

Development of HIV-1 Dried Tube Specimen Prototype as Quality Control Samples for HIV Viral Load Testing

Supaporn Suparak*, Kanokwan Ngueanchanthong, Busarawan Sriwanthana and Ballung Upapong

Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province, Thailand

Abstract

HIV viral load is an important parameter in monitoring effectiveness of antiretroviral therapy for HIV-infected individuals. Quality control (QC) for HIV viral load testing is essential to achieve accuracy and precision of the assay. Currently, QC sample is in a form of liquid preparation (plasma) from HIV infected specimen that requires cold-chain condition for storage and transportation. To circumvent the usage of a cold-chain dependent system, a QC sample using dried tube sample (DTS) that can be shipped and stored at ambient temperature was developed and evaluated. A laboratory strain of HIV-1 NP1525 was propagated co-cultured with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), measured for HIV RNA, aliquoted and air-dried at room temperature for 18 - 24 hours. No significant difference of HIV viral load was observed between DTS and culture fluid specimen at the same concentration ($P \geq 0.05$, t test). The stability of DTS was tested and found stable at -70°C , 4°C , and 45°C for at least 8 weeks. The study suggested that DTS quality control sample could be used as a routine quality control for HIV viral load testing and for external quality assessment program, thus supporting the 95-95-95 target to end the AIDS epidemic by the year 2030.

Keywords: HIV viral load, Dried tube sample, Quality control sample, Proficiency testing

*Corresponding author E-mail address: supaporn.su@dmsc.mail.go.th

Received: 3 February 2021

Revised: 10 March 2021

Accepted: 30 March 2021

การพัฒนาต้นแบบตัวอย่างเชื้อเอชไอวี-1 ในสภาพแห้งบนหลอด สำหรับสอบเทียบการตรวจหาปริมาณ เชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด

สุภาพร สุภารักษ์* กนกวรรณ เจื่อนจันทร์ทอง บุษราวรรณ ศรีวรรณะ และ บัลลังก์ อุปพงษ์

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

บทคัดย่อ

การตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดของผู้ติดเชื้อ (HIV viral load testing) มีความสำคัญมากในการประเมินติดตามผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัส การควบคุมคุณภาพการตรวจจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้ผลทดสอบที่ถูกต้อง ปัจจุบันตัวอย่างสอบเทียบสำหรับตรวจวัดปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดมาจากพลาสมาผู้ติดเชื้อ ซึ่งมีข้อจำกัดในการปฏิบัติงาน เพราะต้องเก็บรักษาและขนส่งในสภาพแช่แข็งที่อุณหภูมิ ≤ -20 องศาเซลเซียส ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาต้นแบบตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (dried tube sample, DTS) เพื่อช่วยลดปัญหาลำบากขั้นตอนการปฏิบัติงาน ลดปัญหาการขนส่งตัวอย่างติดเชื้อ และการจัดเก็บโดยไม่ต้องพึ่งอุณหภูมิความเย็น (cold-chain) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อเอชไอวี-1 สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ (HIV-1 NP1525) ด้วยเทคนิคเพาะเลี้ยงไวรัสร่วมกับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (co-cultivation technique) หลังจากแบ่งบรรจุแล้วปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 18 - 24 ชั่วโมง ผลทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ที่พัฒนาขึ้นเทียบกับตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture fluid) ที่ความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าปริมาณ HIV-1 RNA ไม่มีความแตกต่างกันและมีความคงตัวที่อุณหภูมิ -70, 4 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์ ($P \geq 0.05$, t test) แสดงว่าตัวอย่างสอบเทียบที่พัฒนาขึ้น สามารถนำไปใช้เป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับตรวจปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดได้ และยังสามารถนำไปสู่การพัฒนาเพื่อเป็นตัวอย่างสอบเทียบสำหรับแผนทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการ และเป็นการสนับสนุนเป้าหมาย 95-95-95 เพื่อรักษาเอชไอวีและยุติปัญหาเอดส์ภายในปี พ.ศ. 2573

