การตรวจหาชนิดของ HUMAN PAPILLOMAVIRUS ใน CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN) ระยะที่ III โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และ ดอท ไฮบริไดเซชัน

นาย มณฑล เลิศวรปรีชา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-952-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18207650

DETECTION AND TYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN) GRADE III BY PCR AND DOT HYBRIDIZATION

Mr. Monthon Lertworapreecha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology
Inter-Department of Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-637-952-6

Thesis Title	Detection and Typing of Human Papillomavirus in Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) Grade III by PCR and Dot Hybridization
By	Mr. Monthon Lertworapreecha
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Somchai Niruthisard, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Supawat Chutivongse

..... Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee :

Vanna Punnarugsa .....Chairman

(Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.)

Parvapan Bhattarakosol ..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

Somchai Niruthisard .....Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Somchai Niruthisard, M.D.)

Sontana Siritantikorn .....Member

(Assistant Professor Sontana Siritantikorn, Ph. D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

มณฑล เลิศวรปรีชา : การตรวจหาชนิดของ HUMAN PAPILLOMAVIRUS ใน CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN) ระยะที่ III โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และ ดอท ไฮบริไดเซชั่น (DETECTION AND TYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN) GRADE III BY PCR AND DOT HYBRIDIZATION)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. นพ. สมชัย นิรุตติศาสน์ ; 85 หน้า. ISBN 974-637-952-6.

Genital human papillomavirus (HPV) มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก โดยมีการพัฒนามาจากระยะก่อนมะเร็งที่เรียกว่า cervical intraepithelial neoplasia (CIN) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ CIN-I, CIN-II, และ CIN-III ในปัจจุบันนี้สามารถจำแนก HPV ได้มากกว่า 70 types และประมาณ 35 types มีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรคที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (anogenital tract) ในจำนวนนี้โดยประมาณ 20 types หรือมากกว่าพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิด CIN และมะเร็งปากมดลูก (cervical cancer)

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงความชุกของการติดเชื้อ HPV และการแพร่กระจายของเชื้อ HPV-type ต่างๆในผู้ป่วย CIN ระยะที่ III จำนวน 100 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับผู้ป่วย chronic cervicitis เป็นตัวอย่างควบคุม จำนวน 100 ตัวอย่าง เนื้อเยื่อจากตัวอย่างทั้งหมดถูกตรึงด้วยฟอร์มาลินและฝังเก็บในพาราฟิน (formalin-fixed paraffin embedded tissue) และตรวจหาเชื้อ HPV โดยวิธี PCR ด้วย L1 consensus primers ตัวอย่างที่ผ่านขบวนการ PCR แล้วนำมาทำการวิเคราะห์ ด้วยวิธี gel electrophoresis (GE) และ dot hybridization (DH) โดยใช้ตัวตรวจจับทั่วไป (generic probe ; GP), และ ตัวตรวจจับแบบจำเพาะ (type-specific probes ; TS) ต่อ HPV-6, 11, 16, 18 และ 33 (TS-6, TS-11, TS-16, TS-18 และ TS-33)

ผลการศึกษาในตัวอย่าง CIN-III สามารถตรวจพบ HPV-DNA 72 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 72 และในกลุ่มควบคุมตรวจพบเพียง 6 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 6 ผู้ป่วย CIN-III มีโอกาสตรวจพบเชื้อ HPV มากกว่ากลุ่มควบคุมถึง 40.28 เท่าโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ (95% CI = 19.23-84.35) ในตัวอย่างกลุ่ม CIN-IIIพบว่าส่วนใหญ่เป็น HPV-16คิดเป็นร้อยละ 48.61 (35/72) รองลงมาคือ HPV-18 พบเป็นร้อยละ 15.27 (4/72), HPV-6 และ HPV-33 พบจำนวนเท่ากันคือ 4 จาก 72 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.56 และ HPV-11 พบร้อยละ 2.7 (2/72) นอกจากนี้มี 10 ตัวอย่างที่มีการติดเชื้อร่วมกันมากกว่า 1 type ได้แก่ HPV-6/16, HPV-16/18, HPV-16/33 และ HPV-16/18/33 ที่เหลือ 27 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 37.5 ไม่สามารถทำการจำแนก type ได้ ในตัวอย่างกลุ่มควบคุมตรวจพบ HPV-6 ร้อยละ 33.3 (2/6) และ HPV-18 ร้อยละ 16.6 (1/6) อีก 3 ตัวอย่างไม่สามารถทำการจำแนก type ได้ ผลการวิจัยครั้งนี้สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า HPV บาง type โดยเฉพาะ HPV-16 และ 18 มีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับการเกิด CIN และ มะเร็งปากมดลูก

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

C745506 MEDICAL MICROBIOLOGY
: MAJOR
KEY WORD: HUMAN PAPILLOMAVIRUS / CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIS / PCR / DOT HYBRIDIZATION

MONTHON LERTWORAPREECHA : DETECTION AND TYPING OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA (CIN) GRADE III BY PCR AND DOT HYBRIDIZATION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D. THESOS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. SOMCHAT NIRUTHISARD, MD. 85 pp. ISBN 974-637-952-6.

Genital human papillomavirus (HPV) is one of the most important causative agent in cervical cancer which is developed from precancerous lesion known as cervical intraepithelial neoplasia (CIN-I, CIN-II, and CIN-III).To date over 77 different HPV-types have been identified. More than 35 types are involved in anogenital diseases and 20 types or more are associated with CIN and cervical malignancy.

In this study, the prevalence of HPV-infection in CIN-III and distribution of HPV-types were investigated A hundred tissue samples diagnosed as CIN-III and 100 tissues from chronic cervicitis (with a normal histologic appearance) selected as a control group were used. All specimens were formalin-fixed and paraffin embedded tissues. The extracted DNA were prepared and screened for HPV by polymerase chain reaction (PCR) using L1 consensus primers. All amplified products were analyzed by gel electrophoresis (GE) and dot hybridization (DH) using generic probe (GP), and type-specific probe (TS) specific for HPV-6,11,16,18, and 33 (TS-6, TS-11, TS-16, TS-18, and TS-33).

HPV-DNA was detected in 72 % (72/100) of CIN-III 6% (6/100) of the control group, giving a crude odd ratio of 40.28 (95% CI= 19.23-84.35). Among the CIN-III group, the most prevalent was HPV-16 ; 48.61% (35/72) followed by HPV-18 ; 15.27 (11/72), HPV-6 and 33 were detected in equal percentage 5.56% (4/72) and HPV-11 was found 2.7% (2/72). Mixed infection was identified in 10 specimens i.e., HPV-6/16, HPV-16/18, HPV-16/33, and HPV-16/18/33. Twelve samples (37.5) were untyped. Our results support the hypothesis that certain HPV-types especially HPV-16 and 18 are greatly involved in the development of CIN and cervical cancer.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

It is a great pleasure to express my deep gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible :

First and foremost, I would like to express my sincere appreciation to Assistant Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her kindness, devotion, suggestions, and indispensable help in supervising this thesis.

I am particularly grateful to Associate Professor Dr. Somchai Niruthisard, Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for his kindness providing the specimens and valuable advice.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Pornthep Teinsiwakul, Department of Clinical Microscopy, Faculty of Allied Health Sciences, Chulalongkorn University, for his kindness supporting some chemical reagents, Associate Professor Dr. Viraphong Lulitanond, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kean University, for providing the standard plasmid HPV-DNA and also to Assistant Professor Dr. Ariya Chindamporn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her helping in English correction.

Sincere thanks and appreciation are extended to the members of my thesis committees, Associate Professor Dr. Vanna Punnarugsa, the chairman of thesis committee and Assistant Professor Dr. Sontana Siritantikorn, the member of thesis committee for their kindness, helpful suggestions and criticism.

I am indebted to the Molecular Research Project, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and the Graduate School, for funding of my study.

Special thanks are given to the staffs of the Cytology laboratory unit, Department of Obstetric and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their friendship and help in collecting the specimens.

Sincere appreciation are extended to all personnel of the Department of Microbiology for their friendship, encouragement, and providing the facilities needed.

Finally, I wish to express my infinite thank to my mother and my brother for their love, support and understanding throughout my life.

CONTENTS

page

THAI ABSTRACT..... iv
ENGLISH ABSTRACT..... v
ACKNOWLEDGEMENTS..... vi
CONTENTS..... vii
LIST OF TABLES..... ix
LIST OF FIGURES..... x
ABBREVIATIONS..... xi
CHAPTER
I. INTRODUCTION..... 1
II. REVIEW OF LITERATURE
Histology..... 4
Virology..... 5
Genome structure..... 5
Viral proteins..... 8
Viral replication..... 10
Classification..... 12
Route of transmission..... 14
Role of HPV in human diseases..... 14
HPV infection of the genital tract..... 18
Association of HPV and CIN..... 19
Role of HPV in developing of cervical cancer.... 20
Immune response to HPV infection..... 24
Laboratory diagnosis..... 25

page

III. MATERIALS AND METHODS

Samples..... 32

DNA extraction..... 32

Preparation of standard DNA..... 33

Polymerase chain reaction (PCR)..... 34

Gel electrophoresis (GE)..... 35

Hybridization..... 36

IV. RESULTS

Isolation of DNA from paraffin tissue..... 41

Preparation of standard plasmid DNA 41

The sensitivity of PCR reaction..... 42

Detection of HPV-DNA in clinical specimens by PCR, GE and DH..... 44

Optimization of the temperature for type specific probes hybridization..... 48

Typing of HPV-DNA by type-specific probes.... 50

Southern blot hybridization 53

V. DISCUSSION..... 55

REFERENCES..... 61

APPENDIX I..... 76

APPENDIX II..... 78

BIOGRAPHY..... 85

LIST OF TABLES

Table page

1. HPV proteins and their possible functions..... 11
2. Association of HPV types to human diseases..... 17
3. Diagnostic methods of anogenital HPV infection..... 28
4. Properties and sequence of primers and probes..... 35
5. The optimized condition of hybridization for each probes..... 40
6. Crude ORs for the association between CIN-III and HPV-DNA in CIN-III and control group..... 46
7. Distribution of HPV-types(s) in CIN-III and control group..... 52

LIST OF FIGURES

Figure page

1. Structure of papillomavirus virion..... 6
2. Structure and coding region of HPV-16 and HPV-11 genome..... 7
3. Phylogenetic tree of papillomavirus..... 13
4. Model of the etiologic interaction of high risk HPV E6 and E7..... 23
5. Principles of Southern blot hybridization using radiolabelling probes..... 29
6. Principles of polymerase chain reaction (PCR)..... 31
7. Principles of the ECL' 3 oligolabelling and detection system..... 38
8. Determination of PCR sensitivity for detection of purified plasmid HPV-DNA 43
9. Detection of HPV-DNA in tissue samples by PCR and GE..... 45
10. Detection of HPV-DNA by DH with GPs (GP01 and GP02).....47
11. Optimization of temperature for type specific probe hybridization..... 49
12. Detection and typing of amplified product by DH using GPs and TS probes..... 51
13. Detection of HPV-DNA by Southern blot hybridization in samples which PCR negative but DH positive..... 54

ABBREVIATIONS

bp	base pair
BPV	Bovine papillomavirus
°C	degree celsius
cdk	cyclin dependent kinase
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
CTL	cytotoxic T lymphocyte
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
dUTP	deoxyuridine triphosphate
DDW	deionized distilled water
DH	Dot hybridization
DNA	deoxyribonucleic acid
DW	distilled water
ECL	Enhance chemiluminescense
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
et al	et alii
FISH	Filter *in situ* hybridization
g	Gram
GE	Gel electrophoresis
HPV	Human papillomavirus
kb	Kilobase
KH_2PO_4	Potassium di-hydrogen phosphate
M	Molar
mg	Milligram
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Sodium chloride

NaOH	Sodium hydroxide
ng	Nanogram
nm	Nanometer
OD	Optical density
OR	Odd ratio
ORF	Open reading frame
Pap smear	Papanicolaou smear
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
pmole	Picomole
pRB	Retinoblastoma protein
RIPA	Radio immunoprecipitation assay
rpm	round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SSC	Saline sodium citrate
STD	Sexually transmitted disease
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
μg	Microgram
μl	Microliter
μM	Micromolar
UV	Ultraviolet
VLPs	Viral like particles
WHO	World Health Organization