Thesis Title Optimization of Human Cytomegalovirus (HCMV) Detection by Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of HCMV Retinitis and Monitoring of Disease Reactivation in Transplantation Patients

Author Miss Nongluck Sihapunya

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) infection is a major cause of severe retinitis in AIDS patients and plays a predominate role in the mortality and morbidity of organ transplant recipients. According to the difficulty of HCMV culture procedure and the poor diagnostic efficiency of serology methods, the Polymerase Chain Reaction (PCR) is well suited for the diagnosis of HCMV infection. The attempt to establish an In-House nested PCR technique, which provides a sensitive, specific and cost saving method for the detection of HCMV DNA was achieved. A duplex nested PCR assay was developed for detecting the HCMV MIE gene fragment and human beta-globin gene. The HCMV standard control was prepared by the gene cloning technique, which allowed unlimited production of the HCMV MIE gene fragment. In the optimization process, adjustments were made to the critical PCR conditions: the concentration of primers, dNTP and $MgCl_2$, annealing time, annealing temperature, and DNA target ratio. A comparison of PCR product detection methods between the dot blot hybridization assay and a simple ethidium bromide staining, both methods showed a similar sensitivity. Under optimal conditions, 10^5 copies of HCMV DNA and 20 ng of human genomic DNA were the lowest concentrations detected by the optimized first round PCR. A 10-copy minimum of HCMV DNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

could be detected by the optimized duplex nested PCR, which is 10 times more sensitive than the conventional PCR. In the diagnosis of HCMV retinitis, a total of 74 ocular samples from 13 HCMV suspected retinitis and 13 control patients were studied. Ocular samples (vitreous humor, aqueous humor, conjunctiva scraping) from each patient were tested for HCMV DNA by both the conventional and optimized duplex nested PCR. Vitreous humor proved to be the best specimen, in which HCMV DNA could be detected by both conventional and optimized PCR in 12 of 13 (92.3%) retinitis patients. The percentage of HCMV DNA positive in aqueous humor and conjunctiva scraping by conventional and optimized PCR were 58.3% / 8.3% and 83.3% / 58.3%, respectively. Aqueous humor could replace vitreous humor ($p>0.05$) only when the optimized PCR was used. Conjunctiva scraping was not suitable as a specimen for detecting HCMV DNA. This optimized PCR method showed 100% specificity for the diagnosis of HCMV retinitis, as none of the samples from the control patients gave a positive result. In monitoring renal transplantation patients, the detection of HCMV DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma was performed in 4 donors before transplantation and 11 recipients at 2-week intervals for a total of 8 weeks. The detection of HCMV DNA appeared to be useful in screening for a qualified donor, as one recipient, who received a kidney from a PBMCs HCMV DNA positive donor, developed a sign of HCMV reactivation earlier than the others. At 2, 4, 6 and 8 weeks after transplantation, the increasing positive rate of HCMV DNA in PBMCs (43, 73, 90, 86%) and plasma (14, 36, 70, 86%) were observed. Anti-HCMV IgM was detected in only 1 recipient, who experienced the primary infection after transplantation. No symptom related to HCMV disease was observed in any of the recipients. The use of the beta-globin gene primer was absolutely successful in PBMCs extracted samples, but 1 vitreous humor and no plasma extracted samples showed positive results for the beta-globin gene amplification. Therefore, further study to improve the sensitivity of the beta-globin gene amplification is needed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาการตรวจหาไซโตเมกาโลไวรัสโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อวินิจฉัยโรคจอตาอักเสบและติดตามการเกิดโรคซ้ำในผู้ป่วยที่ได้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ

ผู้เขียน นางสาวนงลักษณ์ สีหาปัญญา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. วาสนา ศิริรังษี

บทคัดย่อ

เชื้อไซโตเมกาโลไวรัสเป็นสาเหตุของโรคจอตาอักเสบรุนแรงในผู้ป่วยโรคเอดส์ และทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในผู้รับการเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ยาก การตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยามีประสิทธิภาพต่ำในการวินิจฉัยการติดเชื้อในผู้ป่วย จึงทำให้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นวิธีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้วินิจฉัยการติดเชื้อไซโตเมกาโลไวรัส ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการพัฒนาเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่มีความไว ความจำเพาะสูง และราคาประหยัดขึ้นมาใช้ ทั้งนี้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาทั้งดีเอ็นเอของไวรัสและยีนของคนไปพร้อมกัน ในการศึกษาครั้งนี้ได้เตรียมดีเอ็นเอของไวรัสมาตรฐานโดยเทคนิคยีนโคลนนิ่ง ทำให้สามารถผลิตเอ็มไอยีนของไวรัสได้โดยไม่จำกัด เพื่อนำไปใช้ในการปรับสภาวะของเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสให้เหมาะสมสำหรับตรวจหาไวรัสนี้ สภาวะที่ศึกษาคือความเข้มข้นของ primer, dNTP, และ $MgCl_2$, เวลา และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing และอัตราส่วนของดีเอ็นเอแม่แบบระหว่างไวรัสและเบต้าโกลบินยีน โดยพบว่าความไวของการตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยวิธี dot blot hybridization และวิธีย้อมด้วย ethidium bromide ไม่ต่างกัน เทคนิคที่พัฒนาแล้วสามารถตรวจปริมาณต่ำสุดของไวรัสได้ 10^5 copies และดีเอ็นเอของคนได้ 20 นาโนกรัม ในปฏิกิริยารอบแรก ส่วนในปฏิกิริยารอบสองตรวจหาไวรัสได้ต่ำสุด 10 copies ซึ่งเทคนิคนี้มีความไวมากกว่าวิธีดั้งเดิม 10 เท่า เมื่อนำเทคนิคที่พัฒนาแล้วไปตรวจวินิจฉัยในผู้ป่วยโรคจอตาอักเสบที่แพทย์วินิจฉัยว่าเกิดจากเชื้อไซโตเมกาโลไวรัสจำนวน 13 ราย และผู้ป่วยควบคุมจำนวน 13 ราย แต่ละรายเก็บสิ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่งตรวจจากตา 3 ชนิด คือ vitreous humor, aqueous humor และเยื่อบุลูกตา โดยตรวจทั้งวิธีดั้งเดิมและวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่า vitreous humor เป็นสิ่งส่งตรวจที่เหมาะสมที่สุด โดยสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสในผู้ป่วยได้สูงถึง 92.3% (12 ใน 13 ราย) จากทั้งสองวิธี แต่เปอร์เซ็นการตรวจพบใน aqueous humor และเยื่อบุลูกตาโดยวิธีดั้งเดิมกับวิธีใหม่ เป็น 58.3% / 8.3% และ 83.3% / 58.3% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติ การใช้สิ่งส่งตรวจ aqueous humor แทน vitreous humor จะทำได้เฉพาะเมื่อใช้เทคนิคที่พัฒนาขึ้นเท่านั้น ($p>0.05$) ส่วนเยื่อบุลูกตาไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจ วิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะในการวินิจฉัยโรคจอตาอักเสบถึง 100% เนื่องจากตรวจไม่พบดีเอ็นเอของไวรัสในผู้ป่วยควบคุมทุกคน เมื่อนำวิธีที่พัฒนาแล้วไปตรวจหาการติดเชื้อไวรัสในเม็ดเลือดขาวและพลาสมาของผู้บริจาคไต 4 ราย และผู้รับการเปลี่ยนไต 11 ราย โดยตรวจติดตามผู้เปลี่ยนไตทุก 2 สัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีประโยชน์ในการตรวจคัดกรองผู้บริจาคไต เนื่องจากผู้เปลี่ยนไต 1 ราย ที่รับไตจากผู้บริจาคที่ตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสในเม็ดเลือดขาวแสดงลักษณะของการเพิ่มจำนวนไวรัส โดยตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสในเม็ดเลือดขาวและพลาสมาได้ก่อนผู้ป่วยรายอื่น อัตราการตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2, 4, 6 และ 8 เป็น 43, 73, 90, 86% ในเม็ดเลือดขาว และ 14, 36, 70, 86% ในพลาสมาตามลำดับ การตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM ต่อเชื้อไซโตเมกาโลไวรัส พบผลบวกในผู้เปลี่ยนไตเพียง 1 ราย โดยเป็นการติดเชื้อครั้งแรกของผู้ป่วยรายนี้ ผู้ป่วยทั้งหมดไม่ได้แสดงอาการของโรคติดเชื้อไซโตเมกาโลไวรัส การตรวจหาเบต้าโกลบินยีนในสิ่งส่งตรวจที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวประสบผลสำเร็จทุกราย แต่ในสิ่งส่งตรวจจากตาพบ vitreous humor เพียง 1 รายที่ให้ผลบวก และไม่พบผลบวกเลยในสิ่งส่งตรวจที่สกัดจากพลาสมา ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาความไวในการเพิ่มขยายเบต้าโกลบินยีนให้สูงขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved