บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

โครงสร้างและคุณสมบัติโดยทั่วไปของ HPV

HPV เป็นไวรัสใน genus papillomavirus family papovaviridae อนุภาคไวรัสประกอบด้วยแคพสิดจำนวน 72 capsomers เรียงตัวเป็นรูป icosahedral ไม่มีเอนเวลลอบ (nonenveloped icosahedral capsid) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 55 nm (14) ภายในบรรจุสารพันธุกรรมชนิด DNA เป็นเส้นคู่ อยู่เป็นวงกลมปิด (closed circular double stranded DNA) มีขนาดความยาวประมาณ 7.9 กิโลเบส น้ำหนักโมเลกุลของ DNA 5.2 x 10^6 dalton (15)

อนุภาคสมบูรณ์มี sedimentation coefficient 296-300 S, Buoyant density 1.34 g/ml ไวรัสสามารถถูกทำลายให้หมดสภาพการติดเชื้อได้โดย 0.4% formalin ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 72 ชั่วโมง (16)

แคพสิดประกอบไปด้วยโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิดคือ โปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 54,000 dalton (17) เป็นโปรตีนแคพสิดที่พบมากที่สุด (major capsid protein) และโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 76,000 dalton ซึ่งพบน้อยมาก (minor capsid protein) (18)

การจัดกลุ่ม

การจัดกลุ่มของ HPV type ต่างๆ จะใช้หลักการแบ่งกลุ่มโดยอาศัยคุณสมบัติของสารพันธุกรรม (genotyping) มากกว่าคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาทางน้ำเหลือง (serotyping) เนื่องมาจาก HPV ยังไม่สามารถทำการเพาะแยกในเซลล์ได้ซึ่งแตกต่างจากไวรัสกลุ่มอื่นๆ (19,20) การศึกษาโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลได้รับการ

ตรวจสอบครั้งแรกโดย Crawford ปี คศ.1965 (21) พบว่า HPV และ papillomavirus ของสัตว์ species อื่นมีความใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide sequence) พบว่ามีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นการจัดกลุ่มจึงอาศัยเทคนิคการทำ DNA hybridization และการย่อยด้วย restriction endonuclease enzyme โดยแบ่งออกได้เป็น group, sub-group, type และ sub-type ดังนี้คือ

Group: โดยใช้การ hybridization ถือความแตกต่างที่น้อยกว่า 1% ปัจจุบันมี 16 groups คือ group A-P

Sub-group: โดยใช้การ hybridization ถือความแตกต่างระหว่าง 1-30% มีแบ่ง sub-group เฉพาะใน group B, D และ E

Type: โดยใช้การ hybridization ถือความแตกต่างกันที่มากกว่า 50% ซึ่งพบอย่างน้อย 65 types (10)

Sub-type: โดยการหาความแตกต่างของ restriction endonuclease clevage site

โครงสร้างและหน้าที่ของ HPV-DNA

มีการศึกษาในระดับยีนของ HPV เรื่อยมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1982 จนถึงปัจจุบันมีรายงานการนำสารพันธุกรรมมาสอดแทรกเข้า plasmid (cloning) และ การศึกษาลำดับการเรียงตัวของเบส (base sequencing) ของ HPV-1, 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33, และ 52 (22,23) อย่างไรก็ตามความรู้ในด้านโครงสร้าง และการทำงานของยีนต่างๆ ในสารพันธุกรรม (genetic organization) ของ HPV ได้มาจากการเปรียบเทียบการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) กับ bovine papillomavirus-1 (BPV-1) (24) เนื่องจากBPV-1 สามารถทำการเพาะ

เพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ ทำให้ยอมรับว่าเป็น prototype ของ papillomaviruses จากการศึกษา DNA sequence, RNA mapping และ functional analysis ใน *in vitro* transformation assay พบว่าสารพันธุกรรมของ papillomavirus ประกอบด้วย 3 functional regions (รูปที่ 1 และ ตารางที่ 1) ได้แก่

1. Early (E) region ประกอบด้วย E1-E7 ทำหน้าที่สร้างโปรตีนหลายชนิดซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ cellular transformation, episomal replication และ transcriptional control

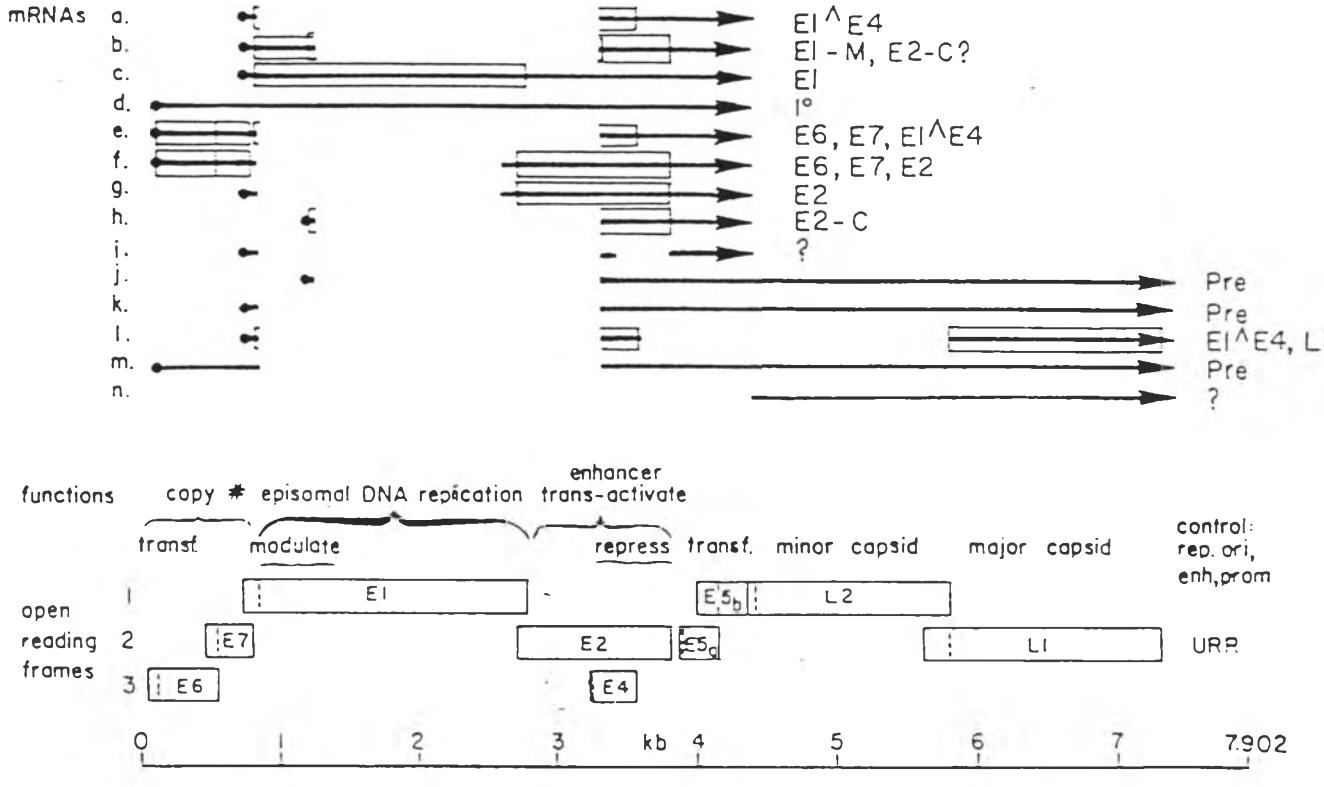
2. Upstream regulatory region (URR) หรือ Long control region (LCR) อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ L-ORF (open reading frame) กับปลายด้าน 5' ของ E-ORF ยีนส่วนนี้มีหน้าที่ในการควบคุมขบวนการ replication

3. Late (L) region ประกอบด้วย L1 ORF สร้าง major capsid protein และ L2 ORF สร้าง minor capsid protein

พบว่าการเรียงลำดับเบสบริเวณ E1, และ L1 ORF มีความคงที่ในการเรียงตัวของลำดับเบสสูง (highly conserved) (25) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการทำปฏิกิริยาข้ามระหว่างไวรัสแต่ละตัว (cross hybridization)

การเพิ่มจำนวนของ HPV

เนื่องจาก HPV ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยง ดังนั้นข้อมูลของการเพิ่มจำนวนส่วนใหญ่จึงได้มาจากการศึกษาของ BPV-1 ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์ bovine fibroblast ได้ การศึกษานี้ทำให้ทราบหน้าที่ของยีนต่างๆ ดังกล่าวมาแล้ว (ตารางที่ 1) การศึกษาของ HPV เริ่มจากความพยายามศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่ได้รับการติดเชื้อ HPV พบว่า การเพิ่มจำนวนของ HPV-DNA สัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ในแต่ละรอบ โดยเฉพาะเซลล์ผิวหนังชนิดหนึ่งคือ keratinocyte (28) ทำให้มีข้อสันนิษฐานว่า การติดเชื้อ HPV เกิดขึ้นที่บริเวณ basal cell



