

## บทความพิเศษ

# การตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีในโลหิตบริจาค

วิไล เกลิมจันทร์, จุฑามาศ ศิริปานิ และ สุทธิวัฒน์ ลำไย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

การตรวจคัดกรองเลือดที่ติดเชื้อเอชไอวีในโลหิตของผู้บริจาคได้เริ่มต้นขึ้นหลังจากที่พบว่าผู้ป่วยจำนวนมากเกิดการติดเชื้อเอชไอวีจากการได้รับเลือด โดยในปี พ.ศ. 2528 ประเทศสหรัฐอเมริกา มีการผลิตน้ำยาที่ใช้ตรวจหาภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HIV (Anti-HIV) ขึ้น และนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโลหิตบริจาคเป็นผลให้จำนวนผู้ติดเชื้อ HIV จากการรับเลือดมีจำนวนลดลงมาก ต่อมาในปี 2538 ประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการพัฒนาน้ำยาตรวจสอบส่วนประกอบของเชื้อ HIV ในส่วนของ p24 ซึ่งสามารถตรวจจับการติดเชื้อได้เร็วกว่าเดิมและเพิ่มความปลอดภัยยิ่งขึ้น สำหรับประเทศไทยก็มีการพัฒนาการตรวจกรองโลหิตบริจาคเช่นเดียวกันนี้ในเวลาใกล้เคียงกัน โดยในปี 2528 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ริเริ่มการสุ่มตรวจ Anti-HIV ในเลือดบริจาคบางกลุ่ม จนกระทั่งพบว่าผู้ติดเชื้อ HIV จากเลือดบริจาครายแรกเกิดขึ้น ในปี 2530 กระทรวงสาธารณสุขจึงกำหนดให้คลังเลือดต้องมีการตรวจเลือดทุกยูนิต และมาตรการดังกล่าวครอบคลุมครบทุกจังหวัดในปี 2531 ต่อมาในปี 2534 คณะกรรมการป้องกันและควบคุมโรคเอดส์แห่งชาติได้มีมติให้เพิ่มการตรวจ HIV p24 Ag ร่วมกับการตรวจ Anti-HIV ในงานตรวจกรองโลหิตบริจาคทุกยูนิต การที่ประเทศไทยตระหนักถึงความสำคัญของเรื่องนี้ จึงนับเป็นกุญแจสำคัญซึ่งนำไปสู่ความสำเร็จในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อเอชไอวีตั้งแต่ช่วงแรกที่มีการระบาดในประเทศไทย

## สิ่งตรวจพบต่างๆ ในร่างกายเมื่อมีการติดเชื้อเอชไอวี

เมื่อไวรัสเอชไอวีเข้าสู่ร่างกาย จะเข้าสู่เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟซัยท์ สารพันธุกรรมของไวรัสซึ่งเป็น RNA จะถูกเปลี่ยนเป็น DNA และแทรกตัวเข้าไปอยู่กับ DNA ของลิมโฟซัยท์ เมื่อเซลล์ร่างกายมีการเพิ่มปริมาณ DNA สารพันธุกรรมของไวรัสจะถูกเพิ่มจำนวนไปพร้อมกัน ทำให้มีการสร้างโปรตีนทั้งส่วนแกนกลาง (capsid

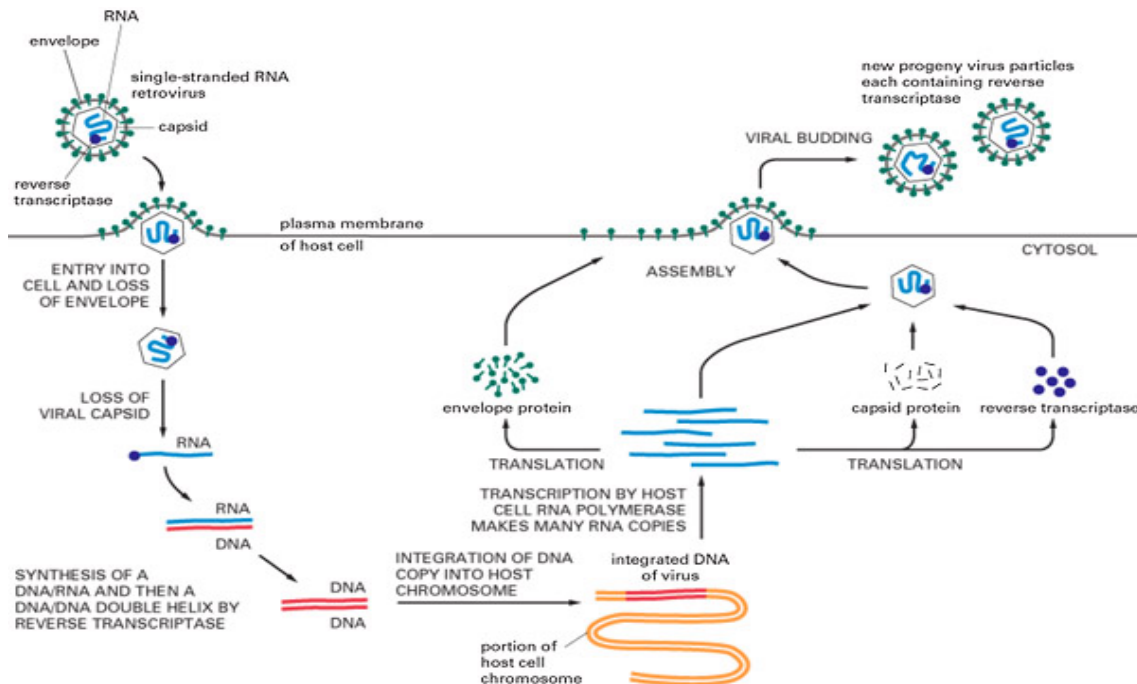
protein) และเปลือกหุ้ม (envelope) ซึ่งจะไปติดอยู่ที่ผิวของลิมโฟซัยท์ จากนั้น RNA ของไวรัสที่ถูกสร้างขึ้นใหม่จะถูกหุ้มด้วย capsid protein รวมตัวกับโปรตีนอื่นของไวรัสที่สร้างโดยตัวไวรัสเองภายในเซลล์เดียวกัน เมื่อไวรัสจะออกจากเซลล์ลิมโฟซัยท์ (budding) จะถูกหุ้มโดยโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มที่ผิวของลิมโฟซัยท์ เกิดเป็นไวรัสตัวใหม่ออกมาในกระแสโลหิตและสามารถเข้าไปฝังตัวในเซลล์เม็ดเลือดขาวตัวใหม่ได้ (รูปที่ 1) ช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 6-11 วันหลังจากเชื้อเข้าสู่กระแสเลือดและมีปริมาณไวรัสมากพอที่จะสามารถตรวจพบได้โดยใช้เทคนิคการตรวจหาสารพันธุกรรม จากนั้นปริมาณ p24 ซึ่งเป็นส่วนของ core protein จะถูกสร้างออกมาเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของไวรัสและถูกปล่อยออกมาในกระแสเลือดจนสามารถตรวจพบ เมื่อใช้วิธีทดสอบที่มีความไวสามารถตรวจพบได้ในช่วงประมาณ 16 วันหลังการติดเชื้อ ต่อมาเมื่อส่วนประกอบของไวรัสซึ่งเป็นสิ่งแปลกปลอมของร่างกายกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและก่อให้เกิดภูมิคุ้มกันทั้งด้านเซลล์และสารน้ำคือแอนติบอดี สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีทดสอบที่มีความไวสูง ตั้งแต่ประมาณ 22 วันหลังจากมีการติดเชื้อ แอนติบอดีจะมีการสร้างในปริมาณมากขึ้นและเป็นแอนติบอดีต่อส่วนต่างๆ ของไวรัสครบทุกส่วนจนพบว่าผลการทดสอบ western blot ให้ผลเป็นบวกประมาณ 60-120 วัน (รูปที่ 2) ปัญหาสำคัญของการตรวจคัดกรองเลือดบริจาคคือ การได้รับเลือดบริจาคจากผู้ติดเชื้อในระยะเริ่มแรกที่ยังไม่มีการสร้างแอนติบอดี หรือยังไม่สามารถตรวจพบสิ่งตรวจอื่นๆ ที่เรียกว่า window period ซึ่งความเสี่ยงที่จะพบผู้บริจาคโลหิตในช่วงนี้จะมากน้อยเพียงไรขึ้นกับปัจจัย 2 ประการ คือช่วงเวลาของระยะ window period และอัตราของผู้ติดเชื้อรายใหม่ (incident of infection) ที่ผู้เกี่ยวข้องต้องพิจารณาและหาทางป้องกันโดยการนำวิธีทดสอบที่เหมาะสมมาใช้ควบคู่กันเป็นต้น

## กลวิธีการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีสำหรับงานตรวจคัดกรองโลหิตบริจาค

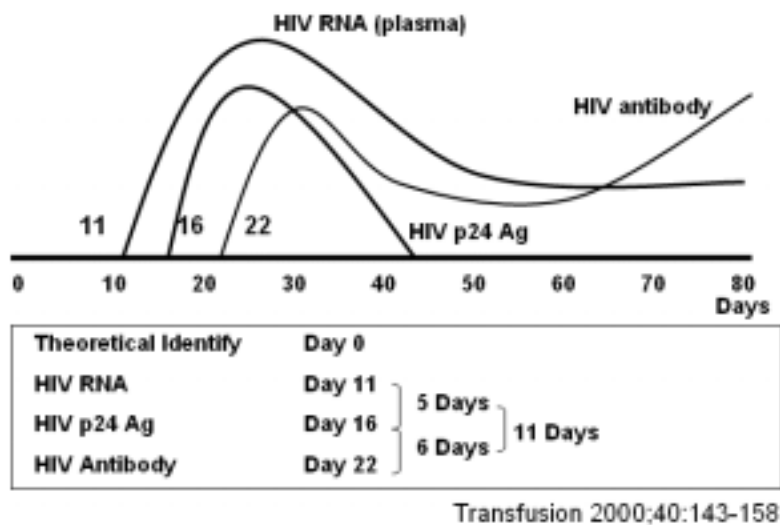
การตรวจเอชไอวีมีวัตถุประสงค์ในการตรวจหลายอย่าง ได้แก่ การตรวจเพื่อวินิจฉัยรายบุคคล (individual diagnosis) เพื่องาน

ได้รับต้นฉบับ 1 พฤษภาคม 2551 ให้ลงตีพิมพ์ 23 พฤษภาคม 2551

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นางวิไล เกลิมจันทร์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ตำบลตลาดขวัญ อำเภอเมือง กรุงเทพฯ 11000



รูปที่ 1 ไดอะแกรมแสดงการแบ่งตัวและเพิ่มปริมาณของไวรัสในกระแสเลือด



รูปที่ 2 สิ่งตรวจพบต่างๆ ในกระแสเลือดเมื่อมีการติดเชื้อเอชไอวี

เฝ้าระวังโรค (disease surveillance) และเพื่อความปลอดภัยในการให้เลือด เป็นต้น ซึ่งวัตถุประสงค์ต่างๆ นี้จะเชื่อมโยงกับการตรวจ (testing strategy) ด้วย เช่นการตรวจเพื่อวินิจฉัยโรค นั้น เนื่องจากผลการวินิจฉัยโรคที่เป็นผลบวกมีผลกระทบต่อชีวิต และผลกระทบทางเศรษฐกิจและสังคมของผู้ติดเชื้อสูงมาก ผลการตรวจจึงต้องมีความถูกต้อง (accuracy) สูงถึงร้อยละ 100 แต่สำหรับการตรวจเพื่อความปลอดภัยในการให้เลือดนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เลือดที่ปลอดภัยมากที่สุด ดังนั้นจึงให้ความสำคัญกับความไว (sensitivity) ของการทดสอบมากที่สุด

คือวิธีทดสอบที่เลือกใช้ต้องมีความไวสูงที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ดังนั้นห้องปฏิบัติการที่ทำการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีเพื่อความปลอดภัยในการให้เลือดจึงต้องทบทวนวิธีทดสอบอย่างน้อยปีละครั้ง เพื่อคัดเลือกวิธีทดสอบที่ดีที่สุด การทบทวนอย่างมีประสิทธิภาพจะต้องอาศัยข้อมูลจากเอกสารวิชาการที่ทันสมัย ปรึกษาผู้เชี่ยวชาญหรือปรึกษาลังเลอดมหาวิทยาลัยหรือศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติซึ่งมีนักวิชาการที่มีประสบการณ์สูงช่วยในการตัดสินใจ

## เทคนิคการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีในเลือดบริจาค

สำหรับเทคนิคการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีในเลือดบริจาค แบ่งเป็น 4 กลุ่มได้แก่ การตรวจ anti HIV, HIV p24 Ag, antigen-antibody combination และ nucleic acid test (NAT) ซึ่งจะได้กล่าวถึงประโยชน์และข้อดีข้อเสียของแต่ละเทคนิค

**1. การตรวจ Anti-HIV** นับเป็นวิธีมาตรฐานขั้นต่ำในการตรวจกรองโลหิตบริจาค ซึ่งปัจจุบันมีชุดทดสอบจำนวนมากจำหน่ายในท้องตลาด แต่เฉพาะวิธีที่มีความไวสูงเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นวิธีทดสอบที่ต้องใช้เครื่องมือ ทั้งประเภทระบบเปิด (open system) ที่เป็นแบบ microplate immunoassay และระบบปิด (machine based assay) ปัจจุบันวิธีทดสอบส่วนใหญ่ใช้หลักการ sandwich immunoassay โดยใช้ระบบการอ่านปฏิกิริยาหลายอย่างได้แก่ enzyme-substrate, fluorescence และ chemiluminescence เป็นต้น สำหรับประเทศไทยไม่อนุญาตให้ใช้ชุดตรวจแบบรวดเร็ว (rapid test) ในการตรวจคัดกรองโลหิตบริจาค

**2. การตรวจ HIV p24 Ag** เป็นวิธีการตรวจหาโปรตีนที่จำเพาะของเชื้อเอชไอวี ซึ่งจะช่วยให้มีความไวในการตรวจหาการติดเชื้อในระยะแรกขณะที่ยังไม่มีสาร Anti-HIV ชุดตรวจ HIV p24 Ag อย่างเดียวที่มีคุณภาพจะมีความไวเชิงวิเคราะห์ในการตรวจ HIV p24 Ag ได้ต่ำถึง 5 พิโคแกรม

**3. ชุดตรวจรวม anti-HIV และ HIV p24 Ag** ชุดตรวจนี้ถูกพัฒนาขึ้นในชื่อของ forth generation HIV test หรือ HIV antigen-antibody combination test เพื่อตรวจ anti-HIV และ HIV p24 Ag ไปพร้อมๆ กันได้ ทำให้สะดวก ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายอย่างมาก เมื่อต้นมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการตรวจกรองเลือดบริจาคอย่างเดียว แต่ต่อมาได้มีการแนะนำให้ใช้เพื่อการวินิจฉัยรายบุคคลด้วย ทำให้สามารถให้การรักษาได้อย่างรวดเร็ว ชุดตรวจนี้เมื่อแรกพัฒนามีความไวในการตรวจ HIV p24 Ag ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับชุดตรวจ HIV p24 Ag อย่างเดียว และยังมีข้อสงสัยในการตรวจ anti-HIV ระดับต่ำด้วย อย่างไรก็ตามผู้ผลิตก็พยายามพัฒนาจนได้ชุดตรวจที่มีความไวในการตรวจ HIV p24 Ag ได้ดีและตรวจ HIV p24 Ag ได้ใกล้เคียงกับชุดตรวจ HIV p24 Ag อย่างเดียว ชุดตรวจนี้ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลาย ประเทศที่พัฒนาแล้วปัจจุบันใช้ชุดตรวจนี้ร่วมกับการตรวจ NAT นอกจากนี้ประเทศต่างๆ ที่เคยตรวจเฉพาะ anti-HIV ส่วนใหญ่เปลี่ยนมาใช้ชุดตรวจ Combination test แทนการตรวจ anti-HIV อย่างเดียว

**4. การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ HIV หรือ Nucleic Acid Test (NAT)** เริ่มมีการศึกษาการใช้ชุดตรวจที่ตรวจหาสาร

พันธุกรรมของเชื้อไวรัสเอชไอวีและนำมาใช้ในการตรวจกรองเลือดเมื่อปี พ.ศ. 2542 ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้วิธีทดสอบหลักการ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ซึ่งสามารถตรวจจับผู้ติดเชื้อได้เร็วกว่าการตรวจ p24 เป็นเวลา 5-7 วัน และเร็วกว่าการตรวจ Anti-HIV ประมาณ 6-12 วัน นับเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก แต่เนื่องจากวิธีทดสอบนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและเทคนิคการทดสอบมีความซับซ้อนและใช้เวลาทดสอบนานกว่าการตรวจทางซีโรโลยี ดังนั้นการนำวิธีนี้มาใช้ในงานจึงมีการใช้ตัวอย่างรวม (pool serum) โดยการรวมตัวอย่างที่จำนวนต่างกัน ตั้งแต่ 24 ถึง 500 ตัวอย่างแตกต่างกันในแต่ละประเทศ ต่อมา มีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากเลือดที่มีปริมาณไวรัสเพียง 1,600 copy ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร จึงมีการลดจำนวนตัวอย่างรวมลงอยู่ในระดับไม่เกิน 24 ตัวอย่าง ปัจจุบันชุดตรวจ NAT ที่มีการจำหน่ายในท้องตลาดมีความไวตามค่ากล่าวอ้างที่ 100 และ 50 copy ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตรวจได้ทั้งตัวอย่างเดี่ยวและตัวอย่างรวม โดยพัฒนาระบบทดสอบที่ใช้เครื่องมือจัดการทั้งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการทดสอบ

ข้อควรระวังสำหรับกลวิธีการตรวจในงานคลังเลือดคือ เมื่อต้องการนำผลการตรวจ anti-HIV หรือ NAT ไปใช้ในงานอื่นนอกเหนือจากการตรวจคัดกรองโลหิต เช่นเมื่อต้องการแจ้งผลการตรวจต่อผู้บริจาคโลหิต หรือเมื่อต้องการใช้ข้อมูลในการสรุปจำนวนผู้ติดเชื้อ ต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย เนื่องจากการตรวจคัดกรองโลหิตบริจาค เน้นในเรื่องผลการทดสอบที่มีความไวสูง ดังนั้นผลการตรวจที่ได้ผลมีปฏิกิริยา (reactive) อาจมีสาเหตุที่แท้จริงแต่เกิดจากความผิดพลาดต่างๆ ที่เกิดอยู่เสมอในงานทางห้องปฏิบัติการหรือเกิดจากตัวอย่างที่ให้ผลบวกปลอม ดังนั้นการนำผลการตรวจกรองในงานคลังเลือดไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นต้องทดสอบเพิ่มเติมจนมั่นใจว่าเป็นผลบวกจริงโดยปฏิบัติตาม national guideline ในการตรวจวินิจฉัยผู้ติดเชื้อ คือใช้วิธีทดสอบที่มีหลักการต่างกัน 3 วิธี แต่ในกรณีที่ต้องการใช้ผลเพื่องานวิจัยควรยืนยันผลบวกด้วยการตรวจ western blot และแปลผลตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก คือพบแถบโปรตีนที่เป็น envelope อย่างน้อย 2 แถบและแถบโปรตีนที่เป็น gag อย่างน้อย 1 แถบ ในกรณีที่ตัวอย่างนั้นๆ ได้ผลก้ำกึ่งหรือผลสรุปไม่ได้ ต้องตามผู้บริจาคโลหิตมาเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจเพิ่มเติมจนกว่าจะได้ผล western blot เป็นผลบวก นอกจากนี้การนำตัวอย่างที่เก็บไว้ในคลังเลือดที่อุณหภูมิ 4°C เกินกว่า 6 ชั่วโมงไปทำการทดสอบทางชีวโมเลกุล เช่น การตรวจด้วยวิธี PCR หรือการตรวจหา viral load ต้องเข้าใจว่าผลการตรวจที่ได้จาก

