



**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A DIAGNOSTIC KIT
FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO
HEPATITIS C VIRUS (HCV) BASED ON RECOMBINANT
ANTIGENS OF THAI STRAINS OF HCV**

PRAPAN KANPAI

อธิปัทมาจารย์
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (TRANSFUSION SCIENCE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001**

ISBN 974-04-0681-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
P899de
2001.
e.g

3936531 SITS/M : MAJOR : TRANSFUSION SCIENCE ; M.Sc.
(TRANSFUSION SCIENCE)

KEY WORDS : HCV/ ELISA/ THAI STRAINS

PRAPAN KANPAI : DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A
DIAGNOSTIC KIT FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS
(HCV) BASED ON RECOMBINANT ANTIGENS OF THAI STRAINS OF HCV
THESIS ADVISORS: SIRIRURG SONGSIVILAI, M.D., Ph.D., SASITORN
BEJRACHANDRA, M.D., TARARAJ DHARAKUL, M.D., Ph.D., PARICHART
PERMPIKUL, M.D. 72 p. ISBN 974-04-0681-5

Hepatitis C virus (HCV) is the major cause of posttransfusion hepatitis. The virus is transmitted by transfusion of blood and blood products. Chronic hepatitis, cirrhosis and liver cancer are serious sequel of HCV infection. The screening of HCV infection in blood donors is necessary to eliminate the viral transmission. The commercially available assays for antibodies to HCV using enzyme immunoassay (EIA) are imported for foreign countries.

In previous studies, analysis of nucleotide sequences of the Thai HCV isolates showed that genotype 3a, 1a, 1b and 6 group variants were found in Thailand. Genotype 3a was the dominant virus (41%), followed by genotypes 1b (21%) and 6 group variants (17%). Other genotypes were uncommon and some isolates were unclassified. The high prevalence of genotype 3a and the presence of genotype 6 group variants were unique characteristics of Thai HCV as this pattern was not found in other regions of the world.

In this study, a preliminary study was performed to evaluate some of the antigens obtain from Thai strain of HCV. Nucleocapsid (core) protein and the non-structural NS5 proteins cloned from the hepatitis C virus genome from chronic hepatitis C patients in Thailand were coated onto microtiter plate and tested using enzyme immunoassay with serum of 2,989 blood donors.

The results were compared with the commercial assay at the Infectious Serology Unit, Department of Transfusion Medicine, Siriraj Hospital, 99.43% of the sample gave the same results. Twenty-five cases have positive results with the commercial kit (18 cases were confirmed as positive with the PCR). As for the tested antigens, 25 cases have positive results when the cut off value equal to mean +2SD (14 cases positive with the confirmed test), and 19 cases have positive results when the cut off value equal to mean +3SD (13 cases positive with confirmed test; PCR).

This preliminary result shared the applicability of using the recombinant antigens from the Thai stains of HCV and further optimizations should be carried out to modify the present test format.

3936531 SITS/M : สาขาวิชา : วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต; วท.ม. (วิทยาศาสตร์การบริการโลหิต)

ประพันธ์ กันภัย : การพัฒนาและทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ ไวรัสตับอักเสบนชนิดซีที่ใช้แอนติเจนของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไทยที่ผลิตโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม(DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A DIAGNOSTIC KIT FOR DETECTION OF ANTIBODIES TO HEPATITIS C VIRUS (HCV) BASED ON RECOMBINANT ANTIGENS OF THAI STRAINS OF HCV). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สิริฤกษ์ ทรงศิวิไล พ.บ.,Ph.D., ศศิธร เพชรจันทร์ M.D., ธารวัชต์ ธราภูล พ.บ., Ph.D., ปารีชาติ เพิ่มพิบูล พ.บ. 72 หน้า ISBN 974-04-0681-5

เชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีเป็นสาเหตุของโรคตับอักเสบนที่เพิ่มขึ้นภายหลังการรับเลือดและส่วนประกอบของเลือด ซึ่งทำให้เกิดโรคตับอักเสบนเรื้อรัง ตับแข็ง และมะเร็งตับตามมาได้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการคัดกรองผู้บริจาคเลือดที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ เพื่อลดอุบัติการณ์ของโรคลง ในปัจจุบันการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ด้วยวิธี Enzyme Immunoassay สามารถกระทำได้โดยชุดน้ำยาดตรวจจากบริษัทต่างๆที่ผลิตจากต่างประเทศ

จากการศึกษาหาพันธุกรรม ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีที่แยกได้ในประเทศไทย พบเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ 3a, 1a, 1b และ 6 ในการนี้พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ 3a มีอยู่มากที่สุด (41%) รองลงมาได้แก่กลุ่ม 1b (21%) และกลุ่ม 6 (17%) ส่วนกลุ่มอื่นๆพบได้น้อย โดยพบสัดส่วนของเชื้อแต่ละกลุ่มคล้ายคลึงกันในแต่ละภูมิภาคของประเทศ การพบเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีกลุ่ม 3a, 1b และ 6 นี้เป็นลักษณะที่พบเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งแตกต่างจากภูมิภาคอื่นในโลก

ในการศึกษาครั้งนี้เบื้องต้นได้นำเอาแอนติเจนในส่วนของ core กับส่วน NS5 ของเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีสายพันธุ์ไทย ที่ได้มาจากการเพาะเชื้อจากคนไข้โรคตับอักเสบนเรื้อรังชนิดซี มา coat ลงบน microtiter plate แล้วนำมาทดสอบกับ serum ของผู้บริจาคเลือดจำนวน 2,989 ราย

ผลที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับผลการตรวจของห้องปฏิบัติการ Infectious Serology ของภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ซึ่งพบว่า 99.43% ของตัวอย่างที่นำมาตรวจให้ผลตรงกัน มี 25 รายให้ผลบวกกับชุดน้ำยาที่ใช้ตรวจของภาควิชาฯ (ยืนยันผลการตรวจด้วยวิธี PCR แล้วให้ผลบวก 18 ราย) ส่วนชุดน้ำยาดตรวจที่ทำการพัฒนาขึ้นหากใช้ค่า cut off เท่ากับ mean+2SD จะได้ผลบวก 25 ราย (ยืนยันผลการตรวจด้วยวิธี PCR แล้วให้ผลบวก 14 ราย) และถ้าใช้ค่า cut off เท่ากับ mean+3SD จะได้ผลบวก 19 ราย (ยืนยันผลการตรวจด้วยวิธี PCR แล้วให้ผลบวก 13 ราย)

จากผลการศึกษาในเบื้องต้นนี้ได้มีการประยุกต์นำเอาแอนติเจนตับอักเสบนชนิดซีสายพันธุ์ไทย มาใช้ร่วมในชุดน้ำยาดตรวจคัดกรองหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบนชนิดซี และควรมีการปรับปรุงชุดน้ำยานี้ในมีความเหมาะสมต่อไป