LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

DETECTION OF HEPATITIS B VIRUS (HBV) BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

THAWATCHAI CHINWISESWONGS

ได้รับทุนการศึกษา
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจไวรัสตับอักเสบชนิดบี โดยวิธีเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์โพลีเมอเรส

ผู้วิจัย ธวัชชัย ชินวิเศษวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ปรีชา ขาวนิล, Ph.D.

เพทาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D.

ไพโรจน์ เหลืองโรจนกุล, M.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 15 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2534

บทคัดย่อ

การตรวจหาดีเอ็นเอ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี อาจใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงภาวะที่มีการเพิ่มจำนวนของไวรัส การตรวจหาดีเอ็นเอสามารถกระทำได้ด้วยวิธีโมเลคคูลาร์ ไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ อย่างไรก็ตามการใช้เทคนิคนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาประยุกต์เพื่อตรวจดีเอ็นเอของไวรัส ในการประเมินสภาวะการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีเนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความยุ่งยากและมีขั้นตอนที่ยืดยาว เทคนิคปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (หรือพีซีอาร์) จึงได้รับการพัฒนาขึ้นในงานศึกษานี้ เพื่อที่จะเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณยีนเอส ของเชื้อไวรัสตับอักเสบ ดีเอ็นเอที่ทำให้มีจำนวนอณูเพิ่มขึ้นนี้ มีความยาวของเบส 579 คู่ ตรวจดูได้โดยง่ายด้วยวิธีอิเล็คโตรฟอรีซีส บนวุ้น และย้อมสีเอ็ทธิเดียมโบรไมด์ ความไวของวิธีตรวจด้วยเทคนิคนี้มีมากกว่าวิธีไฮบริไดเซชันโดยการหยดดีเอ็นเอลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสประมาณ 2×10^3 เท่า

นอกจากนี้วิธีเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี จากซีรั่มซึ่งตามปรกติมีเชื้อจำนวนน้อยเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนอณูด้วยเทคนิคพีซีอาร์ก็ได้รับการพัฒนาขึ้นด้วย การเตรียมดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ใช้วิธีสกัดซีรั่มด้วยฟีนอลและคลอโรฟอร์มโดยปราศจากการย่อยโปรตีนในซีรั่มก่อนด้วยเอ็นไซม์ เพื่อที่จะใช้โปรตีนที่เหลืออยู่ภายหลังการสกัดเป็นตัวช่วยทำให้ดีเอ็นเอตกตะกอนในขั้นตอนของการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยอัลกอฮอล์

Copyright by Mahidol University

วิธีพีซีอาร์ร่วมกับวิธีอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นถูกนำมาใช้สำหรับตรวจดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบี ในตัวอย่างซีรั่มจำนวนทั้งหมด 220 ตัวอย่างซึ่งเก็บรวบรวมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ในกลุ่มซึ่งมีผลการตรวจทางน้ำเหลืองและมีอาการทางคลินิคแบบต่างๆ รวมทั้งตัวอย่างซีรั่มของกลุ่มเปรียบเทียบ ผลการตรวจตัวอย่างซีรั่มจำนวน 36 ตัวอย่างในกลุ่มซึ่งให้ผลการตรวจทางน้ำเหลือง HBsAg + และ HBeAg + ปรากฏว่าตัวอย่างซีรั่มทั้งหมด (คิดเป็นร้อยละ 100) มีดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีซึ่งตรวจพบได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น ในขณะที่มีจำนวนเพียง 23 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 63) เท่านั้นที่ตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบหยด ส่วนในกลุ่มซึ่งให้ผลการตรวจทางน้ำเหลือง HBsAg+ และ HBeAg- มีตัวอย่างซีรั่มจำนวน 21 ใน 47 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 45) ที่ให้ผลบวกสำหรับดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น ในขณะที่มีเพียง 3 ใน 47 ตัวอย่าง (คิดเป็นร้อยละ 6) เท่านั้นที่ให้ผลบวกสำหรับดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบหยด ผลที่ได้นี้แสดงว่าการตรวจ HBsAg ซึ่งเป็นโปรตีนของไวรัสสำหรับบ่งชี้ถึงการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีนั้น มีความไวมากกว่า แต่การตรวจ HBeAg ซึ่งเป็นโปรตีนของไวรัสสำหรับบ่งชี้ถึงการเพิ่มจำนวนของไวรัสนั้น กลับมีความไวน้อยกว่าการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์ รวมกับอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น ซีรั่มในกลุ่มที่มี HBsAg- รวมกับ Anti-HBc+ หรือ Anti-HBc- จำนวนทั้งสิ้น 79 ตัวอย่าง เกือบทุกตัวอย่างให้ผลลบต่อการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสทั้งสองวิธี ยกเว้นซีรั่ม 1 ตัวอย่างที่ให้บวกซ้ำหลายครั้งต่อการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับอีเล็คโตรโฟรีซีส แต่ให้ผลลบต่อการตรวจด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบหยด ซีรั่มนี้ได้มาจากสตรีซึ่งเชื่อว่ามีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีที่ต่างจากเชื้อทั่วไป หรือ HBV2

การวิเคราะห์ผลการตรวจในกลุ่มคนไข้ที่มีอาการทางคลินิคแบบต่าง ๆ ปรากฏว่ากลุ่มผู้ป่วยมีตับอักเสบเรื้อรัง มีตัวอย่างซีรั่มที่ให้ผลบวกต่อการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น 29 ใน 38 ตัวอย่าง (ประมาณร้อยละ 76) ส่วนกลุ่มผู้ที่เป็นพาหะเรื้อรังของไวรัสให้ผลบวกต่อการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีเดียวกัน 25 ใน 43 ตัวอย่าง (ประมาณร้อยละ 58) ตัวอย่างซีรั่มที่เหลือซึ่งให้ผลลบต่อการตรวจในคนไข้ทั้งสองกลุ่มอาจจะเนื่องมาจากการที่มีไวรัสอยู่จำนวนน้อยหรือไม่มีไวรัสอยู่ในตัวอย่างซีรั่มเหล่านี้เลย ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอักเสบแบบเฉียบพลัน มีเพียง 1 ใน 6 ตัวอย่าง (หรือประมาณ

Copyright by Mahidol University

ร้อยละ 17) เท่านั้นที่ให้ผลบวกต่อการตรวจดีเอ็นเอของไวรัสด้วยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น คนไข้ในกลุ่มนี้มีการขจัดไวรัสไปจากกระแสโลหิตค่อนข้างรวดเร็วซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้การตรวจดีเอ็นเอของไวรัสในตัวอย่างซีรั่มพบได้ในสัดส่วนจำนวนน้อย นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ป่วยโรคตับแข็งมีตัวอย่างซีรั่ม 2 ใน 3 ตัวอย่างซึ่งให้ผลบวกต่อการตรวจดีเอ็นเอของไวรัส ผลที่ตรงกันข้ามกับที่แสดงมาคือตัวอย่างซีรั่มจากคนไข้ในกลุ่มที่เป็นโรคตับอักเสบซึ่งเกิดจากไวรัสที่ไม่ใช่ชนิดเอและบี จำนวน 18 ตัวอย่างและจากกลุ่มเปรียบเทียบจำนวน 57 ตัวอย่างให้ผลลบต่อการตรวจดีเอ็นเอทั้งหมด

การตรวจดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบชนิดบี โดยวิธีพีซีอาร์ร่วมกับอิเล็คโตรฟอรีซีสบนวุ้น มีข้อดีเหนือวิธีโมเลคคูลาร์ไฮบริไดเซชั่นในด้านความง่าย ความรวดเร็ว และความไวของวิธี ในด้านความไวของวิธีนั้นสามารถจะทำให้เพิ่มขึ้นได้อีกถ้าหากใช้วิธีพีซีอาร์ร่วมกับการแยกไวรัสจากซีรั่มก่อนโดยใช้แอนติบอดี้ซึ่งจับอยู่กับสิ่งซึ่งมีสภาพเป็นของแข็ง หรือร่วมกับการตรวจต่อมาด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบเซาเทอร์น หรือร่วมกับการทำพีซีอาร์เป็นครั้งที่สองแล้วตรวจโดยตรงด้วยวิธีอิเล็คโตรฟอรีซีส การศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบชนิดบีในระยะต่าง ๆ ด้วยวิธีที่มีความไวของวิธีสูงเหล่านี้จะช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดและอาการทางคลินิคของโรคแบบต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อไวรัสนี้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Detection of hepatitis B virus (HBV) by using polymerase chain reaction (PCR)
Name	Thawatchai Chinwiseswongs
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	Preecha Kownin, Ph.D. Pa-thai Yenchitsomanus, Ph.D. Pairoj Luengrojanakul, M.D.
Date of Graduation	15 February B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

The presence of HBV DNA has been used as a direct marker for active viral replication and the detection of HBV-DNA in clinical samples from patients is made possible through the molecular hybridization technigue using HBV-DNA probe. This technique is, however, not suitable for detection of HBV-DNA in the general application for evaluation of the infection status because it is tco complicated and requires the long-processing steps. The polymerase chain reaction (PCR) technique was developed in the present study to amplify the S-gene region of HBV-DNA. The amplified DNA product with 579 bp in length was able to simply be detected by agarose-gel electrophoresis (AGE) and ethidium bromide staining. The detection of HBV DNA by this newly developed method was found to have about 2×10^3 folds greater sensitivity than the dct-blot hybridization technique.

Copyright by Mahidol University

The method for preparation of HBV DNA, which is normally present in very little quantities in serum samples, appropriate for the amplification by the PCR technique was also developed. This preparation method was based on the extractions of the serum sample with phenol and chloroform without the initial proteinase K digestion and the serum proteins were reserved as carrier molecules in the step of ethanol precipitation.

The PCR-AGE developed method was then used for detection of HBV DNA in a total of 220 serum samples collected from different serological and clinical groups of patients who were infected by HBV and the control group. Of 36 serum samples from the group with HBsAg+ and HBeAg+, HBV DNA was detected in all 36 samples (100%) by the PCR-AGE methcd but in only 23 samples (about 63%) detected by the dot-blot hybridization. Twenty-one out of 47 serum samples (45%) from the group with HBsAg+ and HBeAg- were positive for HBV DNA by the PCR-AGE method but only 3 out of these 47 samples (6%) was positive for HBV DNA by the dot-blot hybridization. These findings indicated that the assay of HBsAg, the viral protein marker for HBV infection, is more sensitive but the assay of HBeAg, the viral protein marker for active viral replication, is less sensitive than the detection of HBV DNA by the PCR-AGE method. Of 79 serum samples from the groups with HBsAg- and either anti-HBc+ or anti-HBc-, almost all were negative for HBV DNA by the PCR-AGE and the dot-blot hybridization methods, except for one serum sample that was repeatedly positive for HBV DNA by the PCR-AGE method but negative by the dot-blot hybridization. This particular serum sample was obtained from a woman who was believed to be infected by HBV2.

Copyright by Mahidol University

Analysis of the results in various clinical groups showed that 29 out of 38 (about 76%) of serum samples collected from the group of patients with chronic hepatitis and 25 out of 43 (about 58%) of those collected from the group of chronic carriers were positive for HBV DNA by the PCR-AGE method. The remaining samples which were negative for HBV DNA in these two groups might be due to the presence in extremely low numbers or the absence of HBV in these samples. Only 1 in 6 (17%) of serum samples collected from the group of patients with acute hepatitis was positive for HBV DNA by the PCR-AGE method. The rapid clearance of HBV in this group of patients might contribute to the low frequency of positive HBV-DNA. Additionally, 2 in 3 serum samples collected from patients with cirrhosis had had the positivity for HBV DNA. In contrast, 18 serum samples collected from the patients with non-A, non-B hepatitis and 57 serum samples in the normal control group were all negative for HBV DNA.

The detection of HBV DNA by the PCR-AGE method had the advantages over the molecular hybridization method in terms of its simplicity, rapidity, and sensitivity. The sensitivity of detection can further be increased if the PCR technique was carried out in combination with the preliminary virus capturing with antibodies bound to a solid phase, or with the subsequent detection by Southern-blot hybridization, or with the use of nested PCR and direct detection on gel electrophoresis. Studies on the courses of HBV infection by these sensitive combined-techniques would provide a better understanding about the pathogenesis and variable clinical manifestations occurred from the infection by this virus.

Copyright by Mahidol University