ความชุกของ HCV RNA โดย Nested-PCR ในเลือดผู้บริจาคโลหิตที่ให้ผลลบและผลบวก โดยการตรวจหาแอนติบอดีและความสัมพันธ์กับระดับ ALT

นางสาวทัศนีย์ อกุฉดำรงค์พานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-069-2

PREVALENCE OF HCV RNA IN SERONEGATIVE AND SEROPOSITIVE BLOOD DONORS BY NESTED-PCR AND CORRELATION TO ALT LEVEL

Miss Tasanee Sakuldamrongpanich

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Medical microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1996

ISBN 974-635-069-2

Thesis Title	Prevalence of HCV RNA in seronegative and seropositive blood donors by Nested-PCR and correlation to ALT level.
BY	Miss Tasanee Sakuldamrongpanich
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	DR. Thaweesak Tirawatnapong
Co-Advisor	DR. Srivilai Tanprasert

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

.....Acting Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis committee:

.....Chairman

(Associate Professor Vanna Punnaragsa, M.D.)

.....Thesis Advisor

(DR. Thaweesak Tirawatnapong, Ph. D.)

.....Co-advisor

(DR. Srivilai Tanprasert, M.D.)

.....Member

(Professor Chaivej Nuchprayoon, M.D.)

.....Member

(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช: ความชุกของ HCV RNA โดย Nested-PCR ในเลือดผู้บริจาคโลหิตที่ให้ผลลบและผลบวกโดยการตรวจหาแอนติบอดีและความสัมพันธ์กับระดับ ALT. อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อาจารย์แพทย์หญิงศรีวิไล ตันประเสริฐ, 72 หน้า. ISBN 974-635-069-2.

ในการศึกษานี้ได้พัฒนาการตรวจหา HCV RNA ในน้ำเหลืองโดยวิธี Nested RT-PCR โดยใช้ primers ในส่วน 5'non-coding region ของยีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี วิธีนี้มีความไวในการตรวจไวรัสตับอักเสบซีได้ถึง 300 HCV RNA ต่อน้ำเหลือง 1 มิลลิลิตร หรือ 15 HCV RNA ต่อการทดสอบ เมื่อนำมาทดสอบหา HCV RNA ในเลือดผู้บริจาคโลหิตพบว่า ผู้บริจาคโลหิตกลุ่มที่ anti-HCV ให้ผลลบ ทั้งที่มีค่า serum alanine aminotransferase (ALT) ปกติหรือสูงกว่าปกติไม่มีการตรวจพบ HCV RNA เลย สำหรับผู้บริจาคกลุ่มที่ anti-HCV ให้ผลบวกมีอัตราการตรวจพบ HCV RNA 62.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าอัตราการตรวจพบ HCV RNA นี้มีความสัมพันธ์กับระดับ serum ALT โดยผู้บริจาคโลหิตที่มีค่า serum ALT สูงกว่าปกติ อัตราการตรวจพบ HCV RNA จะมากกว่าผู้บริจาคโลหิตที่มีค่า serum ALT ปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการตรวจพบ HCV RNA จะสูงในผู้บริจาคโลหิตที่มีค่า ELISA OD สูงมากกว่าผู้บริจาคโลหิตที่มีค่า ELISA OD ต่ำ

เนื่องจากผู้บริจาคโลหิตทุกรายที่ตรวจพบ HCV RNA จะตรวจพบ anti-HCV ให้ผลบวกด้วย สำหรับผู้บริจาคโลหิตที่ anti-HCV ให้ผลลบ จะตรวจไม่พบ HCV RNA เลย ดังนั้นการตรวจกรองเลือดผู้บริจาคโลหิต โดยตรวจหา anti-HCV ด้วย second generation ELISA ของ Abbott น่าจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจากการให้เลือดได้ การตรวจกรองเลือดผู้บริจาคโลหิตโดยตรวจหา serum ALT ร่วมกับการตรวจกรองด้วย anti-HCV พบว่าไม่มีความจำเป็น และเนื่องจากยังไม่มีวิธีการที่จะทดสอบหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสนี้ การตรวจหา HCV RNA โดย Nested RT-PCR จะเป็นประโยชน์ในการช่วยยืนยันภาวะติดเชื้อตับอักเสบซีในเลือดผู้บริจาคโลหิตได้.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต ทัศนีย์ สกุลดำรงค์พานิช

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศรีวิไล ตันประเสริฐ

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C745563 : MAJOR MEDDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: HEPATITIS C VIRUS/ POLYMERASE CHAIN REACTION/ ALANINE AMINO-TRANSFERASE.

TASANEE SAKULDAMRONGPANICH : PREVALENCE OF HCV RNA IN SERONEGATIVE AND SEROPOSITIVE BLOOD DONORS BY NESTED-PCR AND CORRELATION TO ALT LEVEL. THESIS ADVISOR : DR. THAWEESAK TIRAWATNAPONG, Ph.D. , CO-ADVISOR : DR.SRIVILAI TANPRASERT, M.D. 72pp. ISBN 974-635-069-2.

A Nested RT-PCR for detection of HCV RNA, using primers from the 5'non-coding region of the viral genome, was developed and shown to have a limit sensitivity of detecting 300 HCV RNA per ml, or 15 HCV RNA per assay. This sensitive and reliable technique was used to detect the presence of HCV RNA in blood donations with either positive or negative for anti-HCV by ELISA-2 (Abbott).

None of the 314 donations with elevated ALT as well as the 100 donations with normal ALT but negative for anti-HCV had detectable serum HCV RNA. Of the 168 blood donations positive for anti-HCV, 104 (62.5%) had detectable HCV RNA. Among the anti-HCV positive donations, those with elevated ALT had significantly higher probability of detecting HCV RNA than those with normal ALT level. Also, HCV RNA was significantly detected in donations with high ELISA OD value compared to those with low ELISA OD value. Since all HCV RNA positive donations had anti-HCV, anti-HCV screening alone would be sufficient to detect HCV infection, even without ALT screening. The donations with elevated serum ALT but anti-HCV negative, none had detectable HCV RNA. Therefore, the second generation anti-HCV screening by Abbott appeared efficient in preventing transfusion-related HCV transmissions, at least in this study. Routine ALT screening in addition to anti-HCV screening for further prevention of hepatitis C virus infection may be not necessary. In the absence of assays for viral antigens, the direct detection of HCV RNA by PCR could be useful as a confirmatory test to identify infectious carriers in blood donors.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENT

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

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

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

Professor Chaivej Nuchprayoon, the director of the National Blood Center, Thai Red Cross Society for his kindness and encouragement.

All the staffs of the blood collection section and the routine laboratory section at the National Blood Center for their kind help in collecting the blood samples.

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

Page

Page

LIST OF TABLES

TABLE Page

LIST OF FIGURES

FIGURE Page

ABBREVIATIONS

AIH	autoimmune hepatitis
ALT	alanine amino transferase
anti-HBc	anti-hepatitis B core
bp	base pare
^{0}c	degree celsius
C	core
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DEPC	diethylpyrocarbonate
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
E	envelope
EIA	enzyme immuno assay
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al	et alii
xg	gravity (centrifugal force)
geq	genome equivalent
GuSCN	guanidinium isothiocyanate
HAV	hepatitis A virus
HBV	hepatitis B virus
HCV	hepatitis C virus
HCl	hydrochloric acid
IU/ml	international unit per milliliter
KCl	potassium chloride

kD	kilo dalton
M	molar
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute
ml	milliliter
mmol	millimolar
mM	millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mol	molar
NaCl	sodium chloride
NANBH	non-A, non-B hepatitis
NBC	National Blood Center
NCR	non-coding region
NS	non-structural
nt	nucleotide
ORF	open reading frame
pmol	picromolar
PCR	polymerase chain reaction
PTH	posttransfusion hepatitis
RIBA	recombinant immunoblot assay
RNA	ribonucleic acid
RNasin	Ribonuclease inhibitor
rpm	round per minute
RT	reverse transcriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borate-EDTA
TRCS	Thai Red Cross Society
Tris	Tris-(hydroxy methyl)-aminoethane
U/ml	unit per milliliter

ug	microgram
ul	microliter
uM	micromolar
UV	ultra violet
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume