ความชุกและจีโนไทป์ของการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาของปากมดลูกในประชากรที่มาตรวจที่โรงพยาบาลในประเทศไทย

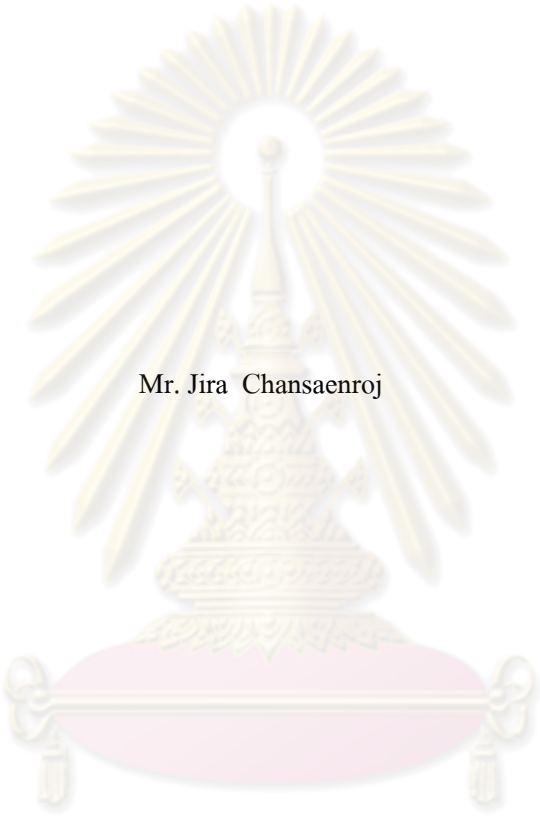
นาย จิระ จันท์แสนโรจน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Prevalence and Genotypes of human papillomavirus infection of cervix among hospital-based population in Thailand

Mr. Jira Chansaenroj



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความชุกและจีโนไทป์ของการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาของปากมดลูกในประชากรที่มาตรวจที่โรงพยาบาลในประเทศไทย
โดย	นายจิระ จันท์แสนโรจน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ยง ภู่วรวรรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ พิเชฐ สัมปทานุกุล)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สัญชัย พยุงภร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายแพทย์ ไพโรจน์ จรรยางค์ดีกุล)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จิระ จันท์แสนโรจน์ : ความชุกและจีโนไทป์ของการติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแปปิโลมาของปากมดลูกในประชากรที่มาตรวจที่โรงพยาบาลในประเทศไทย.
(Prevalence and Genotypes of human papillomavirus infection of cervix among hospital-based population in Thailand) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. นพ. ยง ภู่วรวรรณ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. พิเชฐ สัมปทานุกุล, 55 หน้า.

มะเร็งปากมดลูกนั้นเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 ของประเทศไทย และมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อฮิวแมนแปปิโลมาไวรัส (Human papillomavirus: HPV) โดยสามารถเกิดขึ้นได้กับผู้หญิงในตั้งแต่ช่วงอายุวัยรุ่น ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงทำการศึกษาความชุกของฮิวแมนแปปิโลมาไวรัส และทำการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ในช่วงปีพ.ศ. 2551 และ 2552 จากตัวอย่างเซลล์ของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาล จำนวน 1,698 ตัวอย่าง เป็นจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 848 ตัวอย่าง และโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล 850 ตัวอย่าง โดยได้ทำการตรวจหาเชื้อ HPV ด้วยวิธี semi-nested PCR ที่ใช้ primer ต่อส่วนยีน E1 ของ HPV พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ HPV ทั้งสิ้น 149 ตัวอย่างจากทั้งหมด 1,698 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.8% และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน E1 ของ HPV จากนั้นจึงใช้โปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank เพื่อใช้จำแนกจีโนไทป์ของ HPV พบว่าจีโนไทป์ที่พบมากที่สุด คือ จีโนไทป์ 16 27 ตัวอย่าง จาก 149 ตัวอย่างที่ให้ผลบวก คิดเป็น 18.1% จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด ดังนั้นจากการทดลองแสดงว่าความชุกของ HPV ในประเทศไทยนั้นมีความใกล้เคียงกับกลุ่มประเทศในภูมิภาคเอเชีย และมีจีโนไทป์ 16 เป็นจีโนไทป์หลักที่พบในประเทศไทย ทำให้ช่วยเป็นพื้นฐานในการเฝ้าระวัง ป้องกัน การติดเชื้อไวรัส และการพัฒนาวัคซีนให้มีความเหมาะสมกับประชากรในประเทศไทยต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา....วิทยาศาสตร์การแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต.....จิระ จันท์แสนโรจน์.....
ปีการศึกษา .....2552..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5174867530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : Human papillomavirus / Genotype

JIRA CHANSAENROJ : PREVALENCE AND GENOTYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION OF CERVIX AMONG HOSPITAL-BASED POPULATION IN THAILAND. THESIS ADVISOR: PROF. YONG POOVORAWAN, M.D., THESIS COADVISOR: PROF. PICHET SAMPATANUKUL, M.D., 55 pp.

Cervical cancer is the second cancer in Thailand. Human papillomavirus (HPV) is the main cause for develop cervical cancer and can found since adolescent. We study the prevalence and genotypes of HPV in Thailand during 2008-2009 from women attending cervical screening hospital-based routine check up or investigation and treatment. We collected the cervical cell samples from 1,698 women (848 from King Chulalongkorn Memorial hospital, Bangkok and 850 from Bangkok 9 International hospital, Bangkok). 149 from 1,698 (8.8%) samples yielded the partial HPV E1 gene by semi-nested PCR as a 736-bp product. We subjected to direct sequencing and comparison with nucleotide sequences that stored in GenBank applying the BLAST program. 18.1% of positive samples are conserving with genotype 16. In conclusion the prevalence study of HPV is relate with other country in Asia and showed that HPV genotype 16 also the most prevalence in Thailand. This information is provided the basic knowledge for prevented and developed vaccine for Thailand.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of Study : Medical Science Student's Signature Jira Chansaenroj

Academic Year : 2009 Advisor's Signature Yong Poovorawan

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และได้ทำการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการที่เพียบพร้อม และที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณศาสตราจารย์นายแพทย์พิเชฐ สัมปทานุกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไข ข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความรู้ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ ที่กรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ตลอดจนดำเนินการด้านทะเบียนและประมวลผลการศึกษาตั้งแต่แรกเข้าศึกษากระทั่งสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณครอบครัว เป็นอย่างยิ่งที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ให้ความรักและเป็นกำลังใจจนสำเร็จในการศึกษาครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ฌ
สารบัญภาพ..... ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฏ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2
- ขอบเขตของการวิจัย..... 2
- คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย..... 3
- คำสำคัญ..... 3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
- โครงสร้างของไวรัส…….... 5
- การค้นพบ…… 6
- การติดเชื้อ…… 7
- พยาธิสรีรภาพของการเกิดโรคจาก HPV…….. 9
- การศึกษาเชิงระบาดวิทยาของ HPV…… 12
- ผลของการติดเชื้อ HPV..…….. 14
- อาการ……... 15
- การเก็บตัวอย่างตรวจสำหรับการตรวจ HPV…… 15
- การวินิจฉัย……... 15
- แนวโน้มในการตรวจ HPV DNA…..…….. 17
- แนวทางการปฏิบัติในการตรวจคัดกรอง…….. 17
- การป้องกัน…….. 17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 20
- รูปแบบการวิจัย……..... 20

หน้า

- ประชากรศึกษา…… 20
- การเก็บตัวอย่าง…….... 20
- เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย…..…… 20
- สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย……. 22
- วิธีการดำเนินการวิจัย……... 23
- การวิเคราะห์ข้อมูล..... 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 30
- ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการหา HPV แต่ละคู่ primers…… 30
- ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 30
- ผลการเพิ่มจำนวน DNA ของ DNA ในส่วน E1……... 31
- ผลของการเพิ่มจำนวน Internal control…… 31
- ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ E1 gene…….. 31
- ผลการทำ phylogenetic tree……. 32
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 38
รายการอ้างอิง..... 41
ภาคผนวก..... 47
ภาคผนวก ก..... 48
ภาคผนวก ข..... 49
ภาคผนวก ค……... 50
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงจีโนไทป์ของ HPV ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ.....	8
2.	แสดงตัวอย่างการศึกษาหาความชุกของ HPV ในประชากรผู้หญิงที่มีความเสี่ยงต่ำในการติดเชื้อ HPV……...	12
3.	แสดงลำดับเบส ของ primer แต่ละเส้นที่ใช้ในการทำ PCR……..	25
4.	สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ E1, L1 gene และ Beta-globin gene……..	26
5.	อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน E1, L1 gene และ Beta-globin gene……..…	26
6.	แสดงความชุกของการติดเชื้อ HPV ในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกจำนวนในโรงพยาบาลในประเทศไทย…….	34
7.	แสดงการตรวจพบ HPV DNA ในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกจำนวนในโรงพยาบาลในประเทศไทย……	35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงการจำแนกจีโนไทป์ของ HPV โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ L1 ORF.....	5
2	แสดงโครงสร้างจีโนมของ HPV….....	6
3	แสดงภาพถ่ายอนุภาคของ HPV จีโนไทป์ 1, 6, 16, 18, 31, 33, 35 และ 45 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	9
4	แสดงขั้นตอนการพัฒนาของเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV……..	10
5	แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนของ HPV ในเซลล์เยื่อบุผิว.....	11
6	แผนที่แสดงความชุกของ HPV DNA ที่ได้จากการสำรวจทั่วโลกในผู้หญิงปกติเมื่อปี 2007.....	13
7	แสดงผลผลิตขนาด 136 และ 736 bp ที่ได้จากการทำ nested และ semi-nested PCR ของ HPV ในส่วน L1 และ E1 gene.....	30
8	แสดงผลผลิตขนาด 100 bp ที่ได้จากการทำ PCR ของ Beta-globin gene.....	31
9	แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic ของบริเวณยีน L1 และ E1……	33
10	แสดงความชุกของ HPV จีโนไทป์ต่างๆในผู้หญิงที่ตรวจพบ HPV DNA จากผู้หญิงที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก……	36
11	แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของบริเวณยีน E1 จากตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV DNA ในช่วงปีพ.ศ.2551-2552.....	37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	ความหมาย
µl	Microlitre
AGC	Atypical glandular cells, favor neoplastic
ASC-H	Atypical squamous cells, cannot rule out a high grade lesion
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair
CA	Cervical carcinoma
CIN	Cervical intra-epithelial Neoplasia
CRPV	Cottontail rabbit papillomavirus
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EtOH	Ethanol
HPV	Human papillomavirus
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
IAA	Isoamyl alcohol
kDa	Kilodalton
LCR	Long control region
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
ml	Milliliter
NaOAc	Sodium acetate
nm	Nanometer
ORFs	Open reading frames
pA	Polyadenylation
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tm	Melting temperature

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นมะเร็งที่พบมากในสตรีไทย ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า เชื้อไวรัสฮิวแมนแปปิโลมา (Human papillomavirus, HPV) จีโนไทป์เสี่ยงสูงเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูก และการตรวจทางเซลล์วิทยาด้วยการย้อมสีเซลล์ที่เรียกว่า Papanicolaou (Pap) smear ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการคัดกรองมะเร็งปากมดลูกระยะเริ่มแรก แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดในความไวของผลการอ่าน จึงมีการพัฒนาการตรวจ HPV โดยใช้ DNA ซึ่งจะให้ผลการตรวจที่ดีกว่า [1] อย่างไรก็ตาม HPV DNA testing ที่มีในปัจจุบันใช้ชุดตรวจที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (commercial) ที่ออกแบบไว้ให้ครอบคลุม HPV ทั้งหมด 13 จีโนไทป์ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจทางเซลล์วิทยา พบว่าการตรวจ HPV DNA testing นั้นมีความไวมากกว่าแต่มีความจำเพาะน้อยกว่าในการวินิจฉัยรอยโรคก่อนมะเร็งเมื่อเทียบกับวิธีทางเซลล์วิทยา [2] ในปัจจุบันนี้การตรวจ HPV DNA testing จะใช้ในกรณีที่ การตรวจทางเซลล์วิทยาให้ผลไม่แน่ชัด, ติดตามผลของผู้ที่ตรวจทางเซลล์วิทยาแล้วพบว่าผิดปกติแต่เมื่อตรวจด้วยวิธี colposcopy/biopsy แล้วให้ผลเป็นลบ, ติดตามผลหลังจากการรักษารอยโรคก่อนมะเร็งลุกลามของปากมดลูก (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) ในระยะต่างๆ เนื่องจากมีโอกาสในการติดเชื้อซ้ำ และที่สำคัญที่สุดคือ ใช้เป็นการตรวจเบื้องต้นของ HPV DNA testing ซึ่งอาจใช้ควบคู่กับการตรวจ Pap smear [3] การจำแนกลักษณะของ CIN นั้นจะแยกออกเป็น 3 ระยะตามความรุนแรงของรอยโรคทางด้านเนื้อเยื่อ ในเชิงระบาดวิทยาได้มีการศึกษาอัตราความชุกของผู้ติดเชื้อ HPV ในผู้หญิงที่ปกติ, มีรอยโรคก่อนมะเร็งลุกลามของปากมดลูกระยะที่ 1 และตั้งแต่ระยะที่ 2 ขึ้นไปพบเชื้อ HPV อยู่ 7.6 %, 42.3 % และ 87.5 % ตามลำดับ โดยจีโนไทป์16 เป็นจีโนไทป์ที่พบได้ทั่วไปในทุกกลุ่ม และพบมากในกลุ่มระยะที่ 2 ขึ้นไป รองลงมาคือจีโนไทป์ 18 [4] เมื่อพิจารณาในระดับโมเลกุล การเกิดกลไกการจำลอง DNA ของไวรัส จำเป็นต้องอาศัยโปรตีน E1 โดยจะมีบริเวณจำเพาะที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการคลายเกลียวของสาย DNA ซึ่งมีความสำคัญในการจำลองสาย DNA [5] แสดงให้เห็นว่าโปรตีน E1 จำเป็นต่อการคงอยู่ของไวรัส จึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นยาต้านไวรัส ในระยะเซลล์มะเร็งเริ่มต้น [6]

ในทางคลินิก มีหลักฐานว่าในกลุ่ม HPV ความเสี่ยงสูงบางจีโนไทป์ ได้แก่ จีโนไทป์ 16 และ 18 มีความเสี่ยงในการเกิดเป็นรอยโรคที่จะรุนแรงขึ้นเป็นมะเร็งได้มากกว่าจีโนไทป์อื่น ดังนั้นจึงมีความต้องการตรวจ HPV genotype testing เพื่อระบุจีโนไทป์ที่ก่อให้เกิดรอยโรคก่อนมะเร็งลุกลามของปากมดลูก แต่การกระจายตัวและความชุกของ HPV นั้นขึ้นกับภูมิประเทศและ

ประชากร [7] โดยพบจีโนไทป์ 16 มากที่สุด แต่อันดับที่ 2 จะมีความชุกของจีโนไทป์ต่างกันในแต่ละพื้นที่ เช่น ในอินโดนีเซียเป็นจีโนไทป์ 18, ในรัสเซียเป็นจีโนไทป์ 31, ในอินเดียเป็นจีโนไทป์ 45 และในอิตาลีเป็นจีโนไทป์ 51 และแม้ว่าในปัจจุบันจะมีวัคซีนที่ป้องกันจีโนไทป์ 16 และ 18 ได้ แต่จะเห็นได้ว่าวัคซีนในปัจจุบันนั้นไม่สามารถครอบคลุมประชากรทั้งหมดได้ และชุดตรวจที่ผลิตเชิงพาณิชย์ในปัจจุบันมีข้อกำจัดในการจำแนกจีโนไทป์ของไวรัส ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องทราบถึงความชุกของไวรัสเพื่อใช้พิจารณาในการรักษาและสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นจากการกระจายตัวของไวรัสหลังจากการได้รับวัคซีนในแต่ละพื้นที่ [8-11]

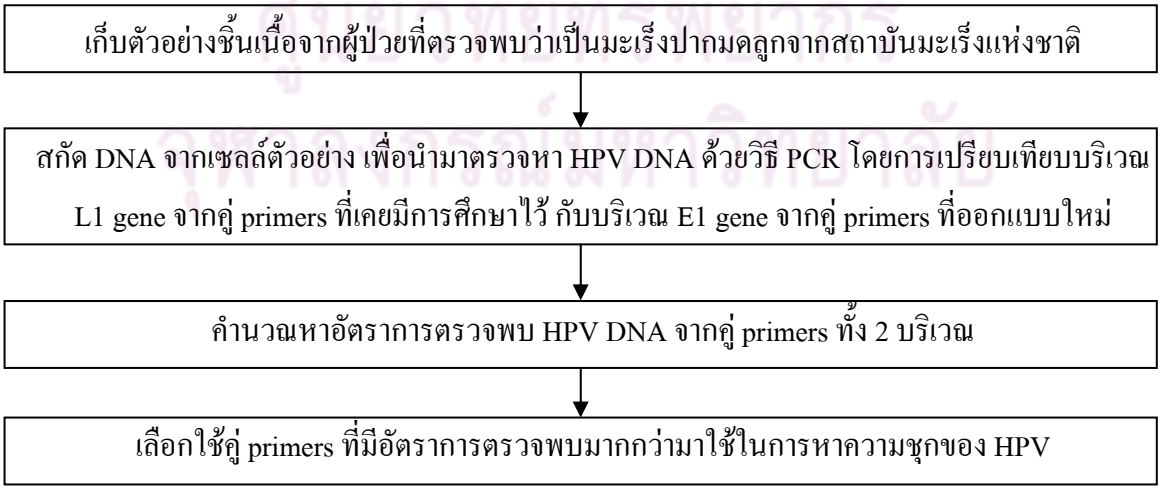
การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาความชุกและจีโนไทป์ของ HPV ในกลุ่มประชากรตัวอย่าง ด้วยการพัฒนาชุดตรวจให้ครอบคลุมทั้งหมด 17 จีโนไทป์ ทั้งในกลุ่มความเสี่ยงสูงและต่ำ โดยใช้บริเวณยีน E1 ของ HPV และนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก มาหาจีโนไทป์ของไวรัส ไว้เป็นข้อมูลความชุกและจีโนไทป์จากการติดเชื้อ HPV ในประชากรตัวอย่างในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเฝ้าระวัง ป้องกัน รักษา ผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อ และผู้ป่วยที่มีรอยโรคก่อนมะเร็งลุกลามของปากมดลูก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

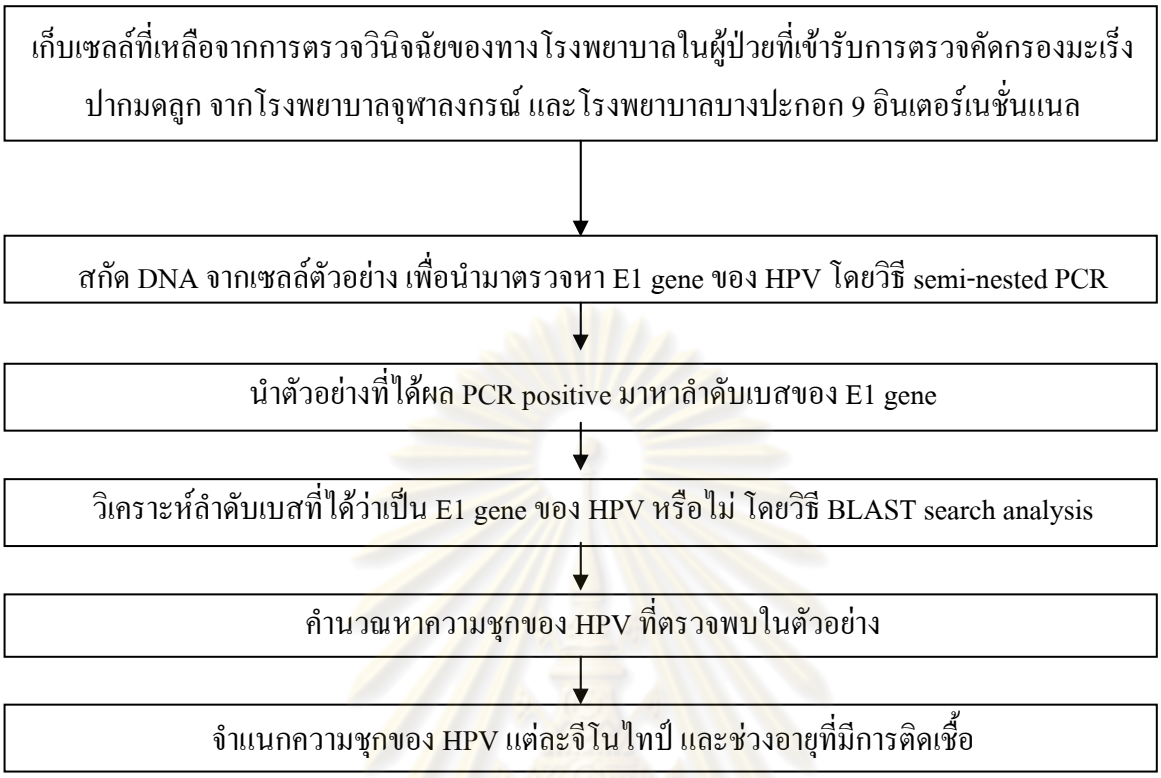
1. ศึกษาความชุกของเชื้อ HPV ในกลุ่มประชากรตัวอย่างในประเทศไทย
2. จำแนกจีโนไทป์ของเชื้อ HPV ในกลุ่มประชากรตัวอย่างในประเทศไทย

ขอบเขตของการวิจัย

การหาอัตราการตรวจพบ HPV DNA



การหาความชุกของ HPV



คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

จีโนไทป์ คือ การแบ่งกลุ่มของไวรัสฮิวแมนแปปิโลมา โดยวิธีการถอดรหัสพันธุกรรม

คำสำคัญ

Human papillomavirus

Genotype

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เนื่องจากข้อมูลของ HPV ในประเทศไทยยังมีไม่มาก ดังนั้นการหาไวรัสนี้มีประโยชน์ดังนี้

1.ทำให้ทราบความชุกของ HPV ในประเทศไทยจากกลุ่มตัวอย่างที่เข้ารับการตรวจในโรงพยาบาล

2.ทำให้ทราบการกระจายตัวของจีโนไทป์ของ HPV และช่วงอายุที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อในประเทศไทย

3.นำข้อมูลไปเพื่อประกอบการติดตาม เฝ้าระวัง วางแผนป้องกัน การรักษา

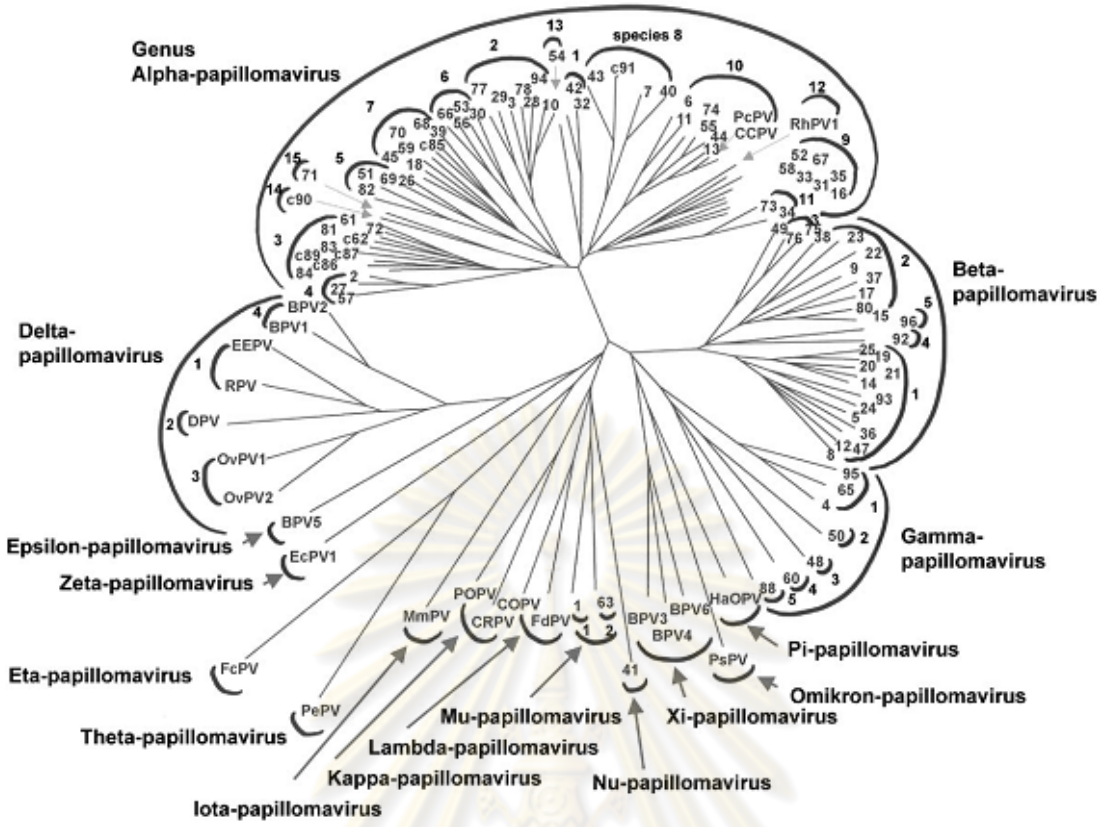
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Papillomaviruses นั้นจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ Polyomavirus ใน Papovavirus family เนื่องจากมีคุณสมบัติคล้ายกัน คือ มีขนาดเล็ก, เป็น nonenveloped virion, มี icosahedral capsid, มีจีโนมเป็น double-strand circular DNA ต่างกันเพียง Papillomavirus มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคประมาณ 55 nm ในขณะที่ Polyomavirus นั้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 45 nm นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในระดับโมเลกุลแล้วพบว่า Papillomavirus นั้นจะมีส่วนประกอบของ open reading frames (ORFs) ที่มากกว่า ทำให้สามารถสร้าง structure และ non-structure proteins ได้หลากหลายกว่า นอกจากนี้ในขั้นตอนการถอดรหัสพันธุกรรมนั้น Papillomavirus จะมีการถอดรหัสพันธุกรรมจากสาย DNA เส้นเดียวกันทั้งหมด การจำแนกความแตกต่างของ virus ทั้ง 2 นี้ จะอาศัย epitope บน major capsid protein [12] Papillomavirus นั้นพบว่ามีการแพร่กระจายมากในกลุ่มที่เป็น higher vetebrates เช่น ในคน, วัว, ม้า, กระต่าย, กวาง, หนู เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว Papillomavirus จะมีความจำเพาะในแต่ละ species [13] ในปัจจุบันพบ Human papillomavirus มากกว่า 100 จีโนไทป์ ซึ่งจำแนกจีโนไทป์โดยอาศัยขนาด homology ของ DNA ด้วยวิธี Liquid hybridization แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่จำเพาะ [14] ซึ่งการจำแนกจีโนไทป์นั้น อาศัยเกณฑ์ที่ยอมรับโดย Papillomavirus Nomenclature Committee คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ E6, E7, L1 ORFs ของสายพันธุ์ใหม่ต้องมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 90% ของจีโนม HPV ที่รู้จีโนไทป์แล้ว [15]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

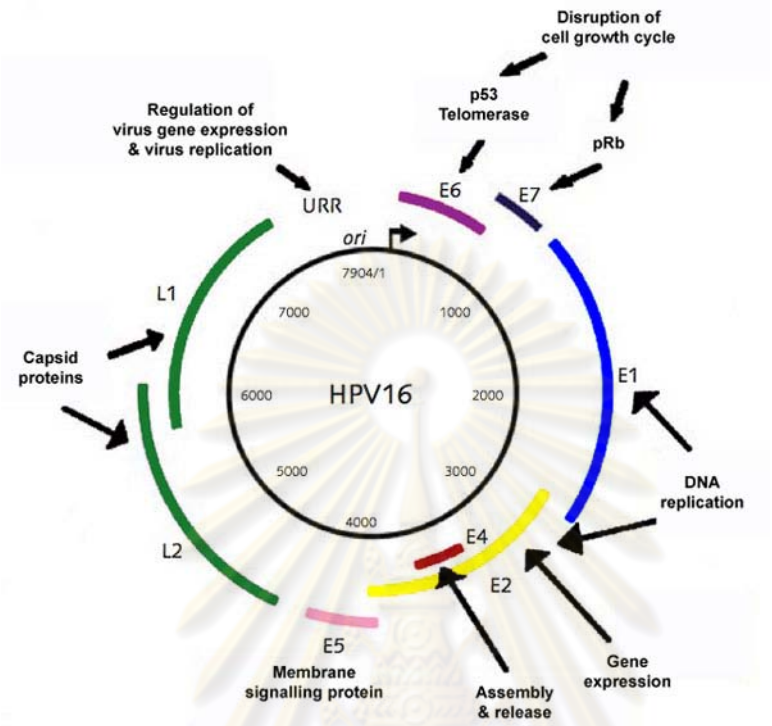


<u>รูปที่1</u> แสดงการจำแนกจีโนไทป์ของ HPV โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ L1 ORF (De Villiers et al., 2004) [74]

โครงสร้างของไวรัส

Papillomavirus มีอนุภาคขนาดเล็ก, nonenveloped, icosahedral DNA virus มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 52 ถึง 55 nm เป็น double-stranded circular DNA ประมาณ 8,000 bp และมี protein coat (capsid) ประกอบด้วย 72 capsomers (60 hexameric + 12 pentameric) [16] Capsid ประกอบด้วย 2 structural proteins คือ 1. major capsid protein (L1) ขนาดประมาณ 55 kDa ซึ่งมีประมาณ 80% ของ viral protein ทั้งหมด 2. minor protein (L2) ขนาดประมาณ 70 kDa [17,18] จีโนมของ Papillomavirus สามารถแบ่งได้เป็น 3 regions หลัก คือ early(E), late(L) และ long control region (LCR) region โดยแบ่งที่บริเวณ polyadenylation (pA) โดย early region ของ Papillomavirus จะครอบคลุมมากกว่า 50 % ของจีโนมไวรัส และถอดรหัสให้เป็น 6 viral regulatory proteins รวมถึง viral protein ที่จำเป็นในการเกิด viral DNA replication ขณะที่ late region จะครอบคลุมประมาณ 40 % ของไวรัสจีโนม และอยู่ถัดจาก early region จะถอดรหัสให้ major (L1) และ minor (L2) viral capsid proteins และทั่วไปจะมีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ที่มีการติดเชื้อเท่านั้น LCR region ซึ่งมีความยาวประมาณ 850 bp (10 % ของ HPV จีโนม) จะไม่มีการ

ถอดรหัสให้โปรตีน แต่เป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดการจำลองตัวเอง โดยเป็น binding sites ของ transcription factor หลายชนิด ซึ่งมีความสำคัญในการควบคุม RNA polymerase II-initiated transcription ของ early และ late promoters [19-21]



รูปที่2 แสดงโครงสร้างจีโนมของ HPV และหน้าที่ในแต่ละ gene ของ HPV (MicrobiologyBytes, 2007) [22]

ใน HPV ทุกจีโนไทป์ บริเวณที่มีความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด คือบริเวณที่แปลรหัสพันธุกรรมให้โปรตีน E1 ซึ่งมีขนาด 68 kDa โปรตีน E1 เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ เป็น acidic โปรตีน มีค่า isoelectric point เฉลี่ยอยู่ที่ 5.44 [23] E1 gene มีความเกี่ยวข้องโดยตรงในการควบคุมการจำลองตัวเองของไวรัส ซึ่ง E1 ORF เป็น ORF ที่ใหญ่ที่สุดในจีโนมของ Papillomavirus และมีความเหมือนกันในทุกสายพันธุ์ของ Papillomavirus E1 protein มีคุณสมบัติของ DNA-dependent ATPase และ DNA helicase ซึ่งมีความจำเป็นในขั้นตอน initiation และ elongation ของ viral DNA systhesis [24]

การค้นพบ

Papillomavirus ในสัตว์พบครั้งแรกในปีคริสตศักราช 1930 โดย Richard Shope ได้ทำการศึกษาใน cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*) และให้ชื่อว่า cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) ซึ่งเป็น DNA tumor virus ตัวแรกที่พบ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของเนื้อร้ายได้ จึงเป็นตัวอย่างที่สำคัญในการศึกษาการเกิดมะเร็งจากการติดเชื้อไวรัส แต่เนื่องจาก

ในสมัยนั้นยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยง CRPV ได้ เนื่องจากยากในการหาระบบเซลล์เพาะเลี้ยง ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัส ทำให้เป็นอุปสรรคในการศึกษาการทำงาน และการจัดจำแนกประเภทจากคุณสมบัติทางชีววิทยาของไวรัสนี้ จนถึงช่วงปีคริสตศักราช 1970 จึงสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ทำให้สามารถศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาและชีวเคมีได้มากขึ้น [25]

ขณะที่ผู้ค้นพบเชื้อ Human papillomavirus (HPV) ในมนุษย์ คือ ศาสตราจารย์เกียรติคุณนายแพทย์ Harald zur Hausen จนได้รับ Nobel Prize in Medicine 2008 ทำให้เกิดความเข้าใจที่ถูกต้อง ในการนำไปสู่การป้องกันและรักษามะเร็งปากมดลูกที่ดีขึ้น จนสามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งปากมดลูกและการตายจากโรคนี้ลงอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งนำไปสู่การคิดค้นวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

การติดเชื้อ

Papillomavirus สามารถแบ่งได้ออกเป็น 5 clades คือ clade A-E และสามารถพบ HPV ได้ใน 3 clades คือ clade A, B และ E [26] ซึ่งในปัจจุบันนี้สามารถทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Papillomavirus แล้วหลายจีโนไทป์ และพบว่าเกิด mutations กระจายทั่วไปในจีโนมมากกว่าการเกิด recombination ระหว่างจีโนม ในระดับจีโนมของ Papillomavirus นั้น จะมีส่วนของ regulatory region หลัก คือ LCR [27] และ coding region ในการควบคุม nonstructural และ structural proteins โดย nonstructural viral gene ประกอบด้วย E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 และ 2 ORFs ซึ่งแต่ละ gene นั้นมีหลายหน้าที่ด้วยกัน เช่น E1 มี DNA replicase activity ซึ่งจำเป็นในการเกิด viral DNA replication, E2 มีหน้าที่เป็น trans-activating และ trans-repressor transcription และมีส่วนในการเกิด viral DNA replication โดยการจับกับของ E2 protein ที่บริเวณ motif ที่จำเพาะในจีโนมของไวรัสโดยเฉพาะอย่างที่ในบริเวณ LCR และควบคุมการสร้าง regulatory protein ที่คุม viral promoter ในการแสดงออกของยีน E6 และ E7, E4 นั้นถอดรหัสพันธุกรรมให้ cytoplasmic phosphoprotein และมี 3 oncogenes คือ E5, E6 และ E7 [28] ซึ่ง E5 protein จะทำปฏิกิริยากับ activate growth factor receptors, E6 protein ทำหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิด ubiquitin-dependent degradation ของ p53 tumor suppressor protein ทำให้เกิดการแตกตัวของโปรตีน p53 นำไปสู่ภาวะ genome instability และ E7 protein จะยับยั้ง retinoblastoma suppressor protein (pRb) ทำให้เกิดการ transcription ของยีนที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ส่วน structural protein มี 2 ชนิด คือ L1 และ L2 ซึ่งจำเป็นในกระบวนการ encapsidation ของไวรัส

Papillomavirus นั้นยากในการทำใน *in vitro* เนื่องจากว่าไวรัสนี้จะมีการจำลองตัวเองในชั้น squamous epithelium ซึ่งมีลักษณะไม่เหมือนใน monolayer ของเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นการตรวจหาไวรัสนี้จึงนิยมใช้วิธีการตรวจหา DNA ของไวรัส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ hybridization มากกว่าการทำ virus isolation

Papillomavirus สามารถติดเชื้อผ่านทางเมือก และเนื้อเยื่อที่ผิวหนัง บริเวณที่มีรอยฉีกขาดหรือถลอก เป็นไวรัสที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอตชั้นสูง ที่มีการเปลี่ยนแปลงของจีโนมน้อย การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการมีเพศสัมพันธ์ และมีหลักฐานว่าสามารถติดต่อจากมารดาสู่ทารกได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มความเสี่ยงต่ำ และสามารถหายเองได้ภายใน 1 ถึง 2 ปี แต่ในกลุ่มที่ติดเชื้อหลายปีจะมีโอกาสที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งมะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 ของผู้หญิงทั่วโลก มีผู้เสียชีวิต 2.8 แสนคน และติดเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 5 แสนคนต่อปี [29] ซึ่งสามารถพบ HPV ได้มากกว่า 25 จีโนไทป์ที่ทำให้เกิดรอยโรคในบริเวณระบบอวัยวะสืบพันธุ์ โดยบางจีโนไทป์จะมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรอยโรคในมะเร็งปากมดลูก การจำแนกจีโนไทป์ของ HPV นั้นอาศัยความสัมพันธ์ในการเกิดโรค, ระยะเวลาในการติดเชื้อ และความสามารถของโปรตีน E6 และ E7 ในการจับตัวกับ tumor suppressor gene โดยแบ่งเป็น

1.) กลุ่มความเสี่ยงสูง (High-risk type) เช่น จีโนไทป์ 16, 18 และ 45

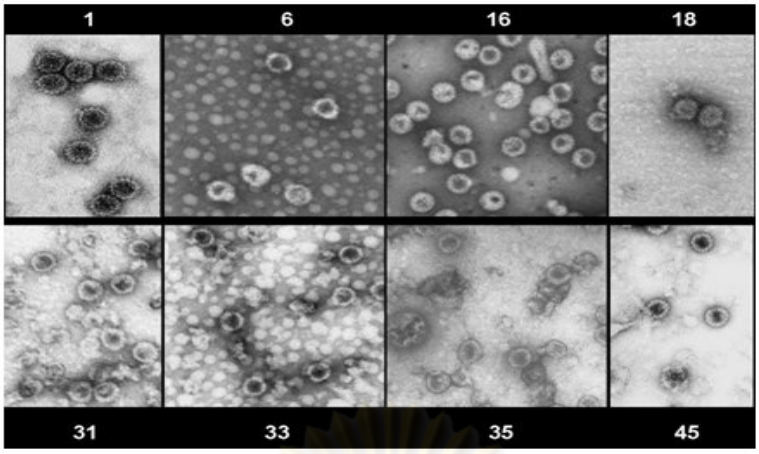
2.) กลุ่มความเสี่ยงค่อนข้างสูง (Probably high-risk type) เช่น จีโนไทป์ 31, 33, 35, 51 และ 52

3.) กลุ่มความเสี่ยงต่ำ (Low-risk type) เช่น จีโนไทป์ 6, 11, 42, 43 และ 44 [30, 31]

ตารางที่1 แสดงจีโนไทป์ของ HPV ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ [32]

Disease	**HPV type**
Common warts	2, 7
Plantar warts	1, 2, 4
Flat warts	3, 10
Anogenital warts	6, 11, 42, 43, 44, 55 and others
Genital cancers	High-risk: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 Probably high-risk: 26, 53, 66
Focal epithelial hyperplasia (oral)	13, 32
Oral papillomas	6, 7, 11, 16, 32

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่3 แสดงภาพถ่ายอนุภาคของ HPV จีโนไทป์ 1, 6, 16, 18, 31, 33, 35 และ 45 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (K. Shetty & J. Leigh, 2005) [33]

พยาธิสรีรภาพของการเกิดโรคจาก HPV

Human papillomavirus ในคน นั้นสามารถพบได้ที่บริเวณมะเร็งที่ปากมดลูก และมะเร็งที่ทวารหนัก โดยเฉพาะจีโนไทป์ 16, 18, 31, 45 และยังสามารถพบได้ในมะเร็งที่ช่องคลอด และมะเร็งที่ช่องปากอีกด้วย HPV สามารถทำให้เกิดหูด (warts) บนผิวหนัง หรือ condylomas ในระบบอวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อเชื้อ HPV ผ่านทางรอยแผลที่เยื่อบุผิวชั้นนอกของอวัยวะ เชื้อจะเข้าไปเกาะภายในเซลล์เยื่อบุผิวชั้นล่าง (Basal and Para basal layer) ซึ่งเป็น Stem cell จากนั้นวงจรชีวิตของ HPV ในร่างกายก็เริ่มขึ้น โดยมี 2 ระยะ คือ

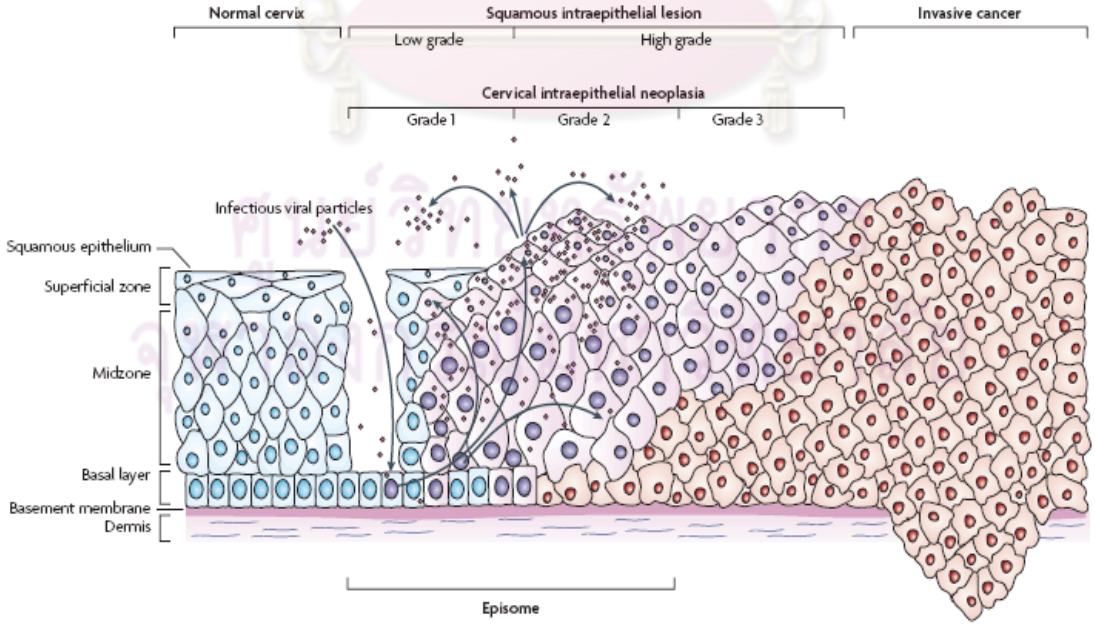
- ระยะแรก : Basal DNA Replication มีการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัส ประมาณ 100 ชุดของยีน และคงจำนวนต่ำๆ ภายในเซลล์เยื่อบุผิวเช่นนี้อยู่ช่วงหนึ่ง เป็นการติดเชื้อแบบคงอยู่นาน (Persistent infection) ภูมิคุ้มกันของร่างกายจะพยายามตรึงเชื้อ HPV ให้สงบอยู่เช่นนี้ไปได้นาน แม้จะไม่สามารถกำจัดเชื้อออกได้หมดก็ตาม
- ระยะหลัง : เมื่อเซลล์เยื่อบุผิวชั้นล่างที่ติดเชื้อถูกดันขยายตัวขึ้นในแนวดิ่ง (Vertical Expansion) สู่ชั้นผิวด้านบนตามธรรมชาติแล้ว ช่วงระยะนี้ เซลล์จะหยุดการแบ่งตัว

เนื่องจากผิวของปากมดลูกบริเวณ Transformation zone เป็นบริเวณที่มีความไวต่อการกระตุ้นจาก HPV และเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่าเยื่อบุบริเวณอื่น จึงทำให้พบรอยโรค (Lesion) และมะเร็งที่ปากมดลูกมากกว่าส่วนอื่นของอวัยวะสืบพันธุ์หลายเท่าตัว ไวรัสนี้สามารถอยู่ได้นานเป็นเดือนหรือปีและสามารถหายไปเองได้

การติดเชื้อที่เยื่อบุผิวชั้นนอกเป็นเวลานานเกิน 6-12 เดือน ถือเป็นขั้นตอนสำคัญ ที่จะทำให้เยื่อบุผิวปากมดลูกเปลี่ยนแปลงสู่ระยะก่อนมะเร็ง และมะเร็งปากมดลูก โดยอาจเกิดการเจริญ

ออกมาที่ชั้นบนของเยื่อบุผิวชั้นนอก เนื่องจากปกติ บริเวณชั้นล่างของเยื่อบุผิวชั้นนอกจะมีจำนวนไวรัสอยู่ในปริมาณน้อยและมีการถอดรหัสสารพันธุกรรมเป็น RNA ปริมาณน้อยด้วย และจะมีการแสดงออกของ viral protein ต่างๆ ในปริมาณมากเมื่ออยู่บริเวณชั้นบนของเยื่อบุผิวชั้นนอก อีกทั้งไวรัสจะยังคงอยู่ในเซลล์จนกว่าจะเกิดการหลุดลอกของเซลล์ [34] โดยทั่วไปจะพบความผิดปกติของผลการตรวจทางเซลล์วิทยา ได้ประมาณ 25-40 % ภายในเวลา 1-3 ปี หลังจากเริ่มตรวจพบเชื้อ

การติดเชื้อเป็นเวลานานของกลุ่มจีโนไทป์ความเสี่ยงสูง โดยเฉพาะเมื่อมีปริมาณไวรัสมากและอยู่ในบริเวณที่มีความเสี่ยงในการเกิดรอยโรคที่รุนแรงขึ้นเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการพัฒนาเป็นเนื้อร้ายได้ การติดเชื้อส่วนใหญ่จาก HPV oncogenic types จะเกิดเป็นรอยโรคก่อนที่จะพัฒนาขึ้นไปเป็นเนื้อร้ายแล้วกลายเป็นมะเร็งอย่างรวดเร็ว แต่การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้จะเกิดกับผู้ที่ติดเชื้อ HPV แบบคงอยู่นานบางรายเท่านั้น เนื่องจากผู้หญิงที่ได้รับ HPV ส่วนใหญ่รอยโรคจะหายได้เองภายใน 1-2 ปี ซึ่งขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างเช่น การสูบบุหรี่, การตั้งครรภ์, การมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุยังน้อย, การมีคู่นอนหลายคน และผู้หญิงที่ติดเชื้อ Human Immunodeficiency Virus (HIV) ร่วมด้วยจะมีความเสี่ยงสูงกว่าในการพัฒนาเป็นมะเร็ง [35, 36, 37] ลักษณะของรอยโรคบริเวณปากมดลูกที่ติดเชื้อไวรัสก่อนที่จะเป็นมะเร็งปากมดลูก สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ CIN 1 (Cervical intra-epithelial Neoplasia หรือ Low – Grade Lesion, LGL) เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงน้อย, CIN 2 เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงปานกลาง แต่ไม่มีการเพิ่มจำนวนไวรัส และ CIN 3 (High - Grade Lesion, HGL) เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงมาก และมีปริมาณโปรตีน E6 และ E7 มาก ซึ่งอาจจะพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ [38]

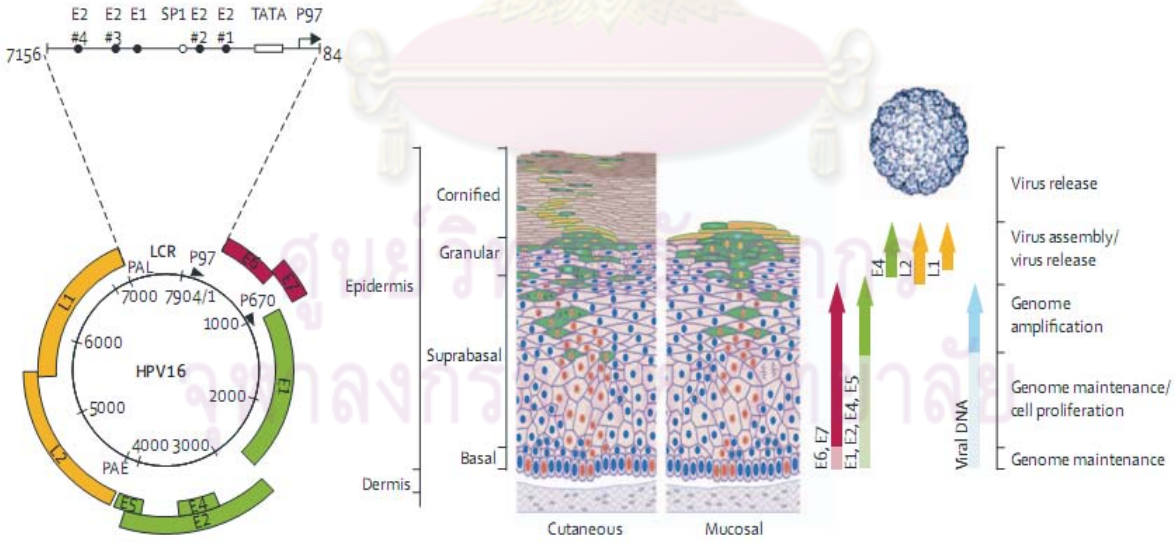


<u>รูปที่4</u> แสดงขั้นตอนการพัฒนาของเซลล์ที่ติดเชื้อ HPV (Ciaran B. J. Woodman. Et al., 2007) [75]

เนื่องจากการติดเชื้อ HPV นั้นอยู่ในระดับเยื่อบุผิว จึงมีผลในการกระตุ้นให้ร่างกายผู้ติดเชื้อสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัสนี้น้อยกว่าไวรัสชนิดอื่น ทำให้ผู้ที่เคยรับเชื้อมีภูมิคุ้มกันอยู่ในระดับต่ำ เพราะฉะนั้นผู้ที่เคยติดเชื้อ HPV และรอยโรคหายไปแล้ว สามารถติดเชื้อ HPV จีโนไทป์เดิมได้ใหม่ ต่างจากภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการฉีดวัคซีน ซึ่งจะกระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อ HPV อยู่ในระดับที่สูงกว่าจากการติดเชื้อจากธรรมชาติประมาณ 11 เท่า

จากการศึกษาพบว่าในเซลล์ที่เกิดเป็นมะเร็งนั้น ส่วนใหญ่พบว่ามาจาก HPV จีโนไทป์ 16 และ 18 [39] โดยเมื่อไวรัสเข้าสู่เซลล์จะเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสรวมเข้ากับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน เกิดการจำลอง DNA ของไวรัสพร้อมกับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน E สร้างกลุ่มโปรตีน E ซึ่งโปรตีน E1, E2, E5, E6 และ E7 จะมีการแสดงออกก่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ขณะที่โปรตีน E4 จะมีการแสดงออกตลอดเวลา และโปรตีน L1 และ L2 จะแสดงออกในระยะสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์

โปรตีน E1 และ E2 จะกระตุ้นให้เกิดการจำลอง DNA ตลอด และเกิดการเจริญและแบ่งเซลล์ ทำให้จำนวนไวรัสในเซลล์เพิ่มขึ้น จนกระทั่งมีจำนวนไวรัสอย่างน้อย 1 พันcopies/เซลล์ และควบคุมการถอดรหัสของจีโนมไวรัส, โปรตีน E4 กระตุ้นการสร้างไวรัสให้อยู่ในระยะแบ่งตัว, โปรตีน E5 กระตุ้นให้มีการสร้าง growth factor, โปรตีน E6 และ E7 ยับยั้งการแปลรหัสของเซลล์เจ้าบ้าน เซลล์จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จากนั้นจะสร้างแคปซิสโปรตีน L1 และ L2 ร่วมกับโปรตีน E [40]



<u>รูปที่5</u> แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีนของ HPV ในเซลล์เยื่อบุผิว (Schiffman M. et al., 2007) [41]

การศึกษาเชิงระบาดวิทยาของ HPV

ความชุกของการติดเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับอายุและความไวของวิธีตรวจ HPV DNA ซึ่งพบมากในผู้หญิงช่วงอายุ 15-25 ปี ถึง 25-40 % และลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น และจะพบมากขึ้นอีกครั้งในผู้หญิงอายุ 60 ปีขึ้นไป [36] และได้มีรายงานการศึกษาความชุกของ HPV ในสตรีที่มีผลการตรวจทางเซลล์วิทยาของปากมดลูกปกติพบว่า มีผู้ที่ติดเชื้อไวรัสถึง 10.4 % โดยแบ่งเป็นแอฟริกา 22.1 %, อเมริกาเหนือ 11.3 %, ยุโรป 8.1 % และเอเชีย 8.0 % [42]

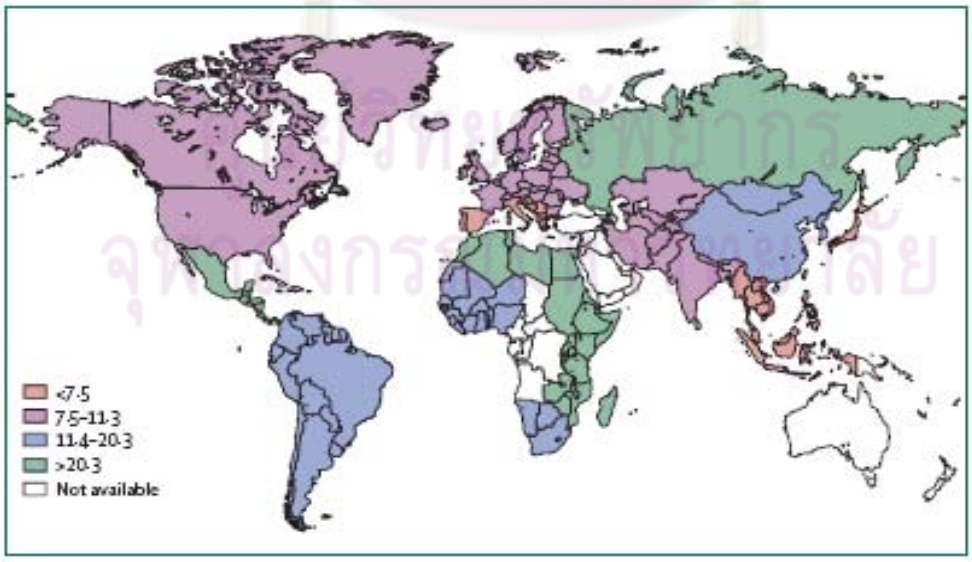
ตารางที่2 แสดงการศึกษาความชุกของ HPV ในประชากรผู้หญิงที่มีความเสี่ยงต่ำในการติดเชื้อ HPV

ประเทศ	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มทดสอบ	วิธีทดสอบ	Prevalence (%)	เอกสารอ้างอิง
Nigeria	Ecto/endocervix-brush	Population-based	GP5+/GP6+	24.8	[43]
Mozambique	Cervix-smear	Population-based	MY09/MY11	40.0	[44]
Zimbabwe	Cervicovaginal-lavage	Population-based	GP5+/GP6+	27.0	[45]
Morocco	Cervix-brush	Cytological normal hospital-based controls	GP5+/GP6+	20.5	[46]
Chile	Ectocervix-spatula Endocervix-brush	Population-based random sample	GP5+/GP6+	12.8	[47]
Mexico	Cervix-brush	Population-based random sample	PCR with L1 primer	14.5	[48]
United State of America	Ecto/endocervix-brush	Population-based random sample	MY09/MY11	9.2	[49]
Australia	Self-sampled	Virgin and cytologically normal women attending outpatient clinic	PCR with L1 consensus primers	6.0	[50]
India	Cervix-broom, brush	Population-based random sample	GP5+/GP6+	16.9	[51]
South Korea	Cervix-swab	Hospital-based population	GP5+/GP6+	35.1	[52]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเทศ	บริเวณที่เก็บตัวอย่าง	กลุ่มทดสอบ	วิธีทดสอบ	Prevalence (%)	เอกสารอ้างอิง
Japan	Cervix-swab	Population-based random sample	PCR L1 primer (6, 11, 16, 18, 31, 33, 52, 58)	10.7	[53]
Philippines	Cervix-brush	Hospital-based controls	GP5+/GP6+	9.2	[54]
Belgium	Cervix-smear	Routine cervical cancer screening	GP5+/GP6+	6.9	[55]
Italy	Cervix-brush	Population-based random sample	GP5+/GP6+	8.8	[56]
Norway	Cervix-smear, brush	Outpatient population-based screening study	GP5+/GP6+	10.4	[57]
England	Cervix-spatula	Routine cervical cancer screening	MY09/MY11	7.3	[58]

ในประเทศไทยมะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 2 โดยอยู่ในอัตราเฉลี่ย 20 % ต่อประชากร 1 แสนคนต่อปี ชนิดที่พบบ่อยที่สุด คือ ชนิด Squamous cell carcinoma ซึ่งเป็นเซลล์ในกลุ่มเยื่อบุปากมดลูกด้านนอก พบได้ประมาณ 80 %



<u>รูปที่6</u> แผนที่แสดงความชุกของ HPV DNA จากการสำรวจในผู้หญิงปกติทั่วโลกเมื่อปี 2007 (Sanjose S. et al., 2007) [42]

การติดเชื้อในระยะซ่อนเร้น จะมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสเพียงชั่วคราว และจะควบคุมให้รักษาระดับของ DNA ให้มีจำนวนน้อย อยู่ในระดับ 50-200 copies ของ DNA ไวรัส ไปควบคู่กันกับการจำลองตัวเองของไวรัสใน S phase เฉลี่ยแล้ว 1 ครั้งต่อวงชีวิตของเซลล์ ส่วนประกอบที่สำคัญในการรักษาระดับ DNA ไวรัส คือ cis-acting replication origin, โปรตีน E1 และ E2 จนกว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ไวรัสจะมีอัตราการจำลองตัวเองสูงขึ้น [59] ทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนโครงสร้างมากขึ้น จนเกิดการหลุดออกนอกเซลล์เพื่อแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่น ซึ่งการติดเชื้อ HPV ในระยะ low-grade lesion นั้นจะพบ HPV DNA อยู่บริเวณผิวเซลล์ และจะมีการรวมตัวกับโครโมโซมของเซลล์เจ้าบ้านในระยะ high-grade lesion และมะเร็ง [60] Copy number ของ HPV DNA ที่เพิ่มขึ้นจากการจำลองตัวเองอย่างต่อเนื่องทั้งใน S phase ของเซลล์ปกติ และใน S phase ในเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากการติดเชื้อไวรัส จะมีการเพิ่มจำนวนอย่างสุ่มขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส [61]

ผลของการติดเชื้อ HPV

กลุ่มสตรี: การติดเชื้อ HPV ความเสี่ยงต่ำทำให้เกิดหูดหงอนไก่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนชนิดความเสี่ยงสูง อาจก่อให้เกิดความผิดปกติของเซลล์บริเวณ ano-genital จนถึงขั้นเป็นมะเร็ง แต่เนื่องจากส่วนใหญ่แล้วการติดเชื้อมักเป็นแบบชั่วคราว ทำให้ประมาณ 70 % ของผู้หญิงที่ติดเชื้อ HPV จะมีผลตรวจ HPV DNA เป็นลบภายใน 1 ปี แม้ว่า HPV สายพันธุ์ 16 จะมีแนวโน้มที่จะคงสภาพการติดเชื้ออยู่นานกว่าสายพันธุ์อื่น แต่ส่วนมากก็หายไปภายใน 2 ปี แสดงว่าผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่มีกลไกในการขจัดเชื้อออกจากร่างกายตามธรรมชาติ แม้ว่าผลการตรวจ HPV DNA เป็นลบ แต่อาจมีเชื้อบางส่วนซ่อนเร้นอยู่ในร่างกายและสามารถเกิดขึ้นอีกได้ในภายหลังก็ตาม จากการศึกษาพบว่าเชื้อเหล่านี้มีความเสี่ยงต่ำมากต่อการก่อเกิดมะเร็งในภายหลัง

กลุ่มบุรุษ: การติดเชื้อ HPV ในกลุ่มความเสี่ยงต่ำ ก่อให้เกิดหูดหงอนไก่ที่บริเวณองคชาตได้เช่นกัน ส่วนชนิดความเสี่ยงสูง ส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดรอยโรคก่อนมะเร็ง ชนิด Squamous ของอวัยวะเพศชาย องคชาตและของทวารหนัก รวมถึงมะเร็งด้วยมะเร็งขององคชาตพบค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะชายที่ผ่านการขลิบหนังหุ้มปลายมาแล้ว แต่มะเร็งของทวารหนักกลับมีแนวโน้มสูงขึ้นชัดเจนในกลุ่มชายรักร่วมเพศ จึงมีแพทย์บางกลุ่มเสนอแนะให้มีการตรวจคัดกรองรอยโรคก่อนมะเร็งของช่องทวารหนักทางเซลล์วิทยาในประชากรกลุ่มนี้

กลุ่มเด็ก: การติดเชื้อ HPV จากแม่สู่ลูกเกิดได้ยากมาก เด็กที่ติดเชื้อ HPV ความเสี่ยงต่ำจากการคลอดอาจทำให้เกิดหูดในทางเดินหายใจของเด็ก แต่พบได้น้อยมาก (0.4-1.1 ราย ต่อการคลอดมีชีวิต 1 แสนราย จากแม่ที่มีประวัติเคยเป็นหูดหงอนไก่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์)

อาการ

ก่อนที่จะกลายเป็นมะเร็ง หรือมะเร็งระยะเริ่มต้นบริเวณปากมดลูก โดยปกติจะไม่มีอาการเจ็บป่วยใดๆ หรือปรากฏอาการให้เห็น ในระยะที่โรคกำลังก่อตัว อาจสังเกตเห็นอาการใดอาการหนึ่งหรือมากกว่านี้ คือ เลือดออกบริเวณช่องคลอด, เลือดออกผิดปกติในระหว่างมีประจำเดือน, เลือดออกหลังจากมีเพศสัมพันธ์, มีประจำเดือนนานหรือมากกว่าปกติ, เลือดออกหลังวัยหมดประจำเดือน, มีสารคัดหลั่งจากช่องคลอดมากขึ้น, มีอาการเจ็บบริเวณเชิงกราน หรือมีอาการเจ็บขณะมีเพศสัมพันธ์

การเก็บตัวอย่างตรวจสำหรับการตรวจ HPV

มีวิธีการเก็บตัวอย่างตรวจหลายวิธีด้วยกันเพื่อใช้สำหรับการตรวจ HPV ได้แก่ ตัวอย่างตรวจที่คนไข้สามารถเก็บเองได้ เช่น urine, vulvar swaps, vaginal tampons, หรือ vaginal swaps ตัวอย่างตรวจที่เก็บโดยแพทย์ เช่น genital swab, vaginal lavage, cervical swab, และ cervical brush specimens และได้มีการประเมินประสิทธิภาพการใช้ตัวอย่างตรวจที่เก็บเองเพื่อใช้ในการตรวจ HPV พบว่าให้ผลที่เชื่อถือได้ในระดับปานกลาง โดยมีการศึกษาหนึ่งที่ศึกษาในสหรัฐ เพื่อเปรียบเทียบ ระหว่าง การใช้ directed swab ที่เก็บโดยแพทย์ กับ vaginal tampons ที่คนไข้เก็บเอง ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกัน นั่นคือให้ผลลบหรือผลบวกจากตัวอย่างตรวจทั้ง 2 ชนิด ถึง 80% และจากอีกหนึ่งการศึกษาที่ในแคนาดา เพื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างตรวจที่เก็บเองจาก vagina, vulvar และ urine กับตัวอย่างตรวจที่เก็บโดยแพทย์ คือ cervical samples หลังจากนั้นทำการตรวจทุกคนด้วย colposcopy ผลการศึกษาพบว่า ค่า sensitivity ต่อการตรวจหา High-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) เท่ากับ 98.3% จากตัวอย่างที่เก็บโดยแพทย์ และ 86.2% จาก vaginal swabs ที่คนไข้เก็บเอง, 62.1% จาก vulvar swabs, และ 44.8% จาก urine โดยพบว่าการเก็บตัวอย่างเองเป็นวิธีที่ผู้หญิงยอมรับได้ และชอบการตรวจโดยใช้ปัสสาวะที่สุด

การวินิจฉัย

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจหามะเร็งปากมดลูก 2 วิธีได้แก่

1. การตรวจทาง cytological ได้แก่การตรวจ Papanicolaou (Pap) smear วิธีนี้ต้องอาศัยบุคลากรที่มีความชำนาญในการตรวจ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (dysplasia) ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจมีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ง่าย เสียค่าใช้จ่ายสูงและมีขั้นตอนที่ยุ่งยาก
2. การตรวจ HPV โดยเทคนิค ทางด้าน molecular ซึ่งเป็นวิธีการตรวจที่มีความไวสูงกว่าการตรวจ Pap smear

เทคนิคที่ใช้ตรวจงานทางด้าน Molecular นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น

1. เทคนิคที่ไม่ใช้การเพิ่มจำนวน (Non- amplified) เช่น nucleic acid probe tests

2. เทคนิคที่อาศัยการเพิ่มจำนวน (Amplified) เช่น PCR และเทคนิคทางด้านนี้ยังแบ่งออกได้เป็น

2.1 Target amplification ซึ่งเป็นการขยายจำนวนกรดนิวคลีอิก (DNA, RNA) ของเป้าหมาย ตัวอย่างเช่น PCR ซึ่งมีความไวในการตรวจหาเชื้อในระดับสูง โดยจะให้ผลบวกเมื่อ HPV มากกว่า 100-480 copies/ml แต่ส่วนใหญ่วิธีนี้ใช้เฉพาะในงานวิจัย

2.2 Signal amplification โดยที่สัญญาณ การตรวจวัดจะถูกผลิตขึ้นจาก probe ซึ่งแปลผลตรงกับปริมาณ HPV DNA ณ เวลาที่เก็บเซลล์เยื่อบุผิวปากมดลูก ระบบที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน เรียกว่า Hybrid Capture 2 (HC2) จะให้ผลบวก เมื่อมีเชื้อมากกว่า 5,000 copies/sample วิธีนี้มีใช้ในทางคลินิกทั่วไป

2.3 Probe amplification โดยที่โมเลกุลของ probe เองจะถูกขยายจำนวน (ตัวอย่างเช่น ligase chain reaction)

และเนื่องจากว่า HPV มีหลายจีโนไทป์และมีแนวโน้มของการก่อมะเร็งต่างกัน ดังนั้นการวินิจฉัยจะไม่เพียงตรวจหา HPV DNA เท่านั้น แต่ยังต้องสามารถแยกจีโนไทป์ของ HPV ในแต่ละตัวอย่างตรวจได้ด้วย

ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดในการตรวจ HPV DNA

1. การตรวจครั้งเดียวไม่สามารถระบุ ระยะเวลาของการติดเชื้อได้ จึงบอกไม่ได้ว่าการติดเชื้อเป็นแบบชั่วคราว หรือแบบคงอยู่นาน (Transient or Persistent)
2. ปริมาณของเชื้อบริเวณปากมดลูก ณ เวลาตรวจและความไวของวิธีการตรวจ เป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการรายงานผลครั้งนั้น
3. HPV DNA test ที่ใช้อยู่ปัจจุบันไม่สามารถระบุจีโนไทป์ของกลุ่มความเสี่ยงสูงได้ ดังนั้นถ้าผลตรวจเป็นบวก 2 ครั้ง อาจเกิดจากเชื้อคนละสายพันธุ์
4. ราคาค่าตรวจยังมีราคาสูง ดังนั้นการตรวจควรเลือกเฉพาะรายที่มีความจำเป็นจริงๆ เช่น ผล pap smear คลุมเครือ

การวินิจฉัยจีโนไทป์ของ HPV ในชิ้นเนื้อนั้น อาศัยวิธี nucleic acid hybridization เนื่องจากการส่องกล้องจุลทรรศน์ในการสังเกตอนุภาคของไวรัส และวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันในการตรวจหา viral capsid antigens นั้นมีข้อจำกัดเพราะว่าจะไม่มีการสร้างอนุภาคของไวรัสและ capsid antigens การวินิจฉัย HPV โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของไวรัสจีโนมด้วยวิธี PCR มีการใช้อย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง, ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย และเหมาะในการตรวจหา HPV หลายจีโนไทป์ในปฏิกิริยาเดียว วิธี PCR นี้สามารถตรวจหาไวรัสจีโนมได้ถึง 10-100 copies ในขณะที่วิธีทั่วไปสามารถตรวจหาไวรัสจีโนมเพียง 10^5-10^6 copies

แนวโน้มในการตรวจ HPV DNA

หลักในการพิจารณาเพื่อเลือกทำการตรวจ HPV DNA เพื่อใช้ในโปรแกรมการเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดมะเร็งได้แก่

1. ในผู้ป่วยที่มีผลการตรวจ Pap smear ที่ไม่ชัดเจน คือ Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US), Atypical squamous cells, cannot rule out a high grade lesion (ASC-H), Atypical glandular cells, favor neoplastic (AGC-H) หรือ low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL)

2. ในผู้ป่วยที่อยู่ในระหว่างการรักษา High-grade dysplasia หรือ microinvasive cancer

3. ใช้เป็นการทดสอบหลักในการตรวจกรอง High-grade dysplasia ในหญิงที่มีอายุ 35 ปีขึ้นไป

การวินิจฉัยหา HPV DNA นั้นสามารถใช้ควบคู่หรือทดแทนการตรวจด้วยวิธี Pap smear ได้ ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจหามะเร็งปากมดลูกและผู้หญิงที่มีผลทางเซลล์วิทยาผิดปกติ ทำให้ช่วยลด false-negative จาก Pap smear screening ได้ 20-30 % และผู้ป่วยสามารถเก็บตัวอย่างเองได้ เพราะเป้าหมายหลักเพื่อป้องกันมะเร็งปากมดลูก [62, 63]

แนวทางการปฏิบัติในการตรวจคัดกรอง

1. ระยะเวลาที่ควรเริ่มต้นตรวจ: ประมาณ 3 ปี หลังมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรก แต่ไม่เกินอายุ 21 ปี สำหรับผู้หญิงโสดควรตรวจเมื่ออายุ 21 ปีขึ้นไป
2. ระยะห่างของการตรวจ:
    - ตรวจปีละครั้งหรือทุก 2-3 ปี สำหรับผู้หญิงอายุ 30 ปี ขึ้นไป และมีผลตรวจเป็นลบ 3 ครั้งติดต่อกัน
    - ตรวจทุก 3 ปี ถ้าผลทดสอบ HPV DNA และผลตรวจ Pap smear เป็นลบทั้งคู่
3. การหยุดคัดกรอง: ผู้หญิงที่อายุมากกว่า 70 ปี มีผลตรวจ Pap smear ครั้งล่าสุดเป็นลบ และไม่เคยมีผลตรวจผิดปกติในระยะ 10 ปีที่ผ่านมา และในกลุ่มผู้หญิงที่ตัดมดลูกออกหมด ไม่ต้องตรวจคัดกรองอีกต่อไป ถ้าข้อบ่งชี้การผ่าตัดไม่เกี่ยวข้องกับมะเร็งของอวัยวะสืบพันธุ์

การป้องกัน

การป้องกันแบบปฐมภูมิ เป็นการป้องกันโดยการหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยง หรือหลีกเลี่ยงสาเหตุที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก ได้แก่ การรักษาความสะอาด, การหลีกเลี่ยงการมีคู่นอนหลายคน, การหลีกเลี่ยงการมีเพศสัมพันธ์เมื่ออายุน้อย, การคุมกำเนิดโดยการใช้ถุงยางอนามัย และการฉีดวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ HPV ในคนที่ไม่เคยติดเชื้อในจีโนไทป์ที่มีในวัคซีนมาก่อน ซึ่งการฉีดวัคซีนนี้

จะได้ผลดีในกลุ่มอายุ 9–26 ปี และควรฉีดก่อนมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรก วัคซีน HPV ที่ได้รับรองจากคณะกรรมการอาหารและยาในประเทศไทยให้ใช้ได้นั้น เป็นชนิด quadrivalent ซึ่งมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. ป้องกันการติดเชื้อ HPV 4 จีโนไทป์ คือ HPV จีโนไทป์ 6, 11, 16 และ 18 สามารถครอบคลุมจีโนไทป์ที่ก่อมะเร็งปากมดลูกได้ ประมาณ 70 % และป้องกันการติดเชื้อที่ก่อให้เกิดหูดหงอนไก่ ประมาณ 90 %
2. วัคซีนผลิตมาจากโปรตีนที่ประกอบกันขึ้นเรียกว่า virus-like particle ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อ
3. การให้วัคซีนจะฉีดเข้ากล้าม 3 ครั้ง ในเวลา 6 เดือน โดยฉีดที่ 0, 2 และ 6 เดือน ตามลำดับ
4. กลุ่มผู้ไดรับประโยชน์จากวัคซีนสูงสุด คือ เด็กหญิงอายุ 10-12 ปี หรือสามารถฉีดได้ตั้งแต่อายุ 9 ปี แต่ในรายอายุ 13-26 ปี ที่ยังไม่เคยได้รับวัคซีน หรือได้รับวัคซีนยังไม่ครบก็สามารถฉีดได้เช่นกัน และควรได้รับวัคซีนก่อนการมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรก
5. ความปลอดภัย ประสิทธิภาพ และระยะเวลาในการป้องกัน
    - พบว่าผลข้างเคียงน้อย อาการไม่พึงประสงค์ส่วนใหญ่พบเพียงอาการปวด บวม แดง บริเวณที่ฉีดเล็กน้อย และอาจมีไข้ต่ำๆ
    - ไม่พบว่าวัคซีนมีผลในแง่ของการรักษาโรคจากการติดเชื้อ HPV หรือรอยโรคที่เกิดจากจีโนไทป์ของ HPV เป้าหมาย
    - ไม่แนะนำให้มีการฉีดวัคซีนในระยะตั้งครรภ์ แม้ว่าจะไม่มีรายงานของความพิการสำหรับมารดาที่ให้นมบุตรสามารถฉีดวัคซีนได้ เนื่องจากส่วนประกอบของวัคซีนไม่มีศักยภาพในการก่อให้ติดเชื้อ (Inactivated Vaccine)
    - ในรายที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ ไม่มีข้อห้ามแต่อย่างใด
    - ยังไม่มีข้อมูลสนับสนุนการให้วัคซีนในกลุ่มผู้ชาย
    - ระยะเวลาการป้องกันของวัคซีนยังไม่ทราบแน่นอน แต่ปัจจุบันพบว่ามีประสิทธิภาพป้องกันได้นานประมาณ 5 ปี และยังไม่ทราบว่าต้องมีการฉีดวัคซีนซ้ำ (Booster) หรือไม่ และเมื่อใด
    - การให้วัคซีน HPV ยังไม่คุ้มค่าการลงทุน คือ ยังไม่ครอบคลุมกลุ่มความเสี่ยงสูงทั้งหมด ผู้ที่ได้รับวัคซีนยังมีโอกาสเป็นมะเร็งปากมดลูกจาก HPV สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากที่ฉีดวัคซีนได้ และมีราคาแพง

การป้องกันแบบทุติยภูมิ เป็นการค้นหามะเร็งในระยะเริ่มแรก ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวินิจฉัยมะเร็งปากมดลูกก่อนที่เซลล์ผิดปกติจะเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็ง โดยการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก สามารถทำได้โดยการตรวจภายใน ซึ่งแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างมูกบริเวณรอบๆ ปากมดลูก โดยจะมีเซลล์ปากมดลูกปะปนออกมากับมูกนั้น แล้วเอาไปตรวจทางกล้องจุลทรรศน์ ที่

เรียกว่า การตรวจทางเซลล์วิทยา เพื่อดูความผิดปกติของเซลล์ เรียกว่า Conventional Pap smear หรือ Liquid-based cytology หากตรวจพบในระยะแรกๆ จะช่วยให้การรักษาได้ผลดียิ่งขึ้น แต่วิธีนี้ยังไม่สมบูรณ์แบบ เพราะบางครั้งไม่สามารถตรวจหาสิ่งผิดปกติที่มีอยู่ได้ ในปัจจุบันจึงมีการพัฒนาการตรวจ HPV DNA ใช้ในการตรวจวินิจฉัยร่วมกันด้วย เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้

การป้องกันตติยภูมิ คือ การดูแลรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งนั้นให้มีอายุที่ยืนยาว และมีการพัฒนาคุณภาพชีวิตให้ดีขึ้น

จะเห็นได้ว่า ผู้หญิงที่ผ่านการมีเพศสัมพันธ์ทุกคนจะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ โดยจะมีโอกาสเสี่ยงมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับพฤติกรรมของแต่ละบุคคล ซึ่งการมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุยังน้อย จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้สูง เพราะเชื้อไวรัส HPV มีโอกาสที่จะสะสมอยู่ในร่างกายได้ตั้งแต่การมีเพศสัมพันธ์ครั้งแรก ดังนั้น วิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันมะเร็งปากมดลูก คือการรณรงค์ให้ผู้หญิงที่มีเพศสัมพันธ์ทุกคนมีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกเป็นประจำทุกๆ ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงพรรณนา (Cross-sectional, descriptive research) โดยการวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Ethics Committee)

ประชากรศึกษา

ทำการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากสตรีที่เป็นมะเร็งปากมดลูกจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ จำนวน 59 ราย เพื่อใช้ในการหา Rate of detection ของ primers

ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์จากประชากรสตรีที่มาทำการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี Pap smear ในรูปของชุดเก็บ Thin prep. โดยสุ่มตัวอย่างจากสตรีที่เข้ารับการตรวจจากทางโรงพยาบาลในช่วงปี พ.ศ. 2551-2552 เป็นนิรนาม และใช้การออกรหัส

- โรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล 850 ตัวอย่าง
- โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 848 ตัวอย่าง

โดยตัวอย่างที่ได้มีข้อมูลเฉพาะด้านอายุและผลตรวจทางเซลล์วิทยา

การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เป็นชิ้นเนื้อจะทำการตัดบางส่วนออกมาเพื่อทำการศึกษา และส่วนที่เหลือจะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ส่วนตัวอย่างชุดเก็บ Thin prep. ที่ได้จากการสุ่มนั้นจะถูกปั่นแยกเพื่อแยกเก็บส่วนที่เป็นเซลล์กับน้ำใสออกจากกัน หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างที่เป็นเซลล์มาทำการศึกษา และตัวอย่างที่เหลือจะทำการเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องมือ

1.1 Pipette tip: 10 µl, 200 µl และ 1,000 µl (Elkay, Ireland)

1.2 Microcentrifuge tube: 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml (AxyGEN, USA)

1.3 Polypropylene conical tube: 15 ml และ 50 ml (Elkay, Ireland)

1.4 Beaker: 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)

1.5 Flask: 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)

1.6 Reagent bottle: 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Duran, USA)

1.7 Cylinder: 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Pyrex, USA)

1.8 Pipette rack (Eppendorf, Germany)

1.9 Thermometer (Precision, Germany)

1.10 Parafilm (American Nation Can, USA)

1.11 Plastic wrap

1.12 Stirring-magnetic bar

1.13 Combs (Bio-RAD, Hercules, California)

1.14 Electrophoresis chamber set (Bio-RAD, USA)

1.15 Cryogenic Vial (Scitech, Canada)

2. อุปกรณ์

2.1 Automatic adjustable micropipette: P2 (0.1-2 µl), P10 (0.5-10 µl), P20 (5-20 µl), P100 (20-100 µl), P1000 (100-1000 µl) (Eppendorf, Germany)

2.2 Vortex mixer (Scientific industry, USA)

2.3 Stirring hot plate (Bamstead/Thermolyne, USA)

2.4 Centrifuge (Beckman GS-6R, USA)

2.5 Refrigerate microcentrifuge (Universal 16R Hettich, USA)

2.6 Microcentrifuge 0.2 ml (Axygen, USA)

2.7 Microcentrifuge 1.5 ml (Elkay, USA)

2.8 Eppendorf Mastercycle personal (Hamburg, Germany)

2.9 Power supply model 250 (Giboco BRL, USA)

2.10 Multi-block heater (Lab-Line Instrument Inc., USA)

2.11 Gel Doc 1000 (Bio-RAD, USA)

2.12 Mitsubishi Video copy processor (Bio-RAD, USA)

2.13 Thermal paper (Bio-RAD, USA)

2.14 Refrigerator 4°C (Misubishi, Japan)

2.15 Freezer -20°C (Sanyo, Japan)

2.16 Freezer -70°C (Forma Scientific, USA)

2.17 PCR Cabinet (Augusta)

2.18 Microwave oven

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.19 Water Purification equipment (Water pro Ps, USA)

2.20 Autoclave (Hydroclave MC10 Harvey, USA)

2.21 Balance (PB1502 Mettler Toledo, Switzerland)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีทั่วไป

1.1 Agarose molecular grade (Promega, USA)

1.2 Diethyl pyrocarbonate (Sigma, Singapore)

1.3 Ethidium bromide (Sigma, Singapore)

1.4 Sucrose (USB, Hongkong)

1.5 100 base pair DNA ladder (Biolab, USA)

1.6 Boric acid (USB, Hongkong)

2. สารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่าง

2.1 Phosphate Buffer Saline (PBS Tablets) (Bio Basic Inc.)

2.2 Penicillin-Streptomycin (10,000 units/ml) (GIBCO)

2.3 ชุดเก็บตัวอย่าง ThinPrep® (Hologic, West Sussex, UK)

2.4 Liquid Nitrogen

3. สารเคมีสำหรับการสกัด DNA (DNA extraction)

3.1 Isoamyl alcohol (Sigma, Singapore)

3.2 Absolute ethanol (Sigma, Singapore)

3.3 Glycogen (USB, Ohio)

3.4 Sodium acetate (Sigma, Singapore)

3.5 Phenol (Pierce, USA)

3.6 Chloroform (Sigma, Singapore)

3.7 Tris base Biotechnology Grade (USB, Hongkong)

3.8 Disodium ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) (MERCK, Germany)

3.9 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Biotech, Sweden)

3.10 Proteinase K

4. สารเคมีสำหรับการทำ PCR

4.1 Eppendorf Mastermix (2.5x) (Eppendorf, Hamburg, Germany)

5. สารเคมีสำหรับการทำผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์

5.1 HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Bioscience)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

Positive control

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่มี positive control ของ HPV เพราะฉะนั้นจึงทำการสุ่มเลือกตัวอย่างที่ให้ผลการตรวจหา HPV DNA เป็นบวกด้วยวิธี PCR จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกนั้นสามารถพบเชื้อ HPV ได้มากกว่า 96.6% [64] หลังจากนั้นนำผลิตผลที่ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันผลว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPV แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วย BLAST analysis เมื่อได้ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น HPV ในส่วน E1 gene แล้วจึงนำมาเป็น positive control

Negative control

เนื่องจาก HPV เป็น DNA ไวรัส เพราะฉะนั้น negative control ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Distilled water ที่มีปริมาตรเท่ากับ DNA ที่ใช้ในการทดลอง

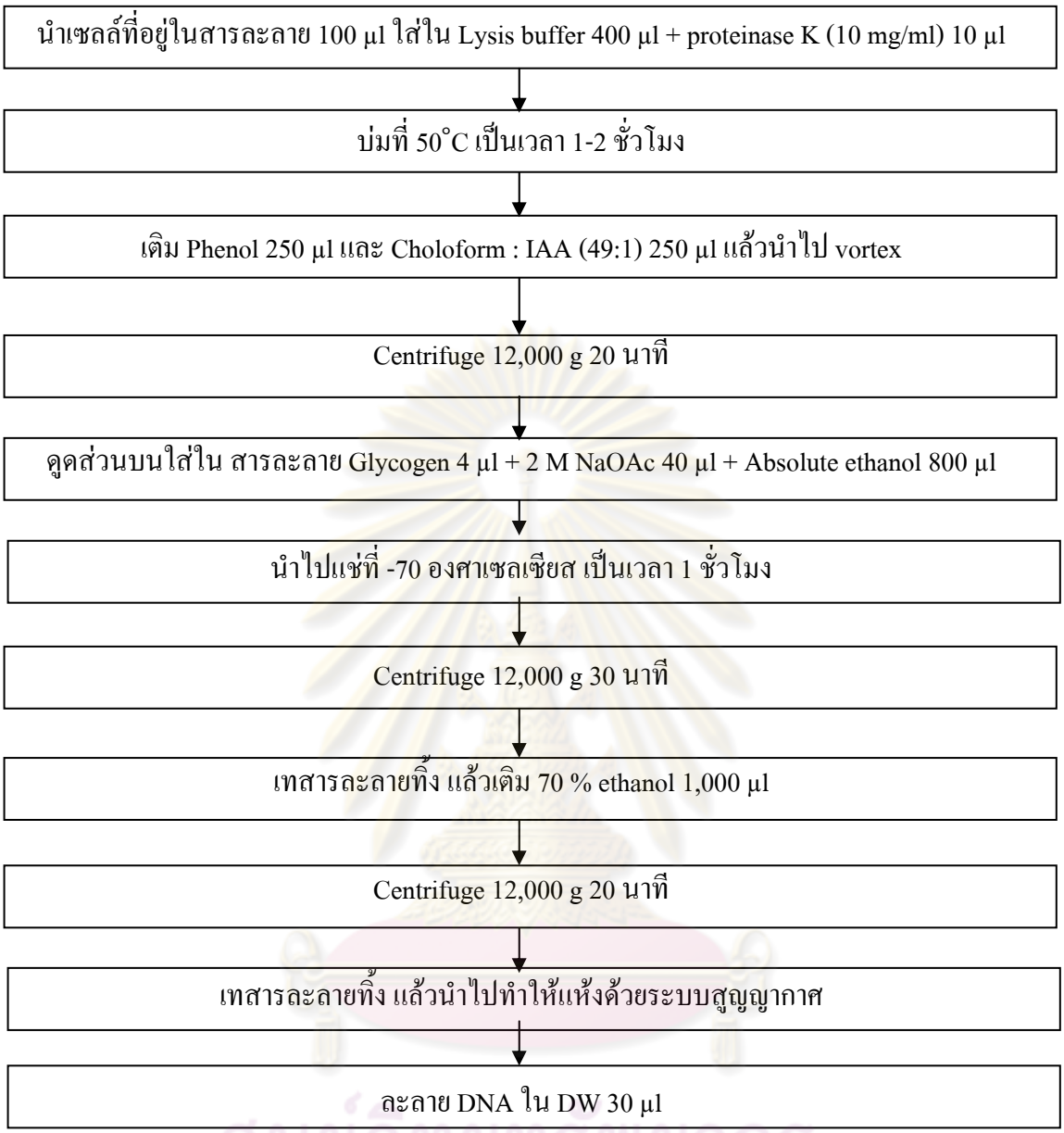
Internal control

เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถสกัด DNA ได้จริง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้ DNA ที่มีอยู่ในเซลล์ปกติทุกเซลล์เพื่อเป็นการยืนยันผลการสกัดว่าการให้ผลลบกับการทำ PCR นั้นให้ผลเป็นลบจริง ไม่ใช่จากการสกัด DNA ไม่ได้และในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ DNA ในส่วน Beta-globin จึงได้ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ของ Beta-globin ด้วยวิธี PCR ซึ่งต้องให้ผลบวกเสมอ หากการเพิ่มปริมาณ DNA ของ HPV ให้ผลลบ และการเพิ่มปริมาณ DNA ของ Beta-globin ให้ผลลบเช่นกัน จะต้องทำการสกัด DNA ใหม่ เพราะมาสามารถสกัด DNA ได้

หลังจากที่คัดเลือกตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาโดยการสุ่มตัวอย่างแล้ว ก็จะทำการสกัด DNA โดยมีขั้นตอนดังแผนภาพที่แสดงไว้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพแสดงขั้นตอนการสกัด DNA



การเพิ่มจำนวน HPV ในส่วน E1, L1 gene และ Beta-globin gene ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การออกแบบ Primers

การศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจคัดกรองหา HPV DNA ในเซลล์ของผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาล โดยการเพิ่มจำนวน HPV ใน E1 gene และเพิ่มจำนวน DNA ของ Human ในส่วน Beta-globin gene ดังนี้

HPV ส่วน E1 gene จะทำการเพิ่มจำนวน HPV ในส่วน E1 gene ด้วยวิธี semi-nested polymerase chain reaction (semi-nested PCR) การออกแบบ primers จะออกแบบให้ครอบคลุมในส่วน E1 gene

ของ HPV ทั้งที่เป็นกลุ่มความเสี่ยงสูงทั้งหมดและจีโนไทป์ 6 และ 11 โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน E1 gene ของ HPV กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงและจีโนไทป์ 6 และ 11 ที่มีอยู่บนฐานข้อมูล GenBank มาเปรียบเทียบกันเพื่อหาตำแหน่งที่มีความ conserve และออกแบบ primers ที่ตำแหน่งนั้น โดยใช้โปรแกรม Bioedit ในการออกแบบ primers ซึ่งได้มีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ว่า primers ที่นำมาใช้ในการศึกษานั้นมีความจำเพาะกับ HPV เท่านั้น โดยการทดสอบร่วมกับไวรัสอื่น เช่น HIV, Parvovirus 4, Parvovirus B19, Hepatitis B และ Hepatitis C เพื่อแสดงว่าสามารถจับกับ HPV ได้เท่านั้น และทดสอบความไว (sensitivity) ของ primers ว่า primers ดังกล่าวมีความไวในการตรวจหาไวรัสได้ถึง 10^2 copies/µl[65]

HPV ส่วน L1 gene จะทำการเพิ่มจำนวน HPV ในส่วน L1 gene ด้วยวิธี nested polymerase chain reaction (nested-PCR) โดยใช้ primers คู่ที่มีการใช้ในการตรวจหาจีโนไทป์ของ HPV กันทั่วไป คือ MY09/MY11 และ GP5+/GP6+ [66-68]

การเพิ่มจำนวน DNA (DNA amplification) ในส่วน E1, L1gene ของ HPV และ Beta-globin gene

เพิ่มปริมาณ HPV ในส่วน E1 gene ด้วยวิธี semi-nested PCR, เพิ่มปริมาณ HPV ในส่วน L1 gene ด้วยวิธี nested-PCR และเพิ่มปริมาณ Beta-globin ด้วยวิธี PCR โดยรายละเอียดของ primers ดังแสดงในตารางที่ 3

นำ microtube ใส่สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่3 แสดงลำดับเบส ของ primers แต่ละเส้นที่ใช้ในการทำ PCR

Region	Primer (nucleotide position)	Sequence	Product size(bp)
E1	HPV-E1F1_1219	5’-AGT ACA GGT TCT AAA ACG AAA GT-3’	F1/R1=900
	HPV-E1F2_1383	5’-GCG AAG ACA GCG GNT ATG GC-3’	F2/R1= 736
	HPV-E1R1_2119	5’-CAT TAT CAA ATG CCC AYT GYA CCA T-3’	
L1	MY09	5’-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3’	451
	MY11	5’-GCM CAG GGW CTA TAA YAA TGG-3’	
	GP5+	5’-TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC-3’	136
	GP6+	5’-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C-3’	
Beta-globin	Beta-globinF	5’-GTG CAY CTG ACT CCT GAG GAG A-3’	100
	Beta-globinR	5’-CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG-3’	

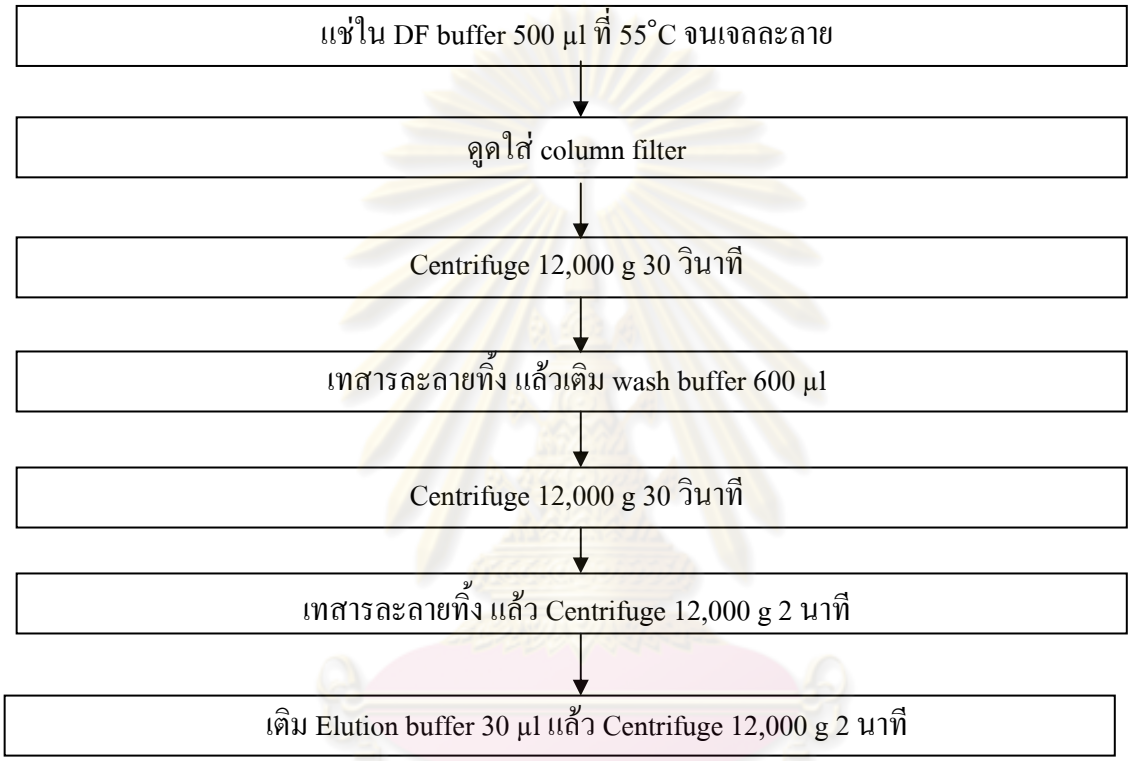
ตารางที่4 สารเคมีในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ในบริเวณ E1, L1 gene และ Beta-globin gene

สารเคมี	E1 gene (volume/tube)		L1 gene (volume/tube)		Beta-globin gene (volume/tube)
	1st PCR (µl)	2nd PCR (µl)	1st PCR (µl)	2nd PCR (µl)	
Distilled water	9.0	12.0	9.0	12.0	13.0
Eppendorf Mastermix (Humburg, Germany)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
HPV-E1F1_1219	0.5	-	-	-	-
HPV-E1R1_2119	0.5	0.5	-	-	-
HPV-E1F2_1383	-	0.5	-	-	-
MY09	-	-	0.5	-	-
MY11	-	-	0.5	-	-
GP5+	-	-	-	0.5	-
GP6+	-	-	-	0.5	-
Beta-globinF	-	-	-	-	0.5
Beta-globinR	-	-	-	-	0.5
DNA template	5.0	2.0	5.0	2.0	1.0
Total volume	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0

ตารางที่5 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำ PCR ในส่วน E1, L1 gene และ Beta-globin gene

PCR cycle	PCR E1 gene		PCR L1 gene		Beta-globin
	1st PCR	2nd PCR	1st PCR	2nd PCR	
Pre-denaturation	94°C, 5 นาที	94°C, 5 นาที	94°C, 5 นาที	94°C, 5 นาที	94°C, 5 นาที
Denaturation	94°C, 0.30 นาที	94°C, 0.30 นาที	94°C, 0.30 นาที	94°C, 0.30 นาที	94°C, 0.30 นาที
Annealing	55°C, 0.30 นาที	55°C, 0.30 นาที	55°C, 0.30 นาที	50°C, 0.30 นาที	60°C, 0.30 นาที
Extension	72°C, 1.30 นาที	72°C, 1.00 นาที	72°C, 1.00 นาที	72°C, 1.00 นาที	72°C, 1.00 นาที
Cycles	ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation – Extension 40 รอบ				
Post-extension	72°C, 7 นาที	72°C, 7 นาที	72°C, 7 นาที	72°C, 7 นาที	72°C, 7 นาที

จากนั้นนำ microtube ที่ใส่สารละลายดังกล่าวทั้งหมดใส่ในเครื่อง thermal cycle (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Boston) โดยมีอุณหภูมิตามตารางที่ 5 PCR Product ที่ได้ จะถูกนำมาตรวจสอบโดยการ ทำ electrophoresis ใน 2% agarose gel โดยใช้ 100 bp ladder เป็น marker เพื่อใช้ตรวจสอบขนาด DNA ที่ต้องการ จากนั้นทำการย้อมแถบ DNA โดยใช้ ethidium bromide แล้วจึงทำการตัดชิ้น DNA ที่ต้องการแล้วมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้



จากนั้นจึงนำ DNA บริสุทธิ์ ที่ได้ มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ DNA sequencing

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยการตัด gel ในส่วนแถบ DNA ที่มีขนาดตรงตามต้องการ ที่ได้หลังจากการทำ gel electrophoresis มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำผลผลิตที่ได้ 5 µl ทำการตรวจด้วย gel electrophoresis อีกครั้งหนึ่งว่าได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการหรือไม่ และเพื่อตรวจสอบว่าไม่มี DNA อื่นเจือปน หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตที่ผ่านการตรวจสอบแล้วส่งไปที่บริษัท First Base Laboratory ประเทศ มาเลเซีย เพื่อทำ cycle sequencing

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นจะใช้ primer forward หรือ primer reverse ผสมสารต่างๆที่ใช้ทำ cycle sequencing

หลังจากผ่านการทำ cycle sequencing แล้ว ทางบริษัทจะส่งผลการทำ cycle sequencing กลับมา ซึ่งสามารถใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 ในการแปลผลได้

ทำการอ่านผลที่ได้โดยใช้โปรแกรม Chromas Lite 2.0 เพื่อวิเคราะห์ chromatogram ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Analysis)

โดยใช้โปรแกรม

- Clustal X (version 1.83) เพื่อทำการเปรียบเทียบ sequence ที่เราได้มาจากการทำ DNA sequencing กับ sequence ที่เป็นตัวอ้างอิง (references)
- Chromas (version 2.0.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้ดูกราฟที่ได้จากการทำ sequencing
- Oligos (version 9.1) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเปลี่ยนลำดับ sequence ที่เกิดจากการใช้ reverse primer
- Bioedit (version 5.0.9) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบ primers
- MEGA เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างทั้งหมด เป็นข้อมูลที่มีการออกเป็นรหัส และมีประวัติเฉพาะ อายุและผลทางเซลล์วิทยาเท่านั้น

2. ทดสอบ Rate of detection ของ primers บริเวณ E1 และ L1 gene ที่ใช้
จำนวนตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกที่ให้ผลบวกกับ primers บริเวณ E1 และ L1 gene รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูก แล้วเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์ที่ได้

3. ข้อมูลการตรวจหา HPV DNA
จำนวนของการติดเชื้อ HPV รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาล ด้วย primers ที่ให้ค่า Rate of detection ดีที่สุด

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPV ในส่วน E1 gene
เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Direct sequencing เรียบร้อยแล้ว

- ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast
- ทำการจำแนกจีโนไทป์จากผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

5. ข้อมูลความชุกของ HPV แต่ละจีโนไทป์

ความชุกของ HPV แต่ละจีโนไทป์ รายงานผลเป็นเปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างที่ให้ผลบวกของผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก

6. ข้อมูลการจัดกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบผลของจีโนไทป์จากตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกที่ได้จากการทำ BLAST analysis บริเวณยีน L1 และ E1 โดยการใช้ phylogenetic analysis จัดกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ด้วยวิธี Bootstrap Test, Neighbor-Joining Method รายงานผลเป็น phylogenetic tree ของยีน L1 และ E1

เผยแพร่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเผยแพร่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการศึกษา โดยใช้ Program Sequin version 6.0 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sequin) ไปยังฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

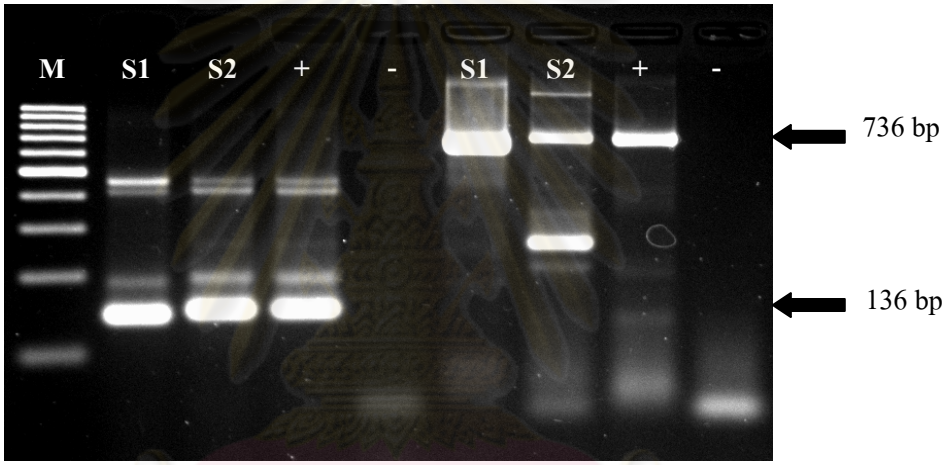
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการหา HPV แต่ละคู่ primers

จากการทำการตรวจหา HPV DNA ในชิ้นเนื้อของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกด้วยคู่ primers บริเวณยีน L1 กับ E1 จำนวน 59 ตัวอย่าง พบว่าคู่ primers ที่ใช้เพิ่มจำนวน HPV DNA บริเวณยีน L1 ให้ผลบวกจำนวน 56 ตัวอย่าง คิดเป็น 94.9% และบริเวณยีน E1 ให้ผลบวกจำนวน 57 ตัวอย่าง คิดเป็น 96.6% และเมื่อทำการวิเคราะห์จีโนไทป์จาก direct sequencing ด้วย BLAST analysis พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนทั้ง 2 บริเวณนั้น ให้ผลจีโนไทป์แตกต่างกันเพียง 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด



<u>รูปที่7</u> แสดงผลผลิตขนาด 136 และ 736 bp ที่ได้จากการทำ nested และ semi-nested PCR ของ HPV ในส่วน L1 และ E1 gene ตามลำดับ โดยที่ M คือ 100 bp marker, S1 คือ ตัวอย่างที่ 1, S2 คือ ตัวอย่างที่ 2, + คือ positive control, - คือ negative control ตามลำดับ

2. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากเซลล์ของผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาล ด้วยชุดเก็บ LBC (ThinPrep®, Hologic, West Sussex, UK) จำนวน 1,698 ตัวอย่าง แบ่งเป็นจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ 848 ตัวอย่าง และจากโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนล 850 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่มีข้อมูลไม่สมบูรณ์จำนวนทั้งหมด 36 ตัวอย่าง ทำให้จำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้วิเคราะห์เป็น 1,662 ตัวอย่าง

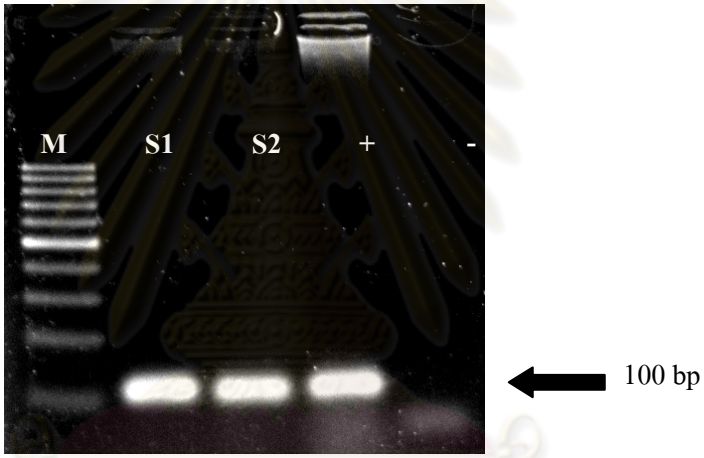
ทุกตัวอย่างได้รับการตรวจหาการติดเชื้อ HPV โดยการทำ semi-nested PCR ในส่วน E1 gene รวมทั้งการตรวจหา Beta-globin gene

3. ผลการเพิ่มจำนวน DNA ของ HPV ในส่วน E1

จากการทำ semi-nested PCR ของ HPV DNA ส่วน E1 gene แล้วจะได้ผลผลิตจากการทำ PCR รอบ 2 ขนาด ประมาณ 736 bp ผลปรากฏว่า จากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 1,698 ตัวอย่าง ให้ผลบวก 149 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.8 % จากตัวอย่างทั้งหมด แต่เนื่องจากมีตัวอย่างข้อมูลไม่สมบูรณ์ จำนวน 36 ตัวอย่าง จึงทำการคัดออก ทำให้เหลือจำนวนที่ให้ผลบวก 145 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.7 % จากตัวอย่างที่คงเหลืออยู่

4. ผลของการเพิ่มจำนวน Internal control

ในการตรวจกรองการติดเชื้อ HPV จะใช้ Beta-globin gene ของ Human เป็น Internal control ซึ่งจะให้ผลผลิตขนาดประมาณ 100 bp และให้ผลบวกกับการรทำ PCR ของ Beta-globin ทุกตัวอย่าง



<u>รูปที่8</u> แสดงผลผลิตขนาด 100 bp ที่ได้จากการทำ PCR ของ Beta-globin gene โดยที่ M คือ 100 bp marker, S1 คือ ตัวอย่างที่ 1, S2 คือ ตัวอย่างที่ 2, + คือ positive control, - คือ negative control ตามลำดับ

5. ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ E1 gene

BLAST Analysis

ผลจากการทำ semi-nested PCR ในส่วน E1 gene ของ HPV เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกทั้งหมด 145 ตัวอย่าง มาตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ปรากฏว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน E1 gene นั้นมีความเหมือนกับ E1 gene ของ HPV ในฐานข้อมูล GenBank สามารถจำแนกจีโนไทป์ที่ได้จากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูลทั้งหมด 27 จีโนไทป์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มความเสี่ยงสูง 65 ตัวอย่าง คิดเป็น 44.8 %, กลุ่มความเสี่ยงค่อนข้างสูง 13 ตัวอย่าง คิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็น 9.0 %, กลุ่มความเสี่ยงต่ำ 12 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.3 % และกลุ่มอื่นๆ 55 ตัวอย่าง คิดเป็น 37.9 % รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 6

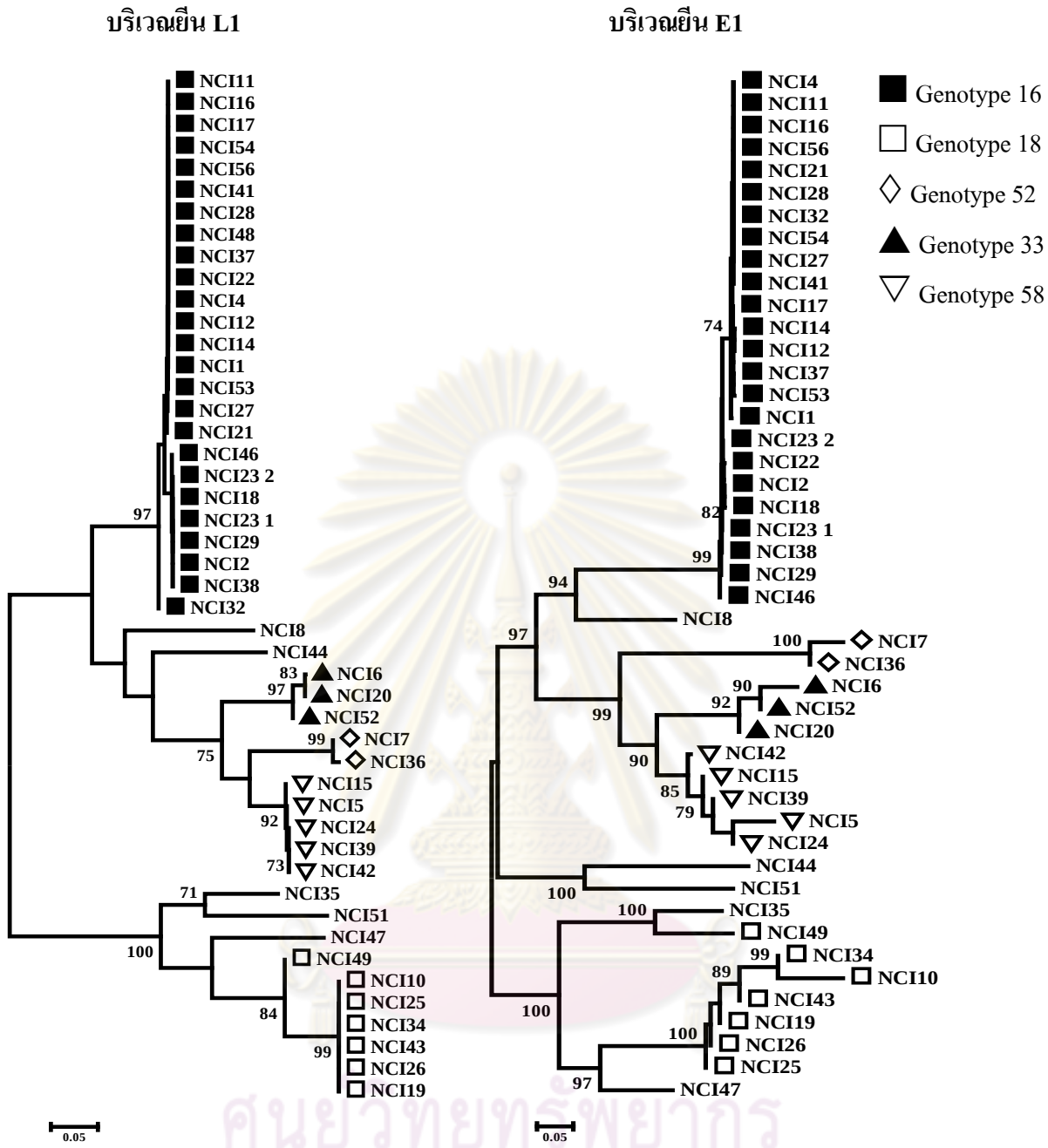
เมื่อพิจารณาจำแนกตามอายุกับจีโนไทป์ของ HPV ที่ตรวจ ตัวอย่างทั้งหมดนั้นมาจากผู้หญิงที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกหลายช่วงอายุ โดยอายุน้อยสุด คือ 14 ปี และมากที่สุด คือ 88 ปี จึงได้แบ่งเป็นช่วงอายุ ช่วงละ 10 ปี ตั้งแต่ช่วงอายุ น้อยกว่า 30 ปี ถึงช่วงอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 70 ปี พบว่าช่วงอายุน้อยกว่า 30 ปี มีการพบเชื้อ HPV มากที่สุด คิดเป็น 15.4 % จากจำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ HPV ทั้งหมด รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 7 นอกจากนี้สามารถพบ HPV ทุกกลุ่มความเสี่ยง ในกลุ่มผู้หญิงช่วงอายุน้อยมากกว่า และเมื่ออายุมากขึ้นจะพบแต่ HPV กลุ่มความเสี่ยงสูง

เมื่อพิจารณาจำแนก HPV แต่ละจีโนไทป์ พบว่าในกลุ่มที่ตรวจพบ HPV DNA นั้น พบจีโนไทป์ 16 มากที่สุด คิดเป็น 17.9 % รองลงมา คือ จีโนไทป์ 90 คิดเป็น 16.6 % และ 71 คิดเป็น 10.3 % ตามลำดับ ดังรูปที่ 10

6. ผลการทำ Phylogenetic tree

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกที่ได้ทำการ direct sequencing เปรียบเทียบ คู่ primer ที่บริเวณยีน L1 และ E1 มาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี phylogenetic analysis เพื่อสร้าง phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน L1 และ E1 ทำให้สามารถจัดกลุ่ม HPV จีโนไทป์ได้ ทำการจัดกลุ่มเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ direct sequencing ที่บริเวณยีน L1 และ E1 ด้วยวิธี Cluster analysis โดยโปรแกรม Clustal X version 1.83 วิธี Multiple Alignment จากนั้นนำผลที่ได้มาทำ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม MEGA 3.1 โดยวิธี Neighbor-Joining Method

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>รูปที่9</u> แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของบริเวณยีน L1 และ E1

ผลการจัดกลุ่มจากการทำ phylogenetic analysis พบว่า HPV จากกลุ่มตัวอย่างที่ผลการวิเคราะห์จีโนไทป์จาก BLAST analysis ในบริเวณยีน L1 และ E1 แล้วได้จีโนไทป์เหมือนกันนั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน มีเพียงตัวอย่าง NCI44 เท่านั้น ที่ผลจาก BLAST analysis ของยีน L1 เป็นจีโนไทป์ 67 ส่วนยีน E1 เป็นจีโนไทป์ 56 และเมื่อวิเคราะห์จาก phylogenetic tree ที่ได้มีนิวคลีโอไทด์ที่แยกกลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจน และผลจากการวิเคราะห์ phylogenetic tree จากตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV DNA พบว่าในแต่ละจีโนไทป์นั้นมีความใกล้เคียงกับจีโนไทป์ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank)

ตารางที่6 แสดงความชุกของการติดเชื้อ HPV ในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาลในประเทศไทย จำนวน 1,662 คน

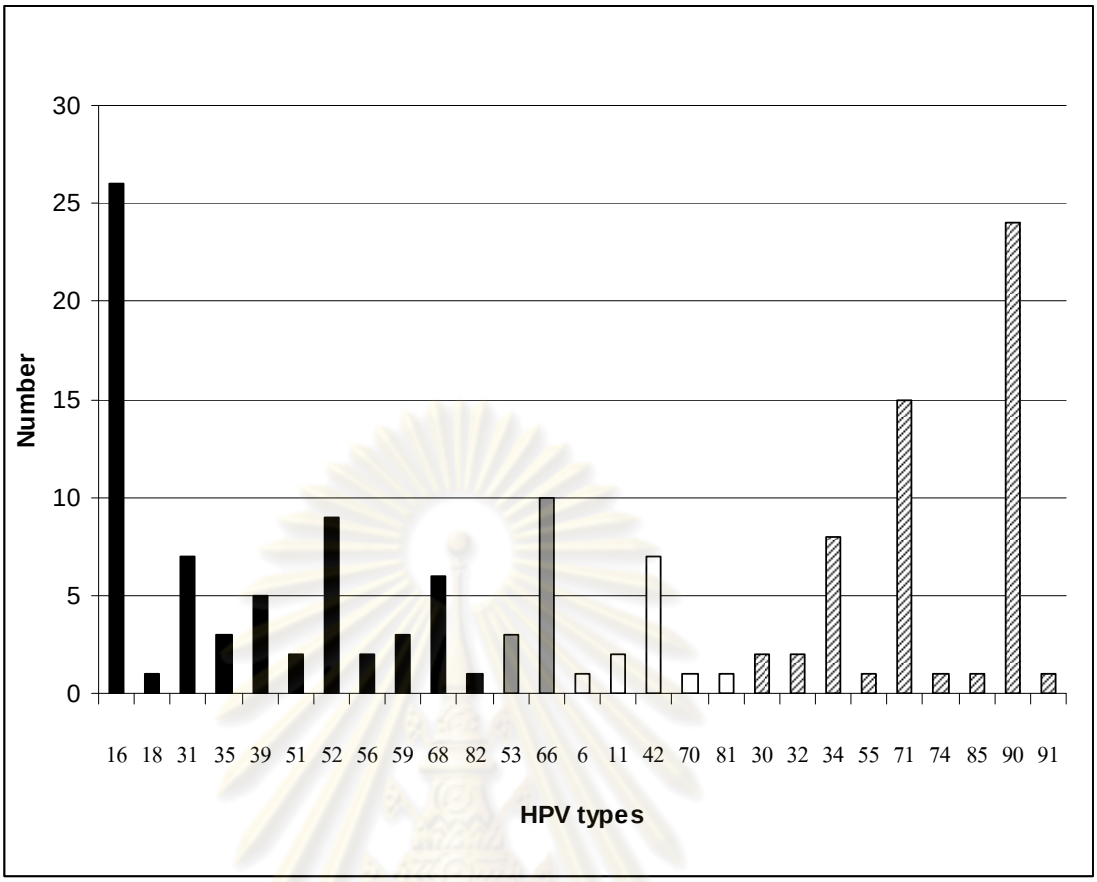
	Normal cytology no. (%)	Abnormal cytology no. (%)							Total no. (%)
		ASC-US	ASC-H	AGC-H	LSIL	HSIL	CA	Total	
HPV DNA negative	1495 (90.0)	9 (69.2)	2 (100)	2 (66.7)	6 (50)	3 (37.5)	-	22 (1.3)	1517 (91.3)
HPV DNA positive	127 (7.6)	4 (30.8)	-	1 (33.3)	6 (50)	5 (62.5)	2 (100)	18 (1.1)	145 (8.7)
Total no.	1622 (97.6)	13	2	3	12	8	2	40 (2.4)	1662 (100)
LR-HPV Total no.	8	2	-	-	1	1	-	4	12
PHR-HPV Total no.	10	-	-	-	2	1	-	3	13
HR-HPV Total no.	55	2	-	1	2	3	2	10	65
Any types Total no.	54	-	-	-	1	-	-	1	55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่7 แสดงการตรวจพบ HPV DNA ในผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาลในประเทศไทย จำนวน 1,662 คน ในช่วงอายุต่างๆ

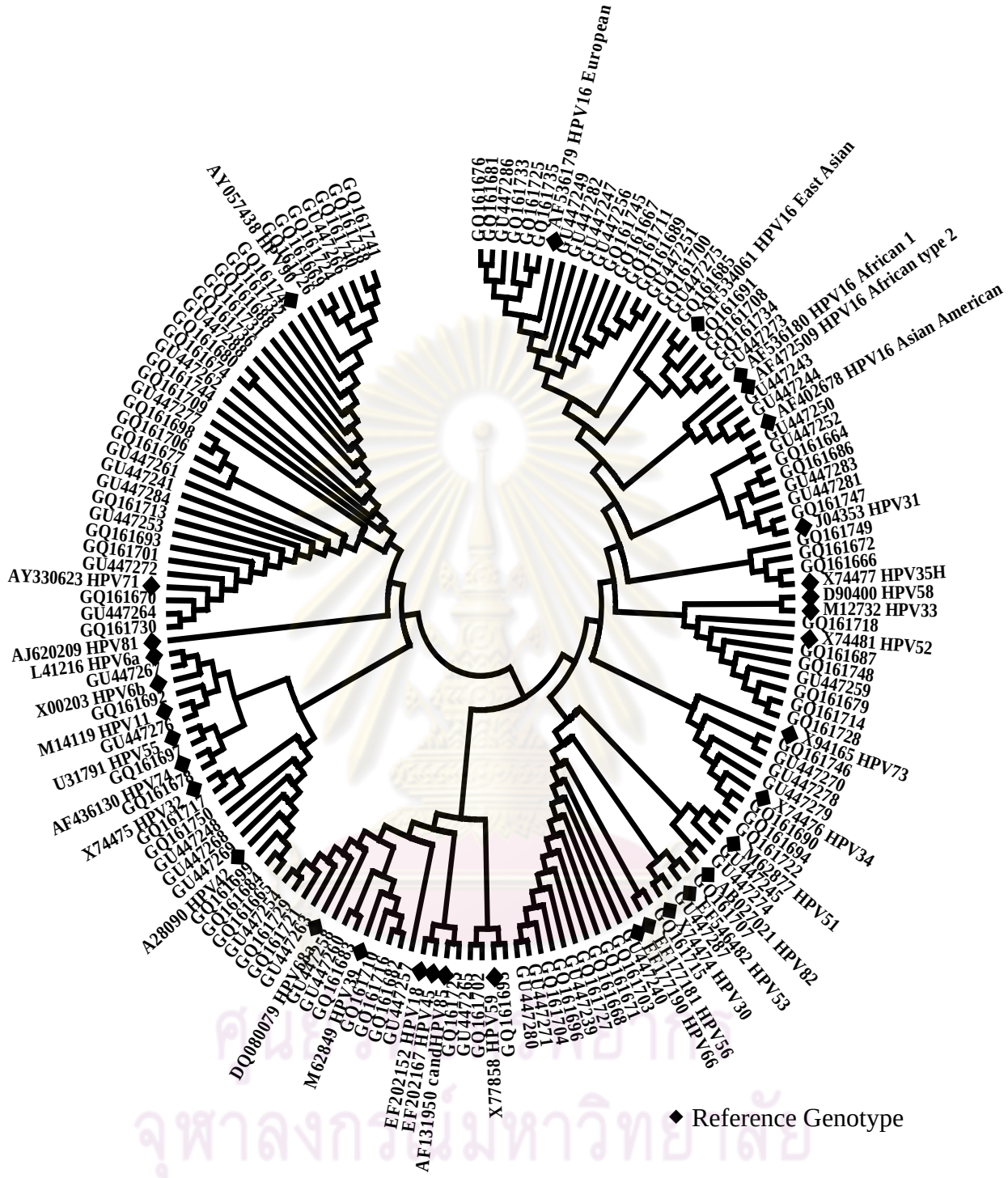
	Age group					
	<30	30-39	40-49	50-59	60-69	>=70
Total No.	214	455	506	325	131	31
HPV DNA Negative (%)	181 (84.6)	401 (88.1)	481 (95.1)	302 (92.9)	124 (94.7)	28 (90.3)
HPV DNA Positive (%)	33 (15.4)	54 (11.9)	25 (4.9)	23 (7.1)	7 (5.3)	3 (9.7)
LR-HPV No.	4	6	2	-	-	-
PHR-HPV No.	5	3	1	3	-	1
HR-HPV No.	14	24	10	11	4	2
Any types No.	10	21	12	9	3	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>รูปที่10</u> แสดงความชุกของ HPV จีโนไทป์ต่างๆในผู้หญิงที่ตรวจพบ HPV DNA (n=145) จากผู้หญิงที่เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก (= high-risk type, = probably high-risk type, = low-risk type, = unclassify risk type)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>รูปที่11</u> แสดงการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของบริเวณยีน E1 จากตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV DNA ในช่วงปีพ.ศ.2551-2552

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

มะเร็งปากมดลูกเป็นหนึ่งในมะเร็งทั่วไปที่พบมากในผู้หญิงทั่วโลก [69] ซึ่งมีหลักฐานทางระบาดวิทยาและชีวโมเลกุลว่า การติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV) นั้นมีความสำคัญต่อการพัฒนาของรอยโรคบริเวณปากมดลูกที่นำไปสู่การเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูก [70] จากสถิติทั่วโลกพบผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่เกือบ 5 แสน รายต่อปี และในจำนวนนี้กว่า 80 % เป็นประชากรในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 90 % ในปี 2020 [71] ได้มีการศึกษาในกลุ่มประชากรในภูมิประเทศต่างๆ พบว่ามีความชุกของ HPV แตกต่างกัน อีกทั้งมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ HPV ในกลุ่มผู้หญิงปกติมากกว่าในกลุ่มผู้หญิงที่เป็นมะเร็งปากมดลูก [72] นอกจากนี้บริเวณที่เก็บตัวอย่าง, วิธีการเก็บตัวอย่าง และวิธีการตรวจ ยังส่งผลในการตรวจหา HPV อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลที่ได้จากการศึกษาในหลายพื้นที่พบว่า HPV จีโนไทป์ 16 และ 18 ยังคงเป็นจีโนไทป์ที่พบมากทั้งในกลุ่มผู้หญิงปกติ, กลุ่มผู้ป่วยที่มีรอยโรค และกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก และพบว่าทั้ง 2 จีโนไทป์นี้มีความเสี่ยงในการทำให้เกิดการพัฒนาของรอยโรคหรือมะเร็งได้มากกว่าจีโนไทป์อื่น ดังนั้นการศึกษาถึงจีโนไทป์ของ HPV จึงสำคัญในการศึกษาระบาดวิทยา เพื่อใช้ในการประเมินแนวโน้มในการติดเชื้อและพัฒนาของมะเร็งจากเชื้อ HPV ทั่วโลก [73] เนื่องจากการติดเชื้อ HPV นั้นสามารถพบได้ในทุกช่วงอายุ แต่จะพบมากในผู้หญิงช่วงวัยรุ่นมากกว่า และจะลดลงเรื่อยๆเมื่ออายุมากขึ้น แต่ในบางพื้นที่จะพบมากอีกครั้งในช่วงวัยสูงอายุ ส่วนในกลุ่มผู้หญิงวัยกลางคน จะมีความชุกของ HPV แตกต่างกันมาก ซึ่งอาจจะเป็นเครื่องมือที่แสดงถึงพฤติกรรมการมีเพศสัมพันธ์ในแต่ละภูมิประเทศ นอกจากนี้การทราบถึงความชุกของ HPV ในแต่ละภูมิประเทศสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการระบุการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของจีโนไทป์ HPV หลังจากการได้รับวัคซีนแล้วได้

ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์ในส่วน E1 gene ของ HPV กับการวิเคราะห์ในส่วน L1 gene ของ HPV โดยใช้วิธี PCR เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจหา HPV DNA โดยใช้ตัวอย่างจากชิ้นเนื้อของผู้ป่วยเป็นมะเร็งปากมดลูก 59 ตัวอย่าง นำมาแยก DNA เพื่อทำ PCR พบว่าการตรวจ HPV DNA ที่บริเวณ E1 gene มีประสิทธิภาพในการตรวจมากกว่า L1 gene โดยพิจารณาจาก Rate of detection ที่ได้นั้น จะเห็นว่า primers ที่ E1 gene นั้นมี Rate of detection ดีกว่า L1 gene และจากการทดลองของวรดีและคณะ ก็แสดงให้เห็นว่าการใช้ primers บริเวณ E1 gene คู่ที่ใช้ในการทดลองนี้มีความไวในการตรวจหา HPV DNA ได้ดีกว่า primers MY09/MY11 และ GP5+/GP6+ บริเวณ L1 gene และ primers E6 gene ที่ออกแบบใหม่ และ primers บริเวณ E1 gene ที่ออกแบบใหม่นี้มีความจำเพาะต่อ HPV เท่านั้น [65]

การตรวจหาความชุกในการติดเชื้อ HPV จากกลุ่มตัวอย่างเซลล์ของผู้เข้ารับการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในโรงพยาบาลในประเทศไทย ช่วงปีพ.ศ.2551-2552 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งสิ้น 1,698 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างจากโรงพยาบาลบางปะกอก 9 อินเตอร์เนชั่นแนลและโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ได้ทำการเก็บแยกส่วนเซลล์บางส่วนเพื่อนำมาใช้ในการศึกษา โดยนำส่วนที่เป็นเซลล์มาทำการแยก DNA เพื่อทำ PCR ซึ่งได้กล่าวถึงในส่วนของขั้นตอนการทดลองแล้ว เพื่อตรวจหาเชื้อ HPV โดยใช้ primers ที่จำเพาะต่อส่วน E1 gene ของเชื้อ HPV ผลจากการทำ PCR ปรากฏว่า มีตัวอย่างจำนวน 149 ใน 1,698 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.8 % ที่ให้ผล DNA ของ HPV เป็นบวก โดยตัวอย่างเหล่านี้มีทั้งที่ผลทางเซลล์วิทยามีลักษณะเซลล์ที่ปกติและผิดปกติ และจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPV ที่ได้ทำให้พบว่ามีการกระจายตัวของจีโนไทป์เป็นจำนวนมาก โดยสามารถตรวจพบ HPV ได้ทั้งหมด 27 จีโนไทป์ ซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่ได้มีการจำแนกอยู่ทั้งในกลุ่มความเสี่ยงสูง, ความเสี่ยงค่อนข้างสูง, ความเสี่ยงต่ำ และที่ยังไม่ได้จำแนกความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงช่วงอายุในการติดเชื้อ HPV พบว่ามีการติดเชื้อมากที่สุดในกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 30 ปี คิดเป็น 15.4 % จากจำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ HPV ทั้งหมด และจะลดลงเรื่อยๆ เมื่อมีอายุมากขึ้น และจากการศึกษาที่สามารถตรวจพบเชื้อ HPV ได้ทั้งที่เซลล์ไม่มีความผิดปกตินั้น อาจเป็นไปได้ว่ากลุ่มที่เซลล์ไม่มีความผิดปกตินี้เป็นผู้ที่มีการติดเชื้อเป็นครั้งแรก หรือผู้ที่มีการติดเชื้อซ้ำแต่เป็นจีโนไทป์อื่นที่ยังไม่เคยมีการติด ทำให้ในผู้ป่วยรายเดียวกัน สามารถพบเชื้อ HPV ได้หลายจีโนไทป์ และเมื่อนำมาจัดกลุ่มตามความเสี่ยง จะพบเชื้อในทุกกลุ่มความเสี่ยงและหลากหลายจีโนไทป์ แต่เมื่อพิจารณาในตัวอย่างที่มีการพัฒนาของรอยโรคระยะต่างๆจะพบว่าความหลากหลายของจีโนไทป์จะลดลงเรื่อยๆ จนเมื่อมีรอยโรคที่ผิดปกติมากหรือถึงขั้นเป็นมะเร็งปากมดลูกนั้นส่วนใหญ่แล้วจะพบแต่เชื้อ HPV ในกลุ่มความเสี่ยงสูง ทำให้อาจกล่าวได้ว่าเชื้อ HPV ในกลุ่มความเสี่ยงสูงสามารถส่งผลให้เกิดการพัฒนาของรอยโรคจนเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษากลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศในภูมิภาคเอเชียอื่นที่พบเชื้อ HPV กลุ่มความเสี่ยงสูงในกลุ่มเซลล์ที่มีความผิดปกติจนถึงมะเร็งปากมดลูกเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าในช่วงวัยรุ่น หรือช่วงอายุที่มีเพศสัมพันธ์ครั้งแรก จะมีการพบเชื้อ HPV มากกว่าช่วงวัยสูงอายุ และความชุกของเชื้อ HPV ในกลุ่มตัวแทนประชากรมีความใกล้เคียงกันในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา

การจัดกลุ่มจีโนไทป์ของเชื้อ HPV โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน L1 และ E1 จากการทำ phylogenetic analysis พบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree มีการจัดกลุ่มที่ใกล้เคียงกันในลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณยีน L1 และ E1 แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์จีโนไทป์ที่บริเวณ L1 และ E1 นั้น สามารถใช้ในการระบุจีโนไทป์ได้เหมือนกัน และตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV DNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นมีความใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์

ที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล ธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) แสดงว่าเชื้อ HPV ที่พบแต่ละจีโนไทป์ในประเทศไทยนั้นมีความใกล้เคียงกับเชื้อ HPV จีโนไทป์นั้นๆ ในภูมิประเทศต่างๆ

HPV นั้นกล่าวได้ว่าเป็นสาเหตุหลักในการทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงทั่วโลก ดังนั้นเราจึงให้ความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสในประเทศไทย เพื่อที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกัน และรักษาในกลุ่มผู้หญิงในประเทศไทย ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาความชุกของเชื้อ HPV ในกลุ่มตัวอย่าง ที่ได้สุ่มเลือกมาในช่วงปี พ.ศ. 2551-2552 โดยศึกษาจำเพาะส่วน E1 gene ซึ่งความชุกของเชื้อ และจีโนไทป์ที่พบมากโดยทั่วไปนั้น มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลุ่มประเทศกำลังพัฒนาในภูมิภาคเอเชีย ซึ่งคาดว่าจากการศึกษานี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาในอนาคตต่อไป โดยสามารถเป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาวัคซีนให้เหมาะสมกับประชากรในประเทศไทย เพื่อเป็นเครื่องมือสำคัญในการเฝ้าระวัง ดูแลป้องกันการติดเชื้อ HPV ของผู้หญิงในประเทศไทย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

[1] Halfon P, Trepo E, Antoniotti G, Bernot C, Cart-Lamy P, Khiri H, Thibaud D, Marron J, Martineau A, Pénaranda G, Benmoura D, Blanc B; RBML (Réseau de Biologie Moléculaire Libérale). Prospective evaluation of the Hybrid Capture 2 and AMPLICOR human papillomavirus (HPV) tests for detection of 13 high-risk HPV genotypes in atypical squamous cells of uncertain significance. J Clin Microbiol 45 (2007): 313-6.

[2] Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G, Liddle S, Dina R, McCarthy J, Buckley H, Bergeron C, Soutter P, Lyons D, Cuzick J. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 17 (2008): 3033-42.

[3] Cuzick J, Arbyn M, Sankaranarayanan R, Tsu V, Ronco G, Mayrand MH, Dillner J, Meijer CJ. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. Vaccine 19 (2008) (Suppl.): K29-41.

[4] Bhatla N, Dar L, Rajkumar Patro A, Kumar P, Pati SK, Kriplani A, Gulati A, Broor S, Iyer VK, Mathur S, Shah KV, Gravitt PE. Human papillomavirus-type distribution in women with and without cervical neoplasia in north India. Int J Gynecol Pathol 27 (2008): 426-30.

[5] Russell J, Botchan MR. cis-Acting components of human papillomavirus (HPV) DNA replication: linker substitution analysis of the HPV type 11 origin. J Virol 69 (1995): 651-60.

[6] Auster AS, Joshua-Tor L. The DNA-binding domain of human papillomavirus type 18 E1. Crystal structure, dimerization, and DNA binding. J Biol Chem 279 (2004): 3733-42.

[7] Szostek S, Klimek M, Zawilinska B, Kosz-Vnenchak M. Genotype-specific human papillomavirus detection in cervical smears. Acta Biochim Pol 55 (2008): 687-92.

[8] Sandri MT, Riggio D, Salvatici M, Passerini R, Zorzino L, Boveri S, Radice D, Spolti N, Sideri M. Typing of human papillomavirus in women with cervical lesions: prevalence and distribution of different genotypes. J Med Virol 81 (2009): 271-7.

[9] Gheit T, Vaccarella S, Schmitt M, Pawlita M, Franceschi S, Sankaranarayanan R, Sylla BS, Tommasino M, Gangane N. Prevalence of human papillomavirus types in cervical and oral cancers in central India. Vaccine 27 (2009): 636-9.

[10] Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, Syrjänen KJ, Gyllensten UB, Syrjänen SM; NIS Study Group. Prevalence of the most common high-risk HPV genotypes among women in three new independent states of the former Soviet Union. J Med Virol 79 (2007): 771-81.

[11] Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S, Peters LA, Fleuren GJ. Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. Gynecol Oncol 93 (2004): 49-53.

[12] Jenson AB, Rosenthal JD, Olson C, et al. Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. J Natl Cancer Inst 64 (1980): 495-500.

[13] Sundberg JP. Papillomavirus infections in animal. In: Syrjanen K, Gissmann L, Koss LG, eds. Papillomavirus and human disease 40-103. Springer-Verlag, 1987.

[14] Coggin JR, zur Hausen H. Workshop on papillomaviruses and cancer. Cancer Res 39 (1979): 545-6.

[15] Delius H, Hofmann B. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol 186 (1994): 13-32.

[16] Crawford LV, Crawford EM, A comparative study of polyoma and papilloma viruses. Virology 21 (1963): 258-63.

[17] Favre M,Breitburd F, Croissant O, et al. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papilloma viruses. J virol 15 (1975): 1239-47.

[18] Pfister H, Gissman L, zur Hausen H. Partial characterization of proteins of human papillomaviruses (HPV) 1-3. Virology 83 (1977): 131-7.

[19] Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. EMBO J 1 (1982): 231–236.

[20] Baker CC, Howley PM. Differential promoter utilization by the papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. EMBO J 6 (1987): 1027-35.

[21] Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. Antivir.Ther 7 (2002): 219–237.

[22] http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html: MicrobiologyBytes, 2007.

[23] Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. Virus Genes 24 (2002): 275-90.

[24] Clertant P. Seif I. A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins. Nature 311 (1984): 276-9.

[25] Kreider JW. The Shope papilloma to carcinoma complex of rabbits: a model system of neoplastic progression and spontaneous regression. Adv Cancer Res 35 (1981): 81-110.

[26] Chan SY, Delius H, Halpern AL, et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing , phylogeny, and taxonomy. J virol 69 (1995): 3074-83.

[27] Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: Active and latent phases. Semin Cancer Biol 337 (1999): 379-86.

[28] zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 92 (2000): 690-8.

[29] Julie E, Norman J. Human papillomavirus and cancer. Microbiology today (2005): 116-20.

[30] Grassman K, Kratzer F, Petry KU, et al. Functional characterization of naturally occurring mutants of human papillomavirus type 16 with large deletions in the non-coding region. Int J Cancer 68 (1996): 265-269.

[31] Bosch FX, Manos MM, Munoz N et al. Prevalence of human papilomavirus in cervical cancer: A worldwide prospective. J Natl Cancer Inst 87 (1995): 796-802.

[32] Muñoza, N., Castellsagué, X., González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. j.vaccine (24), s1-s10.

[33] K. Shetty & J. Leigh. Development Of Immune Assays For Oral Human Papillomavirus (HPV) In Patients With Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. The Internet Journal of Infectious Diseases 4 (2005).

[34] Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: General features. Clin Dermatol 15 (1997):181-198.

[35] Liaw KL, Glass AG, Manos MM, et al. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. J Natl Cancer Inst 91 (1999): 954-60.

[36] Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. J Natl Cancer Inst 92 (2000): 464-74.

[37] Palefsky JM, Minkoff H, Kalish LA, et al. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) positive and high-risk HIV-negative women. J Natl Cancer Inst 91 (1999): 226-36.

[38] Peter M. Howley, Douglas R. Lowy. Papillomaviruses and Their Replication. In: David M. Knipe. Peter M. Howley, editors. Vriology. 5th edition, 2197-231, 2007.

[39] Cullen AP, Reid R, Campion M, Lörincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. J Virol 65 (1991): 606-12.

[40] Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. Biochem Soc Trans 35 (2007): 1456-60.

[41] Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. Lancet 370 (2007): 890-907.

[42] Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, Bosch F. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. Lancet Infect Dis 7 (2007): 453-59.

[43] Thomas JO, Herrero R, Omigbodun AA, et al. Prevalence of papillomavirus infection in women in Ibadan, Nigeria: a population-based study. Br J Cancer 90 (2004): 638–45.

[44] Castellsague X, Menendez C, Loscertales MP, et al. Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. Lancet 358 (2001): 1429–30.

[45] Baay MF, Kjetland EF, Ndhlovu PD, et al. Human papillomavirus in a rural community in Zimbabwe: the impact of HIV co-infection on HPV genotype distribution. J Med Virol 73 (2004): 481–5.

[46] Chaouki N, Bosch FX, Munoz N, et al. The viral origin of cervical cancer in Rabat, Morocco. Int J Cancer 75 (1998): 546–54.

[47] Ferreccio C, Prado RB, Luzoro AV, et al. Population-based prevalence and age distribution of human papillomavirus among women in Santiago, Chile. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13 (2004): 2271–6.

[48] Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. Int J Cancer 91 (2001): 412–20.

[49] Giuliano AR, Papenfuss MR, Denman CA, et al. Human papillomavirus prevalence at the USA–Mexico border among women 40 years of age and older. Int J STD AIDS 16 (2005): 247–51.

[50] Fairley CK, Chen S, Tabrizi SN, et al. The absence of genital human papillomavirus DNA in virginal women. Int J STD AIDS 3 (1992): 414–7.

[51] Franceschi S, Rajkumar R, Snijders PJ, et al. Papillomavirus infection in rural women in southern India. Br J Cancer 92 (2005): 601–6.

[52] An HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method. Cancer 97 (2003): 1672–80.

[53] Maehama T,Asato T,Kanazawa K. Prevalence of HPV infection in cervical cytology-normal women in Okinawa, Japan, as determined by a polymerase chain reaction. Int J Gynaecol Obstet 69 (2000): 175-6.

[54] Ngelangel C, Munoz N, Bosch FX, et al. Causes of cervical cancer in the Philippines: a case–control study. J Natl Cancer Inst 90 (1998): 43–9.

[55] Baay MF, Tjalma WA, Lambrechts HA, et al. Combined Pap and HPV testing in primary screening for cervical abnormalities: should HPV detection be delayed until age 35? Eur J Cancer 41 (2005): 2704-8.

[56] Ronco G, Ghisetti V, Segnan N, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Turin, Italy. Eur J Cancer 41 (2005): 297–305.

[57] Molden T, Kraus I, Karlsen F, et al. Comparison of human papillomavirus messenger RNA and DNA detection: a cross-sectional study of 4,136 women >30 years of age with a 2-year follow-up of high-grade squamous intraepithelial lesion. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 14 (2005): 367–72.

[58] Peto J, Gilham C, Deacon J, et al. Cervical HPV infection and neoplasia in a large population-based prospective study: the Manchester cohort. Br J Cancer 91 (2004): 942–53.

[59] Lentz M, Zanardi T, Filzen R, Carter J, Hella M. Functional analysis of a carboxyl-terminal phosphorylation mutant of the bovine papillomavirus E1 protein. J Mol Biol. 316 (2002): 599-609.

[60] Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. Int J Gynecol Cancer 15 (2005): 727-46.

[61] Hoffmann R, Hirt B, Bechtold V, Beard P, Raj K. Different modes of human papillomavirus DNA replication during maintenance. J Virol 80 (2006): 4431-9.

[62] Wright TC Jr, Denny L, Kuhn L, et al. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. JAMA 283 (2000): 81-86.

[63] Wright TC Jr, Kuhn L, Denny L. Human papilloma detection to screen for cervical cancer. JAMA 284 (2000): 39-40.

[64] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 348 (2003): 518-27.

[65] Lurchachaiwong W, Junyangdikul P, Payungporn S, Chansaenroj J, Sampatanukul P, Tresukosol D, Termrungruanglert W, Poovorawan Y. Relationship between hybrid capture

II ratios and DNA amplification of E1, E6 and L1 genes used for the detection of human papillomavirus in samples with different cytological findings. Asian Pac J Allergy Immunol 27 (2009): 217-24.

[66] Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. Cancer Cells 7 (1989): 209–14.

[67] Evander M, Edlund K, BodÉn E, *et al.* Comparison of one-step and two step polymerase chain reaction with degenerate general primers in population-based study of Human papillomavirus infection in young Swedish women. J Clin Micro-biol 30 (1992): 987-92.

[68] Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group specific differentation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 33 (1995): 901-5.

[69] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer 94 (2001): 153–6.

[70] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 348 (2003): 518–27.

[71] Pagliusi SR, Teresa Aguado M: Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. Vaccine 23 (2004): 569–578.

[72] Clifford G, Franceschi S, Diaz M, et al. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. Vaccine 24 (2006) (Supp 3): 26–34.

[73] Meijer CJ, Snijders PJ, Castle PE. Clinical utility of HPV genotyping. Gynecol Oncol 103 (2006): 12–17.

[74] De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, et al. Classification of papillomaviruses. Virology. 324 (2004): 17-24.

[75] Ciaran B. J. Woodman, Stuart I. Collins & Lawrence S. Young. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer 7 (2007): 11-22.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. 5xTris borate buffer (5xTBE)

   Tris-base 54 กรัม

   Boric acid 27.5 กรัม

   EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร

   จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. 1x Tris borate buffer (1xTBE)

   5xTBE 200 มิลลิลิตร

   น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร

3. 2% (w/v) agarose gel

   Agarose gel 4 กรัม

   1x TBE 200 มิลลิลิตร

   เขย่าแล้วนำเข้าไมโครเวฟจนกว่า agarose gel จะละลายหมด

4. 10% Ethidium bromide

   Ethidium bromide 30 ไมโครลิตร

   น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

5. Loading dye

   0.25% Bromphenol blue

   40% (w/v) sucrose in water

   จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ 4°C

6. PBS Transport Media

   PBS 50 มิลลิลิตร

   Penicillin + Streptomycin 5,000 ไมโครลิตร

   แบ่งใส่ Microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

แสดงรายงานการตีพิมพ์บางส่วนของวิทยานิพนธ์ในวารสาร

1. คาดว่าจะได้ตีพิมพ์ในวารสาร Asian pacific journal of cancer prevention หัวข้อเรื่อง Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ตรวจพบ HPV DNA ในการศึกษา ในช่วงปี 2551-2552

No.	Code	Age	Cytology result	Genotype	Accession No.
cu428	B2	88	Normal	31	GQ161664
cu429	B4	38	Normal	42	GQ161665
cu430	B11	26	Normal	35	GQ161666
cu431	B12	50	Normal	18	GQ161667
cu432	B54	45	Normal	66	GQ161668
cu433	B55	55	Normal	90	GQ161669
cu434	B60	46	Normal	71	GQ161670
cu435	B63	57	Normal	66	GQ161671
cu436	B83	53	Normal	35	GQ161672
cu437	B84	25	Normal	53	GQ161673
cu438	B90	41	Normal	90	GQ161674
cu439	B93	28	Normal	16	GQ161675
cu440	B551	57	Normal	16	GQ161676
cu441	B564	31	Normal	71	GQ161677
cu442	B523	33	Normal	74	GQ161678
cu443	B528	79	CA	52	GQ161679
cu444	B540	31	Normal	90	GQ161680
cu445	B541	31	Normal	16	GQ161681
cu446	B571	35	Normal	39	GQ161682
cu447	B574	34	Normal	39	GQ161683
cu448	B584	32	Normal	42	GQ161684
cu449	B603	28	Normal	16	GQ161685
cu450	B615	35	Normal	31	GQ161686
cu451	B624	32	Normal	52	GQ161687
cu452	B625	30	Normal	90	GQ161688
cu453	B380	41	Normal	16	GQ161689
cu454	B389	34	Normal	34	GQ161690
cu455	B393	57	Normal	16	GQ161691

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	Code	Age	Cytology result	Genotype	Accession No.
cu456	B395	23	Normal	11	GQ161692
cu457	B404	46	Normal	71	GQ161693
cu458	B415	50	Normal	34	GQ161694
cu459	B418	54	Normal	59	GQ161695
cu460	B419	53	Normal	66	GQ161696
cu461	B424	60	Normal	55	GQ161697
cu462	B647	39	Normal	71	GQ161698
cu463	B650	27	Normal	42	GQ161699
cu464	B202	45	Normal	16	GQ161700
cu465	B248	31	Normal	71	GQ161701
cu466	B256	32	Normal	59	GQ161702
cu467	B365	25	LSIL : CIN 1	66	GQ161703
cu468	B374	25	Normal	66	GQ161704
cu469	B377	26	Normal	91	GQ161705
cu470	B444	37	Normal	71	GQ161706
cu471	B460	25	Normal	53	GQ161707
cu472	B467	64	Normal	16	GQ161708
cu473	B481	50	Normal	71	GQ161709
cu474	B483	25	Normal	39	GQ161710
cu475	B511	27	Normal	16	GQ161711
cu476	B735	24	Normal	31	GQ161712
cu477	B736	46	Normal	71	GQ161713
cu478	B766	54	HSIL : CIN 3	52	GQ161714
cu479	B778	25	Normal	56	GQ161715
cu480	B807	33	Normal	39	GQ161716
cu481	B814	27	Normal	32	GQ161717
cu482	B818	26	Normal	52	GQ161718
cu483	B834	24	Normal	30	GQ161719
cu484	B840	78	HSIL : CIN 3	53	GQ161720
cu485	CU2	53	Normal	68	GQ161721
cu487	CU18	31	LSIL	51	GQ161722

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	Code	Age	Cytology result	Genotype	Accession No.
cu488	CU36	39	Normal	85	GQ161723
cu489	CU40	31	Normal	90	GQ161724
cu490	CU77	60	Normal	16	GQ161725
cu491	CU89	24	Normal	90	GQ161726
cu492	CU94	33	LSIL	66	GQ161727
cu493	CU109	21	Normal	52	GQ161728
cu494	B436	48	Normal	68	GQ161729
cu495	B499	ND	Normal	71	GQ161730
cu496	B737	37	Normal	90	GQ161731
cu497	CU148	35	Normal	90	GQ161732
cu498	CU149	23	Normal	16	GQ161733
cu499	CU159	66	Normal	16	GQ161734
cu500	CU124	39	Normal	16	GQ161735
cu501	CU125	54	Normal	90	GQ161736
cu502	CU136	43	Normal	90	GQ161737
cu503	CU137	43	Normal	90	GQ161738
cu504	CU138	62	Normal	90	GQ161739
cu505	CU139	27	Normal	90	GQ161740
cu506	CU140	47	Normal	90	GQ161741
cu507	CU141	43	Normal	90	GQ161742
cu508	CU142	64	Normal	90	GQ161743
cu509	CU143	38	Normal	90	GQ161744
cu510	CU145	36	Normal	16	GQ161745
cu511	CU193	31	Normal	34	GQ161746
cu512	CU201	57	ASC-US	31	GQ161747
cu513	CU203	42	Normal	52	GQ161748
cu514	CU204	37	Normal	35	GQ161749
cu515	CU208	58	Normal	32	GQ161750
cu486	CU3	48	HSIL : CIN 3	16	GQ161751
cu516	CU19	51	Normal	66	GU447239
cu517	CU100	33	Normal	66	GU447240

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	Code	Age	Cytology result	Genotype	Accession No.
cu518	CU263	50	Normal	71	GU447241
cu519	CU284	29	Normal	90	GU447242
cu520	CU293	31	AGC	16	GU447243
cu521	CU332	35	Normal	16	GU447244
cu522	CU375	27	ASC-US	51	GU447245
cu523	CU435	44	Normal	81	GU447246
cu524	CU499	50	Normal	16	GU447247
cu525	CU567	37	ASC-US	42	GU447248
cu526	CU569	26	Normal	16	GU447249
cu527	CU582	41	Normal	31	GU447250
cu528	CU584	43	Normal	16	GU447251
cu529	CU585	29	Normal	31	GU447252
cu530	CU586	47	Normal	71	GU447253
cu531	CU592	37	Normal	68	GU447254
cu532	CU600	33	Normal	68	GU447255
cu533	CU642	33	Normal	16	GU447256
cu534	CU651	34	Normal	70	GU447257
cu535	CU679	56	Normal	68	GU447258
cu536	CU706	30	Normal	52	GU447259
cu537	CU717	39	Normal	39	GU447260
cu538	CU731	33	Normal	71	GU447261
cu539	CU737	47	Normal	90	GU447262
cu540	CU757	50	Normal	68	GU447263
cu541	CU795	56	Normal	71	GU447264
cu542	CU798	63	Normal	59	GU447265
cu543	CU813	30	Normal	90	GU447266
cu544	CU816	30	LSIL	6	GU447267
cu545	CU822	44	Normal	42	GU447268
cu546	CU832	38	ASC-US	42	GU447269
cu547	B150	40	Normal	34	GU447270
cu548	B158	29	Normal	66	GU447271

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

No.	Code	Age	Cytology result	Genotype	Accession No.
cu549	B176	53	Normal	71	GU447272
cu550	B197	36	CA	16	GU447273
cu551	B198	37	Normal	82	GU447274
cu552	B203	49	Normal	16	GU447275
cu553	B290	26	HSIL : CIN 2-3	11	GU447276
cu554	B545	29	Normal	71	GU447277
cu555	B634	48	Normal	34	GU447278
cu556	B656	31	Normal	34	GU447279
cu557	B695	32	Normal	66	GU447280
cu558	B702	ND	Normal	31	GU447281
cu559	B724	41	HSIL : CIN 2-3	16	GU447282
cu560	B735	24	Normal	31	GU447283
cu561	B736	46	Normal	71	GU447284
cu562	B747	ND	CA	16	GU447285
cu563	B765	35	Normal	16	GU447286
cu564	B770	26	LSIL : CIN 1	30	GU447287
cu565	B774	ND	Normal	90	GU447288
cu566	B775	22	Normal	42	GU447289
cu567	B51	33	LSIL : CIN 1	56	-
cu568	B88	30	Normal	90	-
cu569	B99	31	Normal	34	-
cu570	B101	32	Normal	16	-
cu571	B119	25	Normal	34	-
cu572	B123	27	Normal	90	-
cu573	B126	36	Normal	90	-
cu574	B128	32	Normal	52	-
cu575	B133	43	Normal	16	-
cu576	B135	25	Normal	31	-
cu577	B138	50	Normal	90	-

ND = No data

CA = Cervical carcinoma

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล จิระ จันท์แสนโรจน์ **เพศ** ชาย

อายุ 23 ปี **เกิด** 10 มิถุนายน พ.ศ.2529

สถานที่เกิด โรงพยาบาลหัวเฉียว จังหวัดกรุงเทพฯ

ที่อยู่ 60/89 ซอย บรมราชชนนี 41 ถนน บรมราชชนนี เขต ตลิ่งชัน กรุงเทพฯ 10170

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรีสำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีวเคมี)
จาก คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีพ.ศ. 2550

ระดับปริญญาโท เข้าศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2551

การตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

เสนอผลงานหัวข้อเรื่อง : Prevalence and genotypes of human papillomavirus among Thai women. เพื่อตีพิมพ์ในวารสาร Asian Pacific Journal of Cancer Prevention

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย