การตรวจหาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบซีโดยการหาลำดับการเรียงตัวของเบส ในส่วน 5' Non Coding Region

นางสาวดารารัศมี ภูภักดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4587-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GENOTYPING OF HEPATITIS C VIRUS

BY SEQUENCING OF 5' NON CODING REGION

Miss Dararatsamee Poopukdee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4587-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	GENOTYPING OF HEPATITIS C VIRUS BY SEQUENCING OF 5' NON CODING REGION
By	Miss Dararatsamee Poopukdee
Department	Medical Science
Thesis Advisor	Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Varocha Mahachai, M.D.

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

..... Dean of Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Varocha Mahachai, M.D.)

..... Member

(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph. D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดารารัศมี ภูภักดี: การตรวจหาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบซีโดยการหาลำดับการเรียงตัวของเบสในส่วน 5' Non Coding Region (GENOTYPING OF HEPATITIS C VIRUS BY SEQUENCING OF 5' NON CODING REGION) อ. ที่ปรึกษา: ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. พญ. วโรชา มหาชัย. 73 หน้า. ISBN 974-17-4587-7.

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบซีโดยการหาลำดับการเรียงตัวของเบสในส่วน 5' NCR และนำมาทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Clustal W เพื่อเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของเบสกับลำดับเบสอ้างอิง วิธีการดังกล่าวประยุกต์การตรวจหาจีโนไทป์ของไวรัสตับอักเสบซีโดยวิธี TRUGENE ทำให้มีความสามารถตรวจแยกจีโนไทป์ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ตัวอย่างที่นำมาตรวจแยกจีโนไทป์สามารถแยกจีโนไทป์ได้ทั้งหมด และเมื่อนำมาเปรียบเทียบผลการตรวจแยกจีโนไทป์กับวิธี TRUGENE พบว่าวิธีการนี้ให้ผลที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ อีกทั้งยังสามารถตรวจแยกจีโนไทป์ 1a และ 1b ในรายที่ไม่สามารถแยกได้โดยวิธี TRUGENE ซึ่งมีลำดับการเรียงตัวของเบสที่คล้ายกันได้ จีโนไทป์ 6 ซึ่งพบมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีการนี้ ในขณะที่วิธี TRUGENE ไม่สามารถตรวจแยกได้เนื่องจากมีลำดับเบสอ้างอิงที่ใช้เปรียบเทียบมีข้อมูลไม่เพียงพอ

วิธีการนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความชุกของจีโนไทป์ไวรัสตับอักเสบซีในผู้ป่วยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ พบว่าจีโนไทป์ 3a พบได้มากที่สุด (44%) จีโนไทป์ 1b (21%) และ 1a (16%) พบรองลงมาตามลำดับ จีโนไทป์ 6 พบได้ 7%ในกลุ่มผู้ป่วยที่ทำการศึกษา ผลการตรวจแยกจีโนไทป์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพยากรณ์ความรุนแรงของโรคและการรักษาผู้ป่วยต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต...ดารารัศมี ภูภักดี.....
ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

447 52212 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS: HEPATITIS C VIRUS / GENOTYPING/ 5' NON CODING REGION

DARARATSAMEE POOPUKDEE: GENOTYPING OF HEPATITIS C VIRUS BY SEQUENCING OF 5' NON CODING REGION. THESIS ADVISOR: DR. THAWEESAK TIRAWATNAPONG, CO ADVISOR: ASSOC. PROF. VAROCHA MAHACHAI. 73 pp.
ISBN. 974-17-4587-7.

The reliable method for determining the HCV genotype was developed and evaluated by following the reference standard and most definitive method for HCV genotyping which is sequencing of a specific PCR amplification portion of the HCV genome, followed by phylogenetic analysis.

In this study, in-house 5' NCR amplification product obtained from the HCV RNA positive cases were subjected to direct sequencing and genotyping by phylogenetic analysis of Clustal W program. This reliable genotyping method, compared with commercial kit, is a modification of TRUGENE HCV 5' NC genotyping kit with the improve efficiency for genotyping. All specimens were successfully classified the HCV genotype and subtype. Moreover, the HCV genotype 6 variants, which are common in Southeast Asia, can be classified.

This genotyping method was used to study the prevalence of HCV genotype in the patients from King Chulalongkorn Memorial Hospital. HCV genotype 3a was the most prevalent genotype (44%), followed by genotype 1b (21%) and 1a (16%). HCV genotype 6 variants were identified among 7%. The genotype data will be useful in the clinical management and treatment.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Medical Science
Academic year 2003

Student' s signature Dararatsamee Poopukdee
Advisor' s signature Thaweesak Tirawatnapong
Co-advisor' s signature Varocha Mahachai

ACKNOWLEDGEMENT

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

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

I also would like to express my gratefulness to my co-advisor, Associate Professor Varocha Mahachai for her valuable suggestion and discussion on the clinical management.

My grateful appreciation is extended to Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura and Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, my thesis committees, for their kindness and helpful suggesting for the completeness of this thesis.

I am really thankful to technicians at virology laboratory, Ramathibodi Hospital for their supported specimens and their suggestions on laboratory techniques. I feel profoundly indebted to technicians at Molecular Immunology Unit, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their assistance in collection specimens.

This thesis was partially supported by Ministry of University Affairs Funds.

Finally, to my family for their understanding and support during the period of my study.

TABLE OF CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENT vi

TABLE OF CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xii

ABBREVIATIONS.....xiv

CHAPTER

I. INTRODUCTION

- Background and Rationale.....1
- Research Question.....3
- Limitation of the study.....3
- Objective of this research.....3
- Hypothesis.....4
- Key words.....4
- Conceptual Framework.....4
- Expected Benefits and Application.....5

TABLE OF CONTENTS (Continued)

page

II LITERATURE REVIEW

- Hepatitis C Virus (HCV).....6
- HCV Genotype.....10
- Pathogenesis.....11
- Epidemiology.....13
- Signs and symptoms of Hepatitis C Virus (HCV) infection.....14
- Diagnosis.....16
- Treatment of HCV.....18
- HCV Genotyping assay.....19
- Phylogenetic Systematics.....20

III MATERIALS AND METHODS

1. Materials
   - Population study.....24
   - Specimen collection 24
2. Methods
   - HCV RNA Extraction.....25
   - RT-PCR amplification.....26
   - Agarose gel electrophoresis.....28
   - PCR product purification.....28
   - Sequencing.....28
   - Phylogenetic tree.....30

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS (Continued)

page

- Data calculation.....31
- Alignment of HCV sequence in each genotype.....31

IV RESULTS

- Population study.....32
- RT-PCR amplification 33
- PCR product purification 34
- Sequencing and phylogenetic analysis.....34
- The reliable results of in-house HCV 5' NCR direct sequencing and sequence comparison by phylogenetic construction.....40
- The prevalence of the HCV genotypes in patients from King Chulalongkorn Memorial Hospital.....42
- Increasing the efficiency of genotyping of 5' NCR by sequencing the longer template.....43

V DISCUSSION AND CONCLUSION

- Population study.....51
- RT-PCR amplification.....51
- The reliable results of in-house HCV 5' NCR direct sequencing assay.....52
- The prevalence of the HCV genotypes in patients from King Chulalongkorn Memorial Hospital.....59

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TABLE OF CONTENTS (Continued)

Page

- Increasing the efficiency of genotyping of 5' NCR by sequencing the longer template.....60

REFERENCES 62

APPENDIX 69

BIOGRAPHY.....73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. Terminology commonly used in studies related to HCV genomic heterogeneity.....11
2. Recommendations for testing based on risk for HCV infection.....17
3. The reference sequences of HCV 5' NCR in each genotype.....30
4. The numbers of HCV genotype specimens from Ramathibodi Hospital.....32
5. Comparison of number in each genotype determined by TRUGENE HCV 5' NC Genotyping Kit and in-house 5' NCR direct DNA sequencing assay.....37
6. Comparison of HCV genotyping results obtained by TRUGENE HCV 5' NC Genotyping Kit and in-house 5' NCR direct DNA sequencing assay.....40
7. Comparison of HCV subtyping results obtained by TRUGENE HCV 5' NC Genotyping Kit and in-house 5' NCR direct DNA sequencing assay.....41
8. Prevalence of HCV genotype in patients from King Chulalongkorn Memorial Hospital by in-house 5' NCR direct DNA sequencing assay.....42

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE Page

1. The virion of hepatitis C virus.....6
2. The genetic organization of the HCV genome.....9
3. Global Chronic Hepatitis C Infection.....15
4. The Position of primers performed an in-house 5'NCR PCR.....26
5. The in-house of 5'NCR of HCV generated by RT-PCR.....33
6. Phylogenetic tree deduced from 5' NCR of HCV reference sequence.....35
   Phylogenetic tree deduced from 5' NCR of HCV
   reference sequence (continued).....36
7. Phylogenetic tree of sample with HCV genotype1a determined
   by in-house 5' NCR direct DNA sequencing assays.....37
8. Phylogenetic tree of sample with HCV genotype1b determined
   by in-house 5' NCR direct DNA sequencing assays.....38
9. Phylogenetic tree of sample with HCV genotype 3a determined
   by in-house 5' NCR direct DNA sequencing assays.....38
10. Phylogenetic tree of sample with HCV genotype 3b determined
    by in-house 5' NCR direct DNA sequencing assays.....39
11. Phylogenetic tree of sample with HCV genotype 6 variants determined
    by in-house 5' NCR direct DNA sequencing assays.....39
12. The reference sequence alignment of the HCV 5' NCR
    within the first PCR primer pairs of this study.....44
13. The reference sequence alignment of the HCV 5' NCR
    between genotype 1b, 6 variants and the sample.....53
    The reference sequence alignment of the HCV 5' NCR
    between genotype 1b, 6 variants and the sample(continued).....54

LIST OF FIGURES (continued)

FIGURE Page

14. The sequence alignment of HCV 5' NCR
between genotype 1b and genotype 3a.....55
The sequence alignment of HCV 5' NCR
between genotype 1b and genotype 3a (continued).....56
15. The sequence alignment of HCV 5' NCR
between genotype 1b and genotype 3b.....57
The sequence alignment of HCV 5' NCR
between genotype 1b and genotype 3b (continued).....58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

aa	amino acid
ALT	alanine amino transferase
°C	degree celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DEPC	diethypyrocarbonate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
E	envelope
EDTA	ethylene diaminetetraacetic acid
Et al	et alii
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	hepatitis C Virus
HVR	hypervariable regions
IFN	Interferon
ISDA	Interferon-sensitivity-determining region
LiPA	line probe assay
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute
mM	millimolar
MML-V	Molony Murine Leukemia Virus
NANBH	non-A, non-B hepatitis
NCR	non coding region
NHANES III	the third National Health and Nutrition Examination Survey
NS	non structural
nt	nucleotide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
pmol	picomolar
R	region
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonucleic acid
rpm	round per minute
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
S	second
Taq	Thermus aquaticus
U	unit
ul	microliter
UTR	untranslated regions
UV	ultra violet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย