บทคัดย่อ

T 144182

เชื้อไวรัส Human herpesvirus 8 (HHV-8) มีความสัมพันธ์กับการเกิด Kaposi's sarcoma ซึ่งเป็นมะเร็งของหลอดเลือดที่พบบ่อยในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันต่ำ โดยพบอุบัติการณ์สูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเอชไอวี ปัจจุบันเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูงถูกนำมาใช้ในการตรวจพิสูจน์สารพันธุกรรมของ HHV-8 เพื่อบ่งชี้การติดเชื้อดังกล่าวอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากความหลากหลายทางด้านสายพันธุ์ของเชื้อ HHV-8 ในภูมิภาคตาง ๆ ทำให้การตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวทำได้ไม่ครอบคลุม ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทดสอบหาชุด primer และสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อ HHV-8 โดยอาศัยเทคนิค Multiplex PCR จากการศึกษาโดยใช้ HHV-8 DNA ที่แยกสกัดได้จาก BC-3 cell line เป็นตัวอย่างควบคุม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจพบ HHV-8 DNA เกิดขึ้นที่ 56 °C ในภาวะที่มี 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs,1.25 U *Taq* DNA polymerase, 20 pmol ORF-73F, 20 pmol ORF-73R, 15 pmol ORF-26F, 15 pmol ORF-26R, 5 pmol K9-3F, 5 pmol K9-3R, 20 pmol β-globinF และ 20 pmol β-globinR โดยมีความไวในการตรวจพบ HHV-8 DNA ปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 100 pg/μl (1 ng/reaction) และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามพวก (cross reaction) เมื่อทดสอบกับ EBV DNA เมื่อทำการตรวจในตัวอย่าง DNA ที่แยกสกัดจาก PBMCs ของผู้ป่วยเอดส์ในภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 100 ตัวอย่างให้ผลลบต่อ HHV-8 DNA ทั้งหมด โดยพบว่าตรวจพบเฉพาะ β-globin PCR product จำนวน 49 ตัวอย่าง พบ β-globin PCR product ร่วมกับ PCR product ขนาดประมาณ 180 bp จำนวน 38 ตัวอย่าง พบ β-globin PCR product ร่วมกับ PCR product ขนาดประมาณ 150 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง และ 11 ตัวอย่างตรวจไม่พบ PCR product ใด ๆ เลย จากผลการวิจัยข้างต้นทำให้มีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไปว่า PCR product ขนาดประมาณ 180 bp และ 150 bp ดังกล่าวนั้นมีความสัมพันธ์หรือไม่อย่างไรในการบ่งชี้การติดเชื้อ HHV-8 หรือเชื้อในกลุ่ม herpesviruses อื่น ๆ ที่มีความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ HHV-8 และหากมีการตรวจในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากขึ้นน่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น

Abstract

TE 144182

Human herpesvirus 8 (HHV-8) is a causative agent of Kaposi's sarcoma, a cancer of blood vessel that frequently occurs among immunodeficiency patients especially HIV infected group. Currently, Polymerase chain reaction (PCR) technique has been widely used to detect the HHV-8 DNA because of its high sensitivity and its accurate specificity. However, the technique is not totally effective because there are varieties of HHV-8 types that are different in each region. Therefore, this project was conducted to investigate the primers and optimal conditions for detecting the HHV-8 DNA by Multiplex PCR technique. From the study of using HHV-8 DNA extracted from BC-3 cell line as a control sample, the study shows that the suitable temperature is at 56°C and it must be in the following condition; 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs,1.25 U *Tag* DNA polymerase, 20 pmol ORF-73F, 20 pmol ORF-73R, 15 pmol ORF-26F, 15 pmol ORF-26R, 5 pmol K9-3F, 5 pmol K9-3R, 20 pmol β-globinF and 20 pmol β-globinR. The minimal sensitivity to detect HHV-8 DNA is 100 pg/ml (1 ng/reaction) and cross-reaction is not found when testing with EBV DNA. The study was done with 100 DNA of HIV infected patients living in northern Thailand and the HHV-8 DNA are all negative. β-globin PCR product was found in 49 samples. β-globin PCR product and PCR product with 180 bp in size were found in 38 samples. β-globin PCR product and 150 bp PCR product were found in 2 samples. Any PCR product was not found in the other 11 samples. As the result, the study of the correlation between PCR products (180 bp and 150 bp) and the detection of HHV-8 infection should be further studied. Moreover these PCR products and infection of the other herpesvireses that are similar to HHV-8 nucleotide sequences should be also investigated to clarify of the relation. For more valuable information, more samples are suggested to study.