ตัวอย่างดังกล่าวจะได้ค่าต่ำกว่าความเป็นจริงเนื่อง RNA ในตัวอย่างบางส่วนได้เสียคุณภาพไป

#### การประกันคุณภาพการทดสอบ

แม้ว่าเทคนิคการตรวจจะมีความไวสูงขึ้นแต่ความปลอดภัยของโลหิตบริจาคก็ขึ้นอยู่กับคุณภาพการทดสอบทางห้องปฏิบัติการด้วย ขั้นตอนอย่างน้อยที่ห้องปฏิบัติการควรปฏิบัติเพื่อการประกันคุณภาพการทดสอบได้แก่ การคัดเลือกวิธีทดสอบที่เหมาะสมในการใช้งาน จากนั้นเมื่อนำชุดตรวจมาใช้งานจริงต้องฝึกอบรมบุคลากรและตรวจสอบระบบทดสอบของห้องปฏิบัติการก่อนใช้งาน จากนั้นระหว่างการใช้งานต้องมีการควบคุมคุณภาพอย่างต่อเนื่องรวมทั้งการเข้าร่วมโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการโดยองค์กรภายนอกด้วย

#### เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization, Revised recommendation for selection and use of HIV antibody test, *WHO Weekly Epidemiological Record* 1997;72:81-7.
2. Weber B, Fall EHM, Berger M, Doerr HW. Reduction of Diagnostic Window by New Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay. *J Clin Microbiol*, 1998;2235-9.
3. EL Delwart, ND Kalmin, TS Jones, DJ Ladd, B Foley, LH Tobler, RCP Tsui Et, MP Busch. First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation, *Vox Sanguinis* 2001;86:171-7.
4. Ai Ee Ling MD, Kenneth E, Robbins BS, Teresa M, Brown BS, et al. Failure of Routine HIV-1 Tests in a Case Involving Transmission With Preseroconversion Blood Components During the Infectious Window Period, *JAMA*, July 12, 2000-Vol 284, No.2.
5. Eve M Lackritz, Glen A Satten, et al. Estimated Risk of Transmission of the Human Immunodeficiency Virus by Screened Blood in the United States. *New Engl J Med* 1995; 333(26).
6. Committee Report, Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases, *Transfusion*, vol.40, February 2000.
7. J Pillonel, S Laperche et al. Trends in Risk Of Transfusion-Transmitted Viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and Impact of Nucleic Acid Testing (NAT), *Eurosurveillance* vol.10 Issues 1-3 Jan-Mar 2005.
8. World Health Organization. Global Program on AIDS; Recommendation for selection and use of HIV antibody tests, *Wkly Epidem Rec* 1992;67(20):145.
9. สมชาย แสงกิจพร แนวทางการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี คู่มือสำหรับห้องปฏิบัติการ กระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2550.