

บทความพิเศษ

Nucleic Acid Technique Screening มีความเป็นไปได้เพียงไร

ศรีวิไล ตันประเสริฐ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ความเสี่ยงในการติดเชื้อโรคจากการรับโลหิตในปัจจุบัน ที่ยังคงมีอยู่มาจากสาเหตุ 4 ประการคือ

- Window period (preseroconversion)
- Viral variants เช่น HIV-I group O, sub-type แปลกๆ ของ HCV หรือ HBsAg
- Atypical seroconversion หรือ immunosilent infection
- Testing errors

Window period หมายถึงระยะเวลาตั้งแต่ผู้ป่วยได้รับเชื้อไวรัสจนถึงเวลาที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน (current screening tests) ซึ่งในช่วงเวลานี้ไวรัสจะถูกระบุตรวจพบได้ด้วยวิธี NAT

Window period ของ HIV ที่ผ่านมา

1990	45	วัน
1995	20.3	วัน

(Busch et al)

เปรียบเทียบ Window period ของ HIV และ HCV จากวิธีเดิมกับ NAT

	HIV	HCV
(antibody testing)	28	63 วัน
(NAT)	17	4 วัน

(Noah's Arc. August 1999;10(4):54)

ได้รับต้นฉบับ 6 สิงหาคม 2544 และให้ตีพิมพ์ 12 สิงหาคม 2544

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.ศรีวิไล ตันประเสริฐ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนัง เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Window period virus detection โดย NAT

Window	HIV	HCV	HBV
Infection to antibody (day)	22	70	56
Reduced by NAT (day)	10-15	41-60	6-16
Double time (day)	1	<1	4
Viral load	10^2 - 10^7	10^5 - 10^7	10^2 - 10^4
Transferase	2,000	40	145

HIV NAT ช่วยลด window period ลงไปได้ 10-15 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ HIV Ab testing และเปรียบเทียบกับ HIV p24 antigen testing จะลดได้ 3-8 วัน

ข้อแตกต่างนี้ชี้ให้เห็นว่า NAT สามารถตรวจเชื้อไวรัสได้เร็วกว่าวิธี antibody testing ซึ่งแสดงว่าการลดระยะ window period ทำได้โดยการตรวจเชื้อโดยตรงคือ NAT testing

NAT (Nucleic acid technique) คือวิธีการใหม่ในการตรวจสอบโดยตรง ที่ยีนของเชื้อไวรัสเช่น เชื้อไวรัสตับอักเสบบี (HCV) เชื้อโรคเอดส์ (HIV) และ เพราะ NAT สามารถตรวจจับยีนของเชื้อไวรัสแทนที่จะต้องรอจนร่างกายสร้าง antibody ขึ้นมา เมื่อนำ NAT มาใช้ในการตรวจกรองเชื้อ จึงทำให้สามารถลด window period ให้สั้นลงได้ แต่เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการตรวจด้วยวิธี NAT ยังมีราคาสูงมาก จึงทำให้มีการหาวิธีตรวจโดยทำ pooled serum ซึ่งขนาดของ pooled serum ที่จะใช้

จำนวนตัวอย่างมากน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับอุบัติการณ์ของเชื้อนั้นๆ ในแต่ละพื้นที่ ซึ่งเมื่อ pooled serum ตรวจพบผลบวก จะต้องดำเนินการตรวจหาอีก 1 หรือ 2 รอบต่อไป เพื่อให้ได้ตัวอย่างโลหิตที่มีผลบวก

การใช้วิธีเพิ่มขยายจำนวน nucleic acid อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมและผลลบปลอมได้

สาเหตุของผลบวกปลอมมักมาจากการปนเปื้อน (contamination) ซึ่งอาจจะเกิดตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนหรือการปนเปื้อนของน้ำยาที่ใช้ ปัญหาอาจเกิดจากเทคโนโลยีในการตรวจ หรืออาจมาจากปัญหาที่มีความไวมากเกินไป

สาเหตุของผลลบปลอม อาจเกิดได้ตั้งแต่การเตรียมตัวอย่าง ในการสกัด nucleic acid มาไม่พอ ปัญหาของน้ำยาที่ใช้ ความผิดพลาดของผู้ปฏิบัติ คุณภาพตัวอย่างไม่ดี รวมทั้งเครื่องมือมีปัญหา (failure)

การนำ NAT testing มาใช้เพื่อลดระยะ window ได้มีการใช้พอสมควรในประเทศยุโรป ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย ซึ่งได้นำมาใช้ในการทำการตรวจคัดกรองโลหิต และมีรายงาน่วิธี NAT testing สามารถตรวจพบ HIV, HCV, HBV เพิ่มขึ้นจากวิธี antibody testing อย่างแน่นอน

จากการศึกษาเปรียบเทียบ HCV PCR และ HIV

PCR กับวิธี antibody testing ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ จาก 100,000 รายของตัวอย่างโลหิต ระหว่างมิถุนายน 2000 ถึงเมษายน 2001 ตรวจ 500-600/วัน (random) ส่วนเดือนพฤษภาคม 2000 ตรวจประมาณ 1,000 หน่วย/วัน (ทุกยูนิต) โดยใช้ AmpliScreen HCV v.20 และ AmpliScreen HIV v.15 ตามตารางที่ 1

ผลการศึกษาพบว่า HCV RNA positive 1 ราย 5×10^5 copies/mL (anti HCV negative) เมื่อตรวจไป 50,000 ราย และพบ HIV RNA positive 2 ราย รายแรก viral load 693 cp/mL (anti-HIV neg, HIV-Ag neg) อีก 1 ราย HIV RNA positive และ HIV-Ag positive เมื่อตรวจครบ 100,000 ราย ตามตารางที่ 2, 3 และ 4

ฉะนั้นอาจกล่าวได้ว่าการนำ NAT testing มาใช้เป็นการเพิ่มความปลอดภัยของโลหิตอีกขั้นหนึ่ง แต่ถึงแม้จะได้ใช้วิธีการตรวจที่เหมาะสมเพียงใด ก็อาจยังมีเชื้อบางตัวที่ยังไม่สามารถตรวจพบได้ การตัดสินใจเลือกวิธีการตรวจ จึงขึ้นอยู่กับการศึกษาความเป็นไปของการแพร่ระบาดของเชื้อและผลตามมาของเชื้อนั้นๆ

ข้อควรพิจารณาการนำ NAT มาใช้ในภาคปฏิบัติ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยของโลหิต และผลิตภัณฑ์โลหิต

การนำ NAT มาใช้ในการตรวจพลาสมาเพื่อใช้ในการ

ตารางที่ 1 AmpliScreen Program

Month	% Implement	No.of pool	No.of unit tested
June 00-April 01	50%	3,518	84,432
1-24 May 01	100%	1,014	24,336
Total	-	4,532	108,768

ตารางที่ 2 ผลการตรวจ HCV และ HIV ที่ให้ผลบวกโดยวิธี NAT

Result	Date	Viral Load	Time Diff.
HCV positive	2/10/43	> 500,000 cp/mL	10 days vs HCV Ab
HIV positive	14/5/44	693 cp/mL	4 days vs HIV Ag
HIV positive	20/5/44	HIV-Ag positive	-

ตารางที่ 3 ผลการติดตามตรวจ HCV ที่ให้ผลบวกโดยวิธี NAT กับการตรวจ anti HCV

Date	HCV RNA	Anti HCV (Prism) S/CO	Time Diff.
2/10/43*	+ (OD 3.955)	-(0.49)	-
12/10/43**	+ (OD 3.955)	+ (4.78)	10 days
17/10/43***	+ (OD 3.955)	+ (4.13)	

* ALT 320 IU/mL; ** ALT 1,016 IU/mL; *** ALT 867 IU/mL

ตารางที่ 4 ผลการตรวจติดตาม HIV ที่ให้ผลบวกโดยวิธี NAT กับการตรวจ HIV Ag และ HIV Ab

Date	HIV RNA	HIV Ag	HIV Ab		
		Abbott EIA	Rapid test	Test A	Test B
		S/CO		S/CO	
Time diff	0	4 days	Undetect	7 days	Undetect
14/5/44	+ (OD3.491)	0.48	Neg	0.32	0.072
	Viral load 693				
	cp/mL				
18/5/44	+(OD2.613)	7.56	Neg	0.61	0.11
	Viral load				
	>750,000 cp/mL				
19/5/44	+ (OD2.720)	11.95	Neg	0.64	0.075
20/5/44	+ (OD2.774)	19.16	Neg	0.71	0.075
21/5/44	+ (OD2.858)	> 34.92	Neg	1.04	0.086
22/5/44	+ (OD3.428)	> 34.92	Neg	1.24	0.088
23/5/44	+ (OD2.547)	> 34.92	Neg	0.38	0.097
-					
29/5/44	ND	32.35	Pos	1.38	4.283
4/6/44	ND	1.77	Pos	4.08	ND

ผลิตผลิตภัณฑ์นั้นจะเป็นการเพิ่มความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่ใช้ ถึงแม้ว่าในขบวนการผลิตนั้นอาจจะมีการทำ virus inactivation ด้วย การนำ NAT มาใช้อยู่ในระหว่างการนำมาปฏิบัติโดยแรงกระตุ้นของ European regulatory authorities

การนำ NAT มาใช้ด้วยวิธีการรวมตัวอย่าง (pooled technique) ตามทฤษฎีการตรวจ pooled NAT จะช่วย

ลดหรือขจัด window period ของส่วนประกอบของโลหิตที่นำมาใช้ ข้อมูลนี้ทำให้ต้องศึกษาต่อว่าการใช้ NAT จะช่วยลดอัตราเสี่ยงของการติดเชื้อจากการรับส่วนประกอบของโลหิตโดยจะต้องไม่เกิดผลกระทบต่อทั้งความปลอดภัยและความต้องการใช้โลหิตของผู้ป่วย

การเลือกเชื้อที่จะตรวจด้วย NAT จากการศึกษาพบว่า การใช้ NAT pooled plasma สำหรับ HCV จะเป็น

การลดการติดเชื้อได้เป็นจำนวนมาก จึงน่าจะเป็นเชื้อตัวแรกที่จะตรวจ เนื่องจากพบว่าสามารถลดอัตราเสี่ยงการติดเชื้อ HCV จาก 1/100,000 เป็น 1/500,000 สำหรับอัตราเสี่ยงสำหรับเชื้อ HIV นั้นพบว่าไม่ได้ลดลงมาก แต่เนื่องจากการติดเชื้อ HIV เป็นสภาวะที่คุกคามความรู้สึกของประชาชน ซึ่งต้องการให้ความเสี่ยงของการรับโลหิตเป็น “zero risk” จึงควรตรวจ HIV ด้วย pooled NAT ด้วย

สำหรับ HBV นั้น พบว่าปริมาณของ virus ในช่วง window period มีระดับต่ำ และอาจตรวจไม่พบ HBV DNA ด้วย วิธี NAT pooled plasma ปัจจุบันยังไม่ได้มีข้อสนับสนุนพอที่จะตรวจ HBV ด้วย pooled plasma NAT

ข้อจำกัดในการนำ NAT มาใช้ทางภาคปฏิบัติ ผู้ที่เกี่ยวข้องกับการใช้โลหิตจะต้องพิจารณาว่าการนำ NAT มาใช้เพื่อความปลอดภัยของโลหิตให้มากยิ่งขึ้นนั้นจะต้องไม่มีผลกระทบต่อการใช้ส่วนประกอบของโลหิตโดยเฉพาะ labile components ซึ่งมีอายุ (shelf life) สั้น การใช้ NAT ต้องคำนึงถึงอัตราเสี่ยงที่ไม่สามารถใช้ component นั้นๆ ได้ ในขณะที่ปัจจุบันนี้ปัญหาการใช้ NAT ยังมีผลบวกปลอมและเครื่องมือเสียเกิดขึ้นได้บ่อย การรอผล NAT จะมีผลทำให้ไม่สามารถนำ components มาใช้ได้

ข้อแนะนำสำหรับการปฏิบัติจึงน่าจะดำเนินการดังนี้

ระยะที่ 1 ทำตาม “European requirement” โดยตรวจ plasma ที่จะทำการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ ในขณะที่ดำเนินการดังกล่าวนี้ให้ใช้โลหิตและส่วนประกอบของโลหิต โดยใช้ผลของ serological tests ไม่ต้องรอผล NAT แต่ถ้าผล NAT เป็น positive ซึ่งจะใช้เวลาานพอสมควร และโลหิตนั้นอาจจ่ายหรือใช้ไปแล้ว ให้แจ้งผลการตรวจแก่โรงพยาบาลเพื่อดูแลและให้คำแนะนำผู้ป่วยที่ได้รับโลหิตหน่วยนั้นไป สำหรับส่วนประกอบของโลหิตโดยวิธี apheresis เช่น platelet apheresis ซึ่งส่วนใหญ่จะมาจากผู้บริจาคสม่ำเสมอ (regular) น่าจะมี

ความปลอดภัย จึงไม่จำเป็นต้องรอผลของ NAT ทั้งนี้เพื่อให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาได้รวดเร็วและได้ประโยชน์คุ้มค่า

ระยะที่ 2 จะทำต่อเมื่อผลการตรวจ NAT สามารถแล้วเสร็จในเวลาที่เหมาะสม และสม่ำเสมอ เพื่อให้สามารถจ่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตได้เช่นเดียวกับการใช้วิธี serological test และเมื่อเปลี่ยนมาใช้วิธี NAT แล้ว ให้ติดตามข้อมูลการลดอัตราเสี่ยงของการติดเชื้อไวรัสจากการรับโลหิตด้วย และนอกจากนี้ควรอาศัยข้อมูลการตรวจพบผลบวกของเชื้อด้วยวิธี NAT ติดตามดูอัตราการติดเชื้อ ซึ่งอาจเกิดกับผู้รับโลหิต ซึ่งรับโลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิต ในการบริจาคโลหิตครั้งก่อน

เอกสารเผยแพร่เรื่อง NAT มีข้อแนะนำว่าสถาบันหรือองค์กรที่เกี่ยวข้องกับงานธนาคารโลหิต ควรจัดทำเอกสารที่ให้ความรู้มาตรฐานเกี่ยวกับ NAT เผยแพร่ ซึ่งเอกสารเหล่านี้ควรมีข้อมูลเกี่ยวกับ NAT และการนำมาใช้ปฏิบัติ และเมื่อมีประสบการณ์แล้ว ควรมีการพัฒนาข้อมูลของเอกสารในด้านผลกระทบในการนำมาใช้ตรวจ plasma derivatives, labile components ผลของ NAT ที่เกิดกับการบริหารจัดการโลหิตและส่วนประกอบของโลหิต

การจัดตั้ง NAT ในหน่วยงาน สถาบันที่ดำเนินการเจาะเก็บโลหิตและปั่นแยกส่วนประกอบของโลหิตสามารถนำ NAT มาใช้ได้ และเป็นศูนย์กลางในการตรวจสำหรับหน่วยงานที่ยังไม่สามารถจัดตั้ง NAT ในหน่วยงานนั้นๆ ได้

การนำ NAT มาทดแทน serological test ข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบัน ยังไม่สามารถนำ NAT มาทดแทน serological test ได้ แต่อาจจะนำมาใช้แทนการตรวจ HIVp24 ถ้าเวลาในการทำ NAT จะสั้นพอที่จะทำให้จ่าย platelet ใช้ได้ทัน

การนำ NAT มาทดแทน serological test ยังต้องอาศัยข้อมูลอีกหลายด้านมาสนับสนุนการตัดสินใจ

สรุป

1. จากการศึกษาคณะคุณฯ พบ HCV RNA positive (anti-HCV neg) 1 ราย HIV RNA positive 1 ราย (anti-HIV neg, HIV-Ag neg) ในการศึกษา 108,768 ราย ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อซึ่งมิได้ตรวจพบด้วยวิธี conventional tests จะตรวจพบและกำจัดได้ด้วยวิธี NAT testing

2. Serological assays สามารถลดอัตราเสี่ยงของการติดเชื้อจากการรับโลหิต แต่ NAT testing จะสามารถลดอัตราเสี่ยงได้มากขึ้น

3. การนำ NAT testing มาใช้ต้องคำนึงถึงปัญหาของการขาดแคลนโลหิต ปัญหาในการใช้โลหิตสด ปัญหาในเรื่อง shelf life ของส่วนประกอบโลหิต

4. การนำ NAT testing มาทดแทน serological tests ยังต้องมีข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมอีกหลายด้าน

5. ค่าใช้จ่ายของน้ำยาที่ใช้ใน NAT testing ประมาณ 2-10 ดอลลาร์สหรัฐอเมริกา โดยใช้ pooled serum

เอกสารอ้างอิง

1. *Transfusion* 2000;40:143-7, 153-5.
2. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine*, May 1998; 25:Issue 2-3.
3. *ISBT Proceedings*, 1999.
4. *AABB Association Bulletin* # 99-3.
5. *US-Japan Cooperative Medical Science Program*, San Antonio, January 2000.

