

**ความชุกของ HCV RNA โดย Nested-PCR
ในเลือดผู้ป่วยโรคโลหิตที่ให้ผอบและผอบวก
โดยการตรวจหาแอนติบอดีและความสัมพันธ์กับระดับ ALT**

นางสาวทัศนีย์ ฤกษ์คำรงค์ทานิช



**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539**

ISBN 974-635-069-2

อธิบดีของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**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

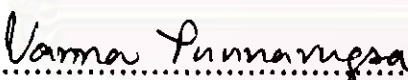
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.



.....Acting Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

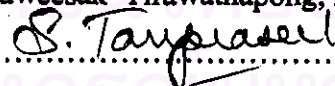
Thesis committee:

.....Chairman

(Associate Professor Vanna Punnaragsa, M.D.)

.....Thesis Advisor

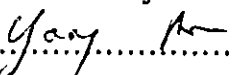
(DR. Thaweesak Tirawatnapong, Ph. D.)

.....Co-advisor

(DR. Srivilai Tanprasert, M.D.)

.....Member

(Professor Chaivej Nuchprayoon, M.D.)

.....Member

(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ทัศนีย์ สกุลดำรงคณาณิช: ความชุกของ HCV RNA โดย Nested-PCR ในเลือดผู้ป่วยจาก
โลหิตที่ให้ผลลบและผลบวกโดยการตรวจหาแอนติบอดีและความสัมพันธ์กับระดับ ALT.
อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ ดร. ทวีศักดิ์ ศิริวัฒนพงษ์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: อาจารย์
แพทย์หญิงศรวิไล ดันประเสริฐ, 72 หน้า, ISBN 974-635-069-2.

ในการศึกษานี้ได้พัฒนาการตรวจหา HCV RNA ในน้ำเหลืองโดยวิธี Nested RT-PCR
โดยใช้ primers ในส่วน 5' non-coding region ของจีโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี วิธีนี้
มีความไวในการตรวจไวรัสตับอักเสบซีได้ถึง 300 HCV RNA ต่อน้ำเหลือง 1 มิลลิลิตร หรือ 15 HCV
RNA ต่อการทดสอบ เมื่อนำมาทดสอบหา HCV RNA ในเลือดผู้ป่วยจากโลหิตพบว่า ผู้บริจาคโลหิตกลุ่มที่
anti-HCV ให้ผลลบ ทั้งที่มีค่า serum alanine aminotransferase (ALT)
ปกติหรือสูงกว่าปกติไม่มีการตรวจพบ HCV RNA เลย สำหรับผู้บริจาคโลหิตที่ anti-HCV ให้ผลบวก
มีอัตราการตรวจพบ HCV RNA 62.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าอัตราการตรวจพบ HCV RNA นี้มีความ
สัมพันธ์กับระดับ 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 ดังนั้นการตรวจกรองเลือด
ผู้บริจาคโลหิต โดยตรวจหา anti-HCV ด้วย second generation ELISA ของ Abbott
น่าจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจากการให้เลือดได้ การตรวจกรองเลือดผู้บริจาค
โลหิตโดยตรวจหา serum ALT ร่วมกับการตรวจกรองด้วย anti-HCV พบว่าไม่มีความจำเป็น และ
เนื่องจากยังไม่มีวิธีการที่จะทดสอบหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสซี การตรวจหา HCV RNA โดย Nested
RT-PCR จะเป็นประโยชน์ในการช่วยยืนยันภาวะติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีในเลือดผู้บริจาคโลหิตได้.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์.....
สาขาวิชา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์.....
ปีการศึกษา 2539.....

ลายมือชื่อนิติกร ทวีศักดิ์ ศิริวัฒนพงษ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ทวีศักดิ์ ศิริวัฒนพงษ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.วิไล ดันประเสริฐ

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C745563 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: HEPATITIS C VIRUS/ POLYMERASE CHAIN REACTION/ ALANINE AMINO-TRANSFERASE.

