Thesis Title Development of TaqMan-based Real-time Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis for Detection and Typing of Human Papillomaviruses

Author Mr. Chaiwat Chaisomboon

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai

ABSTRACT

Background: Infection with high-risk human papillomaviruses (HPV) is the major causal of cervical cancer in women worldwide. Using of Papanicolaou smear for abnormal cytological screening generally has the low sensitivity and need highly skill of technicians.

Objective: To develop TaqMan-based real-time PCR and restriction enzyme analysis (REA) for detection and typing of HPV in cervical scrapes and determine the detection rate and genotype distribution of HPV in women with high-risk STI.

Methods: Primers, probe and appropriate restriction enzymes were selected for TaqMan-based real-time PCR and REA including optimization the assay and DNA extraction procedure. Cervical cell scrapes were collected from 435 women enrolled for Papanicolaou and visual inspection with acetic acid (VIA) screening preserved in *Liqui*-PREP^{TM} solution. DNA was extracted with lysis buffer containing proteinase K. HPV DNA was detected and typing by TaqMan-based real-time PCR and REA with *Mae*III, *Rsa*I and *Mse*I. The negative samples were confirmed by detecting β–globin DNA using the PCR technique.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Results: PGMY09/11- GP6+ and GP5+ were selected to use as primer and probe respectively for development and optimization of TaqMan-based real-time PCR while *Mae*III, *Rsa*I and *Mse*I were selected for REA. Proteinase K at concentration 200 μg/ml and 30 minutes for lysing time were optimum for DNA extraction. After optimization, TaqMan-based real-time PCR assay has sensitivity in detection of HPV recombinant plasmid DNA at 5 fg. Among 453 cervical scraped samples, HPV DNA was detected in 52 samples; 36 from VIA positive and 16 from VIA negative samples. After confirmation with β–globin DNA detection, 86 of 401 samples gave negative results and were excluded from the analysis. Thus, the prevalence of HPV infection was 14.17%. Only 43 of 52 HPV positive samples could be typed successfully within 12 genotypes. HPV16 was the most prevalence detected in 22 (51.16%) followed by 8 (18.60%) for HPV18. HPV51, 58, and 59 were detected in 2 samples each (4.65%) and HPV6, 31, 35, 39, 52, 66, and 72 were detected 1 each (2.33%).

Conclusion: TaqMan-based real-time PCR optimized in this study has sensitivity for detection of HPV recombinant plasmid DNA at 5 fg and the REA can differentiate at least 21 HPV types which covered all the high-risk types. HPV DNA was detected in 14.17% in this study and higher detection rate was observed in VIA positive than the VIA negative women. HPV16 and 18 were detected in 51.16% and 18.60 %, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีแทกแมนเบส เรียลไทม์ โพลีเมอเรส เชน รีแอคชัน และเรสตริกชัน เอนไซม์ แอนาไลซิส เพื่อตรวจหาและจำแนกทัยป์เชื้อฮิวแมนแพปพิลโลมาไวรัส

ผู้เขียน นายไชยวัฒน์ ไชยสมบูรณ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย

บทคัดย่อ

ที่มาและปัญหา: การติดเชื้อ human papillomaviruses (HPV) ชนิดความเสี่ยงสูงเป็นสาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูกในสตรีทั่วโลก การใช้วิธีทางเซลล์วิทยา Pap smear เพื่อตรวจคัดกรองความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุบริเวณปากมดลูกเป็นวิธีที่มีความไวต่ำ และอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจสูง

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาวิธี TaqMan-based real-time PCR และ restriction enzyme analysis (REA) เพื่อตรวจหาและจำแนกทัยป์เชื้อ HPV จากเซลล์ขูดปากมดลูกและหาความชุกและทัยป์ของเชื้อ HPV จากสตรีที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์

วิธีการ: ทำการคัดเลือก primer และ probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ HPV และ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธี TaqMan-based real-time PCR และ REA ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและ ความไวของวิธีที่พัฒนาขึ้น รวมทั้งวิธีสกัด DNA จากเซลล์ เก็บตัวอย่างเซลล์ขูดปากมดลูก จากสตรีที่เข้ารับการตรวจกรองด้วยวิธี Pap smear และ visual inspection with acetic acid (VIA) ในน้ำยา *Liqui*-PREP™ จำนวน 453 ราย ทำการแตกเซลล์ด้วย proteinase K และตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี TaqMan-based Real-time PCR ที่พัฒนาขึ้น ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะทำการจำแนกทัยป์โดยวิธี REA โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mae*III, *Rsa*I และ *Mse*I ตัวอย่างที่ให้ผลลบจะตรวจยืนยันด้วยการตรวจหา β–globin DNA ด้วยวิธีพีซีอาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง: PGMY09/11- GP6+ และ GP5+ ได้ถูกคัดเลือกและปรับแต่งเพื่อใช้เป็น primer และ probe ตามลำดับและหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิธี TaqMan-based real-time PCR เพื่อตรวจหา HPV DNA จากเซลล์ขูดปากมดลูกที่เก็บในน้ำยา *Liqui*-PREP™ ปริมาณ proteinase K และเวลาที่เหมาะสมที่ใช้สกัด DNA คือ 200 μg/ml และ 30 นาทีตามลำดับ วิธี TaqMan-based real-time PCR มีความไวที่ 5 fg ในการตรวจหา HPV DNA ในการตรวจหา HPV DNA จากตัวอย่างเซลล์ขูดปากมดลูกจำนวน 453 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 52 ตัวอย่าง โดยพบในกลุ่ม VIA บวก 36 ตัวอย่าง VIA ลบ 16 ตัวอย่าง ผล HPV ลบ 401 ตัวอย่าง หลังตรวจยืนยัน 86 ตัวอย่างไม่พบ β–globin DNA ซึ่งไม่นำไปรวมในการวิเคราะห์ผล ดังนั้นอัตราการตรวจพบ HPV DNA เท่ากับ 14.17% และตัวอย่างที่ให้ผลบวกสามารถจำแนกทัยป์ได้เพียง 43 ตัวอย่าง โดยตรวจพบทั้งสิ้น 12 ทัยป์ ที่พบมากที่สุดคือ ทัยป์ 16 จำนวน 22 ตัวอย่าง (51.16%) รองลงมาคือทัยป์ 18 จำนวน 8 ตัวอย่าง (18.60%) นอกจากนั้นพบทัยป์ 51, 58 และ 59 ทัยป์ละ 2 ตัวอย่าง (4.65%) ทัยป์ 6 , 31, 35 , 39 , 52 , 66, และ 72 ทัยป์ละ 1 ตัวอย่าง (2.33%)

สรุปผลการทดลอง: วิธี TaqMan-based real-time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองมีความไวในการตรวจหา HPV recombinant plasmid DNA ที่ 5 fg และวิธี REA สามารถจำแนกทัยป์ HPV ได้ 21 ทัยป์ซึ่งครอบคลุมทัยป์ที่เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งสูงได้ทั้งหมด อัตราการตรวจพบ HPV ในกลุ่มตัวอย่าง 14.17% โดยพบในกลุ่ม VIA บวกได้สูงกว่ากลุ่ม VIA ลบ และพบ HPV16 และ 18 ได้สูงสุด 51.16% และ 18.60 % ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved