS AND METHODS.....41
PART I. DELVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR DETECTION OF HBV DNA AND HCV RNA 41
1. Chemical reagents and instruments.....41
2. Oligonucleotide primers.....41
3. Pools of blood donation 43
4. Extraction of nucleic acid.....43
5. PCR amplification.....44
6. Detection of amplification product.....45
PART II. THE LIMIT OF DETECTION OF MULTIPLEX HBV/HCV PCR.....45
PART III. CONSTRUCTION OF THE INTERNAL CONTROL TEMPLATE FOR NESTED PRIMER PCR OF HBV DNA.....46
1. Synthesis of the HBV PCR internal control template oligonucleotides...46
2. Amplification of HBV DNA by nested PCR.....48
3. PCR purification.....48
4. Optimal copy number of the internal control for HBV DNA PCR.....49
V. RESULTS.....50
PART I. DELVELOPMENT OF MULTIPLEX PCR DETECTION OF HBV DNA AND HCV RNA.....50
PART II. THE LIMIT OF DETECTION OF MULTIPLEX HBV/HCV PCR.....50
PART III. CONSTRUCTION OF THE INTERNAL CONTROL TEMPLATE FOR NESTED PRIMER PCR OF HBV DNA 57
VI. DISCUSSION.....61
VII.CONCLUSIONS.....64
REFERENCES.....65
APPENDICES I.....72
APPENDICES II.....75
BIOGRAPHY.....78

LIST OF TABLES

TABLE Page

1. Nomenclature for viral hepatitis.....7
2. Comparison of antibody detection and nucleic acid amplification.....33
3. The nucleotide sequence of HBV and HCV primers.....42

LIST OF FIGURES

FIGURE Page

1. Schematic representation of the architecture of the HBV virion.....6
2. HBV genome.....8
3. Replication cycle of hepatitis B virus.....10
4. Sequence of events after acute HBV infection.....16
5. Genetic organization of the HCV genome.....25
6. The natural history of HCV infection.....29
7. HCV markers during early infection.....30
8. Step-by-step protocal for the multiplex PCR.....40
9. Schematic diagrame for the construction of internal control template and oligonucleotides used.....47
10. Agarose-gel electrophoresis showing PCR products of multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR.....52
11. Agarose-gel electrophoresis showing the sensitivity of multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR for HBV DNA detection in various dilution.....53
12. Agarose-gel electrophoresis showing the sensitivity of multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR for HCV RNA detection in various dilution.....54
13. Graph showing the percentage of limit detection of multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR for detection of HBV DNA.....55
14. Graph showing the percentage of limit detection of multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR for detection of HCV RNA.....56
15. Agarose-gel electrophoresis showing PCR product of HBV DNA internal control template oligonucleotides.....58
16. Agarose-gel electrophoresis showing the optimal copy number of internal control for the individual HBV PCR.....59
17. Agarose-gel electrophoresis showing the addition of optimal copy numbers of internal control for detection of both HBV and HCV RNA using multiplex HBV DNA/HCV RNA PCR.....60