

การติดตามและลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อไวรัสแดงกึ่งในเลือดและสิ่งส่งตรวจที่
ไม่ใช่เลือดในผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน

นายเมธี ศรีประพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MONITORING AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
DENGUE VIRUS IN BLOOD AND NON-BLOOD SPECIMENS
IN ADULTS WITH ACUTE INFECTION

Mr. Methee Sriprapun

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedical Sciences

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title MONITORING AND MOLECULAR
 CHARACTERIZATION OF DENGUE VIRUS IN
 BLOOD AND NON-BLOOD SPECIMENS
 IN ADULTS WITH ACUTE INFECTION

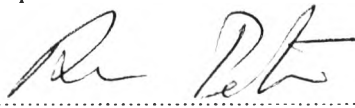
By Mr. Methee Sriprapun

Field of Study Biomedical Sciences


Thesis Advisor Associate Professor Wanla Kulwichit, M.D.


Thesis Co-advisor Associate Professor Padet Siriyasatien, M.D., Ph.D.

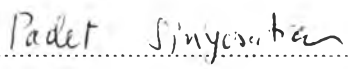
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

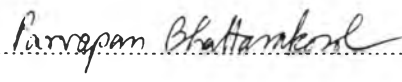
 Dean of the Graduate School
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

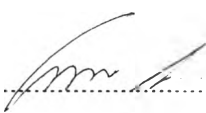
THESIS COMMITTEE

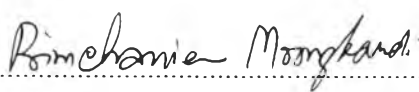
 Chairman
(Associate Professor Kanisak Oraveerakul, D.V.M., Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Associate Professor Wanla Kulwichit, M.D.)

 Thesis Co-advisor
(Associate Professor Padet Siriyasatien, M.D., Ph.D.)

 Examiner
(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

 Examiner
(Assistant Professor Tewin Tencomnao, Ph.D.)

 External Examiner
(Associate Professor Primchanien Moongkarndi, Ph.D.)

เมธี ศรีประพันธ์ : การติดตามและลักษณะทางอนุชีววิทยาของเชื้อไวรัสเดงกีในเลือดและสิ่งส่งตรวจที่ไม่ใช่เลือดในผู้ใหญ่ที่ติดเชื้อแบบเฉียบพลัน. (MONITORING AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DENGUE VIRUS IN BLOOD AND NON-BLOOD SPECIMENS IN ADULTS WITH ACUTE INFECTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.นพ.วันลาภกุลวิจิต, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.นพ.ดร.เผด็จ สิริระเสถียร, 193 หน้า.

การศึกษานี้เป็นการติดตามการติดเชื้อ รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเดงกี (dengue virus) ที่ตรวจพบในสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือด น้ำลายและปัสสาวะ ในช่วงเวลาต่างๆ ของการติดเชื้อแบบเฉียบพลันในคนไข้ผู้ใหญ่ที่ถูกวินิจฉัยว่าเป็นไข้เลือดออกจำนวน 23 ราย ผลการศึกษาพบว่าคนไข้จำนวน 18 ราย (78.26 %) ตรวจพบเชื้อไวรัสเดงกีได้มากกว่า 1 ครั้ง โดยสามารถตรวจพบได้นานสุดในปัสสาวะที่ 46 วันหลังมีอาการของการติดเชื้อ เชื้อไวรัสเดงกีที่มีชีวิตสามารถตรวจพบได้ในเลือดในช่วงมีไข้รวมถึงปัสสาวะทั้งช่วงมีไข้และไข้ลงแล้ว ปริมาณของเชื้อไวรัสเดงกีในแต่ละสิ่งส่งตรวจและช่วงเวลามีความแตกต่างกันในคนไข้แต่ละคน เชื้อไวรัสมีปริมาณมากในช่วงมีไข้ โดยเฉพาะในสิ่งส่งตรวจเลือด และลดลงเมื่อเวลาผ่านไป พบปริมาณไวรัสในปัสสาวะมากกว่าปริมาณไวรัสในเลือด ในสิ่งส่งตรวจในวันท้ายๆ ของไข้ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรม (genetic variation) ของเชื้อไวรัสเดงกีในสิ่งส่งตรวจที่เก็บในช่วงเวลาที่ต่างกันของคนไข้ 13 รายพบว่า serotype, genotype and strain มีความเหมือนกันในคนไข้ 8 ราย มีคนไข้ 3 รายที่พบการติดเชื้อที่มากกว่า 1 serotype และคนไข้ 2 รายที่พบการติดเชื้อมากกว่า 1 strain ใน serotype และ genotype เดียวกัน นอกจากนี้เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของ envelope (E) gene ของเชื้อไวรัสเดงกี พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน ที่พบในชนิดสิ่งส่งตรวจและต่างช่วงเวลา มีความเหมือนกัน ยกเว้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เก็บในช่วงหลังไข้ เมื่อทำการศึกษาต่อไปสามารถตรวจพบ ความหลากหลายของเชื้อไวรัสเดงกีที่พบในแต่ละสิ่งส่งตรวจในช่วงเวลาต่างๆ ของการติดเชื้อที่เรียกว่า “quasispecies” ซึ่งพบมากในสิ่งส่งตรวจที่เก็บช่วงมีไข้มากกว่าช่วงหลังไข้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งส่งตรวจเลือด ในคนไข้บางราย พบความหลากหลายของเชื้อไวรัสเดงกี ในช่วงหลังไข้ในปัสสาวะหรือเซลล์เม็ดเลือดขาว เมื่อพิจารณาตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลง พบว่าเกิดในส่วนที่เป็น domain III ของ E gene ที่สัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการติดเชื้อมากกว่าส่วนอื่นๆ การที่มีความหลากหลายของเชื้อไวรัสเดงกี อาจเป็นผลมาจากการปรับตัวของไวรัส ที่หลีกเลี่ยงจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังแสดงให้เห็นว่าประชากรของเชื้อไวรัสเดงกีบางกลุ่มสามารถตรวจพบได้ ในหลายสิ่งส่งตรวจ ทั้งในช่วงเวลาเดียวกันหรือต่างช่วงเวลากัน รวมถึงอาจพบเฉพาะในสิ่งส่งตรวจนั้นๆ เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เก็บในช่วงหลังไข้ ผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นถึงพยาธิกำเนิดของเชื้อไวรัสเดงกี รวมถึงกลไกการปรับตัวของเชื้อไวรัส เพื่อให้คงอยู่ในร่างกายเป็นเวลานาน อันจะเป็นองค์ความรู้ที่ช่วยในการพัฒนาวัคซีนและการควบคุมการระบาดของโรคไข้เลือดออกในอนาคต

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5087782920 : MAJOR BIOMEDICAL SCIENCES

KEYWORDS : DENGUE VIRUS / GENETIC VARIATIONS / QUASISPECIES / VIRAL LOAD / URINE / SALIVA

METHEE SRIPRAPUN : MONITORING AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DENGUE VIRUS IN BLOOD AND NON-BLOOD SPECIMENS IN ADULTS WITH ACUTE INFECTION. ADVISOR : ASSOC. PROF. WANLA KULWICHIT, M.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PADET SIRIYASATIEN, M.D., Ph.D., 193 pp.

This study aims to monitor and to study the genetic variations of dengue virus (DENV) in blood, saliva and urine in different time points of 23 acutely diagnosed DENV infected adult patients. 18 of 23 patients (78.26%) were positive for DENV detection more than one period of specimen collections. Urine was the best specimen to demonstrate persistent genome of DENV up to day 46 of illness. Moreover, live DENV could be detected in blood specimens during febrile and in urine during both febrile and convalescent periods. The dengue viral loads varied in different specimens and time points in each patient. The viral load was higher in plasma or peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) than in other specimens during febrile period. However, the viral load was found in urine much more frequently than in blood specimens during convalescent period. Genetic variation analysis in 13 patients revealed that serotypes, genotypes and strains of the virus in 8 patients were identical. Mixed serotypes were found in 3, and mixed strains in 2. Moreover, the nucleotide and amino acid sequences of DENV envelope (E) gene in different specimens and time points were identical, except for those in convalescent PBMCs of 2 patients. The presence of heterogeneous population of DENV or “quasispecies” of each specimen in different time points was investigated as well. The degree of heterogeneity in blood specimens was higher during febrile than during convalescent period. In selected patients, the complexity of viral population was found in convalescent urine or PBMCs than in febrile specimens. The genetic variations mostly occurred in domain III of E gene correlating with the pathogenesis of DENV infection. Heterogeneous population or “quasispecies” of DENV may partly result from viral adaptation to host immune pressure. Some DENV populations persist in different specimens during the same and different time points, including specifically found in those specimens such as in convalescent PBMCs. These findings may shed lights on pathogenesis of DENV infection and the mechanism of viral adaptation to survive, obviously useful for vaccine development and controlling of DENV epidemics in the future.

