



การตรวจจำแนกสายพันธุ์เชื้อ Human Papillomavirus ชนิดเสี่ยงสูงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค High Resolution Melting Analysis

Genotyping of Human Papillomavirus High Risk Type

by High Resolution Melting Analysis

ปรางทิพย์ อุทัยวัตร¹ อาภาพรรณ ภูมิทอง¹ สุขุมลย์ สว่างวาริ¹
 เยาวลักษณ์ อีระเจตกุล³ ดวงฤดี จังตระกูล³ และ จุริรัตน์ ดาดวง^{3,4*}

บทคัดย่อ

มะเร็งปากมดลูกมีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับ 2 ของมะเร็งในสตรีไทย เชื้อ human papillomavirus (HPV) เป็นสาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูก ในการศึกษาวิจัยพัฒนาตรวจแยกเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูงที่พบบ่อยในประเทศไทย คือชนิด 16, 18, 45 และ 58 ด้วยเทคนิค real-time PCR ร่วมกับ high resolution melting analysis (HRM) เริ่มจากการทดสอบคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้จากเซลล์ปากมดลูกโดยตรวจหา housekeeping gene (beta actin) ตัวอย่าง DNA ได้จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ และ DNA ที่มีคุณภาพจะนำมาเพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อด้วย primer ที่จำเพาะต่อยีน E6/E7 ของ HPVs จีโนม จากนั้นใช้สารเรืองแสง SYBR Green และเทคนิค HRM เพื่อตรวจแยกชนิดเชื้อ โดยอาศัยความแตกต่างระหว่างขนาดของ amplified product และ %GC contents ในยีนเป้าหมาย ซึ่งเทคนิค HRM ใช้เวลาในการทำเพียง 90 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค cervista ที่ใช้ระยะเวลาทำนานถึง 4 ชั่วโมง จากการประเมินเทคนิค HRM ด้านความไวและความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย พบว่าเทคนิค HRM มีความไวในการตรวจหาเชื้อ HPV type 16, 58 ที่ 10^4 copies และ HPV type 18, 45 ที่ 10^3 copies ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่พบการเกิด cross-reaction ระหว่างสายพันธุ์ และจากการตรวจหาเชื้อ HPV ในตัวอย่างผู้ป่วยจำนวน 34 ราย ที่ผ่านการตรวจแยกชนิดของเชื้อ HPV ด้วยเทคนิค cervista และทราบชนิดของเชื้อ HPV แล้ว พบว่าเทคนิค HRM มีค่าความไวของ HPV16 เท่ากับร้อยละ 73.7 (n=19); HPV18 เท่ากับร้อยละ 80 (n=5) และค่าความจำเพาะของ HPV16 เท่ากับร้อยละ 100 (n=10); HPV18 ร้อยละ 90 (n=10), ตามลำดับ โดยสรุปแล้วเทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจแยกเชื้อได้ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะสูง

¹ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

³ ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

* Correspondent Author, E-mail: jurpoo@kku.ac.th

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the major cause of cervical cancer, with high incidence as the second most common cancer of women in Thailand. The objective of this study is to develop the technique for identifying of high risk HPV types 16, 18, 45 and 58 by real-time PCR with high resolution melting analysis (HRM). DNA specimens were provided by National Cancer Institute. The quality of DNA was checked by housekeeping gene (beta actin) determination. Then, type specific primer of E6/E7 of HPV genes was used for DNA amplification. After using, SYBR Green staining, melting curve were analyzed for classification of HPV based on the difference of amplicon size and % GC contents in target genes. The entire assay time of HRM was 90 minutes compared to 4 hours of *cervista* technique. The detection limit of HRM assay for HPV type 16, 58 was 10^4 and for HPV type 18, 45 is 10^3 copies, respectively. No cross-reaction is observed. 34 known HPV genotype samples by *cervista* were subjected to HRM. The result showed that the sensitivity of HRM for HPV16 and HPV18 were 73.7% (n = 19) and 80% (n = 5), respectively. The specificity of HRM for HPV16 and HPV18 were 100% (n = 10) and 90% (n = 10), respectively. In summary, the developed technique is simply and rapid for detection of high risk HPV with high specificity.

คำสำคัญ: Human papillomavirus มะเร็งปากมดลูก เทคนิค high resolution melting เทคนิค cervista

Keywords: Human papillomavirus, Cervical cancer, High resolution melting analysis, Cervista technique

บทนำ

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่มีอุบัติการณ์สูงเป็นอันดับสองของมะเร็งในสตรีไทย (WHO/ICO, 2010) สาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูกคือการติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดเสี่ยงสูง (high risk type) เช่น HPV 16, 18, 45 และ 58 บริเวณอวัยวะเพศ หรือบริเวณปากมดลูก จากรายงานวิจัยพบว่ามะเร็งปากมดลูกมีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ HPV ถึงร้อยละ 90-95 (Munoz, 2000; Sukviroch et al., 1994) สำหรับกลไกของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดมะเร็งมาจากโปรตีน E6 และ E7 ที่สร้างมาจากยีนของไวรัสชนิดเสี่ยงสูง นั้นสามารถ

รบกวนการทำงานของโปรตีน p53 และ pRb ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) และกระบวนการตายของเซลล์แบบแอพอโทซิส (apoptosis) ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ (วิชัยและคณะ, 2554; จตุพล, 2549; Moody and Laimins, 2010) ปัจจุบันมีการณรงค์ให้ตรวจมะเร็งปากมดลูกด้วยเทคนิค pap smear แต่หากมีการติดตามเฝ้าระวังการติดเชื้อ HPV สายพันธุ์เสี่ยงสูงร่วมด้วยก็จะสามารถเฝ้าระวังการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ในอนาคตและในรายที่ยังไม่พบการติดเชื้ออาจป้องกันได้แน่นอน ๆ ด้วยการฉีดวัคซีน (Jo and Kim, 2005)

โดยทั่วไปการตรวจวิเคราะห์และแยกสายพันธุ์ของเชื้อ HPV นิยมใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) แต่ใช้เวลานานและมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหานี้ผู้วิจัยจึงพัฒนาเทคนิค high resolution melting analysis (HRM) โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนยีน E6/E7 ของ HPV จีโนม ด้วยการใส่ specific primer และเติมสารเรืองแสง SYBR Green ซึ่งสารนี้จะเข้าไปแทรกตัวอยู่ระหว่างคู่สมของ base ระหว่างทำ thermal cycling ด้วย ภายหลังจากการทำ PCR สิ้นสุดลงจะทำการแยกสายพันธุ์เชื้อทันที โดยการวิเคราะห์ melting curve ซึ่งทำได้โดยการค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิให้กับ PCR product ขึ้นจาก 56-95 °C และวัดสัญญาณ fluorescence ที่ลดลงตลอดเวลาเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะทำให้ PCR product ที่เดิมเป็นสายคู่แยกตัวออกจากกันเพิ่มขึ้น (ทำให้ SYBR Green หลุดเป็นอิสระไม่สามารถเรืองแสงได้) ซึ่ง DNA จาก amplified product ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมี melting temperature (Tm) เฉพาะตัว คือจุดที่คู่เบส (base pair) ของสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จะแยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด จะทำให้เกิดการลดลงของสัญญาณอย่างเฉียบพลัน ณ จุดนั้น ๆ โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นอยู่กับความยาวและปริมาณของเบสกวานีน (guanine, G) และเบสไซโทซีน (cytosine, C) ที่มีอยู่ใน DNA ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยกระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมานั้นจะใช้เครื่อง real-time PCR เพียงเครื่องเดียวเท่านั้นในการวิเคราะห์ ดังนั้นหากการทำ HRM สามารถพบ melting peak ที่แตกต่างกันระหว่างเชื้อก็จะทำให้แยกสายพันธุ์ของเชื้อได้โดยง่าย รวดเร็ว ราคาเหมาะสม สะดวก ลดการสัมผัส

กับสารเคมีที่เป็นพิษ เช่น ethidium bromide แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet, UV) ที่ต้องใช้ในการทำ gel electrophoresis ในวิธี conventional PCR

ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ทำการตรวจจำแนกสายพันธุ์เชื้อ HPV ที่พบบ่อยในประเทศไทย ชนิดเสี่ยงสูงต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก จากหญิงที่มาตรวจภายในประจำปี ที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดให้รวดเร็ว และง่ายต่อการแปลผล ด้วย real-time PCR ก่อนแล้วจำแนกสายพันธุ์เชื้อทันที โดยการวิเคราะห์ melting curve ในการศึกษานี้ใช้ primer ในตำแหน่งของยีน E6/E7 ของ HPV จีโนม 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 16, 18, 45 และ 58

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

น้ำยาสำหรับการทำ HRM ได้แก่ น้ำยาสำเร็จรูป LightCycler 480® high Resolution Melting Master mix จัดจำหน่ายโดยบริษัท โรช ไดแอ็กโนสติกส์ ประเทศไทย (ประกอบด้วย dNTPs, PCR buffer, Taq DNA polymerase และ high resolution Melting Dye), 25 mM MgCl₂ และ H₂O (PCR grade)

พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ HPV จีโนมสายพันธุ์ 16 18 45 และ 58 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. พญ.แจ่มใส เพียรทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เป็นแหล่ง DNA ในการสร้างกราฟมาตรฐานในขั้นตอนการศึกษา ด้านความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธี

ตารางที่ 1 nucleotide primer ของ HPV16, 18, 45 และ 58

HPV type	Sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	Target region
16	GAGACAACCTGATCTCTACTGT	60	203	E7
	CCCATTAAACAGGTCTTCCAA	58		
18	TCAGAGGAAGAAAACGATGA	56	224	E7
	GTTGCTTACTGCTGGGAT	54		
45*	GTGGAAAAGTGCATTACAGG	58	151	E6E7
	ACCTCTGTGCGTTCCAATGT	60		
58	AGGAAACAACCCAACGCTAA	58	275	E7
	ACGTCGGTTGTTGTAAGTGT	58		

หมายเหตุ: * = Sotlar et al., 2004; Tm= melting temperature; bp = base pair

2. DNA ตัวอย่าง

ใช้ DNA ตัวอย่างที่เก็บโดยสูตินารีแพทย์จากผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยและเข้ารับการรักษาที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ปี พ.ศ.2555 ซึ่งผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติแล้ว โดยตัวอย่าง DNA ได้ผ่านการสกัดด้วย The Genfin DNA Extraction kit และถูกตรวจแยกสายพันธุ์แล้วด้วยเทคนิค cervista จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติจำนวนทั้งหมด 34 ราย แบ่งเป็น HPV 16 จำนวน 19 ราย HPV 18 จำนวน 5 ราย และตัวอย่างที่ให้ผลลบจำนวน 10 ราย

3. Nucleotide primer HPV16, 18, 45 และ 58

ได้ออกแบบลำดับ primer ที่จำเพาะต่อชนิดของยีน E6/E7 ของ HPV จีโนม เพื่อตรวจหาการแสดงออกของเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง 16, 18, 45 และ 58 โดย primer ทุกตัวสังเคราะห์จากบริษัทพรินา ไชน่าเอ็นดีฟิค ประเทศไทย ดังตารางที่ 1

4. สภาพที่เหมาะสมสำหรับ real-time PCR และ HRM analysis

เพิ่มจำนวน DNA ของเชื้อ HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ specific primer ในตำแหน่ง E6/E7 ซึ่งมีลำดับของ primer ดังตารางที่ 1 และมีส่วนประกอบของ PCR reaction (20

μl) คือ HRM master mix 10 μl, 2.5 mM MgCl₂ 2 μl, 500 nM primer 2 μl, DNA template 2 μl และ H₂O (PCR grade) 4 μl จากนั้นนำส่วนผสมไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง Light Cycler 480 โดยตั้งโปรแกรมสถานะของปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation step ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที ขั้นตอนต่อมาคือ denaturation step ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 วินาที annealing step ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 วินาที extension step ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 10 วินาที ทั้งหมดจำนวน 40 รอบ จากนั้น PCR product จะถูกแยกสายพันธุ์ต่อทันทีด้วยเทคนิค HRM โดยเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทีละ 0.1°C จาก 56 ถึง 95°C

5. ทดสอบหา Melting temperature (Tm) ของ HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์

ทดสอบหา Tm ของ HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์เพื่อใช้อ้างอิงในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อ โดยใช้พลาสมิดที่มี HPV จีโนม 16, 18, 45 และ 58 ที่มีจำนวน 10⁷ copies มาเพิ่มจำนวน DNA และแยกสายพันธุ์ ดังวิธีในข้อ 4 ที่กล่าวมาข้างต้นจากนั้นหาขนาดของ PCR product ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis

6. การทดสอบวิธีด้านความไว (sensitivity)

การทดสอบความไวทำโดยการเจือจางพลาสมิดที่มี HPV จีโนม 16 และ 45 ให้มีจำนวนตั้งแต่

10^0 - 10^1 copies ส่วน HPV จีโนม 18 และ 58 เจือจางให้มีจำนวนตั้งแต่ 10^0 - 10^1 copies เนื่องจากพลาสมิดตั้งต้นไม่เพียงพอที่จะเตรียมให้เท่ากับ 10^9 จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยา PCR และแยกสายพันธุ์ ตรวจสอบซ้ำ 3 ครั้ง แล้วสร้างกราฟมาตรฐานและวัดจำนวน copies ที่น้อยที่สุดที่วัดได้ ทำ agarose gel electrophoresis เพื่อดู PCR product

7. การทดสอบวิธีด้านความจำเพาะ (Specificity)

การทดสอบความจำเพาะโดยการทดสอบความเป็นไปได้ในการเกิด cross reaction ระหว่าง HPV type โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Tool (BLAST) software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) และทดสอบความจำเพาะของ primer ของ HPV 16, 18, 45 และ 58 โดยใช้ non specific primer ต่อเชื้อสายพันธุ์นั้น ๆ ในการทำ PCR ในการศึกษาใช้พลาสมิดที่มี HPV จีโนมของ HPV สายพันธุ์ 16, 18, 45 และ 58 จำนวน 10^4 copies เป็น DNA ต้นแบบ

8. การทดสอบกับ DNA ตัวอย่าง

เริ่มจากการตรวจสอบคุณภาพ DNA ของตัวอย่าง ทั้ง 34 ราย โดยการตรวจหา housekeeping

gene (beta actin) ตัวอย่างที่มีคุณภาพดีจะนำมาทดสอบแยกสายพันธุ์ของเชื้อโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังในข้อ 4 จากนั้น DNA ตัวอย่างจะถูกแปลผลว่าเป็น HPV สายพันธุ์ใดด้วย Tm แล้วทำการยืนยันผลของ PCR product ทั้งหมดด้วยวิธี agarose gel electrophoresis หลังจากนั้นประเมินความไวและความจำเพาะของการวินิจฉัยโรคโดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานคือวิธี cervista

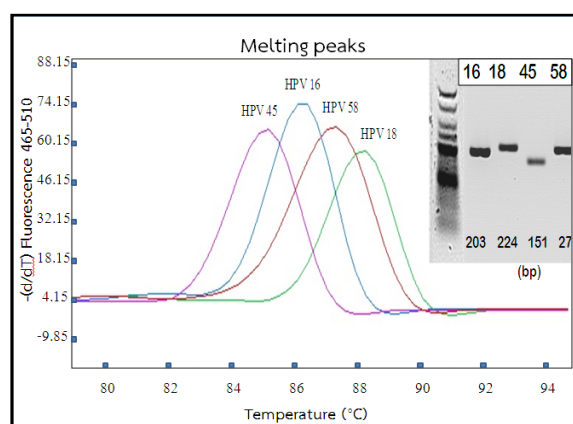
ผลการวิจัย

1. ผลทดสอบหา Tm ของเชื้อ HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์

พบว่า melting temperature ของ HPV 16, HPV 18, HPV 45 และ HPV 58 คือ 86.2 88 85 และ 87 °C ตามลำดับ โดย PCR product ที่ได้สำหรับ HPV สายพันธุ์ 16, 18, 45 และ 58 จะมีขนาด 203, 224, 151 และ 275 bps ตามลำดับดังรูปที่ 1

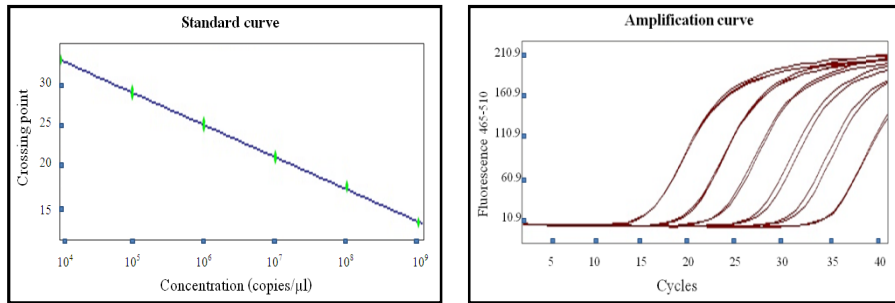
2. ผลทดสอบความไว

พบว่า HPV16 และ HPV58 มีความไวเท่ากับ 10^4 copies/ μ l สำหรับ HPV18 และ HPV45 มีความไวเท่ากับ 10^3 copies/ μ l ดังแสดงเป็นกราฟมาตรฐานในการเพิ่มขึ้นส่วนของยีนในรูปที่ 2

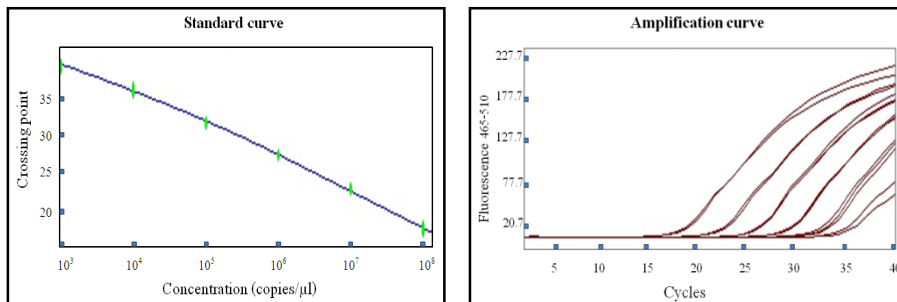


รูปที่ 1 ค่า Tm ของ PCR product ของเชื้อ HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้วย high resolution melting analysis โดยการวัด fluorescence ในหน่วยของ dF/dT และอุณหภูมิโดยเทียบกับขนาดของ PCR product เมื่อทำ gel electrophoresis

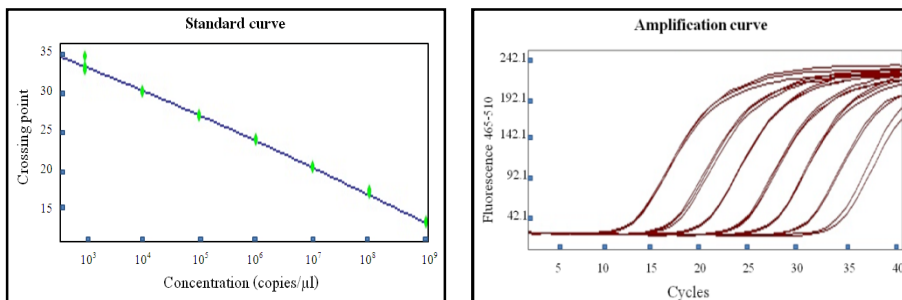
A



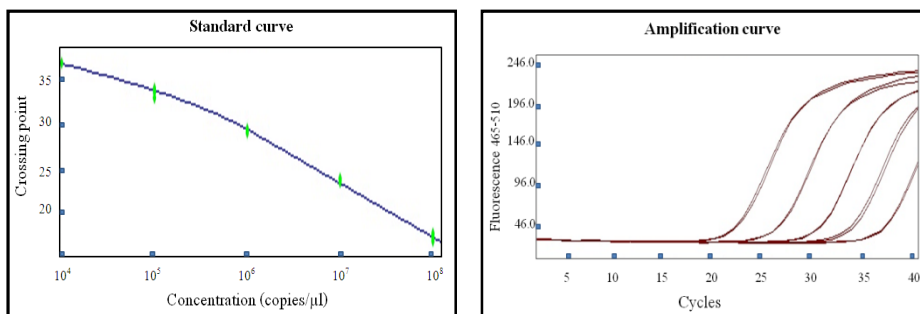
B



C



D



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานในการตรวจวัดยีน E6/E7 จากพลาสมิดจำนวน 10^9 - 10^1 copies/ μ l ใน HPV 16 และ 45 ส่วน 10^8 - 10^1 copies/ μ l ใน HPV 18 และ 58; **HPV 16 (A)** มีค่า point efficiency: 1.815 slope: -3.863 Y: 49.39; **HPV 18 (B)** มีค่า point efficiency: 1.874 Slope: -3.667 Y: 46.05; **HPV 45 (C)** มีค่า point efficiency: 1.874 Slope: -3.667 Y: 46.05 และ **HPV 58 (D)** มีค่า point efficiency: 1.719 Slope: -4.252 Y: 49.83

3. ผลการทดสอบความจำเพาะ

การทดสอบการเกิด cross reaction ระหว่างสายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) และผลทดสอบความจำเพาะของ primer ทั้ง 4 คู่ในหลอดทดลองให้ผลสอดคล้องกันคือไม่มีการเกิด cross reaction ระหว่างสายพันธุ์

4. ผลการทดสอบใน DNA ตัวอย่าง

ผลการตรวจสอบคุณภาพ DNA ของตัวอย่าง ทั้ง 34 ราย พบว่า DNA ตัวอย่างมีคุณภาพดี โดยตรวจพบ housekeeping gene (beta actin) ในตัวอย่าง

ทุกราย ผลการทดสอบเชื้อ HPV16 จำนวน 19 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 14 ราย และให้ผลลบ 5 ราย สำหรับ HPV18 จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลบวก 4 ราย และ ให้ผลลบ 1 ราย ดังแสดงในตารางที่ 2 ตัวอย่าง DNA ที่ไม่ติดเชื้อให้ผลลบทั้งหมด เมื่อประเมินความไวและความจำเพาะของการวินิจฉัยโดยเทียบกับผลการทดสอบกับวิธี cervista ที่ทำโดยสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ได้ผลดังนี้ ความไวของ HPV16 เท่ากับร้อยละ 73.7 (n=19) HPV18 เท่ากับร้อยละ 80 (n=5) และค่าความจำเพาะของ HPV16 เท่ากับร้อยละ 100 (n=10) HPV18 เท่ากับร้อยละ 90 (n=10) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการวินิจฉัยทางเซลล์วิทยาและผลการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPV ใน DNA ผู้ป่วย 2 วิธีคือ cervista กับ HRM

หมายเลขตัวอย่าง	Cytology diagnostic	Cervista	HRM
6	Normal	+	+
10	NILM-Inflam	+	+
13	ASC-US	+	-
21	CIN I	+	+
24	ASC-US	+	+
30	NILM-Atrophy	+	-
40	Normal	+	+
41	NILM-B.vag	+	-
46	Normal	+	+
52	Normal	+	+
57	Normal	+	+
62	ASC-US	+	+
65	CIN II	+	+
67	CIN I-II	+	+
80	Squamous CA	+	+
89	NILM	+	-
96	ASC-US	+	-
98	NILM-Candida	+	+
100	NILM-Inflam	+	+

หมายเหตุ: NILM: Negative for intraepithelial lesion or malignancy, ASC-US: Atypical squamous cells of undetermined significance, CIN I: Cervical Intraepithelial Neoplasia I, B.vag: Bacterial vaginosis, Squamous CA.: Squamous cell carcinoma

วิจารณ์ผลการทดลอง

เทคนิค HRM อาศัยหลักการ target amplification assay ซึ่งจะตรวจหา HPV DNA และ แยกสายพันธุ์ของเชื้อได้ นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาต่อไปในการตรวจหาปริมาณของไวรัสเพื่อเฝ้าระวังติดตามการรักษาหรือการพยากรณ์ความรุนแรงของโรค ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว ลดการปนเปื้อนของ PCR product จากการ carry over ในขั้นตอนหลังทำปฏิกิริยา PCR และยังช่วยลดแรงงาน ลดการสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษ (ethidium bromide) รวมทั้งแสง UV ที่ต้องใช้ในกระบวนการ gel electrophoresis วิธี Conventional PCR (เจริญญา, 2554; Hubbard, 2003)

ในปี ค.ศ. 2009 de Araujo และคณะได้ใช้เทคนิค HRM ในการตรวจเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง โดยศึกษายีนของเชื้อ HPV ส่วน L1 และทำการตรวจแยกเชื้อ 2 รอบ ในครั้งแรกจะทำการตรวจคัดกรองว่ามีการติดเชื้อ HPV โดยใช้ consensus primer GP5+/6+ เป็น broad spectrum primer ของเชื้อ HPV และตัวอย่างที่ให้ผลลบจะมีค่า Tm อยู่ในช่วง 77-82°C และสุดท้ายจะทำการตรวจแยกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธี GP5+/6+ EIA-RLB หรือทำวิธี sequence analysis ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ primer ที่จำเพาะต่อส่วน E6/E7 ของ HPV และสามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อ HPV ชนิดเสี่ยงสูง 16, 18, 45 และ 58 เพียงขั้นตอนเดียวซึ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์ได้จากค่า Tm ที่แตกต่างกันของเชื้อ HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่ง HPV16, 18, 45 และ 58 มีค่า Tm เท่ากับ 86.2, 88, 85 และ 87°C ตามลำดับ

การศึกษานี้พบว่าการตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ HPV 16 และ 18 ด้วยเทคนิค HRM ที่ได้พัฒนาขึ้นให้พบผลลบปลอมจำนวน 6 ราย ซึ่งอาจมี

สาเหตุจากข้อจำกัดของวิธีการตรวจวัดที่ได้พัฒนาขึ้นมาซึ่งมีความไวในการตรวจจำแนกต่ำกว่าเทคนิค cervista (625-1250 copies/reaction (Third Wave Technologies, Inc., 2008) นอกจากนี้ปริมาณ DNA ที่ใช้ในเทคนิค cervista คือ 10 µl ในขณะที่เทคนิค HRM ใช้เพียง 2 µl จึงอาจเป็นสาเหตุของการเกิดผลลบปลอม แต่ด้วยข้อจำกัดด้านปริมาณของ DNA ที่ได้รับจากสถาบันมะเร็งจึงทำให้ไม่สามารถใช้ DNA ปริมาณเท่ากับเทคนิค cervista ได้ และข้อจำกัดอีกประการหนึ่งของการศึกษานี้คือไม่ได้ศึกษา HPV 45 และ 58 ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ DNA จากผู้ป่วย เนื่องจากเทคนิค cervista ซึ่งการศึกษานี้ใช้เป็นวิธีมาตรฐานนั้นจะจำแนกเชื้อ HPV ได้เป็น HPV16, 18 และหากติดเชื้อ HPV สายพันธุ์อื่น ๆ จะถูกจำแนกเป็น non HPV 16/18

สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการศึกษาการพัฒนาเทคนิคการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อ HPV ด้วยเทคนิค HRM สามารถตรวจจำแนกเชื้อ HPV 16 และ 18 ได้ในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วย โดยมีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 73.7 และร้อยละ 80 ตามลำดับ ค่าจำเพาะเท่ากับร้อยละ 100 และร้อยละ 90 ตามลำดับ ซึ่งการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ HRM มีข้อดีคือ สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง HPV ทั้ง 4 สายพันธุ์ ออกจากกันได้โดยใช้ค่า Tm ที่แตกต่างกัน ตรวจแยกเชื้อได้ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะสูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พญ.แจ่มใส เพียรทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์พลาสมิด DNA ของเชื้อ HPV ทั้ง 4 ชนิด และคุณพล กองแก้ว

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง DNA จาก ปากมดลูก ตลอดทั้งเจ้าหน้าที่ห้องเครื่องมือกลาง คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความ อนุเคราะห์ในการใช้เครื่อง real-time PCR

เอกสารอ้างอิง

- จตุพล ศรีสมบูรณ์, บรรณาธิการ. (2549). HPV and cervical cancer. กรุงเทพฯ: ทิมส์.
- จริญญา งามขำ. (2555). มะเร็งปากมดลูกและการตรวจหา ไวรัสฮิวแมนแพปพิโลมา. วารสารโรคมะเร็ง 31(3): หน้า 115-122.
- จิตตานนท์ ศรีสุวรรณ. (2552). การตรวจเชื้อ Human papilloma virus ชนิดเสี่ยงสูงในหญิงที่มาตรวจ ภายในประจำปี. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต ขอนแก่น, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น: 41 หน้า
- วิชัย เดิมรุ่งเรืองเลิศ, กานนท์ เกษมศานต์ และ จตุพล ศรี สมบูรณ์. (2554). HPV-related diseases and HPV vaccines. กรุงเทพฯ: รักลูกกรุ๊ป
- วีระพงศ์ ลุฑิตานนท์. (2008). พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction. แหล่งข้อมูล: http://microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku_microbio/17/Basic_PCR_June_08.pdf. สืบค้นเมื่อวันที่ 1 มีนาคม 2556.
- de Araujo, MR., De Marco, L., Santos, CF., Rubira-Bullen, IR., Ronco, G., Pennini, I., Vizzini, L., Merletti, F. and Gillio-Tos A. (2009). GP5+/6+ SYBR Green methodology for simultaneous screening and quantification of human papillomavirus. Journal of Clinical Virology 45(2): 90-5.
- Hubbard, RA. (2003). Human papillomavirus testing methods. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 127: 940-45.
- Jo, H and Kim, JW. (2005). Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. Cancer Therapy 3: 419-434
- Moody, CA and Laimins, LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. Nature Reviews Cancer 10: 550-60.
- Munoz, N. (2000). Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. Journal of Clinical Virology 19: 1-5.
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R. and Bultmann, B. (2004). Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology 42(7): 3176-84.
- Sukviroch, S., Pitakpraiwan, P., Kosiyatrakul, T. and Hankittipongpaisarn, P. (1994). Detection of human papillomavirus DNA in normal and cervical carcinoma tissue of Thai females. Thai Cancer Journal 20: 85-91.
- Third Wave Technologies, Inc. (2008). Cervista HPV 16/18. Available form: http://www.cervistahpv.com/pdf/Cervista_HPV_16-18_PI_15-3101_Rev_B.pdf. Cited 10 Mar 2013.
- WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre) (2010). Human papillomavirus and Related cancer in Thailand Summary Report 2010. Available form: http://www.nci.go.th/File_download/Nci%20Cancer%20Registry/Hospital%20Base d%20Cancer%20Registry2010.pdf. Cited 7 Mar 2013.

