การตรวจ HIV-1 proviral DNA จากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเทียบกับชั้นเม็ดเลือดขาวและเลือดรวม

สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์[1,2,*] พัชรี เจียรนัยกูร[1,2] ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ[1,2]
ชัชวาล เส็งทอง[1] ดวงรัตน์ อรไทวรรณ[1] จารุวรรณ เรืองศิริปิยะกุล[3]
[1]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น [2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น [3]โรงพยาบาลสิรินธร จังหวัดขอนแก่น

บทคัดย่อ: เปรียบเทียบเทคนิคการตรวจหา HIV-1 proviral DNA ด้วยวิธี nested PCR จากตัวอย่างชั้นเม็ดเลือดขาว เลือดรวม และหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No.5 เพื่อใช้วินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ศึกษาหาปริมาณไวรัสน้อยที่สุดที่ตรวจพบ ความไว ความจำเพาะและความคงตัวของ HIV proviral DNA บนกระดาษกรอง ผลการศึกษาหาปริมาณไวรัสน้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้พบว่า nested PCR สามารถตรวจพบยีน *gag* และ *pol* ตั้งแต่ 10 copiesขึ้นไป ผลการศึกษาความไวในกลุ่มผู้ป่วยที่ให้ผล anti-HIV บวก จำนวน 65 ราย พบว่ายีน *gag*/*pol* มีความไวร้อยละ 100 (65/65 ราย)/ร้อยละ 96.9 (63/65 ราย) ด้วยดีเอ็นเอสกัดจากชั้นเม็ดเลือดขาว ร้อยละ90.8 (59/65 ราย)/ร้อยละ96.9 (55/65 ราย) ด้วยดีเอ็นเอสกัดจากเลือดรวม ร้อยละ87.7 (57/65 ราย)/ร้อยละ72.3 (47/65 ราย) ด้วยดีเอ็นเอสกัดจากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง ผลการศึกษาความจำเพาะในตัวอย่างดีเอ็นเอสกัดจากเลือดกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่ให้ผลลบต่อการตรวจ anti-HIV จำนวน 50 ราย พบว่ายีน *gag/pol* มีความจำเพาะร้อยละ100 ด้วยดีเอ็นเอสกัดจาก ชั้นเม็ดเลือดขาว เลือดรวม และหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง โดยสรุปการเก็บหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No.5 สามารถประยุกต์ใช้ตรวจกรองการติดเชื้อเอชไอวี โดยผลการตรวจหายีน *gag* จะมีความไวสูงกว่ายีน *pol* ทั้งนี้ HIV proviral DNA ในหยดแห้งที่สภาวะ 4 ºซ และอุณหภูมิห้องมีความคงตัวนานมากกว่า 4 สัปดาห์ และเมื่อผ่านสภาวะจำลองการขนส่งที่อุณหภูมิ 37 ºซ 7 วัน และเก็บรักษาต่อที่ 4 ºซ อีก 1 เดือนจะมีโอกาสเกิดผลลบปลอมกับยีน *gag*/*pol* ร้อยละ 16.1 (5/31 ราย)/ ร้อยละ 12.9 (4/27 ราย) ตามลำดับ
คำสำคัญ: เฮชไอวี-1 โพรไวรัลดีเอ็นเอ พีซีอาร์ หยดเลือดแห้ง

บทนำ: การติดเชื้อไวรัสเอชไอวี (Human Immunodeficiency virus; HIV) เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ จากรายงานสถานการณ์ผู้ป่วยเอดส์และผู้ติดเชื้อที่มีอาการในประเทศไทยเมื่อ 31 มกราคม 2547 โดยสำนักระบาดวิทยา มีผู้ติดเชื้อที่มีอาการแล้วและผู้ป่วยเอดส์ทั้งสิ้นจำนวน 317,065 ราย เสียชีวิตแล้ว จำนวน 72,965 ราย จำนวนผู้ป่วยโรคเอดส์สะสมที่มีสัญชาติไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 จนถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2549 มีทั้งสิ้น 306,642 ราย เสียชีวิตแล้ว 84,966 ราย มีรายงานผู้ป่วยโรคเอดส์รายใหม่ที่มีสัญชาติไทย ปี พ.ศ. 2549 มีจำนวน 10,766 ราย อัตราป่วย/ตายในแต่ละปีไม่คงที่เนื่องจากโรคเอดส์มีระยะฟักตัวนานก่อนแสดงอาการ ผู้ป่วยมารับการรักษาช้าเมื่อเปรียบเทียบกับโรคติดเชื้ออื่น ประกอบกับการขาดความเข้าใจในนิยามผู้ป่วยที่ใช้เพื่อการเฝ้าระวังโรคเอดส์ของผู้ปฏิบัติงาน ทำให้ความครบถ้วนของการรายงานผู้ป่วย ต่ำกว่าความเป็นจริง เหลือเพียงร้อยละ 4.2-52.3[1)] ปัจจุบันยังไม่มีวิธีรักษาหรือวัคซีนป้องกันการติดเชื้อเอดส์อย่างได้ผล การแพร่ระบาดของโรคจึงยังเป็นปัญหา การศึกษาในกลุ่มผู้บริจาคเลือดเพื่อพัฒนาระบบการกรองและเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจนับเป็นสิ่งสำคัญต่อการค้นหาผู้ติดเชื้อเพื่อช่วยควบคุมการแพร่เชื้อ[2-4)]

การตรวจการติดเชื้อไวรัสเอชไอวีโดยตรวจ anti-HIV จากพลาสมาหรือซีรัม เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีความไวสูง แต่ก็สามารถตรวจได้จากน้ำในช่องปาก[5,6)] เชื้อ HIV-1 เมื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านสามารถเปลี่ยน RNA viral genome เป็น complementary DNA และสอดแทรกเข้ากับ DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน แฝงอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านตลอดไปจนกว่าจะมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Virion ใหม่ การตรวจหา proviral DNA ที่แฝงอยู่ในเซลล์จึงเป็นวิธีที่สามารถบอกถึงการติดเชื้อระยะแรกๆและระยะที่ยังไม่แสดงอาการ (asymptomatic patients) จึงมีความไวและความจำเพาะสูง ในระยะแรกของการติดเชื้อ มีเซลล์ติดเชื้อจำนวนน้อยประมาณ 1 ใน 10^4-10^5ของperipheral blood mononuclear cells (PBMCs)[7,8)] ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มผู้ติดเชื้อที่แสดงอาการของโรคประมาณ 100 เท่า[9-11)] วิธี Nested PCR จะสามารถเพิ่มจำนวน HIV proviral DNA โดยใช้ primers 2 คู่ที่จำเพาะกับยีน *gag* และ *pol* ทำปฏิกิริยา PCR 2 ช่วง (two step PCR) ปฏิกิริยาช่วงแรกจะใช้ bracket primers (outer primers) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอต้นแบบ ปฏิกิริยาช่วงสองจะใช้ nested primers

*ติดต่อได้ที่ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40002
โทรศัพท์/ โทรสาร 0 4320 2089 e-mail: sahapat@kku.ac.th, dr_sahapat@yahoo.com

(inner primers) ซึ่งมีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งที่อยู่ถัดเข้ามาด้านในจาก outer primers เพื่อเพิ่มผลผลิต PCR โดยมีผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาช่วงแรกเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ให้ผลผลิตเพิ่มมากกว่า PCR ทั่วไปและมีความบริสุทธิ์สูง จึงมีความจำเพาะและความไวสูงขึ้น[12] การตรวจ HIV–1 proviral DNA โดยวิธี PCR ทั่วไปต้องอาศัยดีเอ็นเอที่สกัดจากได้จากตัวอย่างที่มากพอ ในกรณีเด็กทารกจึงมีข้อจำกัดในการเก็บตัวอย่างเลือดประกอบกับความไม่สะดวกในการจัดส่งตัวอย่างเลือดรวมจากสถานที่ห่างไกล การเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษกรองจึงมีข้อได้เปรียบ โดยเริ่มนำมาใช้เก็บตัวอย่างในหลายโรคตั้งแต่ปี ค.ศ. 1973[13] และใช้เก็บตัวอย่างตรวจการติดเชื้อไวรัส HIV–1 ในช่วงปี ค.ศ. 1987[14,15] กระดาษกรองที่นำมาใช้มีคุณสมบัติดูดซับสูง เช่น กระดาษกรอง Schleicher & Schuell No.903 นิยมใช้สำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจหาการติดเชื้อไวรัส HIV–1 ด้วยวิธี PCR[16-21] กระดาษกรอง FTA card cat no.10786-010, Life technologics นิยมใช้สำหรับเก็บสิ่งส่งตรวจการติดเชื้อไวรัส HIV–1 ด้วยวิธี enzyme immunoassay[22]

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้กระดาษกรอง Whatman No. 5 ซึ่งมีราคาไม่แพงและมีจำหน่ายทั่วไป มาใช้เก็บตัวอย่าง HIV–1 proviral DNA โดยวิธี PCR การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาชนิดตัวอย่างตรวจและขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสม โดยศึกษาความไว และความจำเพาะ ของการตรวจหา HIV-1 proviral DNA ในยีนส่วน *gag* และ *pol* ด้วยเทคนิค nested PCR จากดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดจากเลือดรวม (whole blood) หยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 (dried blood spot) และส่วนชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) รวมทั้งศึกษาความคงตัวของ HIV-1 proviral DNA ส่วน *gag* และ *pol*จากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนแผ่นกระดาษกรอง Whatman No. 5

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ:

กลุ่มตัวอย่างศึกษา

กลุ่ม anti-HIV negative จำนวน 50 ราย จากผู้บริจาคโลหิตประจำ ณ คลังเลือดกลาง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และกลุ่ม anti-HIV positive จำนวน 65 ราย จากกลุ่มผู้ป่วยใหม่ที่ยังไม่ได้รับยาต้านไวรัสเอชไอวีมาก่อนของคลินิก Hope โรงพยาบาลสิรินธร จ. ขอนแก่น โดยเจาะเก็บเลือดตัวอย่างปริมาตร 2 ml (EDTA blood) แบ่งเป็น 3 ส่วน เลือดส่วนแรกปริมาตร 500 µl เพื่อสกัดดีเอ็นเอทันที (whole blood) เลือดส่วนที่สองปริมาตร 1 ml เพื่อแยกเอาชั้นเม็ดเลือดขาวไปสกัดดีเอ็นเอจากชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) และเลือดส่วนที่สามหยดลงบนกระดาษกรองให้เลือดแห้งก่อน จากนั้นนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอ (dried blood spot; DBS)

DBS sample: นำเลือดตัวอย่าง EDTA blood แต่ละราย มาหยดลงบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 หยดละ 50 µl ปล่อยให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บแยกเป็น 2 ส่วน ก่อนนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอ ดังนี้ ส่วนแรกเก็บที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง (fresh DBS-sample) เพื่อใช้ศึกษาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ของการตรวจ HIV-1 proviral DNA และส่วนที่สองเก็บที่ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บต่อที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (transported DBS-sample) เพื่อใช้ศึกษาความคงตัว (stability) ของ HIV proviral DNA ในเลือดหยดแห้งจากการขนส่ง

DBS standard: นำเลือดตัวอย่าง EDTA blood ที่ให้ผลลบต่อการตรวจ anti-HIV เติมดีเอ็นเอไวรัสมาตรฐาน (pUC 19/ HIV-1 proviral recombinant DNA) ให้มีปริมาณแตกต่างกัน ตั้งแต่ 125, 250, 375, 500 และ 625 copies ต่อปริมาตรเลือด 50 µl (10, 20, 30, 40, และ 50 copies ต่อปริมาตร 4 µl ตามลำดับ) นำตัวอย่างเลือดดังกล่าวมาหยดเลือดแห้งลงบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 หยดละ 50 µl ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บแยกเป็น 3 สภาวะก่อนนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอ ดังนี้ ส่วนแรกเก็บที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง (fresh DBS-standard) เพื่อใช้ศึกษาค่าความไว (detection limit) ของวิธีตรวจ HIV-1 proviral DNA ส่วนที่สองเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ (normal stored DBS-standard) และส่วนที่สามเก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ (cool stored DBS-standard) เพื่อใช้ศึกษาค่าความไว (detection limit) ของวิธีและความคงตัว(stability) ของ HIV proviral DNA ในเลือดหยดแห้งจากการเก็บ

pUC 19/HIV-1 proviral recombinant DNA

ดีเอ็นเอไวรัสเอชไอวีทราบจำนวน copies แน่นอน ที่สอดแทรกอยู่กับพลาสมิด (pUC 19/HIV-1 proviral recombinant DNA) ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุธน วงษ์ชีรี กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เตรียมได้จากเซลล์ 8E5 ใช้เป็นมาตรฐานสำหรับการเทียบจำนวนของ HIV proviral DNA ในตัวอย่างตรวจ

การเตรียมดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

Whole blood: เติมน้ำยา RBC lysis buffer (10% w/v sucrose, 10% Triton X-100, 5 mM $MgCl_2$) ปริมาตร 1 ml ลงในตัวอย่างเลือด EDTA blood รายละ 0.5 ml ผสมให้เข้า

