DETECTION AND CHARACTERIZATION OF TT VIRUS (TTV) IN SELECTED GROUPS OF POPULATION IN THAILAND

PIYAPORN RATTANANINSRUANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACLUTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-4938-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจหาและจำแนกไวรัสทีทีจากประชากรกลุ่มต่างๆในประเทศไทย

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF TT VIRUS (TTV) IN SELECTED GROUPS OF POPULATION IN THAILAND

ปิยะภรณ์ รัตนนิลสรวง 4337132 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จันทพงษ์ วะสี, M.D., ยง ภู่วรวรรณ, M.D., สุดา ลุยศิริโรจนกุล, Ph.D., ปาริชาติ เพิ่มพิกุล, M.D., นพดล ศิริธนารัตนกุล, M.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสทีทีถูกค้นพบเมื่อไม่นานมานี้จากการศึกษาในญี่ปุ่นโดยพบเชื้อตัวใหม่นี้ในเลือดผู้ป่วยโรคตับอักเสบหลังการได้รับเลือดชนิดที่ไม่ใช่เอถึงอี เชื้อนี้อาจทำให้เกิดโรคตับอักเสบชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง วัตถุประสงค์ในการศึกษาคือ: 1) ศึกษาอัตราความชุกของการติดเชื้อไวรัสทีทีในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต, กลุ่มหญิงตั้งครรภ์, ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย, และกลุ่มผู้ใช้สารเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น; 2) ตรวจหาสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสทีทีโดยวิธี RFLP และวิธี direct sequencing; 3) เปรียบเทียบผลการตรวจหาสายพันธุ์โดยวิธี RFLP กับวิธี direct sequencing

จำนวนตัวอย่างทดสอบที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 180 ราย ที่ได้จาก กลุ่มผู้บริจาคโลหิต, กลุ่มหญิงตั้งครรภ์,กลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมีย และกลุ่มผู้ใช้สารเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้น ตัวอย่างทั้งหมดนำมาศึกษาโดยการเพิ่มขยายยีนบริเวณ N22 ของส่วน open reading frame 1 โดยวิธี semi-nested polymerase chain reaction ให้ผลผลิตขนาด 286 bp และ 271 bp หลังจากนั้นนำไปทดสอบหายีโนไทป์โดยวิธี restriction fragment length polymorphism ซึ่งใช้เอนไซม์ *Nde*I, *Pst*I, *Nla*III และ *Mse*I ตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ และ วิธี direct sequencing วิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้สายพันธุ์อ้างอิงจาก GenBank จำนวน 19 สายพันธุ์

การตรวจหาความชุกของการติดเชื้อไวรัสทีทีโดยวิธี semi-nested PCR พบผลบวกในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 7), โลหิตบริจาคจากผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบไม่มีอาการจำนวน 4 ราย (ร้อยละ 13), กลุ่มหญิงตั้งครรภ์จำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3), กลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีแบบไม่มีอาการจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 3), กลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่มีประวัติได้รับเลือดจำนวน 2 ราย (ร้อยละ 20), กลุ่มผู้ป่วยธาลัสซีเมียที่ไม่เคยได้รับเลือดจำนวน 1 ราย (ร้อยละ 5), และ กลุ่มผู้ใช้สารเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้นที่มีการติดเชื้อ HIV และไวรัสตับอักเสบซีจำนวน 15 ราย (ร้อยละ 50)

ความชุกของการติดเชื้อไวรัสทีทีพบได้สูงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มผู้ใช้สารเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้นที่มีการติดเชื้อHIVและไวรัสตับอักเสบซี ผลการศึกษาแสดงว่าเชื้อไวรัสทีทีมีการติดต่อโดยทาง parenteral ในประชากรไทย การตรวจยีโนไทป์โดยวิธี direct sequencing พบว่ามีการกระจายตัวของเชื้อไวรัสทีทีจากกลุ่มที่ทำการศึกษาคือ ยีโนไทป์ 1 (2 ราย), ยีโนไทป์ 2 (2 ราย), ยีโนไทป์ 3 (1ราย), และไม่สามารถจำแนกได้ (5 ราย) การตรวจแยกสายพันธุ์โดยวิธี restriction fragment length polymorphism อ่านผลยากและไม่ตรงกับวิธี direct sequencing ตัวอย่างจากผู้ใช้สารเสพติดซึ่งได้จากการศึกษาครั้งก่อนสามารถบอกยีโนไทป์ได้โดยวิธี restriction fragment length polymorphism และ direct sequencing แต่ตัวอย่างตรวจที่เก็บในการศึกษาครั้งนี้บอกยีโนไทป์ได้ยากมาก แสดงถึงการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ทำให้ไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธี restriction fragment length polymorphism

84หน้า ISBN 974-04-4938-7

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF TT VIRUS (TTV) IN SELECTED GROUPS OF POPULATION IN THAILAND

PIYAPORN RATTANANINSRUANG 4337132 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: CHANTAPONG WASI, M.D. YONG POOVORAWAN, M.D. SUDA LOUISIRIROTCHANAKUL, Ph.D., PARICHART PERMPIKUL, M.D., NOPPADOL SIRITANARATKUL, M.D.

ABSTRACT

The TT virus was identified recently in Japanese patients with post-transfusion non-A-E hepatitis and has been implicated as a cause of acute and chronic liver diseases of unknown etiology in some patients. The objectives of this research were: 1) to study the prevalence of TT virus infection among blood donors, pregnant women, thalassemic patients, and intravenous drug users; 2) to determine the virus genotypes by restriction fragment length polymorphism and by direct sequencing; and 3) to compare the TTV genotypes determined by these two methods.

A total of 180 blood samples were obtained from Thai blood donors, pregnant women, thalessemic patients, and intravenous dug users. TT virus DNA was investigated by semi-nested polymerase chain reaction assay for amplification of a 286-base pair and a 271-base pair fragment from the N22 region of the open reading frame 1 gene. The amplified products were further genotyped by two different methods: by restriction fragment length polymorphism using four restriction enzymes (*Nde*I, *Pst*I, *Nla*III and *Mse*I) and by direct sequencing with phylogenetic analysis using 19 TT virus genotypes from the GenBank database as reference strains. In the semi-nested polymerase chain reaction results, two of 30 healthy donors (7%) and four of 30 (13%) hepatitis B positive but asymptomatic donors had the TT virus. There was a 3% prevalence of the virus among both groups of pregnant women – healthy and hepatitis B positive but asymptomatic women. TT virus DNA was found in two of the ten thalassemic patients who had received multiple transfusions, but in only 1 of the 20 who had not received transfusions. Among intravenous drug users infected with HIV and hepatitis C, the prevalence of TT virus DNA was 50% (15 of 30).

Significant higher prevalence of infection was found among HIV and hepatitis C infected intravenous drug users. Our findings give evidence that parenteral transmission of the TT virus has occurred in the Thai population. By direct sequencing, the virus was found to be of genotypes 1 (n=2/10), 2 (n=2/10), and 3 (n=1/10), but half were untypable (n=5/10). By restriction fragment length polymorphism it was difficult to distinguish the genotype and the results did not agree with those of direct sequencing. Using samples collected from intravenous drug users during 1996-2000, the genotypes could be determined by both methods, but this could not be done with currently collected specimens suggested genetic diversity.

KEY WORDS: TTV / PREVALENCE / TRANSMISSION / GENOTYPE

84 pp. ISBN 974-04-4938-7