Field of Study : .. Biomedical Sciences Student's Signature *Methee Sriprapun*
 Academic Year : .. 2012 Advisor's Signature *Wanla Kulwichit*
 Co-advisor's Signature *Padet Siriyasatien*

ACKNOWLEDGMENTS

I am deeply grateful to my advisor, Wanla Kulwichit, MD, my co-advisor, Associate Professor Dr. Padet Siriyasatien, MD, PhD, and my thesis committee, Associate Professor Dr. Kanisak Oraveerakul, DVM, PhD, Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, PhD, Assistant Professor Dr. Tewin Tencomnao, PhD and Associate Professor Dr. Primchanien Moongkarndi, Dr. rer. nat., for their invaluable comments and advice. I also owe a particular debt to Assistant Professor Dr. Kriengsak Limkittikul, MD, Dengue Laboratory Research Unit, Department of Tropical Pediatrics, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, and Dr. Khunying Ananda Nisalak, MD, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), for kindly providing dengue virus stocks and Assistant Professor Dr. Sunchai Payungporn, PhD, for his advice and assistance with bioinformatics analysis.

I am deeply thankful to my research team, Dr. Chalinee Laosakul, MD, Ms. Kesinee Arunyingmonkol and Ms. Sunisa Krajiw for their help with patient enrollment, clinical information, specimen collection, and laboratory assistance. I am also thankful to all staffs and scientists at Infectious Disease Laboratory Unit, Entomology Laboratory Unit and Chulalongkorn Medical Research Center (CU-MRC), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

I am particularly indebted to the Chulalongkorn University Dusadee Phiphat Scholarship, Chulalongkorn University Graduate Scholarship to Commemorate the 72nd Anniversary of His Majesty King Bhumibol Adulyadej and Conference Grant for Ph.D. Student for supporting me to study and conduct this project.

Last but not least, I whole-heartedly thank my parents, my family and my friends for their constant encouragement and supporting me for my education life. Also, allow me to say “thank you” to all the patients participating in this project. They are undoubtedly the most important parts, making this project plausible.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Background and rationale.....	1
1.2 Objectives.....	4
1.3 Major and minor research questions.....	5
1.4 Conceptual framework and experimental design.....	6
CHAPTER II REVIEW OF RELATED LITERATURE.....	9
2.1 The virology of dengue virus (DENV).....	9
2.2 DENV transmission, replication and pathogenesis.....	11
2.3 Epidemiology of DENV infection.....	14
2.4 Laboratory diagnosis of DENV infection.....	18
2.5 DENV detection in blood specimens.....	21
2.6 DENV detection in non-blood specimens.....	22
2.7 The different viral loads in each specimen and tissue.....	23
2.8 Molecular strategies for detecting the evidence of viral replication.....	25

	Page
2.9	Persistent flavivirus infection..... 26
2.10	Genetic variation of flaviviruses..... 28
CHAPTER III	MATERIALS AND METHODS..... 34
3.1	Patient and specimen recruitments..... 34
3.2	Lab equipments and instruments..... 35
3.3	Chemicals and reagents..... 37
3.4	Laboratory methods..... 39
CHAPTER IV	RESULTS..... 60
4.1	Patient recruitment and specimen collections..... 60
4.2	Nested RT-PCR (E gene) results for DENV detection..... 62
4.3	Serotype classification of DENV-infected patients..... 66
4.4	Genotype and strain classifications of DENV in DENV-infected patients..... 71
4.5	The DENV detection and viral load in different time points of infection..... 76
4.6	Negative strand detection of DENV in different time points using tagged real time RT-PCR (tagged qRT-PCR)..... 89
4.7	Genetic variation of DENV in different periods of infection... 97
4.8	Genetic diversity of DENV in each specimen and time points of DENV-infected patients..... 106
4.9	Phylogenetic analysis to demonstrate the association of DENV population in different specimens and time points..... 126

	Page
CHAPTER V DISCUSSION	140
CHAPTER VI CONCLUSION.....	156
REFERENCES.....	158
APPENDICES.....	181
APPENDIX A.....	182
APPENDIX B.....	185
APPENDIX C.....	187
APPENDIX D.....	190
APPENDIX E.....	191
BIOGRAPHY.....	193

LIST OF TABLES

Table		Page
1	The summary of genotype classification of DENV.....	10
2	Primers for semi-nested RT-PCR (E gene).....	40
3	The reaction setup of first round nested RT-PCR (E gene).....	40
4	The reaction setup of nested RT-PCR (E gene).....	41
5	Primers for semi-nested RT-PCR (DENV serotype classification)....	42
6	The reaction setup of cDNA synthesis for semi-nested RT-PCR serotype.....	42
7	The reaction setup of cDNA synthesis for semi-nested RT-PCR serotype (mastermix preparation).....	43
8	The reaction setup of first round semi-nested RT-PCR for dengue serotype classification.....	43
9	The reaction setup of semi-nested RT-PCR for dengue serotype classification.....	44
10	Primers for nested RT-PCR serotype (Yenchitsomanus protocol)....	45
11	The reaction setup of nested serotypic RT-PCR.....	45
12	Primers of real time RT-PCR (qRT-PCR) for DENV detection and quantification.....	46
13	The reaction setup of qRT-PCR for DENV detection.....	46
14	The reaction setup of PCR ligation into pCR [®] 8/GW//TOPO [®]	48
15	The reaction setup of colony PCR screening.....	49
16	Primers for tagged qRT-PCR.....	51
17	The reaction setup of cDNA synthesis of tagged qRT-PCR.....	51
18	The reaction setup of cDNA synthesis for tagged qRT-PCR (mastermix preparation).....	52

Table	Page
19 The reaction setup of qRT-PCR for negative strand detection.....	53
20 The summary of both DENV and non-DENV-infected patients in this study.....	60
21 Nested RT-PCR results (E gene primers) of dengue and non-dengue infected patients.....	63
22 The summary of nested RT-PCR results (E gene primers) of plasma, PBMCs, saliva and urine collected from each patient in different time points.....	66
23 DENV serotype results of 23 DENV-infected patients.....	67
24 The major and minor serotypes of DENV in 3 mixed-serotype-infected patients.....	70
25 Summary results of serotypes, genotypes and strains of DENV in 23 DENV-infected patients.....	72
26 Serotypes, genotypes and strains of DENV in 13 prolonged dengue-infected patients.....	74
27 qRT-PCR results of 23 DENV-infected patients.....	79
28 qRT-PCR results of DENV-infected patients (presented in each specimen and time point).....	83
29 The demonstration of dengue viral load in different specimens and time points.....	84
30 The longest time of positive DENV detection in each specimen by comparing two methods of RT-PCR.....	89
31 Tagged qRT-PCR results in positive real time RT-PCR specimens...	91
32 Summary results of nucleotide and amino acid variations of DENV-infected patients.....	105
33 The diversity (complexity) parameters of nucleotide and amino acid sequences of 13 DENV-infected patients.....	124

Table		Page
34	Summary data of specimen collections from both DENV and non-DENV-infected patients.....	185
35	The ELISA results of DENV and non-DENV-infected patients.....	187