กันจนเม็ดเลือดแดงแตกหมด ปั่น 13,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที แล้วล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เติม WBC lysis buffer (12 mg% proteinase K, 75 mM NaCl, 24 mM EDTA, 1% SDS) ปริมาตร 400 µl นำไปอุ่นที่ 55°ซ นาน 30 นาที ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม 6M NaCl ปริมาตร 120 µl แล้วเขย่าอย่างแรงนาน 15 วินาที ปั่น 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่อุณหภูมิ –20°ซ นาน 30 นาที ปั่นแยกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วล้างด้วย 70% ethanol 1 รอบ จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (0.01 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 µl เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20°ซ จนกว่าจะใช้งาน

Buffy coat: นำตัวอย่างเลือด EDTA blood รายละ 1 ml ปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อแยกเอาชั้นเม็ดเลือดขาวไปสกัดแยกเป็นดีเอ็นเอ โดยเติม RBC lysis buffer ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันจนเม็ดเลือดแดงแตกหมด สกัดดีเอ็นเอเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น และละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 150 µl เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20°ซ จนกว่าจะใช้งาน

Dried blood spot: นำตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 จำนวน 1 หยด มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เติม RBC lysis buffer ปริมาตร 1 ml เขย่า 100 รอบ/นาที นาน 30 นาที ปั่น 10,000 รอบ/นาที 10 นาที สกัดดีเอ็นเอเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 150 µl เก็บไว้ที่ –20°ซ จนกว่าจะใช้งาน

การตรวจ HIV-1 proviral DNA ในส่วน *gag/pol* ด้วยวิธี Nested PCR

PCR primers 4 คู่ ประกอบด้วย gag outer primers[23] **SK038**; GAG AAC CAA GGG GAA GTG ACA TAG CAG G, **SK039**; TAG AAC CGG TCT ACA TAG TCT CTA AAG GG, gag inner primers[24] **SK38**; ATA ATC CAC CTA TCC CAG TAG GAG AAA T, **SK39**; TTT GGT CCT TGT CTT ATG TCC AGA ATG C เกิดเป็น PCR product 217 bp และ 115 bp ตามลำดับ pol outer primers[12], **JA17**; TAC AGG AGC AGA TGA TAC AG, **JA20**; CCT GGC TTT AAT TTT ACT GG, pol inner primers[12]: **JA18**; GGA AAC CAA AAA TGA TAG GG, **JA19**; ATT ATG TTG ACA GGT GTA GG เกิดเป็น PCR product 267 bp และ 130 bp ตามลำดับ internal control primers[25] **hGH1**; CAG TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A, **hGH2**; ATC CAC TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C เกิดเป็นPCR product 439 bp

ปฏิกิริยา Outer PCR: เตรียมส่วนผสม PCR ปริมาตรรวม 20 µl ในหลอด thin wall ขนาด 0.2 ml ประกอบด้วย 50 µM each dNTPs, 1.5 mM MgCl2, 2 pmole hGH-1/hHG-2, 10 pmole outer primer, 1.0 unit Tag polymerase, DNA sample ปริมาตร 4 µl อุ่นที่ 94 °ซ นาน 3 นาที แล้ว amplify 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation ที่ 94°ซ นาน 1 นาที annealing ที่ 56°ซ นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°ซ นาน 1 นาที เมื่อครบ 30 รอบแล้วอุ่นที่ 72°ซ นาน 5 นาที

ปฏิกิริยา Inner PCR: เตรียมส่วนผสม PCR ปริมาตรรวม 20 µl ในหลอด thin wall ขนาด 0.2 ml ประกอบด้วย 50 µM each dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 pmole hGH-1/hHG-2, 10 pmole outer primer, 1.0 unit Tag polymerase, outer PCR product sample ปริมาตร 4 µl และโปรแกรม thermal cycle เช่นเดียวกับปฏิกิริยา Outer PCR นำ inner PCR product 5 µl ผสม 5x loading dye ปริมาตร 1 µl หยอดลงบนหลุม agarose gel ความเข้มข้น 2% นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที จากนั้นย้อมด้วย Ethidium Bromide นาน 15 นาที และนำไปดูภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 1000

การศึกษาความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ต่อ HIV-1 proviral DNA

Whole blood, DBS, buffy coat: นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากกลุ่ม anti-HIV positive และ anti-HIV negative มาทดสอบหา HIV proviral DNA ด้วยวิธี nested PCR ในส่วนของยีน *gag* และ *pol* โดยนำผลจาก whole blood และ fresh DBS-sample เปรียบเทียบผลจาก buffy coat จากส่วนของยีน *gag*

DBS standard: นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอไวรัสมาตรฐาน ซึ่งสกัดได้จาก fresh DBS-standard ตัวอย่างละ 4 µl (HIV proviral DNA เท่ากับ 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 copies ตามลำดับ) มาใช้ศึกษาปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจพบ HIV-1 proviral DNA ในส่วนของยีน *gag* และ *pol* ด้วยวิธี Nested PCR

การศึกษาความคงตัวของ HIV proviral DNA ในเลือดหยดแห้ง

DBS standard: นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอไวรัส เท่ากับ 10 และ 40 copies ซึ่งสกัดได้จาก normal stored DBS-standard และ cool stored DBS-standard มา

ตรวจ HIV-1 proviral DNA ในส่วนของยีน *gag* และ *pol* ด้วยวิธี nested PCR เปรียบเทียบกัน

DBS sample: ดีเอ็นเอที่เตรียมจากหยดเลือดแห้งตัวอย่างที่ผ่านการจำลองการขนส่งและเก็บ โดยเก็บที่ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บต่อที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง (fresh DBS-sample) และเก็บที่ 37°ซ เป็นเวลา 7 วัน แล้วเก็บต่อที่ 4°ซ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (transported DBS-sample)

ผล:

ความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ต่อ HIV-1 proviral DNA จากเลือดตัวอย่าง

ผลการตรวจ HIV-1 proviral DNA ด้วยวิธี nested PCR จากเลือดตัวอย่างในส่วนของยีน *gag* เมื่อเปรียบเทียบกับผลตรวจจาก buffy coat ที่ให้ผลถูกต้องทุกรายพบว่า buffy coat, whole blood และ fresh DBS-sample ให้ค่าความไวร้อยละ 100 (65/65 ราย), 90.8 (59/65 ราย) และ 87.7 (57/65 ราย) ตามลำดับ โดยทั้งหมดมีความจำเพาะร้อยละ 100 (0/50 ราย) ในส่วนของยีน *pol* พบว่า buffy coat, whole blood และ fresh DBS-sample ให้ค่าความไวร้อยละ 96.9 (63/65 ราย) 84.6 (55/65 ราย) และ 72.3 (47/65 ราย) ตามลำดับ โดยทั้งหมดมีความจำเพาะร้อยละ 100 (0/50 ราย) (ตารางที่ 1) แสดงว่าการตรวจ HIV-1 proviral DNA ด้วยวิธี nested PCR จากเลือดตัวอย่างในส่วนของยีน *gag* จาก buffy coat มีความไวและความจำเพาะสูงสุด

ดีเอ็นเอที่ทราบปริมาณดีเอ็นเอไวรัสมาตรฐาน สกัดได้จากหยดเลือดแห้งที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง (fresh DBS-standard) ตัวอย่างละเท่ากับ 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 copies ตามลำดับ จำนวน 10 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วยวิธี nested PCR พบว่าหากมี HIV-1 proviral จำนวนตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไป ทุกตัวอย่างจะสามารถตรวจพบ PCR product ขนาด 115 bp ในส่วนของยีน *gag* และ 130 bp ในส่วนของยีน *pol* โดยมี PCR product ขนาด 439 bp ของยีน *hGH* เป็นตัวควบคุมผล (internal control) ดังแสดงในรูป 1A และรูป 1B ตามลำดับ แต่หากมีปริมาณต่ำกว่า 10 copy (5 copy) จะมีโอกาสตรวจพบเฉพาะยีนส่วน *gag* ได้เพียง 2 ตัวอย่างใน 10 ตัวอย่าง เกิดผลลบปลอม 8 ราย (8/10 ราย) ดังแสดงในรูปที่ 1C ในขณะที่ยีนส่วน *pol* จะไม่สามารถตรวจพบได้เลย เกิดผลลบปลอม 10 ราย (10/10 ราย) แสดงว่าวิธีการตรวจหา HIV-1 proviral DNA ของยีนส่วน *gag*/*pol* มีความไวตั้งแต่ 10 copy ขึ้นไป โดยที่การตรวจในส่วนยีน *gag* มีค่าความไวของวิธีดีกว่าการตรวจหายีนส่วน *pol*

ความคงตัวของ HIV proviral DNA ในเลือดหยดแห้ง

ผลการศึกษาความคงตัวของ HIV-1 proviral DNA จากดีเอ็นเอที่มีปริมาณดีเอ็นเอไวรัสมาตรฐาน 10 และ 40 copies สกัดได้จากหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง whatman No 5 ผ่านการเก็บนาน 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง (normal stored DBS-standard) และเก็บที่ 4°ซ (cool stored DBS-standard) สามารถตรวจหายีนส่วน *gag* และ *pol* ของ HIV-1 proviral DNA ด้วยวิธี nested PCR ได้ แสดงว่าสามารถเก็บตัวอย่างตรวจ HIV-1 proviral DNA ที่เก็บในสภาพเลือดหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง whatman No 5 ที่อุณหภูมิห้องหรือเก็บที่ 4°ซ ได้นานอย่างน้อย 4 สัปดาห์

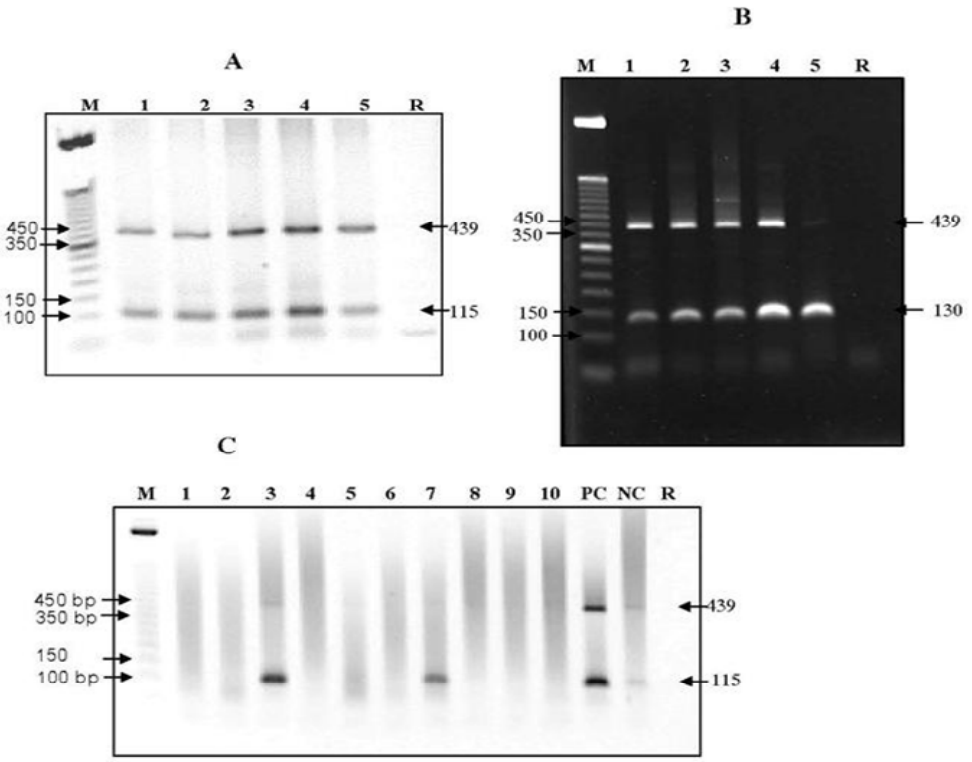
ผลการศึกษาสภาพการขนส่งด้วยสภาวะจำลอง การเก็บหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง whatman No 5 ที่ 37°ซ นาน 7 วัน แล้วนำไปเก็บรักษาสภาพต่อที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 4 สัปดาห์ ก่อนเริ่มทำการสกัดดีเอ็นเอ (transported DBS-sample) เปรียบเทียบกับผลการตรวจดีเอ็นเอที่สกัดภายใน 24 ชั่วโมง (fresh DBS-sample) พบว่าตัวอย่างหยดเลือดแห้งที่ผ่านการเก็บที่ 37°ซ นาน 7 วัน แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาสภาพต่อที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 1 เดือน จำนวน 31 ราย ให้ผลลบปลอม 5 ราย ในส่วนของยีน *gag* และ 4 ราย ในส่วนของยีน *pol* ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 The sensitivity and specificity of HIV-1 proviral DNA detection by nested PCR from fresh DBS-sample compare to buffy coat and whole blood samples among 65 untreated anti-viral drug cases of anti-HIV positive and 50 anti-HIV negatives

HIV nested PCR	HIV positive group (n=65)		
	+	-	% sensitivity
gag region:			
Buffy coat	65	0	100.0
Whole blood	59	6	90.8
Fresh DBS-sample	57	8	87.7
pol region:			
Buffy coat	63	2	96.9
Whole blood	55	10	84.6
Fresh DBS-sample	47	18	72.3
HIV nested PCR	**HIV negative group (n=50)**		
	+	-	% specificity
gag region:			
Buffy coat	0	50	100.0
Whole blood	0	50	100.0
Fresh DBS-sample	0	50	100.0
pol region:			
Buffy coat	0	50	100.0
Whole blood	0	50	100.0
Fresh DBS-sample	0	50	100.0

ตารางที่ 2 The results of HIV-1 proviral DNA detection by nested PCR from 36 dried blood spot samples (fresh DBS-sample) compare to which keep at 37°C for 7 days and further store at 4°C for 4 weeks as transportation model (transported DBS-sample)

PCR	*gag*		*pol*	
	fresh DBS-sample	transported DBS-sample	fresh DBS-sample	transported DBS-sample
+	31 (100%)	26 (83.9%)	30 (96.8%)	27 (87.1%)
-	0 (0%)	5 (16.1%)	1 (3.2%)	4 (12.9%)
Anti-HIV positive	31	31	31	31



รูปที่ 1 The sensitivity of HIV-1 proviral DNA detection by nested PCR from 10, 20, 30, 40 and 50 copies of pUC 19/HIV-1 proviral recombinant DNA containing dried blood spot on Whatman No. 5. filter paper. The 115 bp PCR product of HIV-*gag* region; **1A**), and 130 bp PCR product of HIV-*pol* region; **1B**), were showed in all samples. Only 2 from 10 samples of dried blood spot which contained 5 copies were positive; **1C**). 439 bp PCR product of *hGH* was used as internal control.

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรวจ HIV-1 proviral DNA โดยวิธี nested PCR ในสิ่งส่งตรวจหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No.5 จากเลือดรวมเปรียบเทียบกับเลือดที่แยกดีเอ็นเอจากชั้นเม็ดเลือดขาว (buffy coat) เนื่องจากดีเอ็นเอมีความคงตัวสูงและสามารถอยู่ในสภาวะแห้งที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลานาน การเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษกรองจึงเป็นทางเลือก เนื่องจากมีความสะดวกไม่มีขั้นตอนการปั่นหรือถ่ายเทตัวอย่าง จึงลดโอกาสผิดพลาดในการติดฉลาก และประหยัดเวลาในการทำงาน เก็บรักษาง่าย ไม่มีขั้นตอนหรือเครื่องมือที่ต้องระวังเป็นพิเศษในการนำส่งตัวอย่าง สามารถเก็บไว้ได้ในอุณหภูมิห้อง ค่าใช้จ่ายต้นทุนต่ำเหมาะสำหรับงานจำนวนมาก การศึกษาครั้งนี้สนใจการเก็บสิ่งส่งตรวจแบบหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 ซึ่งเป็นกระดาษกรองที่มีราคาไม่แพง และใช้อยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

การเก็บตัวอย่างเลือดบนกระดาษกรองเริ่มนำมาประยุกต์ใช้เก็บตัวอย่างในหลายโรคตั้งแต่ปี ค.ศ. 1973[13] เริ่มนำมาใช้เก็บตัวอย่างตรวจการติดเชื้อไวรัส HIV–1 ในราวปี ค.ศ. 1987[14,15] ได้รับความสนใจศึกษาอย่างต่อเนื่อง[14-22,24,26-32]

แต่กระดาษกรองที่ใช้ศึกษามีลักษณะพิเศษเฉพาะ สามารถดูดซับสูง จึงมีราคาแพง การประยุกต์ใช้เทคนิคการตรวจหา HIV-1 proviral DNA โดยวิธี nested PCR จากสิ่งส่งตรวจชนิดเลือดรวม และ หยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 เพื่อที่จะใช้ตรวจการติดเชื้อ HIV ในผู้ป่วย และการหยดเลือดบนกระดาษกรองถูกนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหาการเจาะเลือดในเด็กทารก และการนำส่งเลือดหรือสิ่งส่งตรวจเนื่องจากดีเอ็นเอมีความคงทนสูงและสามารถอยู่ในสภาวะแห้งที่อุณหภูมิห้องได้เป็นเวลานาน ได้มีผู้ศึกษาโดยใช้หยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองชนิดพิเศษ no. 903 Schleicher & Schuell[16-21] มีคุณสมบัติการดูดซับสูง ราคาค่อนข้างแพง ไม่สามารถหาได้ในท้องตลาดทั่วไป การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ประยุกต์ใช้กระดาษกรอง Whatman no. 5 ซึ่งเป็นกระดาษกรองที่ใช้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไปสามารถหาซื้อในท้องตลาดแทนกระดาษกรองชนิดพิเศษดังกล่าว โดยได้ทำการศึกษาสภาวะของ nested PCR ที่เหมาะสม ขีดความสามารถของการตรวจพบในด้านความไว ความจำเพาะ และความคงตัวของดีเอ็นเอบนกระดาษกรอง Whatman No. 5 ผลการศึกษาพบว่าวิธี nested PCR มีความไวสามารถตรวจพบ HIV-1 proviral DNA ส่วนยีน *gag* และ *pol* เท่ากับตั้งแต่ 10 copies ต่อปฏิกิริยาขึ้นไป สอดคล้องกับข้อมูลที่มีรายงานว่าความไวของยีน gag อย่างน้อย 5 copies/150,000 PBMCs ต่อปฏิกิริยา[33] อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยืนยันว่ายีนส่วน *gag* มีแนวโน้มให้ค่าความไวสูงกว่ายีนส่วน *pol* จากการศึกษาความไวในเลือดผู้ป่วยกลุ่ม Anti-HIV positive จำนวน 65 ราย พบว่าการตรวจหา HIV-1 proviral DNA ด้วยเทคนิค nested PCR ในตัวอย่างดีเอ็นเอสกัดจากชั้นเม็ดเลือดขาว หรือ PBMC นั้น ยีน *gag* จะมีความไวเท่ากับร้อยละ 100 สูงกว่ายีนส่วน *pol* ซึ่งมีความไวร้อยละ 96.7 สอดคล้องกับการศึกษาของ Sutthent R. และคณะ[23] ในขณะที่ตัวอย่าง ดีเอ็นเอที่สกัดจาก dried blood spot มีค่าความไวสำหรับยีน *gag* และ *pol* เท่ากับร้อยละ 87.7 และ 72.3 ตามลำดับ ต่ำกว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดรวม ซึ่งมีค่าความไวเท่ากับร้อยละ 90.8 และ 84.6 ตามลำดับ จากผลการศึกษาในเลือดผู้ป่วยกลุ่ม anti-HIV negative จำนวน 50 ราย ให้ค่าความจำเพาะสูงเท่ากับร้อยละ 100 ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่เคยมีผู้รายงาน[17,19,23,30,34] เมื่อพิจารณาผลการศึกษาถึงความไวของวิธี nested PCR จากตัวอย่างชั้นเม็ดเลือดขาว เลือดรวม และหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองโดยไพร์เมอร์จากยีนส่วน gag และ *pol* พบว่าไพร์เมอร์จากยีนส่วน *gag* จะมีความไวในการตรวจพบสูงกว่าไพร์เมอร์จากยีนส่วน *pol* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sutthent R. และคณะ[23] ที่มีความไวร้อยละ 100, 90.8 และ 87.7 เมื่อตรวจจากชั้นเม็ดเลือดขาว เลือดรวม และหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองตามลำดับ ในขณะที่เมื่อใช้ไพร์เมอร์จากยีนส่วน *pol* มีความไวร้อยละ 96.9, 84.6 และ 72.3 เมื่อตรวจจากชั้นเม็ดเลือดขาว เลือดรวม และหยดเลือดแห้งบนกระดาษตามลำดับ ผลชั้นเม็ดเลือดขาวให้ความไวสูงสุด เนื่องจากมีปริมาณของ mononuclear cell มากกว่าจึงมีปริมาณ viral copy สูงกว่าตัวอย่างเลือดรวม และหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองนั่นเอง นอกจากนี้ viral DNA อาจมีการสูญเสียไปบางส่วนจากขั้นตอนการสกัดจากกระดาษกรอง Whatman No. 5 ซึ่งจะต้องมีการย่อยกระดาษกรอง และโปรตีนด้วยน้ำยา phenol-chloroform ซึ่งหากกำจัดสารเหล่านี้ไม่หมดจะสามารถยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทำให้เกิดผลลบปลอมได้ ดังนั้นการตรวจที่สามารถเลือกตัวอย่างตรวจได้ควรใช้ ชั้นเม็ดเลือดขาว เป็นตัวอย่าง ซึ่งจะให้ความไวในการตรวจได้สูงสุดทั้งยีน *gag* และ *pol*

เมื่อนำข้อมูลการตรวจจากตัวอย่างรายเดียวกันที่ให้ผลบวกต่อการทำ nested PCR บนยีน *gag* หรือ *pol* อย่างใดอย่างหนึ่ง มาพิจารณาเพื่อคำนวณความไวพบว่า กรณีที่ตัวอย่างเลือดเป็น เลือดรวมจะมีความไวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 98.5 (ให้ผลบวกต่อยีน *gag* หรือ *pol* 64 ราย จาก 65 ราย) และการใช้หยดเลือดแห้งจะมีความไวเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 92.3 (ให้ผลบวกต่อยีน *gag* หรือ *pol* 60 ราย จาก 65 ราย) ดังนั้นการทำ nested PCR ทั้งยีน *gag* และ *pol* ร่วมกันในผู้ป่วยรายเดียวกัน จะสามารถให้ความไวในการตรวจเพิ่มขึ้น สามารถใช้เลือดรวม หรือหยดเลือดแห้งบนกระดาษกรองเป็นทางเลือกในการเก็บตัวอย่างตรวจในเด็กทารกที่เก็บเลือดยาก หรือกรณีต้องขนส่งตัวอย่างตรวจ เป็นต้น

HIV-1 proviral DNA ในตัวอย่างหยดเลือดแห้งสามารถตรวจพบได้หลังผ่านการเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือ 4 ºซ ได้นานอย่างน้อยถึง 24-30 เดือน[18,34] แต่เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส HIV จำเป็นต้องรายงานในระยะเวลาที่ไม่นานเกินไป เพื่อประโยชน์ของผู้ป่วยและป้องกันการแพร่เชื้อ การศึกษาความคงตัวของ HIV-1 proviral DNA ในหยดเลือดแห้งครั้งนี้ จึงได้ศึกษาการเก็บที่สภาพ 37 ºซ นาน 7 วันแล้วเก็บต่อที่ 4 ºซ นาน 1 เดือน เพื่อจำลองสภาวะการขนส่ง ผลการศึกษาพบว่า HIV-1 proviral DNA ในหยดเลือดแห้งจากตัวอย่างที่มีจำนวนไวรัสอย่างน้อย 10 copies สามารถคงตัวอยู่ได้ที่ 4 ºซ และอุณหภูมิห้องเป็นเวลานานอย่างน้อย 4 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง

รายเดียวกันที่นำมาสกัดดีเอ็นเอทันที พบว่าผลบวกในส่วนของยีน *gag* และ *pol* ใกล้เคียงกัน แต่มีความไวค่อนข้างต่ำคือร้อยละ 83.9 และ 87.1 ตามลำดับ สาเหตุที่ทำให้จำนวนผลลบปลอมสูงขึ้นน่าจะเกิดจากการสูญเสียดีเอ็นเอในขั้นตอนการสกัด เนื่องจากหยดเลือดที่ผ่านการเก็บไว้ที่ 37 ºซ นาน 7 วัน จะแห้งติดกระดาษกรองเกินไป จนไม่สามารถละลายออกได้หมด ขั้นตอนการย่อยด้วย proteinase K นาน 30 นาที ยังคงมีคราบเลือดบางส่วนเหลือติดอยู่บนกระดาษกรอง ซึ่งเมื่อได้เพิ่มเวลาให้นานขึ้นเป็น 1 ชั่วโมงพร้อมกับการเขย่าเบาๆ ตลอดเวลามีผลช่วยให้การย่อยคราบเลือดหลุดออกดียิ่งขึ้น ทำให้ผลลบปลอมน้อยลง ซึ่งสอดคล้องรายงานที่ระบุว่าหากเพิ่มเวลาในขั้นตอนการย่อยด้วย proteinase K เป็น 8 ชั่วโมงโดยไม่มีการเขย่าจะสกัด DNA ได้ร้อยละ 50 แต่หากเขย่าตลอดเวลาจะสกัด DNA ได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 75[18] มีรายงานการตรวจหา HIV-1 โดยเทคนิค PCR ในส่วนของยีน *gag* จากตัวอย่างเลือดแห้งบนกระดาษกรองชนิดพิเศษ (no.903; Schleicher & Schuell) เทียบกับผลการตรวจจาก PBMC มีความไวเท่ากับร้อยละ 96 และ 88 เมื่อทำการทดสอบซ้ำ 4 ครั้ง และ 2 ครั้ง ตามลำดับ[21] สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่ใช้หยดเลือดแห้งบนกระดาษกรอง Whatman No.5 ซึ่งทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ให้ผลความไวสำหรับยีน *gag* เมื่อตรวจวิเคราะห์ภายใน 1 วัน เป็นร้อยละ 87.7 และเมื่อเก็บไว้นาน 1 เดือน เป็นร้อยละ 83.9 ดังนั้นเพื่อเพิ่มความไวของวิธีโดยการเพิ่มจำนวนครั้งการตรวจมากกว่าหนึ่งครั้งจึงควรพิจารณาในตัวอย่างรายที่น่าสงสัย

การศึกษานี้ได้ใช้เทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่เพิ่มความไวการตรวจแต่มีโอกาสเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนเนื่องจาก carry over ได้ง่าย เทคนิคการทำแต่ละขั้นตอนต้องมีความระมัดระวังโดยมีตัวควบคุมผลลบ (negative control) ทำควบคู่แต่ละขั้นตอนทุกครั้งและปฏิบัติตามหลักข้อแนะนำการขยายชิ้นส่วนยีน เช่นการแยกอุปกรณ์และพื้นที่ส่วนการทำในแต่ละขั้นตอน การทำความสะอาดอุปกรณ์และพื้นที่ก่อนและหลังการทำ ตรวจการปนเปื้อนของ amplicon จากละอองฝอยตามเทคนิค sentinel ด้วยการใช้หลอดเปล่ามาเปิดฝาทิ้งไว้ในบริเวณต่างๆเมื่อครบเวลา 6 ชั่วโมงเติมน้ำลงไปในหลอดปริมาณเล็กน้อย จากนั้นนำน้ำดังกล่าวไปทำการทดสอบ[35] ซึ่งหากตรวจพบการปนเปื้อนจะขจัด amplicon ที่ตกค้างโดยการเช็ดด้วย 10% sodium hypochloride (Clorox)[36] รวมทั้งการใช้แสงยูวี[37,38] การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า Whatman No.5 สามารถใช้เก็บตัวอย่างสำหรับการตรวจ HIV-1 proviral DNA โดยวิธี Nested PCR ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัยทบวงมหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2540 และภายใต้การสนับสนุนบางส่วนจากทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)ร่วมกับทบวงมหาวิทยาลัยสัญญาเลขที่ MRG4680180 ขอขอบคุณ จันทนา กาลพัฒน์, สุรสิทธิ์ เตียงดัง, จริยา ภาโส, เยาวมาลย์ บริวงษ์, กาญจนา ศรีคำมี และ จงกลณี ธนาไสย์ ในฐานะผู้ช่วยวิจัยที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

1. กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. โรคเอดส์. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค 2549. 168-174.

2. Barusrux S, Urwijitaroon Y, Puapairoj C, Romphruk Am. 1997. Association of HCV and Treponema pallidum infection in HIV infected voluntary male blood donors. J Med Assoc Thai 80 (Suppl.1): S106-S111.

3. Urwijitaroon Y, Barusrux S, Romphruk Am, Puapairaj C, Thongkrajai P. 1997. Anti-HIV antibody titer: An alternative supplementary test for diagnosis of HIV-1 infection. Asian Pac J Allergy Immunol 15: 193-8.

4. Urwijitaroon Y, Barusrux S, Romphruk A, Puapairoj C, Pakote L. 1996. Reducing the risk of HIV transmission through blood transfusion by donor self-deferring. Southeast Asian J Trop Med Public Health 27: 452-5.

5. สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. 2539. การตรวจ anti-HIV จากน้ำในช่องปาก. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 8: 136-42.

6. สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ, อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, จินตนา พัวไพโรจน์, ประวี คำภีระ, อนงค์นาถ นพวิญญูวงศ์. 2541. การตรวจแอนติเอชไอวีจากน้ำลายแทนเลือด. วารสารเทคนิคการแพทย์ 26: 56-68.

7. สหพัฒน์ บรัศว์รักษ์, ยุพา เอื้อวิจิตรอรุณ. 2540. การวัดปริมาณไวรัสในผู้ติดเชื้อเอชไอวี. วารสารเทคนิคการแพทย์ 25: 109-30.

8. ไพจิตร์ วราชิต, สุธน วงษ์ชีรี, สุรางค์ สงวนวงศ์, นวลจันทร์ ฤชุศาศวัต, จินตรา อุ่นเอกลาภ. 2537. การตรวจ Proviral DNA ของเชื้อ HIV-1 โดยวิธี Nested PCR.วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 36: 11 -8.

9. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJL. 1990. Human immunodeficiency virus infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. J Virol 64: 864-72.

10. Ho DD, Moudgil T, Alam M. 1989 Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. N Engl J Med 321: 1621-5.

11. Bagasra O, Hauptman SP, Lischner HW, Sachs M, Pomerantz RJ. 1992. Detection of human immune-deficiency virus type I provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. N Eng J Med 326: 1385-91.

12. Albert J, Fenyo EM. 1990. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primer. J Clin Microbiol 28: 1560-4.

13. Garrick MD, Dembure BS, Guthrie R. 1973. Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies: procedures and strategy for screening and employing spots of blood on filter papers as specimens. N Engl J Med 288: 1256–68.

14. Farzadegan H, Quinn T, Polk BF. 1987. Detecting antibodies to human immunodeficiency virus in dried blood on filter paper. J Infect Dis 155: 1073–4.

15. Lindhardt BO, Bygbjerg C, Ulrich K, Petersen HD, Lausen I, Frederiksen B. 1987. Detection of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV) in eluates from whole blood impregnated filter paper discs. J Virol Methods 18: 73–7.

16. Cassol S, Salas T, Gill M, Montpetit M, Rudnik J, Sy C, *et al.* 1992. Stability of dried blood spot specimens for detection of human immunodeficiency virus DNA by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30: 3039–42.

17. Cassol S, Lapointe N, Salas T, Hankins C, Arella M, Fauvel M, *et al.* 1992. Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the polymerase chain reaction and dried blood spot specimens. J Acquir Immune Defic Syndr 5: 113-9.

18. Yourno J, Conroy J. 1992. A novel polymerase chain reaction method for detection of human immuno-deficiency virus in dried blood spots on filter paper. J Clin Microbiol 30: 2887-92.

19. Nyambi PN, Fransen K, De Beenhouwer H, Chomba EN, Temmerman M, Ndinya-Achola JO, *et al.* 1994. Detection of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) in heel prick blood on filter paper from children born to HIV-1- seropositive mothers. J Clin Microbiol 32: 2858-60.

20. Chanbancherd P, Brown AE, Trichavaroj R, Tienamporn P, Puthakird P, Limpairojn N, *et al*. 1999. Application of dried blood spot specimens for serologic subtyping of human imunodeficiency virus type 1 in Thailand. J Clin Microbiol 37: 804-6.

21. Panteleeff DD, John G, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Richardson B, Kreiss J, *et al*. 1999. Rapid method for screening dried blood samples on filter paper for human immunodeficiency virus type 1 DNA. J Clin Microbiol 37: 350–3.

22. Beck IA, Drennan KD, Melvin AJ, Mohan KM, Herz AM, Alarcón J, *et al*. 2001. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 subtype B DNA in dried blood samples for diagnosis in infants in the field. J Clin Microbiol 39: 29-33.

23. Sutthent R, Foongladda S, Likanonskul S, Tun-supasawasdeekul S, Roongpisuthipong A, Chearskul S, *et al*. 1996. Detection of HIV-1 proviral DNA by polymer-ase chain reaction: A preliminary study in Bangkok. J Med Assoc Thai 79: 142-8.

24. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, *et al*. 1988. DNA amplification for direct detection of HIV–I in DNA of peripheral blood mono-nuclear cells. Science 239: 295-7.

25. Bein G, Glasor R, Kirchner H. 1992. Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification 39: 68-13.

26. Evengard B, Ehrnst A, von Sydow M, Pehrson PO, Lundbergh P, Linder E. 1989. Effect of heat on extracted HIV viral infectivity and antibody activity using the filter paper technique of blood sampling. AIDS 3: 591–5.

27. Cassol S, Salas T, Arella M, Neumann P, Schechter M, O'Shaughnessy M. 1991. Use of dried blood spot specimens in the detection of human immunodeficiency virus type 1 by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 29: 667–71.

28. Kunisada T, Ando S, Saito K, Eshita Y, Röder W, Kruse M, *et al*. 1994. Detection of human immuno-deficiency virus type-1 nucleic acid on inactivated filter paper disks by polymerase chain reaction and microtiter plate assay. Microbiol Immunol 38: 649–54.

29. Cassol S, Weniger BG, Babu PG, Salminen MO, Zheng X, Htoon MT, *et al*. 1996. Detection of HIV type 1 *env* subtypes A, B, C, and E in Asia using dried blood spots: a new surveillance tool for molecular epidemio-logy. AIDS Res Hum Retrovir 12: 1435–41.

30. Comeau AM, Pitt J, Hillyer GV, Landesman S, Bremer J, Chang BH, *et al*. 1996. Early detection of human immunodeficiency virus on dried blood spot

specimens: sensitivity across serial specimens. Women and Infants Transmission Study Group.J Pediatr 129: 111–8.

31. Biggar RJ, Miley W, Miotti P, Taha TE, Butcher A, Spadoro J, *et al*. 1997. Blood collection on filter paper: a practical approach to sample collection for studies of perinatal HIV transmission. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 14: 368-73.

32. Spielberg F, Critchlow C, Vittinghoff E, Coletti AS, Sheppard H, Mayer KH, *et al*. 2000. Home collection for frequent HIV testing: acceptability of oral fluids, dried blood spots and telephone results. HIV Early Detection Study Group. AIDS 14: 1819-28.

33. Farzadegan H, Vlahov D, Solomon L, Munoz A, Astemborski J, Taylor E, *et al*. 1993. Detection of human immunodeficiency virus type I infection by polymerase chain reaction in a cohort of seronegative intravenous drug users. J Infect Dis 168: 327-31.

34. Cassol S, Butcher A, Kinard S, Spadoro J, Sy T, Lapointe N, *et al*. 1994. Rapid screening for early detection of mother-to-child transmission of human immunodiciency virus type 1. J Clin Microbiol 32: 2641-5.

35. Saksena NK, Dwyer D, Barré-Sinoussi F. 1991. A "sentinel" technique for monitoring viral aerosol contamination. J Infect Dis 164: 1021-2.

36. Prince AM, Andrus L. 1992. PCR: how to kill unwanted DNA. Biotechniques 12: 358-60.

37. Ou CY, Moore JL, Schochetman G. 1991. Use of UV irradiation to reduce false positivity in polymerase chain reaction. Biotechniques 10: 442-6.

38. Sarkar G, Sommer S. 1990. More light on PCR contamination. Nature 347: 340 -1.

HIV-1 PROVIRAL DNA DETECTION FROM DRIED BLOOD SPOT COMPARE TO BUFFY COAT AND WHOLE BLOOD SAMPLES

***Sahapat Barusrux*[1,2,*] *Patcharee Jearanaikoon*[1,2] *Yupa Urwijitaroon*[1,2] *Chatchawan Sengthong*[1]**
***Daungrat Orataiwan*[1] *Jaruwan Ruangsiripiyakul*[3]**

[1]*Faculty of Associated Medical Sciences* [2]*The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University* [3]*Sirindhorn Hospital, Khon Kaen*

ABSTRACT: Detection of HIV-1 proviral DNA by Nested PCR is highly sensitive and specific technique. Dried blood spot on filter paper is an alternative to reduce large amount sample collection and can be easily transferred by ordinary post. This study aim to apply nested PCR technique in buffy coat, whole blood and dried blood spot samples on Whatman No.5 filter paper for HIV-1 proviral DNA detection. Minimal viral copies presented in PCR reaction, sensitivity, specificity and HIV proviral DNA stability on filter paper were investigated. The result showed that only 10 copies of recombinant standard HIV DNA can be detected by Nested PCR on *gag* or *pol gene* in dried blood spot samples. Sensitivity testing in 65 cases of anti-HIV positive shows that; *gag*/*pol* gene were 100% (65/65 cases)/96.9% (63/65 cases) in buffy coat extracted DNA samples, were 90.8 % (59/65 cases)/ 84.6 %(55/65 cases) in whole blood extracted DNA samples, were 87.7 % (57/65 cases)/72.3 % (47/65 cases) in dried blood spot extracted DNA samples, while specificity on *gag/pol gene* were 100 % for all DNA extractions. In conclusion, dried blood spot on filter paper (Whatman No.5) can use for HIV infection screening. The sensitivity of nested PCR on *gag* gene is higher than *pol* gene. HIV proviral DNA on dried blood spot is stable more than 4 weeks at either 4 ºC or room temperature storage. The transportation and storage condition was false negative affected to *gag/pol* gene in 16.1% (5/31 cases)/12.9% (4/27 cases), respectively.

Keywords: HIV-1 proviral DNA, PCR, dried blood spot

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: sahapat@kku.ac.th, dr_sahapat@yahoo.com