คำสำคัญ: เอชไอวีในกระแสเลือด ตัวอย่างเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด ตัวอย่างสอบเทียบ แผนประเมินความชำนาญ

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: supaporn.su@dmsc.mail.go.th

รับบทความ: 3 กุมภาพันธ์ 2564

แก้ไขบทความ: 10 มีนาคม 2564

รับตีพิมพ์บทความ: 30 มีนาคม 2564

บทนำ

จากเป้าหมายหลักและวิสัยทัศน์ “มุ่งสู่เป้าหมายที่เป็นศูนย์” (Getting to Zero) ของยุทธศาสตร์ป้องกันและแก้ไขปัญหายาเอดส์ตามนโยบายระดับชาติและนานาชาติ ที่มีเป้าหมายหลักคือไม่มีผู้ติดเชื้อรายใหม่ ไม่มีการตายเนื่องจากเอดส์ และไม่มีการตีตราและเลือกปฏิบัติ ประเทศไทยได้กำหนดยุทธศาสตร์แห่งชาติว่าด้วยการยุติปัญหาเอดส์ พ.ศ. 2560 - 2573 เพื่อให้สามารถยุติปัญหาเอดส์ได้ภายในปี พ.ศ. 2573 ซึ่งได้กำหนดยุทธศาสตร์สำหรับพัฒนาและเร่งรัดการรักษา ดูแล และช่วยเหลือทางสังคมให้มีคุณภาพ รอบด้าน และยั่งยืน โดยมีวัตถุประสงค์คือผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้รับการวินิจฉัย ได้รับการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวี และควบคุมไวรัสสำเร็จตามเป้าหมายร้อยละ 90-90-90 ภายในปี พ.ศ. 2563 และร้อยละ 95-95-95 ภายในปีพ.ศ. 2573^(1, 2) รายงานความก้าวหน้ายุติปัญหาเอดส์ประเทศไทย การดำเนินงานตั้งแต่ปี พ.ศ. 2558 - 2562 พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวีได้รับการวินิจฉัย รู้สถานภาพการติดเชื้อของตนเองบรรลุเกินเป้าหมายที่ตั้งไว้ ได้ค่าร้อยละเพิ่มขึ้นและเกินร้อยละ 90 ที่ตั้งไว้ แต่ผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยการติดเชื้อแล้ว และกำลังรับการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวีมีค่าร้อยละ 74.1 - 79.9 และผู้ที่รับยาต้านเอชไอวีที่สามารถกดปริมาณไวรัสสำเร็จมีเพียงร้อยละ 77 ซึ่งยังไม่บรรลุตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ โดยสองเป้าหมายสุดท้ายขึ้นกับการวัดและติดตามปริมาณไวรัสเอชไอวีอย่างมีประสิทธิภาพ⁽³⁾ การตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือด (HIV viral load) มีความสำคัญมากในการทำนายการพยากรณ์โรค ใช้ติดตามผลการรักษาด้วยยาต้านไวรัสต่าง ๆ เพื่อประเมินผลและวินิจฉัยการรักษา และลดอัตราการตายเนื่องจากเอดส์^(4, 5) ดังนั้นผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ จึงเป็นสิ่งสำคัญมากที่ควรตระหนักถึงตัวอย่างสอบเทียบสำหรับควบคุมคุณภาพ (quality

control sample) จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการควบคุมคุณภาพการทดสอบเพื่อประกันคุณภาพผลทดสอบที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด^(6 - 8)

ปัจจุบันโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการการตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดแห่งชาติ (National External Quality Assessment for HIV Viral Load Testing) โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้ประเมินและพัฒนาคุณภาพการตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดให้กับห้องปฏิบัติการทั่วประเทศที่เข้าร่วมประเมินคุณภาพทดสอบความชำนาญ (proficiency testing) โดยจัดส่งตัวอย่างสอบเทียบสำหรับตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดในรูปแบบตัวอย่างพลาสมาแบบเหลวในสภาพแช่แข็ง (≤ -20 องศาเซลเซียส) ซึ่งถือเป็นตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด แต่ข้อจำกัดของตัวอย่างของเหลวพลาสมา คือต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็งจึงจะสามารถรักษาความคงตัว (stability) ของปริมาณเชื้อเอชไอวีได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาและขนส่งมากขึ้น และการใช้ตัวอย่างสอบเทียบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่เหมาะสมจะส่งผลกระทบต่อผลการตรวจวิเคราะห์

การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (dried tube sample, DTS) สำหรับตรวจปริมาณไวรัสในกระแสเลือดผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV viral load) เพื่อเป็นต้นแบบวิธีเตรียมตัวอย่างสอบเทียบสำหรับประเมินการปฏิบัติงานด้านการตรวจหาปริมาณไวรัสในกระแสเลือดด้วยการวัด HIV-1 RNA ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-1) ในห้องปฏิบัติการชีวনিরภัยระดับ 3 (biosafety

level 3, BSL 3)

นำเชื้อ HIV-1 สายพันธุ์ NP1525 (NIH AIDS Reagent Program, Germantown, Maryland) มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี co-cultivation technique ร่วมกับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) เพื่อเพิ่มจำนวน⁽⁹⁾ และตรวจหาไวรัสโดยเก็บน้ำเลี้ยงเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (culture fluid) ทุกๆ 3 วัน นำมากรองด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) เพื่อตรวจวัดปริมาณ viral load และเก็บรักษาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปทดสอบต่อไปในข้อ 2

2. การเตรียมตัวอย่างสอบเทียบเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-1)

2.1 การตรวจหาปริมาณ HIV viral load

นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-1) ที่เก็บจากข้อ 1 มาตรวจวัดปริมาณ viral load ด้วยชุดทดสอบ COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 For Use With The High Pure System (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) ตามคำแนะนำของชุดตรวจ โดยสกัดสารพันธุกรรม RNA ด้วยระบบ manual high pure system และตรวจวัดด้วยเทคนิค real time polymerase chain reaction (real time PCR) โดยเครื่องมืออัตโนมัติ COBAS® TaqMan® 48 Analyzer เพื่อเพิ่มปริมาณ และตรวจหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ด้วย probe (ชนิด TaqMan probe) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง

2.2 การเตรียมตัวอย่างสอบเทียบจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำเลี้ยงเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-1) จากข้อ 2.1 มาปรับให้ได้ความเข้มข้นของ HIV-1 RNA ตั้งแต่ 10^3 ถึง 10^7 ก๊อบปี่ต่อมิลลิลิตร

(copies/mL) โดยเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) โดยทำ 3 ซ้ำต่อการทดสอบ และตรวจหาปริมาณ HIV-1 viral load ในแต่ละความเข้มข้น โดยไม่ผ่านการทำลายเชื้อด้วยอุณหภูมิสูง (heat inactivation) ก่อนทดสอบเพราะต้องการรักษาความคงสภาพของสารพันธุกรรม RNA

2.3 การเตรียมตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS)

นำน้ำเลี้ยงเชื้อไวรัสเอชไอวี-1 (HIV-1) ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากข้อ 2.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเติมลงใน Sarstedt SC Micro Tube (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) ขนาด 20 มิลลิลิตร ปลอ่ยให้แห้งโดยเปิดฝาทอดตั้งไว้ในตู้ชีวนิรภัย (biological safety cabinet) ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน ครบเวลานำตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ที่ได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิทดสอบต่างๆ กัน⁽¹³⁾ ก่อนนำไปตรวจหาปริมาณ HIV-1 RNA ละลายตัวอย่างด้วย 200 ไมโครลิตรสารละลายบัฟเฟอร์ PBS เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4, ที่มี Tween (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) เข้มข้นร้อยละ 0.05 และ green dye (food color, Kroger band) เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์เพิ่มอีก 300 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรเพียงพอ ตามคำแนะนำของชุดทดสอบ COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

3. การทดสอบประสิทธิภาพตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS)

3.1 การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณ HIV-1 RNA

นำตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ที่ได้พัฒนาขึ้นที่ความเข้มข้นต่างๆ

กับตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้เก็บรักษาที่ 5 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ -70, 4, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์ มาตรวจวัดปริมาณ HIV-1 RNA ทุกสัปดาห์

3.2 การทดสอบความคงทนของปริมาณ HIV-1 RNA

นำตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ที่เก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (freezing-thawing) ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพความคงทนที่อุณหภูมิ 37, 45, และ 60 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณ HIV-1 RNA

ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณ HIV-1 RNA ของตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) กับตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นระดับเดียวกันคือ 10^3 และ 10^7 ก๊อบปี่ต่อมิลลิลิตร โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70, 4, 37, 45, และ 60 องศาเซลเซียส ทดสอบซ้ำสามครั้งแบบ intra-assay และวิเคราะห์สถิติ t-test ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel โดย $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และวิเคราะห์ความคงทนตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) เมื่อเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส และถูกละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นจำนวนแปดรอบก่อนทดสอบ

ผลการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS)

ตัวอย่างเชื้อไวรัสจากน้ำเพาะเลี้ยงเชื้อได้ HIV-1 RNA ความเข้มข้นประมาณ 3×10^8 ก๊อบปี่ต่อมิลลิลิตร ใช้เวลา 12 - 14 วัน นำมาปรับให้ได้

ความเข้มข้นระหว่าง 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 และ 10^7 ก๊อบปี่ต่อมิลลิลิตร หลังจากเตรียมเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) แล้ว นำมาละลายในบัฟเฟอร์ PBS เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่มี Kroger food dye เข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยสารละลายบัฟเฟอร์ไม่ได้รับกวนหรือมีผลต่อการทดสอบ และ สีที่นำมาละลายช่วยให้สามารถมองเห็นตัวอย่างและการละลายได้ชัดเจนมากขึ้น หากพบว่าการละลายยังไม่สมบูรณ์ ให้วางที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที และสามารถใช้ vortex ร่วมด้วย

2. การทดสอบเปรียบเทียบปริมาณ HIV-1 RNA ในตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) กับตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

ผลเปรียบเทียบปริมาณ HIV-1 RNA ความเข้มข้น 10^3 และ 10^7 ก๊อบปี่ต่อมิลลิลิตร ของตัวอย่างเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) และตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70, 4 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าค่าเฉลี่ยของสัปดาห์ที่ 8 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \geq 0.05$, t test) (Table 1) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่อุณหภูมิ 37 และ 60 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบประสิทธิภาพความคงตัวของตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS)

ผลการเก็บรักษาตัวอย่างเชื้อไวรัสในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ที่ระดับความเข้มข้น HIV-1 RNA ตั้งแต่ 10^3 ถึง 10^7 ก๊อบปี่ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส และตรวจวัดปริมาณ HIV-1 RNA ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าตัวอย่างในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) มีความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์ (Fig. 1) ผลทดสอบความคงทน

Table 1 Comparison of HIV-1 viral load (10^3 and 10^7 Log₁₀ RNA copies/mL) at -70°C, 4°C, 37°C, 45°C, and 60°C over 8 weeks between dried tube sample (DTS) and culture fluid (Liquid)

Result of HIV viral load (mean ± SD, copies/mL)															
Log ₁₀ HIV viral load	at -70 °C			at 4 °C			at 37 °C			at 45 °C			at 60 °C		
	DTS	Liquid	P	DTS	Liquid	P	DTS	Liquid	P	DTS	Liquid	P	DTS	Liquid	P
(range,copies/mL)															
10 ³ (1.00 - 3.00)	2.15 ± 0.14	2.36 ± 0.15	0.157	2.26 ± 0.13	2.35 ± 0.09	0.364	2.18 ± 0.11	2.56 ± 0.12	0.015*	2.45 ± 0.13	2.62 ± 0.13	0.193	1.83 ± 0.15	1.43 ± 0.91	0.015*
10 ⁷ (4.00 - 7.00)	6.91 ± 0.10	6.97 ± 0.61	0.357	6.81 ± 0.11	6.84 ± 0.90	0.861	5.83 ± 0.10	6.92 ± 0.10	0.0001*	5.53 ± 0.12	5.33 ± 0.10	0.072	5.34 ± 0.71	3.20 ± 0.10	0.00001*

All experiments were performed in triplicate and expressed as the mean ± standard deviation.

*P < 0.05, t-test

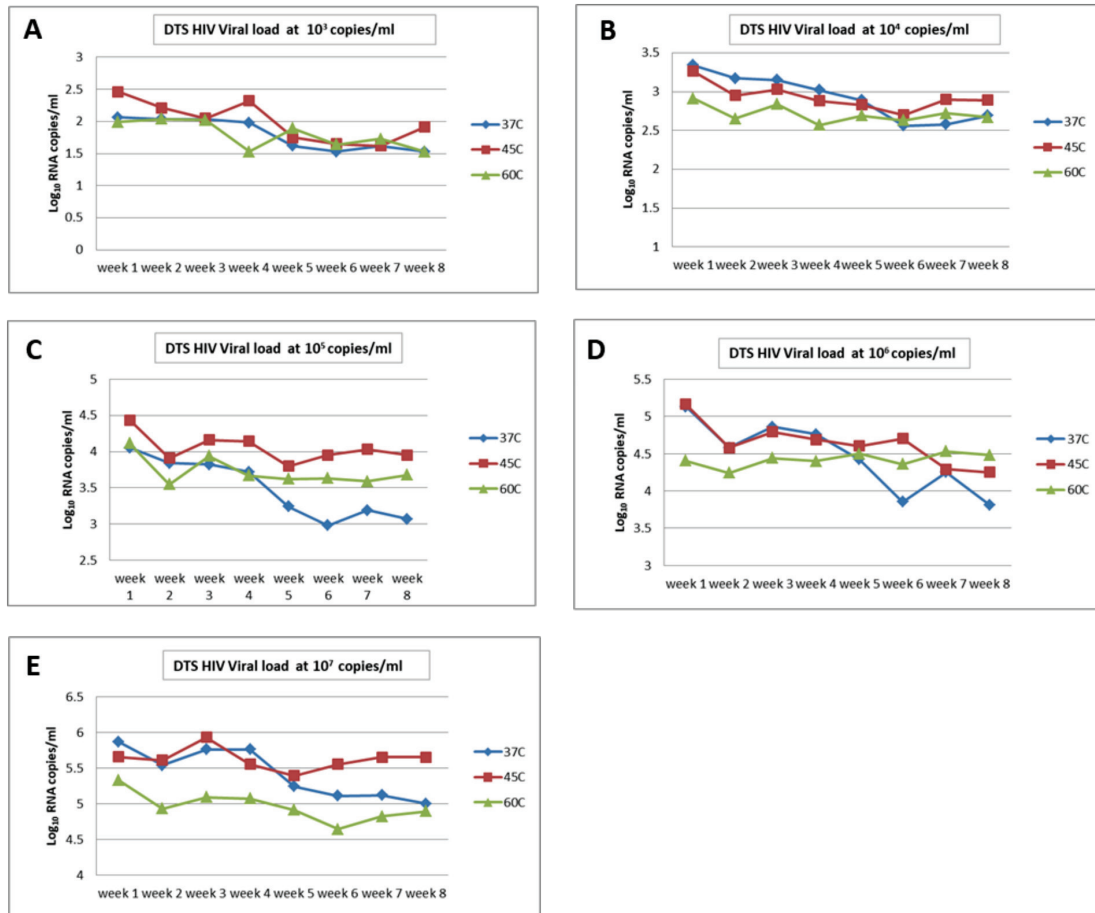


Fig. 1 Stability of DTS HIV viral load starting from 10^3 (A), 10^4 (B), 10^5 (C), 10^6 (D) and 10^7 (E) Log_{10} RNA (copies/mL) at 37°C , 45°C , and 60°C over 8 weeks.

ตัวอย่างเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) เมื่อเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งและถูกละลาย (freezing-thawing) ที่อุณหภูมิระหว่าง -70 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าตัวอย่างมีความคงทน โดยการถูกแช่แข็งและทำให้ละลายอย่างน้อย 8 รอบ ไม่ทำให้ปริมาณ HIV-1 RNA ลดลง (ไม่ได้แสดงผล)

วิจารณ์

การตรวจวัดปริมาณไวรัสเอชไอวีในกระแสเลือดมีความสำคัญมากในการประเมินผลและวินิจฉัยการรักษาการติดเชื้อเอชไอวี/เอดส์ ดังนั้นผลการตรวจ

วินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องน่าเชื่อถือจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ตัวอย่างสอบเทียบสำหรับควบคุมคุณภาพ (quality control sample) จึงเป็นเครื่องมือสำคัญในการควบคุมคุณภาพการทดสอบเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือมากที่สุด⁽⁶⁾ ปัจจุบันในประเทศไทย ตัวอย่างควบคุมคุณภาพสำหรับตรวจวัดปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดเป็นแบบซีรัมเหลวหรือพลาสมา ไม่สะดวกในการขนส่งไปยังโรงพยาบาลชุมชนต่างๆ เนื่องจากการรักษาสภาพไวรัส HIV-RNA ต้องเก็บที่อุณหภูมิแช่แข็งจึงจะสามารถรักษาความคงตัวได้ ทำให้ต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายใน

การขนส่งและเก็บรักษา ส่งผลให้การใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่เก็บรักษาไม่เหมาะสมทำให้ผลการทดสอบไม่น่าเชื่อถือ องค์การอนามัยโลกได้สนับสนุนให้มีการประยุกต์ใช้ตัวอย่างกระดาษซับเลือดแห้ง (dried blood spot, DBS) หรือกระดาษซับพลาสมาแห้ง (dried plasma spot, DPS) เพื่อใช้ตรวจปริมาณไวรัส^(10, 11) โดยมีค่าเกณฑ์การตรวจที่ระดับ 1,000 ก๊อบปีต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจติดตามและรักษาผู้ป่วยเอชไอวีเอดส์ ว่าสามารถกดปริมาณไวรัสได้สำเร็จในกรณีได้ค่าน้อยกว่า 1,000 ก๊อบปีต่อมิลลิลิตร และไม่สามารถควบคุมปริมาณไวรัสได้ในกรณีได้ค่ามากกว่า 1,000 ก๊อบปีต่อมิลลิลิตร

ในปี พ.ศ. 2553 ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคสหรัฐฯ (Centers for Disease Control and Prevention) ได้รายงานการใช้ตัวอย่างเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) สำหรับโปรแกรมทดสอบความชำนาญและควบคุมคุณภาพการตรวจเอชไอวีทางซีโรโลยีวิทยา⁽¹²⁾ และในปี พ.ศ. 2555 ได้รายงานการพัฒนาตัวอย่างในสภาพแห้งสำหรับตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวี⁽¹³⁾ และได้นำไปใช้เป็นตัวอย่างสำหรับทดสอบความชำนาญได้อย่างมีประสิทธิภาพ⁽¹⁴⁾ นอกจากนี้สถาบัน National Serology Reference Laboratory (NRL) ประเทศออสเตรเลีย ได้พัฒนาตัวอย่างควบคุมคุณภาพในสภาพแห้งบนหลอด (DTS)⁽¹⁵⁾ เพื่อใช้ในการตรวจปริมาณไวรัส HIV RNA สำหรับทดสอบความชำนาญและควบคุมคุณภาพการตรวจ โดยตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งไม่จัดอยู่ในประเภทตัวอย่างติดเชื้ออันตรายร้ายแรง แต่จัดอยู่ในประเภท biological substances category B, UN 3373 ทำให้สามารถลดขั้นตอนการขออนุญาตนำเข้าและขนส่งเชื้ออันตรายตามมาตรฐานการขนส่ง เพิ่มความสะดวกและปลอดภัยแม้การขนส่งทางอากาศ ทำให้สามารถขนส่งตัวอย่างในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ไปยังประเทศกำลังพัฒนาและห่าง