รูปที่ 1: โครงสร้าง และ coding region ของ HPV DNA (26)

ตารางที่ 1: แสดง function ของ papilomavirus open-reading frame (ORF) (27)

ORF	function
E1	plasmid replication
E2	regulation of transcription
E3	ยังไม่ทราบแน่นอน
E4	coding for late cytoplasmic protein
E5	transformation by BPV-1
E6	transformation by HPV-16, 18
E7	transformation by HPV-16, 18
E8	ยังไม่ทราบแน่นอน
L1	coding for major capsid protein
L2	coding for minor capsid protein

ของเยื่อบุผิวของผิวหนังโดยที่ไวรัสจะหลบซ่อน (latency period) อยู่ในนิวเคลียสในรูปของ extrachromosomal plasmid หรือ episome จนกระทั่งเซลล์ที่มีไวรัสอยู่ภายในมีการเพิ่มจำนวน และเปลี่ยนแปลง (proliferation and differentiation) HPV-DNA ก็จะทำหน้าที่ขยายจำนวน และสร้างไวรัสขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกการกระตุ้นที่แน่ชัด

จากการศึกษาภาวะของ HPV-DNA ที่อยู่ภายในเซลล์ติดเชื้อ HPV จากโรคต่างๆเช่น มีการศึกษาใน HPV-1 virions (DNA) พบว่า plantar wart, skin wart, genital condylomas HPV-DNA จะอยู่ในลักษณะ extrachromosomal plasmid (29) แต่เซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงจนเป็นเซลล์มะเร็ง (malignant cells หรือ carcinomas) พบว่า HPV-DNA ส่วนใหญ่จะสอดแทรกเข้าไป (integrated) อยู่ใน cellular genome แต่ในบางครั้งก็สามารถพบ viral DNA ในรูปของ extrachromosomal DNA ได้บ้างแต่น้อย (30)

<u>HPV กับการเกิดโรคในคน</u>

การติดต่อของเชื้อมีได้หลายทางได้แก่ การสัมผัสเชื้อโดยตรง (direct skin contact), การสัมผัสโดยอ้อม (indirect skin contact) เช่นการใช้เสื้อผ้าร่วมกัน, การมีเพศสัมพันธ์ (sexual intercourse) นอกจากนี้อาจติดต่อโดยผู้ป่วยเอง เรียกว่า autoinoculation ได้แก่ การเกาบริเวณที่เป็นโรคแล้วไปเกาในบริเวณอื่นของร่างกายที่ยังไม่ได้รับเชื้อ เป็นต้น

ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HPV ได้แก่ บุคลากรทางการแพทย์เช่น แพทย์, พยาบาล ที่ต้องสัมผัสกับผู้ป่วย บุคคลที่มีพฤติกรรมเที่ยวสำส่อนทางเพศและ ผู้ที่มีภาวะกดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression)

ระยะฟักตัวของโรคยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากการทดลองในสัตว์ทดลองใช้เวลาประมาณ 3-18 เดือน แต่ในคนถ้าผ่านทางเพศสัมพันธ์จะใช้เวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์

(31) ลักษณะของโรคที่ปรากฏและรู้จักกันทั่วไปคือ โรคหูด (wart) ลักษณะการเกิดโรคหูดสามารถจัดแบ่งตามตำแหน่งที่เกิดโรคได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. <u>บริเวณผิวหนังทั่วไป</u> (Non-genital: skin) กลุ่มไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคคือ cutaneotropic HPV ได้แก่ HPV-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 34, 36, 37, 38, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 57, 60 ไวรัสกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในผู้ป่วย epidemodysplasia verruciformis (EV) [EV: เป็นโรคทางพันธุกรรมมีความผิดปกติของยีน อย่างน้อย 2 แห่ง อาจเป็น autosomal recessive หรือ X-linked ผู้ป่วย EV นี้มีความบกพร่องของ T-cell ทำให้มีการติดเชื้อ HPV ได้บ่อยและเป็นการติดเชื้อหลายตำแหน่งพร้อมกันได้ (multiple infection)] อีกด้วย

2. <u>บริเวณเซลล์เยื่อเมือก</u> (mucous membrane) แบ่ง HPV ออกเป็นอีก 2 กลุ่มย่อยคือ

2.1 <u>Genital mucosotropic HPV</u> ได้แก่ HPV-6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 มักพบมากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์

2.2 <u>Oral mucosotropic HPV</u> ได้แก่ HPV-13, 32, 30, 57 พบที่บริเวณช่องปาก

เมื่อไวรัสเข้าเจริญในเซลล์ (cutaneous และ mucosal squamous epithelium) จะทำให้มีการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (induce epithelial cell proliferation) เกิดเป็นก้อนเนื้อนูนขึ้นมาที่เรียกว่า หูด (wart) ซึ่งก้อนเนื้อนี้อาจจะเป็นเนื้องอกที่ไม่ร้ายแรง (benign tumor) หรือ กลายเป็นเนื้อมะเร็ง (malignant tumor) ซึ่งสามารถกระจายลุกลามออกไปได้ในลักษณะของมะเร็งทั่วไป ตารางที่ 2 แสดงการจัดแบ่งกลุ่มของ HPV types กับการเกิดเนื้องอกชนิดต่างๆ

ตารางที่ 2: การจัดแบ่งกลุ่ม ของ HPV types กับการเกิดเนื้องอกชนิดต่างๆในคน

Group I-Skin	
1, 4	Plantar warts (benign)
2, 26, 28, 29	Common warts (benign)
3, 10, 27	Flat warts (benign)
7	Butcher's warts (benign)
Group II-Epidermodysplasia verruciformis	
5, 8	Macular lesions (frequently malignant)
9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36, 46-50	Macular or flat lesions (benign-rarely malignant)
Group III-Mucosa	
6, 11, 34, 39, 41-44, 51-55	Condyloma/CIN* (rarely malignant)
13, 32	Focal epithelial hyperplasia (benign)
16, 18	Condyloma/CIN (frequently malignant) Bowenoid papulosis(?)
30, 31, 33, 35, 45, 56	Condyloma/CIN (occasionally malignant)

* CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia

คัดลอกจาก Pfister, H. 1984 (34)

ในคน จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ HPV types กับการเกิดการพัฒนาไปเป็นเนื้อมะเร็ง ทำให้แบ่ง HPV ออกเป็นอีก 2 กลุ่ม (32,33) คือ

1. Low risk group หมายถึง HPV types ที่ก่อให้เกิดรอยโรคแล้วมีโอกาสเปลี่ยนไปเป็นเนื้อมะเร็งได้น้อยมากได้แก่ HPV-6, HPV-11 เป็นต้น

2. High risk group หมายถึง เมื่อมีการติดเชื้อจาก HPV types ในกลุ่มนี้ โอกาสที่รอยโรคจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อมะเร็งมีโอกาสสูงมาก ได้แก่ HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, และ 56 เป็นต้น

บทบาทของ HPV กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก

โดยทั่วไปโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ HPV ที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก จะสังเกตเห็นได้ชัดเจนที่รู้จักกันคือ โรคหูดหงอนไก่ หรือ condyloma acuminata จากการศึกษาโดยใช้ nucleic acid hybridization พบว่าส่วนมากมีสาเหตุการติดเชื้อจาก HPV-6 และ 11 (35,36) การกลายเป็นมะเร็งของโรคหูดหงอนไก่นี้มีโอกาสน้อยมาก แต่พบว่าประมาณ 70% ของการติดเชื้อ HPV บริเวณปากมดลูกจะทำให้เกิดลักษณะ flat wart หรือ noncondyloma cervical wart ซึ่งจะสังเกตเห็นเมื่อใช้กล้อง colposcope ตรวจวินิจฉัยเท่านั้น ในกรณีเช่นนี้พบว่าเซลล์ติดเชื้อสามารถเปลี่ยนและ กลายเป็น dysplasia หรือ CIN และเป็น invasive carcinoma (11) มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HPV type กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มดลูกในระยะต่างๆกัน ผลปรากฏว่า เนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกจะมี HPV-DNA อยู่ประมาณ 90% (4, 37,38) และ พบ HPV-16 และ 18 เป็นส่วนใหญ่ประมาณ 70-95% (30,39,40)

การศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่า ในเซลล์มะเร็งดังกล่าวจะมียีน E6 และ E7 ของ HPV-16 หรือ 18 สอดแทรกอยู่ มีการสร้าง E6, E7 protein ซึ่งเข้าใจว่าจะมีบทบาทที่ทำให้เกิด dysplasia และพัฒนาไปเป็นมะเร็งในที่สุด (41)โดยถ้า HPV-DNA แทรกเข้าไปในตำแหน่งที่มีการแสดงออก (expression) จะมีการสร้างโปรตีนของไวรัส

ออกมาอย่างมากมาย E7 เป็น oncoprotein ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติสามารถเปลี่ยนแปลงเซลล์ ได้ (42,43) และ E6 protein ก็มีคุณสมบัติสามารถทำให้ primary human cells โดยเฉพาะ squamous epithelial cell คงอยู่ไม่ตาย (immortalization) (44,45) มีรายงานพบว่า E6 และ E7 อยู่ร่วมกันจะทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (46) นอกจากนี้โดยเฉพาะ E6 protein ของ HPV-16 และ 18 มีคุณสมบัติจับเกาะกับ cellular tumor suppressor protein คือ p53 มีผลทำให้ p53 ถูกทำลายและหมดไป (47) ซึ่ง p53 เป็นโปรตีนควบคุม cellular DNA replication และ transformation (48)

การสอดแทรกของ HPV-DNA นอกจากยีน E6 และ E7 แล้วยังอาจมี E-region อื่นที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ transcriptional regulation เช่น E2 เป็นต้น ซึ่งถ้าไปสอดแทรกอยู่หน้า cellular oncogene เช่น *myc* gene ก็จะพบว่ามี *myc* protein เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากมาย ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดเซลล์มะเร็งได้ (49)

<u>การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน</u>

พบว่าการคงอยู่ของโรคหูด จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการตอบสนองทางภูมิต้านทานของแต่ละบุคคล การศึกษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก HPV พบว่า cellular immunity ถูกกระตุ้นเมื่อแผลเริ่มหายโดย immunity ช่วงนี้จะเป็น type specific ดังนั้นการมีแอนติบอดีจะใช้ประโยชน์ในการพยากรณ์ผลการรักษาได้

<u>Humoral immunity</u> มีการทดลองใช้ undisrupted HPV virion (HPV-1, 5, 6, 6b, 8, 11) จาก pooled skin wart biopsies เป็น target (50,51) พบว่า HPV infection ชักนำให้เกิดแอนติบอดีในระดับต่ำๆ (โดยทั่วไปไตเตอร์น้อยกว่า 1:200) การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันนี้ทำกันหลายวิธีได้แก่ immune electron microscopy (52), monoclonal antibodies (53), agar gel diffusion (54), complement fixation (51), radioimmunoassay (RIA) (50), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (55),

heamagglutination inhibition (56) จากการศึกษาพอจะบอกได้ว่า humoral immunity มีผลต่อไวรัสน้อยมาก

Cell-mediated immmunity เป็นระบบสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ HPV โดยเป็น HPV type specific การศึกษาพบว่า structural, nonstructural protein ของไวรัสจะถูก recognized โดย cellular immune response ในปี ค.ศ.1987 Campion (57) ได้รายงานว่า macrophage (langerhan cells) ของ squamous epithelium มีบทบาทสำคัญในกรณีของ mucosotropic HPV infection

การตรวจวิเคราะห์ HPV ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจ หรือศึกษาไวรัสในสมัยก่อนส่วนมากใช้การตรวจจากรอยแผลโดยตรง เช่น การตัดชิ้นเนื้อมาตรวจสามารถแบ่งวิธีการตรวจได้ 3 วิธีได้แก่

1. Histologic examination (5,58) ดูลักษณะของเซลล์ koilocyte (squamous cell ที่มีขนาดใหญ่ ติดสีทึบหนึ่งหรือสอง nucleus ลักษณะ chromatin ไม่ชัดเจน อาจทึบ หรือ มีลักษณะเปรอะๆ รอบ nucleus มีช่องว่างอยู่โดยรอบ ซึ่งขอบชัดเจนแต่ไม่เรียบ cytoplasm รอบ nucleus ติดสีไม่สม่ำเสมอ) ลักษณะนี้เป็นลักษณะสำคัญของการติดเชื้อ HPV จากการย้อมสีทางพยาธิวิทยา

2. Direct virus detection (6,7) โดยตรวจดูอนุภาคไวรัสในตัวอย่างผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

3. Direct antigen detection (59) เป็นการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะของไวรัสโดยวิธีการต่างๆเช่น ELISA, immunofluorescence assay (IFA) staining by monoclonal antibody

ข้อจำกัดของวิธีการเหล่านี้คือ ไม่สามารถบ่งบอก type ของไวรัสได้, ความไวของการตรวจต่ำ และ จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะเช่น การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน, การตรวจหา koilocyte เป็นต้น

ต่อมาเทคนิคในการตรวจหาได้พัฒนาขึ้นโดยเฉพาะเทคนิคทางด้าน molecular biology และ hybridization (ตารางที่ 3) ทำให้เราสามารถหาวิธีการตรวจที่รวดเร็ว, แม่นยำมากขึ้น Hybridization เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่สงสัยอย่างเฉพาะเจาะจง โดยทำการตรึงสารพันธุกรรม DNA ที่ต้องการตรวจหาบนแผ่น membrane เป็นตำแหน่งเฉพาะ นำแผ่น membrane นี้ผ่านขั้นตอนแยก DNA ออกเป็นสายเดี่ยว แล้วให้ทำปฏิกิริยากับสายตรวจจับ DNA จำเพาะ (probe) ที่ติดสลากกับสารกัมมันตภาพรังสี หรือ เอ็นไซม์ซึ่งเป็นสารปลอดกัมมันตภาพรังสี ในสภาวะที่เหมาะสมจะมีการจับเกาะเป็นคู่ของสาย DNA ที่อยู่บนแผ่น membrane กับ probe ถ้าทั้ง 2 สายมีคู่เบสสมกันจะมีการจับคู่เรียกว่า hybridization หลังจากนี้จึงนำมาทดสอบการจับคู่ hybridization โดยการประกบฟิลม์ (autoradiograph) หรือใส่ substrate ของเอ็นไซม์นั้น (enzymatic reaction) วิธีการเหล่านี้ได้แก่

Southern hybridization Southern blot หรือ DNA blot นี้เป็นวิธีที่คิดค้นโดย Southern เมื่อปี ค.ศ.1975 (60) เป็นวิธีการทดสอบที่เหมาะสมสำหรับการตรวจแยก type ของ HPV และการศึกษา viral genome โดยทำการสกัด DNA แล้วนำมาตัดเป็นชิ้นส่วนย่อยๆ โดยใช้ restriction endonuclease enzyme เช่น PstI หรือ BamHI นำมาแยกใน gel electrophoresis (GE) ภายใต้สนามไฟฟ้า นำแผ่น gel ไปประกบกับแผ่น membrane เพื่อถ่าย DNA จาก gel ไปสู่ membrane จากนั้นจึงผ่านขบวนการ hybridization กับสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารปลอดกัมมันตภาพรังสีก็ได้ วิธีการนี้มีข้อดีคือ สามารถแยก type หรือ sub-type ของตัวอย่างได้ ข้อควรระวังคือ ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบต้องสดใหม่หรืออยู่ในสภาพที่เก็บรักษามาอย่างดีและต้องมีปริมาณของเซลล์เนื้อเยื่อมากพอเพียง (อย่างน้อย 10^6 เซลล์)

ตารางที่ 3: วิธีการที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ HPV-DNA ทางห้องปฏิบัติการ

วิธีการ	ระดับความไว	ลักษณะความสำคัญ
Southern blot	ต้องใช้ DNA จากเซลล์ ประมาณ 10^6 เซลล์	เป็นวิธีที่สามารถตรวจไวรัส ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันและตรวจหาไวรัสที่แทรกเข้าไปในเซลล์ด้วย
Dot blot	ใกล้เคียงกับ Southern blot	เป็นวิธีที่สะดวก สำหรับจำนวนสิ่งส่งตรวจมากราย แต่วิธีนี้มี background ค่อนข้างมาก
Filter *in situ* hybridization	อย่างน้อยต้องมี 10^4 viral genome	สำหรับ high grade lesion ความไวจะค่อนข้างต่ำ
Tissue *in situ* hybridization	อย่างน้อยต้องมี 20-50 viral genome	เหมือนกันกับ filter *in situ* hybridization
PCR	อย่างน้อย 1 viral genome	เป็นวิธีที่มี ความไว และ ความจำเพาะสูงมาก

Dot หรือ slot hybridization (DH)(61) เป็นวิธีการตรึงตัวอย่าง DNA อย่างง่ายๆบนแผ่น membrane การตรึงตัวอย่าง DNA ทำได้โดยการหยด DNA ลงบน membrane โดยตรง หรือจะใช้เครื่องมือช่วยในการตรึงเช่น hybri-blot manifold โดยใช้ร่วมกับเครื่องดูดสูญญากาศ เครื่อง dot มีความแตกต่างจาก slot ที่ขนาดของช่องที่ใช้หยดตัวอย่าง DNA โดย dot blot จะเป็นช่องกลมๆ ส่วน slot blot จะเป็นช่องรีๆ เมื่อตรึงตัวอย่าง DNA บน membrane แล้วจึงทำการแยกสาย DNA โดยใช้ด่าง และ ยึดตัวอย่าง DNA ให้อยู่บน membrane โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศา-เซลเซียส ภายใต้สภาวะสูญญากาศ จากนั้นจึงนำไปผ่านขบวนการ hybridization ตามปกติ ข้อดีของวิธีการนี้คือ มีความไวพอๆกับ Southern hybridization แต่สามารถทำได้ง่ายกว่าและเหมาะกับการทำงานจำนวนมาก ข้อควรระวังของวิธีการนี้คือ ต้องใช้ตัวอย่างสดใหม่หรือตัวอย่างที่ผ่านการเก็บรักษามาอย่างดี และอาจจะมีความลำบากในการพิจารณาอ่านผลบวกและผลลบในกรณีที่ผล dot มีความเข้ม (intensity) ต่ำ

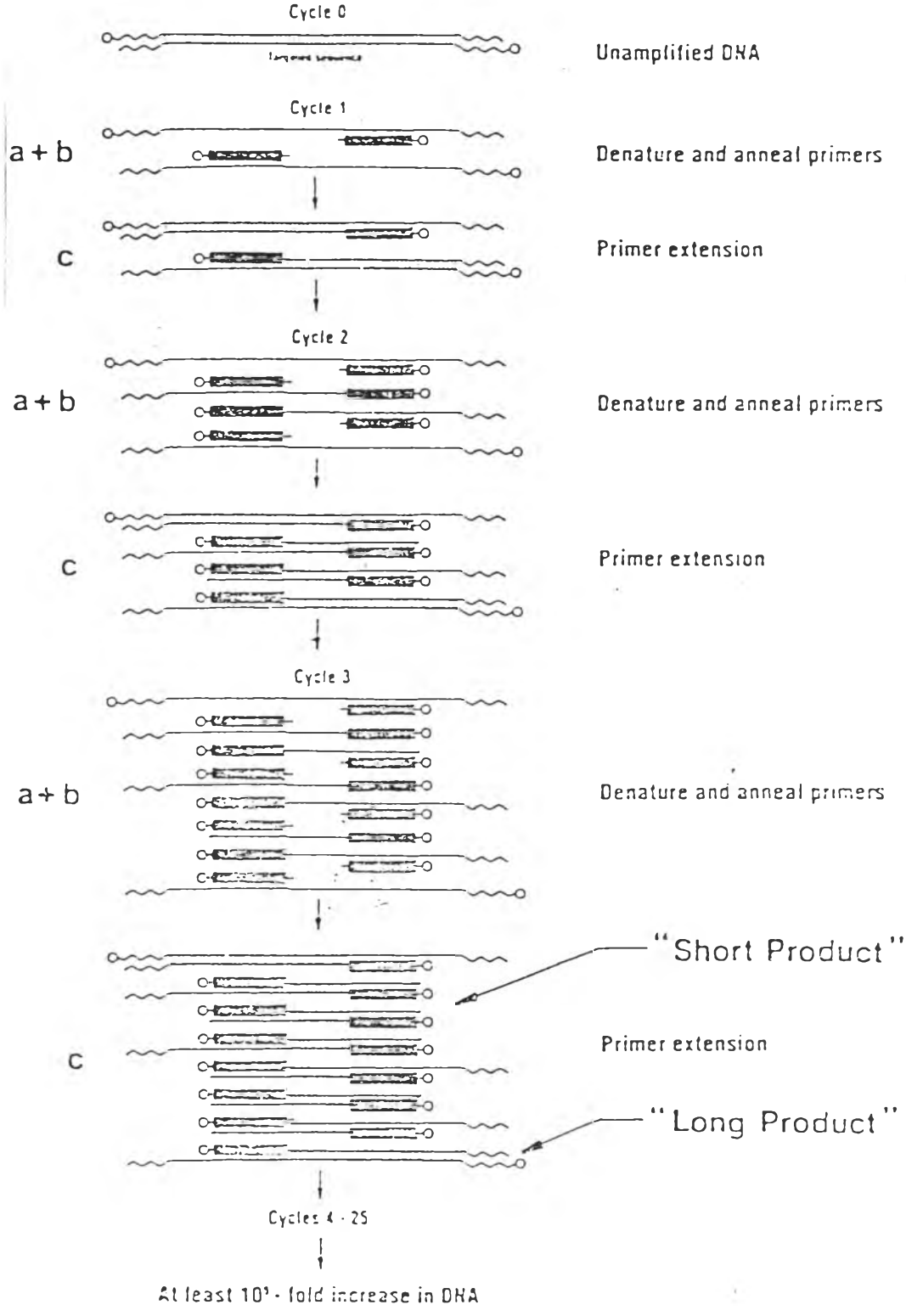
Filter *in situ* หรือ *in situ* hybridization (61,62) วิธีการนี้มีความไวต่ำกว่าวิธีการที่กล่าวมา โดยการทำ *in situ* hybridization นั้นจะทำบนเซลล์ที่นำมาจากบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโดยตรง บนแผ่นกระจกทดสอบนำไป denature แล้วเติม probe ที่ผ่านการ label แล้วลงบนเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยตรง ส่วน filter *in situ* hybridization มีความแตกต่างที่ใช้แผ่น filter รองรับเนื้อเยื่อตัวอย่างก่อนที่จะนำไป denature เนื้อเยื่อดังกล่าวอาจเป็นได้ทั้งเนื้อเยื่อใหม่หรือเนื้อเยื่อที่ได้จากการเก็บรักษาโดยฝังในพาราฟิน (paraffin embedded tissue) ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถตรวจสภาพของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ตัวอย่างไปพร้อมกับการตรวจหาไวรัส แต่ข้อเสียคือความไวต่ำเนื่องจากข้อจำกัดของการแทรกตัวของ probe เข้าไปในเซลล์ทำได้น้อยกว่าการจับกับ DNA โดยตรง

Polymerase chain reaction (PCR) (63,64) เป็นเทคนิคใหม่ทาง molecular biology เพื่อตรวจหาสารพันธุกรรมที่ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวงการแพทย์ หรือ ความผิดปกติทางพันธุกรรมของมนุษย์ เทคนิคนี้ช่วยเพิ่มความแม่นยำ และสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว แม้จะมีปริมาณสารพันธุกรรมต้นแบบอยู่เพียงเล็กน้อย หลักการโดยทั่วไป

คือ สามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมต้นแบบ ไม่ว่าจะเป็น DNA หรือ RNA อย่างจำเพาะเจาะจงได้มากกว่าหนึ่งล้านเท่า ซึ่งผู้ทำงานสามารถเลือกชนิดและขนาดของสารพันธุกรรมที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนได้โดยขึ้นกับ primer และ probe ที่ได้รับการคัดเลือกแล้วว่าจำเพาะกับสารพันธุกรรมต้นแบบนั้นๆ ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1. <u>การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม</u> (gene amplification) โดยสารพันธุกรรมที่ต้องการจะทำการตรวจหาเรียกว่า สารพันธุกรรมต้นแบบ จะถูกนำมาเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองโดยใส่ส่วนประกอบต่างๆเช่น primer ซึ่งเป็น DNA สังเคราะห์สายสั้นๆ, dNTP และ polymerase enzyme เป็นต้น เมื่อทั้งหมดอยู่ที่สภาวะเหมาะสมสารพันธุกรรมต้นแบบ จะถูกเพิ่มจำนวนมากกว่าล้านชุดจนสามารถนำไปตรวจสอบในขั้นต่อไปได้ (รูปที่ 2)

2. <u>การตรวจยืนยัน PCR product</u> ทำได้โดยนำสารพันธุกรรมที่ได้จากขั้นตอนที่หนึ่งมาทำปฏิกิริยากับ probe ซึ่งเป็น DNA สังเคราะห์ที่ติดฉลากด้วยสารที่ติดตามได้ ซึ่งทั้งนี้สารที่ติดตามได้ดังกล่าวอาจจะเป็นสารกัมมันตภาพรังสี (radioactive compound) หรือ สารปลอดกัมมันตภาพรังสี (non radioactive compound) ก็ได้ แล้วตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการทำ autoradiograph หรือ fluorograph บนแผ่นฟิลม์เอ็กซ์เรย์หรือสังเกตสีที่พัฒนาขึ้น (65)



รูปที่ 2: หลักการของ polymerase chain reaction (PCR)