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The diagram of flavivirus classification.....	9
2	The genome organization of DENV.....	10
3	The diagram of DENV transmission.....	12
4	DENV life cycle.....	13
5	The endemic areas of DENV infection.....	15
6	The distribution of DENV serotype in different periods.....	16
7	Serotype distribution of DENV in Thailand during 2008-2011.....	17
8	Diagnostic protocols for DENV detection in different times of specimen collections.....	18
9	The map and sequence of pCR [®] 8/GW/TOPO [®] vector.....	49
10	Schematic pattern of tagged real time RT-PCR to detect negative strand of DENV.....	51
11	The webpage of Viral Bioinformatics Research Center (VBRC).....	57
12	A number of specimens collected from 23 DENV-infected patients...	62
13	1.5% agarose gel electrophoresis of nested RT-PCR product using E gene primers.....	65
14	Serotypic classification of 23 DENV-infected patients.....	67
15	Serotypic nested RT-PCR results in N33 specimens.....	69
16	The example of genotype blast result of N12 specimens.....	71
17	The example of DENV strain blast result of N17 specimens.....	72
18	Melting curve analysis of positive controls (DENV1-DENV4).....	76
19	Standard curve of all 4 serotypes using each DENV stock.....	77
20	Amplification plot and melting curve analysis of N28 specimens.....	82

Figure	Page
21 2% gel electrophoresis of real time RT-PCR products of N28 specimens.....	82
22 Trends of dengue viral load (viral dynamic) of dengue-infected patients.....	87
23 Melting curve analysis of negative stand DENV1-DENV4.....	90
24 Melting curve analysis and amplification plot of replicative form detection results.....	95
25 The 2% agarose gel electrophoresis of replicative form detection by tagged qRT-PCR.....	96
26 The comparison of positive and negative strand detection results of DENV-infected patients.....	96
27 Nucleotide and amino acid sequence alignments of E gene sequences derived from positive specimens of DENV1-infected patients.....	98
28 Nucleotide and amino acid sequence alignments of E gene sequences derived from positive specimens of DENV2-infected patients.....	101
29 Nucleotide and amino acid sequence alignments of E gene sequences derived from positive specimens of DENV3-infected patient.....	103
30 Nucleotide and amino acid sequence alignments of E gene sequences derived from positive specimens of DENV4-infected patient.....	104
31 Nucleotide and amino acid sequence alignments of all clones in each specimen of N12 patient.....	107
32 Nucleotide and amino acid sequence alignments of all clones in each specimen of N2 patient.....	114
33 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N2 patient.....	127
34 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N5 patient.....	128

Figure	Page
35 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N10 patient.....	129
36 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N12 patient.....	130
37 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N13 patient.....	131
38 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N17 patient.....	132
39 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N20 patient.....	133
40 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N21 patient.....	134
41 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N28 patient.....	135
42 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N29 patient.....	136
43 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N33 patient.....	137
44 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N34 patient.....	138
45 The phylogenetic tree of nucleotide sequences (E gene) derived from all clones in each specimen of N40 patient.....	139
46 The comparison of the latest time of DENV detection when using qRT-PCR and nested RT-PCR.....	188
47 The comparison of DENV detection in different specimens and time points when using qRT-PCR and nested RT-PCR.....	188
48 The strategy of tagged RT-PCR assay.....	190

LIST OF ABBREVIATIONS

μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar
bp	=	base pair
ADE	=	antibody dependent enhancement
CCHFV	=	Crimean–Congo hemorrhagic fever virus
cDNA	=	complementary DNA
DengueDB	=	Dengue Viral Database
DENV	=	dengue virus
DNA	=	deoxyribonucleic acid
EDTA	=	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
g	=	gram
HCV	=	Hepatitis C virus
HIV	=	Human immunodeficiency virus
HSV	=	Herpes simplex virus
kbp	=	kilobase pair
lb	=	pound
M	=	molar

mg	=	milligram
ml	=	milliliter
mM	=	milli molar
PBLs	=	peripheral blood leukocytes
PBMCs	=	peripheral blood mononuclear cells
PFU	=	plaque forming unit
qRT-PCR	=	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction or real time RT-PCR
RF	=	replicative form
RI	=	replicative intermediate
RNA	=	ribonucleic acid
rpm	=	revolutions per minute
RSV	=	Respiratory Syncytial Virus
RT-PCR	=	reverse transcription polymerase chain reaction
SLEV	=	St. Louis encephalitis virus
TBE	=	Tick-borne encephalitis
TDC	=	Tropmed Dengue Diagnostic Center
UTR	=	untranslated region
VBRC	=	Viral Bioinformatics Research Center
WHO	=	World Health Organization
WNV	=	West Nile virus