ไกล (low middle income countries) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับประเทศไทย ได้มีรายงานการศึกษาวิจัยเตรียมตัวอย่างแบบแห้งบนกระดาษกรอง (dried blood spot, DBS) ในการศึกษาหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในทารกแรกคลอดที่เกิดจากการติดเชื้อ⁽¹⁶⁾ แต่ปัจจุบันยังไม่มีมีการประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาวิจัยนี้ได้ผลิตต้นแบบวิธีเตรียมตัวอย่างสอบเทียบในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) เพื่อใช้ตรวจปริมาณไวรัส ซึ่งมีความคงตัว ที่อุณหภูมิ -70, 4 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์ เนื่องจากงานวิจัยนี้ทำในระดับหลอดทดลองในห้องปฏิบัติการจึงพบความแปรปรวนของการทดสอบ ผลตรวจวัดระดับ HIV-1 RNA จึงอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ทั้งจากสาเหตุขั้นตอนการละลายตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ หรือขั้นตอนการทำเชื้อสภาพแห้งบนหลอดปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม การควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ และขั้นตอนการละลายตัวอย่างในสภาพแห้งให้สมบูรณ์ก่อนการทดสอบ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณไวรัสมีค่าต่ำและค่าสูงไม่สอดคล้องกันที่อุณหภูมิต่าง ๆ ทำให้ตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 10^5 ก๊อบปีต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจพบ HIV-1 RNA ลดลง ในสัปดาห์ที่ 5-8 แต่ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส HIV-1 RNA ไม่ลดลง (Fig. 1) และอาจเป็นสาเหตุทำให้ตัวอย่างเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ไม่มีความคงทนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่มีความคงทนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Table 1) อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณ HIV-1 RNA ไม่แตกต่างระหว่าง DTS และน้ำเลี้ยงเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ -70 และ 4 องศาเซลเซียส แสดงว่าสามารถนำส่งหรือเก็บรักษาตัวอย่าง DTS ที่อุณหภูมิ -70 และ 4 องศาเซลเซียส ได้ จากการวิจัยนี้ จึงควรศึกษาต่อยอดในระดับความ

เข้มข้น viral load $10^3 - 10^5$ ก้อนปืต่อมิลลิลิตร และนำส่งที่ 4 องค์การเซเชส ก่อนนำตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้งไปใช้ในห้องปฏิบัติการจริง เพื่อศึกษานำร่องการใช้ตัวอย่างในโรงพยาบาลภาคสนามสำหรับทดสอบและประเมินประสิทธิภาพการใช้งานจริง ให้สามารถเตรียมความพร้อมทางห้องปฏิบัติการทั้งในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 การเตรียมตัวอย่างสอบเทียบเชื้อในสภาพแห้ง วิธีการละลายตัวอย่าง และการทดสอบที่ถูกต้อง เพื่อศึกษาและป้องกันปัญหาและอุปสรรคก่อนการนำไปใช้งานจริงให้สามารถควบคุมคุณภาพการตรวจปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดได้อย่างถูกต้อง เพิ่มประสิทธิภาพห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลชุมชนหรือเทียบเท่า และช่วยแก้ปัญหาตัวอย่างเชื้อเป็นแบบของเหลวที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ลดปัญหาด้านการเก็บรักษาและขนส่ง ลดค่าใช้จ่ายและลดการนำเข้าตัวอย่างควบคุมคุณภาพจากต่างประเทศ และอาจนำไปสู่การจัดทำโครงการทดสอบความชำนาญห้องปฏิบัติการตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือดโดยใช้ตัวอย่างเชื้อสภาพแห้งในอนาคต ช่วยให้การตรวจวัดปริมาณไวรัสเอชไอวีของห้องปฏิบัติการ มีการประกันคุณภาพอันจะส่งผลต่อความถูกต้องเชื่อถือได้ ส่งเสริมความครอบคลุมในการตรวจปริมาณไวรัสเอชไอวีให้สำเร็จได้ตามเป้าหมาย 95-95-95 ในปี พ.ศ. 2573 นำไปสู่การติดตามผลการรักษาที่ถูกต้อง ลดอัตราการตายและยุติเอดส์ของประเทศไทยต่อไป

สรุป

ต้นแบบวิธีเตรียมตัวอย่างเชื้อในสภาพแห้งบนหลอด (DTS) ที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในกระแสเลือด สามารถนำมาใช้เป็นตัวอย่างสอบเทียบในโครงการประเมินการตรวจทางห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจติดตามการรักษาเอชไอวี/เอดส์ของโรงพยาบาล การทดสอบควบคุม

คุณภาพจากองค์การภายนอกจะส่งผลต่อความถูกต้องเชื่อถือได้ และลดการนำเข้าตัวอย่างสอบเทียบจากต่างประเทศ ลดค่าใช้จ่ายในการขนส่งและเก็บรักษา ทำให้คุณภาพของตัวอย่างมีประสิทธิภาพเหมาะสมอันจะส่งผลต่อความถูกต้อง เชื่อถือได้ของห้องปฏิบัติการทดสอบ เพื่อสนับสนุนเป้าหมาย 95-95-95 เพื่อรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและการยุติปัญหาเอดส์ภายใน ปี พ.ศ. 2573

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณสำหรับการศึกษาวิจัยจาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และความร่วมมือวิจัยจาก ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข

เอกสารอ้างอิง

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2014. 90-90-90 an ambitious treatment target to help end the aids epidemic. Switzerland
2. Granich R, Gupta S, Hall I, *et al.* Status and methodology of publicly available national HIV care continua and 90-90-90 targets: A systematic review. PLoS Med 2017; 14: e1002253.
3. World Health Organization, 2014. Global update on the health sector response to HIV. WHO, Geneva, Switzerland.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for laboratory test result reporting of human immunodeficiency virus type 1 ribonucleic acid determination. Recommendations from a CDC working group. MMWR Recomm Rep 2001; 50: 1-12.

5. Gunthard HF, Aberg JA, Eron JJ, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 2014; 312: 410-25.
6. World Health Organization, 2016. WHO manual for organizing a national external quality assessment programme for health laboratories and other testing sites. WHO Press, France.
7. Dimech W, Vincini G, Karakaltsas M. Determination of quality control limits for serological infectious disease testing using historical data. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53: 329-36.
8. Dimech W, Karakaltsas M, Vincini GA. Comparison of four methods of establishing control limits for monitoring quality controls in infectious disease serology testing. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 1970-8.
9. Dezzutti CS, James VN, Ramos A, *et al.* *In vitro* comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3834-44.
10. World Health Organization, 2013. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. WHO, Geneva, Switzerland.
11. World Health Organization, 2019 Update of recommendations on first- and second-line antiretroviral regimens. WHO, Geneva, Switzerland.
12. Parekh BS, Anyanwu J, Patel H, *et al.* Dried tube specimens: a simple and cost-effective method for preparation of HIV proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings. *J Virol Methods* 2010; 163: 295-300.
13. Ramos A, Nguyen S, Garcia A, *et al.* Generation of dried tube specimen for HIV-1 viral load proficiency test panels: a cost-effective alternative for external quality assessment programs. *J Virol Methods* 2013; 188: 1-5.
14. Nguyen S, Ramos A, Chang J, *et al.* Monitoring the quality of HIV-1 viral load testing through a proficiency testing program using dried tube specimens in resource-limited settings. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 1129-36.
15. Dimech W, Vincini G, Davies K, *et al.* Validation of dried tube sample format quality controls for the monitoring of viral load and blood screening assays. *J Virol Methods* 2020; 285: 113957.
16. Uttayamakul S, Likanonsakul S, Sunthornkachit R, *et al.* Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. *J Virol Methods* 2005; 128: 128-34.