การศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์และจีโนไทป์ ในองค์ประกอบต่างๆ ของเลือดและสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเฉียบพลันในแต่ละราย

นางสาวสุนิสา กระจิว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A PREVALENCE STUDY OF INFECTIONS BY DIFFERENT SEROTYPES AND GENOTYPES OF DENGUE VIRUS IN DIFFERENT BLOOD AND BODY FLUID COMPARTMENTS OF ACUTELY-INFECTED INDIVIDUAL PATIENT

Miss Sunisa Krajiw

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

501921

Thesis Title	A PREVALENCE STUDY OF INFECTIONS BY DIFFERENT SEROTYPES AND GENOTYPES OF DENGUE VIRUS IN DIFFERENT BLOOD AND BODY FLUID COMPARTMENTS OF ACUTELY-INFECTED INDIVIDUAL PATIENTS
By	Miss Sunisa Krajiw
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Wanla Kulwichit , M.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Medicine

(Associate Professor Adisorn Patradul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Apiwat Mutirangura, M.D, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Wanla Kulwichit, M.D.)

..... Member

(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Anucha Apisarnthanarak, M.D)

สุนิสา กระจิว: การศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์และจีโนไทป์ในองค์ประกอบต่างๆของเลือดและสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเฉียบพลันในแต่ละราย. (A PREVALENCE STUDY OF INFECTIONS BY DIFFERENT SEROTYPES AND GENOTYPES OF DENGUE VIRUS IN DIFFERENT BLOOD AND BODY FLUID COMPARTMENTS OF ACUTELY-INFECTED INDIVIDUAL PATIENTS) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. นพ. วันล่า กุลวิชิต, 75 หน้า.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรไทป์และจีโนไทป์ในองค์ประกอบต่างๆ ของเลือดและสารคัดหลั่งจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อเฉียบพลันในแต่ละราย โดยใช้วิธี Nested-Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Nested RT-PCR) และ Sequencing ซึ่งจากการตรวจหาผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธี Nested RT-PCR และ Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) จำนวน 95 ราย จากนั้นนำตัวอย่างจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีมาตรวจหาซีโรไทป์โดยวิธี Multiplex RT-PCR พบว่าสามารถตรวจพบซีโรไทป์ของเชื้อไวรัสเดงกีได้ 85 ราย จาก 95 ราย โดยใน 85 รายนั้น 65 รายตรวจพบซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี 1 ชนิด (single infection) ซึ่งพบไวรัสเดงกี ซีโรไทป์ 1 จำนวน 16 ราย (24.61%) ซีโรไทป์ 2 จำนวน 6 ราย (9.23%) ซีโรไทป์ 3 จำนวน 11 ราย (16.92%) และ ซีโรไทป์ 4 จำนวน 32 ราย (49.23%) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบซีโรไทป์ของไวรัสเดงกีมากกว่า 2 ชนิด (multi-serotypes) จำนวน 20 ราย เมื่อคิดเป็นร้อยละจะได้ค่าเท่ากับ 23.53 ซึ่งมีค่ามากกว่างานวิจัยที่มีรายงานไว้ ซึ่งไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 1 และซีโรไทป์ 4 และ ซีโรไทป์ 2 และ ซีโรไทป์ 4 พบมากที่สุด จำนวน 5 ราย (25%) ซีโรไทป์ 1 และ ซีโรไทป์ 2 พบจำนวน 2 ราย (10%) ซีโรไทป์ 2 และซีโรทป์ 3 พบ 3 ราย (15%) ส่วน ซีโรไทป์ 1 และ ซีโรไทป์ 3 พบจำนวน 2 ราย (15%) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบซีโรไทป์ของไวรัสเดงกี 3 ชนิด (multiple infections) ซึ่งพบซีโรไทป์1 ซีโรไทป์ 2และซีโรไทป์ 4 จำนวน 2 ราย (10%) ส่วน ซีโรไทป์ 1ซีโรไทป์ 3 และซีโรไทป์ 4 พบจำนวน 1 ราย(5%) จากนั้นนำตัวอย่างที่รู้ซีโรไทป์มาทำการตรวจหาลำดับเบสโดยการทำ Sequencing เพื่อศึกษาจีโนไทป์ของไวรัสเดงกี พบว่าไวรัสที่ได้จากผู้ป่วยบางรายที่เป็นซีโรไทป์เดียวกันนั้นเป็นจีโนไทป์เดียวกันด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาการติดเชื้อไวรัสเดงกีมากกว่า 2 ชนิดจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อดูความเกี่ยวข้องต่อความรุนแรงของโรค

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

##4874807230 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: DENGUE / SEROTYPING / GENOTYPING.

SUNISA KRAJIW: A PREVALENCE STUDY OF INFECTIONS BY DIFFERENT SEROTYPES AND GENOTYPES OF DENGUE VIRUS IN DIFFERENT BLOOD AND BODY FLUID COMPARTMENTS OF ACUTELY-INFECTED INDIVIDUAL PATIENTS.

THESIS ADVISOR: ASST.PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., 75 pp.

In this present research, we performed a prevalence study of infections by different serotypes and genotypes of dengue virus (DENV) in different blood and body fluid compartments of acutely-individual patients by using nested reverse transcription-polymerase chain reaction (nested RT-PCR) and sequencing. 95 dengue patients were enrolled and confirmed by standard criteria of enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and nested RT-PCR. All specimens from all dengue patients were serotype by using multiplex RT-PCR. We detected serotypes of dengue virus from 85 of 95 patients. We found both single and multiple infections. We found dengue serotype 1 (DEN-1) at 24.61% (16 of 85), serotypes 2 (DEN-2) at 9.23% (6 of 85), serotypes 3 (DEN-3) at 16.93% (11 of 85), and serotype 4 (DEN-4) at 49.23% (32 of 85). Moreover, 23.53% or 20 of 85 patients were multiple infections, a proportion that is more than previously reported. We found the rate of double infections with DEN-1 and DEN-4 at 25% (5 of 20), which was the same as those of DEN-2 and DEN-4. DEN-1 with DEN-2 was 10% (2 of 20), DEN-2 with DEN-3 15% (2 of 20), and DEN-1 with DEN-3 8.7% (2 of 23). In addition, we also detected multiple infections with 3 serotypes of dengue virus. We found that triple infections with DEN-1, DEN-2, and DEN-4 were 10% (2 of 23), and also one patient with DEN-1, DEN-3, and DEN-4. Next, all specimens were genotyped by DNA sequencing. We found that single-serotype dengue isolates from several compartments of an acutely-infected individual patient on the same day are of a single genotype and strain. Isolates from the following days, however, demonstrated selected mutations. A correlation between single or multi-serotype infections and clinical severity cannot be demonstrated from the present study.

Field of Study:Medical Science.....Student's Signature :Sunisa Krajiw

Academic Year:2007.....Advisor's Signature :.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express her deepest gratitude to her advisor, Assistant Professor Wanla Kulwichit, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kind and excellent supervision and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and guidance throughout the period of the study. His expertise has improved my research skills and prepared me for future challenges.

I would like to thank the committee of Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis in the first instance, to do the necessary research work.

A special thank to Dr. Butsaya Thaisomboonsuk, Department of Virology, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) for valuable advice and support. Moreover, I would like to thank members of the Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, for their kindness and courtesy for laboratory facilities. Without them, this work would not be accomplished.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents, my brother, and my friends for their love, support, understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

ABSTRACT(THAI).....iv

ABSTRACT(ENGLISH).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....ix

LIST OF ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

Background and Rational.....1

Research Questions.....3

Objective.....3

Hypothesis.....3

II LITERATURE REVIEW

Dengue structural and non structural.....4

Dengue replication.....5

Dengue epidemiology.....7

The definition and severity classification of disease.....8

Pathology and pathogenesis of dengue hemorrhagic fever and Dengue shock syndrome.....11

Dengue disease pathogenesis.....11

Diagnosis.....13

Prevention and treatment.....16

Virulent strain of dengue.....18

Dengue serotypes and co-circulation.....19

Dengue genotypes.....19

Page

Dengue evolution.....20

III MATERIALS AND METHODS

Patients.....22

Sample size calculation.....22

Definitions.....23

Viral strains.....23

Blood and body fluid collection.....25

Viral RNA extraction.....25

Measurement Viral RNA Concentration.....26

Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

(Nested RT-PCR).....26

Serological methods and antigens.....27

Serotyping study.....29

Genotyping study.....30

Interpretation of Restriction Site-Specific (RSS)-PCR.....32

PCR products purification.....32

Sequencing of the 3' UTR and/or capsid/ prM.....32

IV RESULTS

Sample Characteristics.....33

Detection of dengue infected by Nested RT-PCR 33

Serologic study by IgM and IgG 35

Detection of dengue serotypes by multiplex RT-PCR.....35

Detection of dengue genotypes by RSS-PCR.....41

Sequencing of the 3' UTR and/or capsid/prM.....43

V DISCUSSION and CONCLUSION.....48

REFERENCES.....52

APPENDICES.....62

APPENDIX A.....63

APPENDIX B.....74

BIOGRAPH.....75

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Time course of clinical signs and symptoms	10
2.	13strains of dengue virus as positive control	24
3.	The sequences of primers used to amplify dengue-1 to dengue- 4 by Nested RT-PCR	27
4.	The sequences of primers used to amplify serotypes of dengue-1 to dengue- 4 by semi-nested RT-PCR	30
5.	The sequences of primers used to amplify genotypes of dengue-1 to dengue- 4 by restriction site-specific – polymerase chain reaction (RSS-PCR)	31
6.	The result of ELISA and nested RT-PCR for screening dengue infection	35
7.	Serotypes of dengue patient determined by Multiplex RT-PCR Were detected with single infection and multiple infection	40
8.	Distribution of multi-infection with 2 or more dengue serotypes Within the same compartment	41
9.	Blast result of various specimen compartments from individual patient	44

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Structure of the dengue virus genome.....5
2. Intracellular life cycle of dengue virus 6
3. Countries/areas reporting dengue cases to the World Health Organization in 2001.....8
4. WHO classification of symptomatic dengue infection.....8
5. Classification of symptomatic dengue virus infection 10
6. Antibody (Ab)-dependent enhancement of viral replication.....13
7. Course of dengue infection and timing of diagnosis.....16
8. Agarose gel analysis of the product from blood and body fluid compartments by nested RT-PCR.....34
9. Agarose gel analysis of the product from clinical specimens by Multiplex RT-PCR. 37
10. Agarose gel analysis of the product from clinical specimens by Multiplex RT-PCR for detecting dengue serotype.....38
11. RSS-PCR patterns of DEN-2 strain of blood and body fluid compartments compare with known DEN-2 (16881) strai.....42
12. Chromatogram nucleotide sequencing of capsid gene using TS2 type Specific primer for dengue-2 from PBMC sample.....43
13 Chromatogram nucleotide sequencing from A-2 Plasma 1st sample collection and 2nd sample collection.....46

ABBREVIATIONS

Ab	Antibody
bp	base pair
^{o}C	degree Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
et al	and others
IgG	immunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M
vRNA	viral RNA
UTR	untranslated region
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
N/A	not applicable
OD	optical density
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RSS-PCR	restriction site-specific polymerase chain reaction

RT-PCR	reverse transcription PCR
WHO	The World Health Organization
µl	microliter
µg	microgram
INF	interferon