โครงการ R2R

งานอณูพยาธิวิทยา (Molecular Pathology)

ประจำปีงบประมาณ 2565

1. ชื่อโครงการ: การเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ

(Comparison of EGFR gene mutation detection using Real time PCR based technique by reducing volume of PCR master mix)

ผู้ดำเนินการ:

ที่ปรึกษาโครงการ

นายแพทย์พงษฎา ประสงค์อุปถัมภ์

ผู้ดำเนินการและรับผิดชอบโครงการ

นายเมธพนธ์ พุฒิชาติ

ผู้ร่วมโครงการ

นางสาวสุมลรัตน์ ปานทอง

นางสาวพุทธิชานันท์ เกิดพร

นางสาวภัทรกันย์ มีศิริ

นายภาณุพณ ถวิลประวัติ

หน่วยงานที่รับผิดชอบ งานอณูพยาธิวิทยา กลุ่มงานชันสูตรพิเศษ สถาบันพยาธิวิทยา

2. หลักการและเหตุผล/แนวคิดในการพัฒนาคุณภาพงาน

เนื่องจากโรคมะเร็งปอดเป็นหนึ่งในมะเร็งที่ตรวจพบได้บ่อยในผู้ป่วย โดยการตรวจการกลายพันธุ์ของยีน EGFR (EGFR mutation) เป็นหนึ่งในแนวทางการรักษา ปัจจุบันงานอณูพยาธิวิทยามีการเปิดตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ด้วยเทคนิค Real time PCR แต่เนื่องด้วยแนวโน้มปริมาณการส่งตรวจวิเคราะห์ที่สูงมากขึ้นในแต่ละปี รวมถึงราคาน้ำยามีราคาค่อนข้างสูง เฉลี่ยค่าน้ำยาประมาณ 4,445 บาท ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยที่น้ำยาหนึ่งกล่องสามารถใช้ตรวจวิเคราะห์ได้เพียง 24 ตัวอย่าง จากเหตุผลเหล่านี้ทำให้ต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์มีราคาที่สูงมาก

โครงการวิจัยนี้ จึงต้องการทดสอบเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ โดยคาดหวังว่าผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยการปรับลดปริมาณน้ำยาจะให้ผลที่ดีมีความสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน

3. วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ

4. ประโยชน์ที่จะได้รับ

สามารถนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบไปใช้ในงานบริการการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ของงานอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์

5. ระยะเวลาในการดำเนินการ

ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2564 – กันยายน 2565

6. กิจกรรมดำเนินการ

กิจกรรม	ปีงบประมาณ 2565											
	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
1. ทบทวนวรรณกรรม	←	—	—	—	—	—	→					
2. เขียนโครงการ				←	—	→						
3. คัดเลือกตัวอย่างเพื่อใช้ในการสกัด DNA จำนวน 30 ตัวอย่าง					←	—	→					
4. สกัด DNA จากบล็อกพาราฟิน หรือบล็อกเซลล์วิทยา หรือสไลด์เซลล์วิทยา จำนวน 30 ตัวอย่าง					←	—	→					
5. ตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR mutation ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีปกติ						←	→					
6. รวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ								←	→			
7. สรุปผลการทดลอง									←	→		
8. เขียนรายงาน และนำเสนอผลงาน										←	—	→

7. งบประมาณของโครงการวิจัย

ไม่มีค่าใช้จ่าย

หมายเหตุ : น้ำยาตรวจวิเคราะห์ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท

8. วิธีการและผลการทดลอง

8.1 การคัดเลือกตัวอย่าง

สุ่มคัดเลือกตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ที่ส่งมาตรวจงานอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ จำนวน 30 ตัวอย่าง

8.2 การสกัด DNA จากตัวอย่างส่งตรวจ

การสกัด DNA ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป โดยการตัดชิ้นเนื้อใส่ลงในหลอด 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นเติมสารเคมี xylene และ absolute ethanol ตามลำดับ รอให้ตัวอย่างแห้ง จากนั้นเติม lysis buffer และ protease reagent ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 56°C และ 90°C เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างมาเติมสารเคมี binding buffer ตามด้วย alcohol จากนั้นย้ายตัวอย่างไปปั่นล้างด้วย washing buffer ปั่นเหวี่ยงให้ตัวอย่างแห้งสนิท ทำการชะตัวอย่าง DNA ที่บริสุทธิ์แล้วด้วยสารเคมี elution buffer นำตัวอย่าง DNA ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Nanodrop และเจือจางให้เป็นความเข้มข้นที่ต้องการ

8.3 การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค Real time PCR

เตรียมน้ำยา master mix ที่ใช้ในปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน DNA ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ตามคู่มือของชุดน้ำยา โดยชุดการทดลองหนึ่งใช้ปริมาตรตามวิธีมาตรฐาน และอีกชุดการทดลองหนึ่งใช้ปริมาตรกึ่งหนึ่งของวิธีมาตรฐาน นำเข้าเครื่องตรวจวิเคราะห์ จากนั้นอ่านผลการทดสอบ

9. ผลการดำเนินการ/ผลการทดลอง

ผลการทดลองเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบให้ผลตรงกันกับวิธีมาตรฐานทั้ง 30 ตัวอย่าง โดยที่ชนิดของตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบและปริมาณ tumor ไม่มีกระทบต่อผลลัพธ์ แสดงดังตารางที่ 1

เมื่อทำการทดสอบความสอดคล้องกันทางสถิติ (Kappa analysis) พบว่าทั้งสองชุดการทดลองให้ผลการตรวจวิเคราะห์ที่มีความสอดคล้องกันระดับสมบูรณ์ (Almost Perfect) แสดงดังตารางที่ 2

นอกจากนี้เมื่อทำการลดปริมาตรสารที่ใช้ในการทดสอบยังสามารถเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ตรวจได้ อีกทั้งยังสามารถลดต้นทุนเฉพาะค่าน้ำยาต่อตัวอย่างลงไปได้ราวกึ่งหนึ่ง และลดราคาต้นทุนรวมของการทดสอบได้อีกด้วย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ผลการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR ด้วยเทคนิค Real time PCR โดยการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบ

No.	Sample type	Tumor percentage (%)	Mutation results (1X)	Mutation results (0.5X)
1	FFPE	30	Wild-type	Wild-type
2	FFPE	30	Exon19	Exon19
3	FFPE	90-100	L585R	L858R
4	FFPE	60	Exon20	Exon20
5	FFPE	60	G719X	G719X
6	FFPE	15	Wild-type	Wild-type
7	FFPE	20	S768I	S768I
8	FFPE	20	Exon20	Exon20
9	FFPE	10	Exon19	Exon19
10	FFPE	20	G719X	G719X
11	cytoslide	40	Exon19	Exon19
12	FFPE	50	Wild-type	Wild-type
13	FFPE	20	L858R	L858R
14	FFPE	40	L858R	L858R
15	FFPE	30	L858R	L858R
16	FFPE	20	S768I	S768I
17	FFPE	40	Exon19,T790M	Exon19,T790M
18	FFPE	5	Exon19	Exon19
19	cell block	20	L861Q	L861Q
20	cell block	30	Wild-type	Wild-type
21	FFPE	40	L858R,T790M	L858R,T790M
22	FFPE	40	Exon20	Exon20
23	FFPE	<100	L858R	L858R
24	FFPE	20	G719X	G719X
25	FFPE	30	G719X	G719X
26	FFPE	<100	Exon19	Exon19
27	FFPE	30	Exon20	Exon20
28	cell block	15	Wild-type	Wild-type
29	cytoslide	30	Exon19	Exon19
30	FFPE	-	Exon19,L858R,T790M	Exon19,L858R,T790M

ตารางที่ 2 สถิติแสดงความสอดคล้องกันระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีปรับลดน้ำยาในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR

0.5X REACTION * 1X REACTION Crosstabulation

			1X REACTION		Total
			Wild-type	Mutant	
0.5X REACTION	Wild-type	Count	5	0	5
	Mutant	Count	0	25	25
Total		Count	5	25	30

Symmetric Measures

		Value	Asymptotic Standard Error[a]	Approximate T[b]	Approximate Significance
Measure of Agreement	Kappa	1.000	.000	5.477	<.001
N of Valid Cases		30			

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนตัวอย่างและต้นทุนในการตรวจวิเคราะห์ ระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธีปรับลดน้ำยาในการทดสอบ

รายการ	1X REACTION	0.5X REACTION
จำนวนตัวอย่างที่ตรวจได้	24 ตัวอย่าง	48 ตัวอย่าง
ราคาน้ำยา EGFR คิดต่อ 1 ตัวอย่าง	4,445 บาท	2,222.50 บาท
ต้นทุนเฉพาะค่าชุดสกัด DNA / วัสดุ / ค่าแรง	1,314.14 บาท	
ต้นทุนรวม	5,759.14 บาท	3,536.64 บาท
อัตราค่าบริการตรวจวิเคราะห์	8,000 บาท (รัฐบาล) / 10,500 บาท (เอกชน)	

10. สรุปผลการทดลอง

การลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน EGFR โดยเทคนิค Real time PCR ให้ผลลัทธ์ตรงกับวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังสามารถลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์เฉพาะค่าน้ำยาได้มากถึงกึ่งหนึ่ง ดังนั้นวิธีการปรับลดปริมาณน้ำยาที่ใช้ในการทดสอบอาจสามารถนำไปใช้ในงานบริการ ของงานอณูพยาธิวิทยา สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ได้ต่อไป