TASANE E SAKULDAMRONGPANICH : PREVALENCE OF HCV RNA IN SERONEGATIVE AND SEROPOSITIVE BLOOD DONORS BY NESTED-PCR AND CORRELATION TO ALT LEVEL. THESIS ADVISOR : DR. THAWEE SAK 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

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา.....2539

ลายมือชื่อนิสิต.....*พิมพ์- อัญชลี อัญชลี*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*ทศพร อัญชลี*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*ดร.วิภา อัญชลี*



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
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.	3
III. LITERATURE REVIEWS	
HISTOLOGY	4
BIOLOGY	4
GENETIC HETEROGENEITY.....	8
CLINICAL MANIFESTATION.....	9
SEQUENCE OF HCV INFECTION	11
EPIDEMIOLOGY	13
LABORATORY DIAGNOSIS	15
Antibody screening tests	16
Confirmatory tests	17
Anti-HCV IgM assays	19
Detection of viral RNA	19
PREVENTION	21
TREATMENT	21

IV. MATERIALS AND METHODS

PART I. DEVELOPMENT OF NESTED RT-PCR	23
1. Chemical reagents and instruments.....	23
2. Oligonucleotide primers	23
3. Extraction of nucleic acid	
by Proteinase-K/SDS digestion.....	25
by Guanidinium isothiocyanate.....	25
4. Amplification of HCV RNA by Nested PCR	
Reverse transcription step	26
First PCR amplification.....	26
Nested PCR amplification.....	27
5. Detection of amplification products	27
6. Quality control	27
PART II. DETERMINATION OF THE SENSITIVITY OF	
NESTED RT-PCR	28
PART III. DETECTION OF HCV RNA IN BLOOD DONATIONS	
1. Study group	28
2. Specimen collection	29
3. Anti-HCV screening assay	29
4. ALT testing	29
5. Statistical analysis	30
V. RESULTS	
PART I. DEVELOPMENT OF NESTED RT-PCR	33
PART II. DETERMINATION OF SENSITIVITY	34
PART III. DETECTION OF HCV RNA IN BLOOD	
DONATIONS	34
VI. DISCUSSION	
DEVELOPMENT OF NESTED RT-PCR	47

DETECTION OF HCV RNA IN BLOOD DONATIONS	48
VII. CONCLUSIONS	52
REFERENCES.....	53
APPENDIX I	67
APPENDIX II	69
BIOGRAPHY	72



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE		Page
1	HCV RNA detection rate by different PCR methods in the PELICHECK dilution series of the genotype 1	31
2	HCV RNA detection rate by different PCR methods in the PELICHECK dilution series of the genotype 3.....	32
3	Clinical characteristics of blood donors in study group	41
4	Detection rate of HCV RNA in anti-HCV negative blood donations: correlation to ALT level	42
5	Positive rate of HCV RNA in anti-HCV positive blood donations and correlation to ALT level	43
6	Positive rate of HCV RNA in anti-HCV positive blood donations and correlation to ELISA OD value.....	44
7	Positive rate of HCV RNA in anti-HCV positive blood donations: correlation with ELISA OD and sera ALT level.....	45
8	Correlation between the detection rate of HCV RNA by PCR and anti-HCV antibody by ELISA	46

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE		Page
1	The organization of HCV genome and the encoded polyprotein.....	6
2	Sequence of events of HCV infection	12
3	Hepatitis C virus polyprotein: recombinant antigens and immunoassays	18
4	The position of primers for PCR	24
5	Agarose-gel electrophoresis showing comparison of PCR products which were extracted by Protein-K/SDS and GuSCN	37
6	Agarose-gel electrophoresis showing amplification of the PELICHECK genotype 1 plasma standard	38
7	Agarose-gel electrophoresis showing amplification of the PELICHECK genotype 3 plasma standard.....	39
8	Agarose-gel electrophoresis of amplified HCV RNA obtained from anti-HCV seropositive samples	40

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

AIH	autoimmune hepatitis
ALT	alanine amino transferase
anti-HBc	anti-hepatitis B core
bp	base pair
°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



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย