

บทบรรณาธิการ

การใช้ NAT ในการตรวจโลหิตบริจาค

ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจกรองการติดเชื้อในเลือดบริจาคเป็นมาตรการสำคัญที่ป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อจากการให้เลือด ในปัจจุบันความเสี่ยงในการติดเชื้อจากการให้เลือดลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับในอดีต เนื่องจากการตรวจกรองการติดเชื้อโดยวิธีการทาง Serology ที่มีความไวและความจำเพาะสูงโดยการตรวจ anti HIV1/HIV2, p24 antigen, anti HCV, HBsAg และ TPHA¹ แต่ก็ยังมีความเสี่ยงจากการที่มีเชื้อไวรัสบางชนิดที่ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีการทาง Serology เพราะการติดเชื้อในระยะแรก (primary infection) นั้น ยังไม่มีการสร้างแอนติบอดีหรือแอนติเจนมากพอที่จะตรวจพบได้โดยวิธีปกติ เรียกว่าเป็น “window period” หรือ pre-sero-conversion² ซึ่งถ้ามีการบริจาคเลือดในช่วงนี้ก็จะทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีการที่ใช้อยู่ ไวรัสที่มีความสำคัญซึ่งทำให้การติดเชื้อในระยะแรกมี window phase ได้แก่ HIV, HCV และ HBV การตรวจหาเชื้อไวรัสเหล่านี้ต้องใช้วิธี Nucleic Acid Testing (NAT) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจหาการดัดแปลงของไวรัสโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ในต่างประเทศโดยเฉพาะประเทศที่พัฒนาแล้ว ได้นำเทคนิค NAT มาใช้ในการตรวจคัดกรองเลือดผู้บริจาคและผลิตภัณฑ์จากเลือด³ เพื่อลดความเสี่ยง แต่เนื่องจากวิธีการตรวจมีเทคนิคที่ยุ่งยากและราคาแพง เพื่อลดค่าใช้จ่ายจึงใช้วิธี pool ตัวอย่างรวมกันแล้วจึงตรวจด้วย NAT ในระยะแรกจะใช้ pool ขนาดใหญ่ คือตั้งแต่ 96-500 ตัวอย่าง แต่ต่อมาพบว่าแม้จะใช้เทคนิค NAT ก็ยังไม่สามารถปิด window period ได้หมด จึงลดจำนวน pool ลงเป็น 16 หรือ 24 ซึ่งเรียกว่า

minipool (MP) ในช่วงเวลานั้นได้มี NAT assays ที่ได้รับอนุญาตจาก FDA ประเทศสหรัฐอเมริกา ให้ใช้ในการตรวจกรองเลือด 3 assays คือ COBAS AmpliScreen HIV-1 and HCV assays ใช้หลักการ Polymerase Chain Reaction (PCR : Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA), Procleix HIV-1 and HCV assays ใช้หลักการ Transcription Mediated Amplification (TMA : ผลิตโดย Gen-Probe Inc. San Diego, CA และจัดจำหน่ายโดย Chiron Corporation, Emeryville, CA) และ assay ของ National Genetic Institute (NGI) ใช้หลักการ Reverse-transcription PCR (RT-PCR) ตรวจกรอง HIV-1 และ HCV ใน pool plasma โดยที่ pool จะมีขนาดใหญ่คือ 512 ทั้ง 3 assays มีความแตกต่างกันทั้งในด้านเทคนิคที่ใช้และวิธีการตรวจ แต่ทั้ง 3 assays มี standard sensitivity ตามที่ FDA กำหนด คือ 100 copies/mL สำหรับ pool test และ 5,000 IU/mL สำหรับ original donation โดย FDA กำหนดให้ใช้ NAT แทนการตรวจ p24 antigen โดยที่ Procleix assay ใช้ตรวจใน pool ขนาด 16 หรือตรวจแบบ individual ส่วน COBAS AmpliScreen ใช้ตรวจใน pool ขนาด 24 หลังจากที่มีการตรวจ NAT โดยใช้ minipool (16-24) ยังพบว่ามี HIV และ HCV บางรายหลุดจากการตรวจพบไปได้ โดยเฉพาะรายที่มีจำนวนไวรัสน้อยๆ (Break-through case)^{4,5} จึงมีการคิดว่าถ้าตรวจเป็นแบบ individual จะทำให้ลดอัตราเสี่ยงลงได้อีก และได้มีบางประเทศเปลี่ยนมาใช้ในการตรวจแบบ individual ทั้งที่ยัง

ไม่ได้มีการศึกษาถึงความคุ้มค่าและประโยชน์ที่จะได้จากการตรวจแบบ individual เมื่อเทียบกับการตรวจแบบ minipool

ในประเทศไทยได้มีการทดลองใช้ NAT ในการตรวจกรองเลือดผู้บริจาคในปี พ.ศ. 2544 โดยใช้ COBAS AmpliScreen HIV-1 and HCV assays ซึ่งในขณะนั้นเป็นเพียงผลิตภัณฑ์เดียวในตลาดโลก โดยได้ทำการตรวจในขนาด minipool 24 และใช้ตรวจจากผู้บริจาคประมาณ 100,000 ราย ผลพบ HIV-1 window period 1 ราย ไม่พบ HCV window period (HCV window period ที่พบ 1 ราย เมื่อนำไปตรวจ Serology ด้วยวิธีการอื่น ปรากฏว่า anti HCV ให้ผลบวก จึงไม่ถือเป็นการตรวจพบโดย NAT) ทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติได้เชิญกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากหลายๆ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องมาประชุมเกี่ยวกับการตัดสินใจใช้ NAT ในงานของศูนย์บริการโลหิต ที่ประชุมมีความเห็นว่า ยังไม่ควรใช้ NAT ในประเทศไทยเพราะจะเป็นการสิ้นเปลืองงบประมาณโดยประโยชน์ที่ได้ไม่คุ้มกับค่าใช้จ่ายที่ต้องเสียไป และ window case ในประเทศไทยขณะนั้นไม่ได้สูงอย่างที่ประมาณการเอาไว้ ประกอบกับ test มีราคาแพงเกินไป คือ test ละ 4,000 บาท และวิธีการตรวจยังไม่เป็นแบบอัตโนมัติ ซึ่งยังไม่เหมาะกับงานปริมาณมากๆ และยังมีวิธีป้องกัน window case ที่ดีคือไม่รับบริจาคโลหิตจากผู้ที่มีความเสี่ยงสูง ซึ่งทำได้โดยวิธีสัมภาษณ์หรือออกแบบสอบถาม ประกอบกับป้องกันการกระบาดของโรคในประชากรทั่วไปให้ดีขึ้น ก็จะทำให้ผู้ติดเชื้อรายใหม่ๆ ลดลง แต่ต่อมาเมื่อมีการแต่งตั้งผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตคนใหม่ ทางศูนย์บริการโลหิตจึงได้มีการนำ NAT มาใช้ตรวจโลหิตผู้บริจาคตามนโยบายของผู้ผู้อำนวยการ โดยใช้ Procleix assays สำหรับ HIV-1 และ HCV โดยค่าตรวจคิดเป็น 520 บาท/ผู้บริจาค ซึ่งในขณะนั้นยังใช้การตรวจใน pool ขนาด 16 (ราคาน้ำยาจะเป็น test ละ 8,300 บาท) และตรวจเฉพาะกับโลหิตที่จะจ่ายให้กับโรงพยาบาลเอกชนเท่านั้น ในปี พ.ศ. 2549

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้เสนอต่อกระทรวงสาธารณสุขที่จะทำการตรวจ NAT ในเลือดผู้บริจาคโลหิตทุกรายทั่วประเทศ ซึ่งมีประมาณปีละ 1,500,000 ราย ซึ่งจะต้องใช้เงินเกือบ 800 ล้านบาท/ปี สภากาชาดไทยและกระทรวงสาธารณสุขจึงตั้งคณะทำงานเพื่อศึกษาการตรวจคุณภาพโลหิตด้วยวิธี NAT ซึ่งคณะทำงานฯ ได้ตั้งคณะอนุกรรมการประเมินประสิทธิภาพการใช้ NAT ในงานบริการโลหิต ให้จัดทำโครงการวิจัยในหัวข้อเรื่อง “การประเมินความคุ้มค่าของเทคนิคการตรวจ Nucleic Acid Amplification Test (NAT) แบบตัวอย่างเดี่ยวและตัวอย่างรวมในงานบริการโลหิตแห่งชาติ” โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการใช้ NAT โดยใช้ตัวอย่างรวม 6 ตัวอย่างต่อการทดสอบ (minipool) และตัวอย่างเดี่ยว (individual) โดยใช้ชุดตรวจแบบ fully automate ของน้ำยาที่มีจำหน่ายทั้ง 2 บริษัท เพื่อนำผลการศึกษามาวิเคราะห์และประเมินความคุ้มค่า สำหรับเป็นแนวทางในการพิจารณาถึงความเหมาะสมในการนำเทคโนโลยีใหม่มาใช้เป็นมาตรฐานงานบริการโลหิตระดับชาติต่อไป

ในปัจจุบันน้ำยาที่ใช้ในการตรวจ NAT ของทั้ง 2 บริษัทที่จะนำมาทดลองใช้นั้น ได้มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิม คือ Chiron ได้เพิ่มการตรวจ HBV ลงใน test ด้วย เรียกว่าเป็น Procleix Ultrio Assay ซึ่งต้องใช้กับเครื่องอัตโนมัติ TIGRIS System แต่เทคนิคยังเป็นแบบเดิม คือ TMA และใช้ตรวจแบบ individual หรืออาจจะตรวจแบบ pool 3 ก็ได้ ส่วนบริษัท Roche Molecular Systems ก็เพิ่มการตรวจ HBV ลงไปใน test ด้วยเช่นกัน แต่ปรับปรุงหลักการเป็นวิธี Real Time PCR โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ COBAS S201 และใช้ตรวจแบบ intermediate pool 6 ซึ่ง Analytical Sensitivity ของทั้ง 2 tests ได้ผ่านเกณฑ์ของ FDA คือ 100 copies/mL ในตัวอย่างรวม แต่ราคาต่อ donation ต่างกันมาก ดังนั้นการศึกษาวินิจฉัยของคณะอนุกรรมการประเมินประสิทธิภาพการใช้ NAT ในงานบริการโลหิตน่าจะได้

ข้อมูลที่มีประโยชน์อย่างมาก การศึกษาเปรียบเทียบความไวของน้ำยาทั้ง 2 บริษัทนั้น ได้มีการทดลองมาแล้วหลายครั้งในต่างประเทศ เช่นการศึกษาของ Michale P. Bush และคณะ⁶ และ Daniel Candotti และคณะ⁷ ซึ่งผลการทดลองพบว่าน้ำยาทั้ง 2 มี analytical sensitivity เท่าเทียมกัน สามารถตรวจพบ HIV และ HCV ในช่วง early infection ได้เท่าๆ กัน เมื่อตรวจที่ pool 16 และ pool 24 ตามลำดับ แต่ถ้านำ test ทั้ง 2 tests มาตรวจแบบ individual พบว่ามีข้อแตกต่างกันเล็กน้อย คือ อาจสามารถตรวจพบ window case เพิ่มขึ้น 1-2 รายต่อการตรวจ 10 ล้าน donations ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนจากการตรวจด้วย minipool มาเป็น individual อาจจะปิด window period ได้มากขึ้น โดยเฉพาะในรายที่มาบริจาคขณะที่มีไวรัสต่ำมากๆ แต่ยังไม่ต่ำกว่า analytical sensitivity ของน้ำยา เพราะการตรวจแบบ minipool จำนวนไวรัสต้องมีมากพอจนเมื่อเอามาเจือจางใน pool แล้วยังมีจำนวนไวรัสมากพอที่ NAT จะตรวจพบ ส่วนประโยชน์ของการตรวจแบบ individual อาจจะไม่คุ้มเท่ากับจำนวนเงินที่ใช้ไป เนื่องจากอาจต้องใช้งบประมาณเพิ่มอีกเป็น 10 เท่า จึงจะตรวจพบเพิ่มอีก (NAT yield) 1-2 ราย ในสภาพปัจจุบันประเทศไทยยังเป็นประเทศที่กำลังพัฒนา คงไม่มีงบประมาณที่จะมาใช้อย่างฟุ่มเฟือย ซึ่งยังมีอีกหลายวิธีการที่จะลดความเสี่ยงลงโดยใช้งบประมาณเพียงเล็กน้อย เช่น การออกแบบแบบสอบถามเพื่อหลีกเลี่ยงการรับบริจาคจากผู้ที่มีความเสี่ยงสูงจากการติดเชื้อ เช่น กลุ่มรักร่วมเพศ ผู้ใช้ยาเสพติด และมีนโยบายป้องกันการระบาดในประชากรทั่วไปด้วยวิธีการต่างๆ ที่ได้ผลดี เช่น รณรงค์การใช้ถุงยางอนามัย หรือให้การศึกษาด้านเพศศึกษา ก็จะทำให้มีผู้บริจาคที่อยู่ในระยะ window period น้อยลง

การใช้ NAT ในการตรวจโลหิตบริจาคมีข้อดี เพราะเป็นวิธีที่มีความไวสูง สำหรับตรวจหาไวรัสที่มีจำนวนน้อยๆ ได้ และเมื่อมีการนำมาใช้ก็พบว่า สามารถลดอัตรา

เสี่ยงของการติดเชื้อจากการได้รับเลือดลงได้ แต่ก็ยังไม่สามารถปิด window ได้ทั้งหมด เนื่องจากวิธี NAT เองก็มีข้อจำกัด ของการทดสอบ (limit of detection) คือ ถ้ามีไวรัสอยู่จำนวนน้อยมาก ก็ไม่สามารถตรวจพบได้ หรือ NAT อาจทำให้เกิดผลลบปลอม (false negative) ได้ เพราะยังคงใช้หลักการของ primers และ probes และเนื่องจากไวรัสมีหลาย subtypes หรือมี genotypes ที่แตกต่างกัน ก็อาจมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์หรือ genetic sequences ที่แตกต่างกันออกไป ทำให้เกิดการไม่จับกันของ primers ที่ใช้กับ target นั้น นอกจากนี้ NAT ยังเป็นวิธีที่ต้องใช้เอ็นไซม์ในขั้นตอนการทดสอบ ซึ่งอาจมี inhibitors บางอย่างมาขัดขวางการทำงานของเอ็นไซม์ได้ และอีกสาเหตุหนึ่งคือ เนื่องจาก NAT มีความไวสูงเกินไป จึงสามารถทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ง่ายจากการปนเปื้อนทั้งจากตัวอย่างโลหิตที่นำมาตรวจ หรือจาก amplicon ของ NAT เอง ซึ่งการเกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอมนี้ อาจทำให้การจ่ายโลหิตของศูนย์บริการโลหิตมีปัญหาได้ ดังนั้นการนำ NAT มาใช้ในการตรวจโลหิตบริจาค่นั้นยังต้องมีการพิจารณาในอีกหลายด้าน และควรมีการทดลองประเมินการใช้งาน เพื่อดูความเหมาะสมและความคุ้มค่าก่อนที่จะนำมาใช้จริงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงสาธารณสุข ทบวงมหาวิทยาลัย, ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย, นโยบายระดับชาติเกี่ยวกับงานบริการโลหิต พ.ศ. 2538.
2. Busch MP, Lee LL, Satten GA, et al. Time course of detection of viral and serological markers preceding human immunodeficiency virus type 1 Seroconversion; Implications for screening blood and tissue donors. *Transfusion* 1995; 35: 91-7.
3. Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Amplification Testing of Blood Donors; Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. *Transfusion*

- 2000;40:143-59.
4. Schutter CG, Caspari G, Jursch CA, et al. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA [letter]. *Lancet* 2000;355:41-2.
 5. Stramer SL, Chamber SL, Page PL, Wagner AG, Gibble J. Third reported US case of HIV transmission from NAT Screened blood [Abstract S134-040k]. *Transfusion* 2003;43:40A.
 6. Busch MP, Glynn SA, Wright DJ, et al. Relative sensitivities of licensed nucleic acid amplification tests for detection of viremia in early human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfusion* 2005;45:1853-63.
 7. Candotti D, Richetin A, Cant B, et al. Evaluation of a transcription-mediated amplification based HCV and HIV-1 RNA duplex assay for screening individual blood donation : a comparison with a minipool testing system. *Transfusion* 2003;43:215-25.
 8. Katsoulidou AS, Moschidis ZM, Gialeraki RE, et al. Clinical evaluation of an HIV-1 and HCV assay and demonstration of significant reduction of the HCV detection window before seroconversion. *Transfusion* 2004;44:59-66.