

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปิลโลมาด้วยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์		
ผู้เขียน	นางสาววลี คณัม		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)		
คณะกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. ธนวรรณ ลำลิรัตน์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปราณี ลีชนะชัย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

บทคัดย่อ

ที่มาและปัญหา: การตรวจพบติ่งเนื้อของเชื้อไวรัสฮิวแมนแพปิลโลมาไวรัส (เอชพีวี) ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งสูง ในสิ่งส่งตรวจจากปากมดลูก สามารถบ่งชี้ถึงความเสี่ยงในการพัฒนาไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูก การตรวจจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอชพีวี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอชพีวี 16 และ 18 มีความสำคัญต่อการบริหารจัดการผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชพีวี อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบบางชนิด ใช้เวลานาน มีค่าใช้จ่ายสูงและไม่เหมาะสมต่อการตรวจคัดกรองในตัวอย่างที่มีจำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยประสงค์ที่จะพัฒนาเทคนิคที่ง่าย ราคาถูก เพื่อตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอชพีวีในตัวอย่างจำนวนมากได้

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ชนิดหลอดคู่ร่วมกับการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ในการตรวจหาติ่งเนื้อและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอชพีวี

วิธีการ: หาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ในการตรวจหาและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอชพีวีได้แก่ความเข้มข้นของไพรเมอร์และโพรบ อุณหภูมิและเวลาในการจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ในการจำแนกสายพันธุ์เอชพีวี สร้างไฟโลเจเนติกส์ทรีจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งเดียวกับที่ได้จากการทำพีซีอาร์และเปรียบเทียบกับไฟโลเจเนติกส์ทรีมาตรฐานที่สร้างจากยีนแอล1 ประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์โดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป EIA Kit HPV GP HR และ Linear Array® HPV Genotyping Test

ผลการศึกษา: ปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจพบได้ของเชื้อเอชพีวี สายพันธุ์ 16 18 และ 52 คือ 150 150 และ 11,300 ก๊อปปี้ต่อปฏิกิริยา ตามลำดับ จากสิ่งส่งตรวจ 95 ราย โดย 44 และ 51 รายที่ให้ผลบวกและผลลบตรงกันทั้งสองการทดสอบ ความสอดคล้องโดยรวมของทั้งสองการทดสอบในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวีในสิ่งส่งตรวจทางคลินิกคิดเป็นร้อยละ 100 ($k=1$) ค่าความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวีอยู่ในเกณฑ์ดีเยี่ยม คิดเป็นร้อยละ 100 ส่วนการจำแนกสายพันธุ์เอชพีวีมีความสอดคล้องใน 42 จาก 44 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 95.45 โดยมี 2 ตัวอย่างให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับวิธีอ้างอิง และ 1 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนกได้ โดยวิธี Linear Array ในขณะที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เป็น HPV91 ค่าความสอดคล้องในการจำแนกสายพันธุ์เอชพีวีเฉพาะสายพันธุ์ 16 18 และ 52 คิดเป็นร้อยละ 100 100 และ 86 ตามลำดับเมื่อเทียบกับวิธี Linear Array ค่าความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของการจำแนกเชื้อเอชพีวีสายพันธุ์ 16 และ 18 คิดเป็นร้อยละ 100 ในขณะที่เอชพีวีสายพันธุ์ 52 คิดเป็นร้อยละ 57 93 และ 82 ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง: การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชพีวีโดยเทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ มีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกับการตรวจโดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป วิธีนี้ราคาประหยัด ไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาน้อย และสามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้ จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกทดแทนการใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปในการตรวจหาดีเอ็นเอและการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเอชพีวีในห้องปฏิบัติการทางคลินิก

Thesis Title	Development of Methods for Detection and Typing of Human Papillomaviruses Using Real-time PCR Technique and Nucleotide Sequencing		
Author	Miss Wanlee Kongnim		
Degree	Master of Science (Medical Technology)		
Advisory Committee	Lect. Dr. Tanawan Samleerat	Advisor	
	Asst. Dr. Pranee Leechanachai	Co-advisor	

ABSTRACT

Background: The presence of high risk Human papillomavirus (HPV) DNA in cervical sample indicates the risk of cancer development. Detection and typing of HPV especially HPV 16 and 18 is important for management of infected patients. However, some tests are time consuming and costly which unsuitable for mass screening. Thus, we intended to develop a simple, cost saving and high throughput technique to detect and genotype HPV DNA.

Objective: To develop and evaluating performance of two-tube real-time PCR and direct sequencing for detection and typing of HPV DNA.

Methods: Real-time PCR was optimized in the conditions as following; concentration of primers and probes and annealing temperature and time. Short L1 phylogenetic tree constructed from L1 sequences compatible to sequence from real-time PCR was compared with standard whole length L1 tree for HPV genotyping. Performance in detection and identifying of HPV DNA from 95 clinical samples was evaluated with commercial kits; EIA Kit HPV GP HR and Linear Array[®] HPV Genotyping Test.

Results: The limit of detection of HPV16, 18, and 52 were 150, 150, and 11,300 copies per PCR, respectively. Of 95 samples, 44 and 51 were tested as HPV DNA positive and negative respectively by both assays. The overall agreement of the two assays in

detection of HPV DNA in clinical samples was 100% ($k=1$). The sensitivity, specificity and accuracy of HPV DNA detection were excellent (100%). The overall genotypic-specific agreement of HPV was 42 from 44 samples or 95.45%. There were 2 samples with discordant types and 1 sample not typable from Linear Array but can be typed as HPV 91 by sequencing. The genotypic-specific agreement for HPV16, 18 and 52 were 100%, 100% and 86%, respectively when compared to Linear Array. The sensitivity, specificity and accuracy of HPV16 and HPV18 were all 100% while of HPV52 were 57%, 93% and 82% respectively.

Conclusion: Detection of HPV DNA by two tubes real-time PCR was comparable with commercial kit. This technique is cost saving, simple, less time consuming and high throughput, so it can be alternatively used to commercial test kits in clinical laboratory.