Original Article *นิพนธ์ต้นฉบับ*

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี- 1วิธีพีซีอาร์ระหว่างชุดน้ำยาผลิตใช้เองชนิด Multiplex PCR กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Amplicor HIV-1 Test

หรรษา ไทยศรี
พงษ์นุวัฒน์ ศรีงาม
อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์
รัชณีกร ใจซื่อ
สุธน วงษ์ชีรี
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ ระหว่างเดือนธันวาคม ๒๕๔๖ ถึงกรกฎาคม ๒๕๔๗ คณะผู้วิจัยได้รวบรวมตัวอย่างเลือด ๒๕๕ ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างติดเชื้อเอชไอวี ๒๑ ตัวอย่าง ไม่ติดเชื้อเอชไอวี ๒๓๔ ตัวอย่าง โดยเก็บจากทารกที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อเอชไอวี ๓๕ ราย บุคคลผู้มีปัจจัยเสี่ยงขอรับการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี ๔๐ ราย และผู้บริจาคเลือด ๑๘๐ ราย เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อเอชไอวี ระดับห้องปฏิบัติการด้วยชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Amplicor HIV-1 test พบว่าชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR มีความไวในการตรวจร้อยละ ๑๐๐ ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ ๕๕ อยู่ระหว่าง ๗๘.๒๐-๑๐๐ เมื่อเทียบกับเซลล์มาตรฐาน 8E5 ได้ต่ำสุด ๕ ชุดต่อปฏิกิริยา และยังตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อเอชไอวี-1 พร้อมกับตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอของมนุษย์บนโครโมโซมคู่ที่ ๕ ซึ่งใช้ระบุคุณภาพตัวอย่างดีเอ็นเอได้ ชุดน้ำยาทั้งสองให้ผลตรวจตรงกันทั้ง ๒๕๕ ตัวอย่าง (chi-square test, p = 1.00) และตรงกับสถานะการติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน ดังนั้นการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการครั้งนี้แสดงว่าชุดน้ำยาที่ผลิตใช้เองมีประสิทธิภาพเท่ากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงกว่าถึง ๑๐ เท่าตัว

ปัจจุบันได้ใช้ชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR ให้บริการตรวจขั้นพื้นฐานของกระทรวงสาธารณสุข ซึ่งครอบคลุมเด็กอายุต่ำกว่า ๑๘ เดือน ที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน ๘,๐๐๐-๑๒,๐๐๐ คน จำเป็นต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพของชุดน้ำยาในภาคสนาม เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการใช้งานที่แท้จริงต่อไป

คำสำคัญ: **ไวรัสเอชไอวี-1, วิธีเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม, ชุดน้ำยาสำเร็จรูป, ชุดน้ำยาที่ผลิตขึ้นใช้เอง**

บทนำ

กระทรวงสาธารณสุขมีนโยบายลดอัตราการแพร่เชื้อจากแม่สู่ลูกโดยให้ยาต้านไวรัสเอชไอวีในมารดาก่อนคลอดแบบระยะสั้นมาตั้งแต่ พ.ศ. ๒๕๔๒ เพราะช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการติดเชื้อจากแม่สู่ลูกได้ถึงร้อยละ ๕๐[๑-๔] การตรวจพบ anti-HIV ในเด็กที่อายุมากกว่า ๑๘

Scanned by CamScanner

เดือนจะบ่งบอกภาวะการติดเชื้อเอชไอวีเหมือนในผู้ใหญ่ แต่ถ้าพบ anti-HIV ในเด็กที่อายุต่ำกว่า ๑๘ เดือน อาจเป็น anti-HIV ที่ผ่านมาจากมารดาและเด็กอาจไม่ติดเชื้อก็ได้ การติดตามเด็กเพื่อตรวจด้วยวิธีซีโรโลยีหลัง ๑๘ เดือนมีข้อจำกัด สาเหตุมาจากผู้ป่วยส่วนหนึ่งเสียชีวิตไปก่อนหรือสาเหตุอื่น ๆ แต่ปัจจุบันใช้หลักการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี-1 โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่นำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีของเด็กแรกเกิดจากมารดาที่มีประวัติติดเชื้ออย่างแพร่หลาย[๕-๗] พบว่าตรวจได้เมื่อเด็กมีอายุ ๒ เดือนขึ้นไป ซึ่งจะช่วยให้สามารถวินิจฉัยเด็กหลังคลอดได้เร็วกว่าการตรวจด้วยวิธีทางซีโรโลยีที่ต้องรอให้เด็กมีอายุ ๑๒-๑๘ เดือน[๘]

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้พัฒนาและจัดตั้งเครือข่ายห้องปฏิบัติการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีร่วมกับศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ มาตั้งแต่ พ.ศ. ๒๕๓๗[๙] วิธี PCR นี้ได้ผ่านการสอบเทียบกับห้องปฏิบัติการระดับชาติจำนวน ๑๐๐ ตัวอย่าง (บวก ๑๙ ลบ ๘๑) ได้ความไวและความจำเพาะร้อยละ ๑๐๐ พิสูจน์ว่าใช้งานได้จริง (validation) ได้ประเมินประสิทธิภาพการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี-1 ในกลุ่มตัวอย่างต่าง ๆ เช่น การเปรียบเทียบกับวิธีซีโรโลยีในกลุ่มผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีด พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ ๑๐๐[๑๐] แต่ใช้ติดตามอัตราการแพร่เชื้อจากมารดาสู่ทารกร่วมกับโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์ พบว่ามีความไวและความจำเพาะร้อยละ ๑๐๐ และ ๙๕ ตามลำดับ[๑๑] ในปีงบประมาณ ๒๕๔๗ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขและเครือข่ายห้องปฏิบัติการ ร่วมกับสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค ได้ดำเนินการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี-1 วิธี PCR ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อในโครงการเฝ้าระวังและติดตามอัตราการถ่ายทอดเชื้อเอชไอวีจากแม่สู่ลูก ที่มีการให้ยาต้านไวรัสแบบระยะสั้น ใน ๑๔ จังหวัดนำร่อง โดยตรวจปีละ ๓,๕๔๙ ตัวอย่าง พบอัตราการถ่ายทอดเชื้อจากแม่สู่ลูกร้อยละ ๔.๘๑[๑๒]

เนื่องจากมีการตรวจและใช้ชุดน้ำยา In-house Multiplex* PCR ซึ่งผลิตโดยหน่วยชันสูตรเองอย่างกว้างขวาง และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นและการใช้วิธี PCR เป็นการตรวจบริการขั้นพื้นฐานของกระทรวงสาธารณสุข ชุดน้ำยานี้ยังขาดข้อมูลการเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปซึ่งผ่านการรับรองโดยคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาที่นำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงได้ศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 จากชุดน้ำยาที่ผลิตขึ้นใช้เองชนิด Multiplex PCR และใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นำเข้าจากต่างประเทศคือ Amplicor HIV-1 Test (Roche Molecular System, Inc. Branchburg, NJ USA) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 ทั้งในด้านความไวและความจำเพาะในตัวอย่างคนไทย โดยมุ่งเน้นใช้ในการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี-1 ในเด็กอายุต่ำกว่า ๑๘ เดือน ที่มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

ระหว่างเดือนธันวาคม ๒๕๔๖ และกรกฎาคม ๒๕๔๗ ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดจาก ๓ แหล่งคือ จากโครงการให้ยาต้านไวรัสเอดส์แก่มารดาเพื่อลดอัตราการติดเชื้อเอชไอวีในบุตร เป็นเด็กที่มีอายุระหว่าง ๒ ถึง ๖ เดือน ที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อและได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ จำนวน ๓๕ ตัวอย่าง จากโรงพยาบาลในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและนครนายก จากงานบริการโลหิตของโรงพยาบาลทั่วไปจำนวน ๑๘๐ ตัวอย่าง และผู้ป่วยที่มาตรวจในงานบริการโลหิต จำนวน ๔๐ ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น ๒๕๕ ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างติด-

*ชุดน้ำยานี้ สามารถตรวจหายีนของเชื้อ HIV-1 ไปพร้อม ๆ กับยีนโครโมโซมคู่ที่ ๕ ของมนุษย์ ในปฏิกิริยาเดียวกัน เป็นการตรวจวิเคราะห์เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี-1 และสามารถตรวจระบุคุณภาพของตัวอย่างได้

Scanned by CamScanner

เชื้อเอชไอวี-1 ๒๐ ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างผู้ใหญ่ที่มาตรวจในงานบริการโลหิต ๒๐ ตัวอย่าง และอีก ๑ ตัวอย่างเป็นตัวอย่างเด็กอายุ ๔ เดือนที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อที่เหลือ ๒๓๔ ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างไม่ติดเชื้อเอชไอวี-1 โดยใช้ผลการตรวจเบื้องต้นของวิธีซีโรโลยีเพื่อระบุสถานะการติดเชื้อเอชไอวีจากชุดน้ำยาอิไลซ่า (Uni-Form II plus O, Organon Teknika, Boxtel, Netherland) และ Serodia-HIV (Fujirebio Inc. Tokyo, Japan) ส่วนตัวอย่างเด็กได้ติดตามผลตรวจวิธีซีโรโลยีหลัง ๑๘ เดือนจากโรงพยาบาล เพื่อใช้เป็นผลอ้างอิงทั้งหมด ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดบวกใช้ดีเอ็นเอที่เตรียมจากเซลล์มาตรฐาน 8E5

๑. การตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 วิธี PCR โดยชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR

๑.๑ การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ปริมาตร ๒๐๐ ไมโครลิตร เตรียมเป็นดีเอ็นเอโดยใช้สารละลาย 0.15 M NH_4Cl ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแตกโดยย่อยด้วยเอนไซม์ Proteinase K (PK) ความเข้มข้น ๒๐ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ ๕๖ องศาเซลเซียส นาน ๑ ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ ๑๐๐°ซ นาน ๑๕ นาที นำส่วนใสที่มีดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยา PCR

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดลบเตรียมจากเลือดผู้บริจาคที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี-1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลภูมิพล โดยเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดขาวประมาณแสนเซลล์ต่อปริมาตร ๕ ไมโครลิตร

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดบวกเตรียมจากเซลล์มาตรฐาน 8E5 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี HIV-1 DNA ๑ ชุด ต่อ ๑ เซลล์ ใช้วิเคราะห์ความไวในการตรวจ (analytical sensitivity) โดยเจือจางให้มีจำนวน HIV-1 DNA ต่อ ๑ ปฏิกิริยา เจือจางด้วยตัวอย่างควบคุมชนิดลบให้มีจำนวนเซลล์ประมาณแสนเซลล์ต่อปริมาตร ๕ ไมโครลิตร

๑.๒ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ใช้วิธี Nested DNA-PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสองครั้งด้วยเครื่อง GeneAmp. PCR system 9600 (Perkin-Elmer) ครั้งแรกทำในส่วนผสม ๕๐ ไมโครลิตร ใส่ดีเอ็นเอ ๕ ไมโครลิตร ในสารตั้งต้น ๔๕ ไมโครลิตร ที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นรวมดังนี้ ๑๐ มิลลิโมล Tris-HCl pH 9.0, ๕๐ มิลลิโมล KCl, 0.1% Triton X-100, ๒.๕ มิลลิโมล $MgCl_2$, ๐.๖ มิลลิโมล ของ deoxyribonucleotides และ ๐.๑ ไมโครโมล ของไพรเมอร์ เติมเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Promege) ๑ ยูนิต บ่มที่อุณหภูมิ ๙๔°ซ นาน ๕ นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว และทำปฏิกิริยา PCR ๓๐ รอบ (cycles) แต่ละรอบประกอบด้วย ๓ ขั้นตอน

๑. ขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation step) ที่อุณหภูมิ ๙๔°ซ นาน ๓๐ วินาที

๒. ขั้นตอนการเข้าจับกันของเบสคู่สมกับไพรเมอร์ (annealing step) ที่อุณหภูมิ ๕๕°ซ นาน ๓๐ วินาที

๓. ขั้นตอนการสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (elongation step) ที่อุณหภูมิ ๗๐°ซ นาน ๓๐ วินาที

ในรอบสุดท้ายในขั้นตอนที่ ๓ เป็นเวลา ๕ นาที ครั้งที่สองใช้ไพรเมอร์ถัดจากคู่นอกเข้ามา โดยใช้ PCR product ๒ ไมโครลิตร ใส่ในสารตั้งต้นปริมาตร ๑๘ ไมโครลิตร ทำในส่วนผสม ๒๐ ไมโครลิตร ซึ่งมีองค์ประกอบและความเข้มข้น รวมดังนี้ ๑๐ มิลลิโมล Tris-HCl pH 9.0, ๕๐ มิลลิโมล KCl 0.1% Triton X-100, ๒.๕ มิลลิโมล $MgCl_2$, ๐.๑ มิลลิโมล ของ Deoxyribonucleotides และ ๐.๒ ไมโครโมลของไพรเมอร์ เติมเอนไซม์ Taq DNA polymerase ๐.๔ ยูนิต ทำปฏิกิริยาเหมือนเดิมแต่ทำแค่ ๒๕ รอบ

๑.๓ การตรวจสอบผล

ใช้วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส วิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ภายหลังการทำปฏิกิริยา PCR โดยการแยกด้วย

Scanned by CamScanner

ตารางที่ ๑ ลำดับนิวคลิโอไทด์ ไพรเมอร์ ของยีน *pol* ของเชื้อเอชไอวี-๑[๑๓] และยีน *Ch5B* ของมนุษย์

ขนาดผลิตภัณฑ์	ชื่อและลำดับเบสของไพรเมอร์ (๕' → ๓')	ตำแหน่ง	Gen Bank access no.
เอชไอวี	JA17 (TAC-AGG-AGC-AGA-TGA-TAC-AG)	1873-1892	
(*pol* gene)	JA20 (CCT-GGC-TTT-AAT-TTT-ACT-GG)	2139-2120	NC 001802
๑๓๐ bp	JA18 (GGA-AAC-CAA-AAA-TGA-TAG-GG)	1923-1942	
	JA19 (ATT-ATG-TTG-ACA-GGT-GTA-GG)	2052-2033	
แถบควบคุม	QC3 (GGC-ACG-TAA-TTC-ACC-TAA-GTG-C)	148212-148191	32207633
(*Ch5B* gene)	QC4 (CCA-AGG-AGA-GAG-TAA-CGT-ATC-TCT-CAG)	148309-148283	24580340
๓๙๗ bp	Ch5B (ACT-TGT-GCT-CCT-CAT-TTC-AGC)	147815-147835	24580340

กระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ อ่านผลภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต ดูการเรืองแสงของผลิตผล เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (Standard) 100 bp DNA ladder (Promega) ความเข้มข้น ๐.๒ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

๑.๔ การควบคุมคุณภาพและแปลผล

ต้องทำตัวอย่างควบคุมชนิดบวก (positive control, PC) และชนิดลบ (negative control, NC) ควบคู่ไปด้วยทุกครั้งในการทำ PCR ผลการทดสอบจะเชื่อถือได้เมื่อพบแถบดีเอ็นเอ ๒ ขนาดคือ ๑๓๐ และ ๓๙๗ คู่เบส ในตัวอย่างควบคุมชนิดบวก และพบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด ๓๙๗ คู่เบสในตัวอย่างควบคุมชนิดลบ โดยดีเอ็นเอขนาด ๑๓๐ คู่เบส เป็นส่วนที่จำเพาะต่อยีน *pol* ของเชื้อเอชไอวี-๑ และขนาด ๓๙๗ คู่เบส เป็นส่วนจำเพาะต่อยีนของโครโมโซมคู่ที่ ๕ ของคน ตัวอย่างทดสอบที่พบแถบดีเอ็นเอสองขนาดเดียวกับตัวอย่างควบคุมชนิดบวกแปลผลเป็นบวก ตัวอย่างที่พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด ๓๙๗ คู่เบสแปลผลเป็นลบ ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด ๓๙๗ คู่เบส จะรายงานผลว่าตรวจวิเคราะห์ไม่ได้และต้องติดตามเจาะเลือดใหม่

๒. การตรวจหาเชื้อเอชไอวี-๑ วิธี PCR โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Amplicor HIV-1 test (Roche Molecular System, Inc. Branchburg, NJ USA)

๒.๑ การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็ง EDTA ปริมาตร ๒๐๐ไมโครลิตร เตรียมเป็นดีเอ็นเอด้วย (whole blood specimen preparation kit) เติม ๐.๕ มิลลิลิตร BLD WS (sodium phosphate containing <0.4% detergent) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๕ นาที ปั่นที่ ๑๒,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๓ นาที เติม ๑๐๐ ไมโครลิตร BLD EXT (Tris-HCl buffer containing 1% detergent, ๗.๕ มิลลิโมล $MgCl_2$, 0.01% PK) บ่มที่อุณหภูมิ ๖๐°ซ นาน ๓๐ นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ ๑๐๐°ซ นาน ๑๕ นาที นำส่วนใสที่มีดีเอ็นเอไปทำปฏิกิริยา PCR

๒.๒ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ใช้ HIV-1Amplification Kit (dATP, dCTP, dGTP, dUTP, AmpErase, AmpliTaq, biotinylated primers) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนยีน *gag* ของเชื้อเอชไอวี-๑ ใช้ไพรเมอร์ SK431/462 (GenBank Accession # KO 2007) ด้วยเครื่อง GeneAmp PCR

Scanned by CamScanner

system 9600 (Perkin Elmer) ทำในส่วนผสมปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารตั้งต้น ๕๐ ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ ๕๐ ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ ๕๐°ซ นาน ๒ นาที ทำปฏิกิริยา PCR ๕ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denature step ที่อุณหภูมิ ๙๕°ซ ๑๐ วินาที

๑. เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว ตามด้วย annealing step ที่อุณหภูมิ ๕๕°ซ ๑๐ วินาที

๒. เพื่อการเข้าจับกันของเบสคู่สมระหว่างไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อเอชไอวี และ chain elongation step ที่ ๗๒°ซ ๑๐ วินาที

๓. เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ ต่อด้วยการทำปฏิกิริยา PCR ๓๐ รอบ เริ่มด้วย denature step ที่อุณหภูมิ ๙๐°ซ ๑๐ วินาที ตามด้วย annealing step ที่อุณหภูมิ ๕๕°ซ ๑๐ วินาที และ chain elongation step ที่ ๗๒°ซ ๑๐ วินาที ในรอบสุดท้ายในขั้นตอนที่ ๓ เป็นเวลา ๕ นาที

๒.๓ การทำไฮบริไดเซชั่น

ใช้ Amplicor HIV-1 Detection Kit นำผลิตผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เติม ๑๐๐ ไมโครลิตรของ denaturation ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๑๐ นาที ปิเปตไป ๒๕ ไมโครลิตร ใส่ในถาดหลุมไมโครอิไลซ่าที่มีสารละลาย ๑๐๐ ไมโครลิตร ของ HIV-1 HYB (sodium phosphate buffer containing 0.2% solubilizer, <25% chaotrope) ทำตัวอย่างควบคุมชนิดบวก ๑ หลุม และตัวอย่างควบคุมชนิดลบ ๓ หลุม บ่มที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ นาน ๑ ชั่วโมง ล้างและแช่แต่ละหลุม ๕ ครั้ง ด้วย washing buffer เติม ๑๐๐ ไมโครลิตร ของ AV-HRP (avidin-horseradish peroxidase cojugate) ในแต่ละหลุม บ่มที่อุณหภูมิ ๓๗°ซ นาน ๑๕ นาที ล้างแบบเดิม จากนั้นเติม ๑๐๐ ไมโครลิตร สับสเตรท (tetramethylbenzidine, TMB) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด นาน ๑๐ นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม ๑๐๐ ไมโครลิตร (4.9% sulfuric acid) อ่านค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density, OD) ของสารละลายแต่ละหลุมที่ความยาวคลื่น ๔๕๐ นาโนเมตร การอ่านผลทำภายใน ๑๕ นาที

๒.๔ การควบคุมคุณภาพและการแปลผล

ค่า OD ของตัวควบคุมผลลบ (Negative Control, NC) แต่ละตัวต้องมีค่าน้อยกว่า ๐.๒๕ และค่า OD ของตัวควบคุมผลบวก (Positive Control, PC) ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ ๓.๐ การทดสอบจึงจะเชื่อถือได้ ในชุดน้ำยาระบุให้ใช้ค่าตัดสิน (Cutoff value, COV) เท่ากับ ๐.๓๕๐ การแปลผลตัวอย่างทดสอบเป็นบวกถ้า OD มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ ๐.๓๕ และแปลผลเป็นลบถ้า OD มีค่าน้อยกว่า ๐.๓๕

ตารางที่ ๒ ความไวในการตรวจหา HIV-1 DNA ด้วยชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR

จำนวน 8E5 / ปฏิกิริยา	จำนวนบวก/จำนวนการทดสอบ (ครั้ง)	จำนวนบวก ร้อยละ	ช่วงความเชื่อมั่น ร้อยละ ๙๕
๒๕	๑๕/๑๕	๑๐๐	๗๘.๒๐-๑๐๐*
๑๐	๑๕/๑๕	๑๐๐	๗๘.๒๐-๑๐๐*
๕	๑๕/๑๕	๑๐๐	๗๘.๒๐-๑๐๐*
๒.๕	๔๐/๕๐	๘๐	๖๖.๒๘-๘๙.๙๗*
๑.๒๕	๓๗/๕๐	๗๔	๕๙.๖๖-๘๕.๓๗*
๐.๖๒๕	๓/๕๐	๖	๑.๒๔-๑๗.๕๓**
๐.๓๑๒๕	๐/๕๐	๐	๐.๐๐-๗.๓๘**

*Binomial distribution, **Poisson distribution

Scanned by CamScanner

ผลการศึกษา

๑. ผลการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 วิธี PCR ด้วยชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR

๑.๑ ความไวในการตรวจวิเคราะห์ (analytical sensitivity)

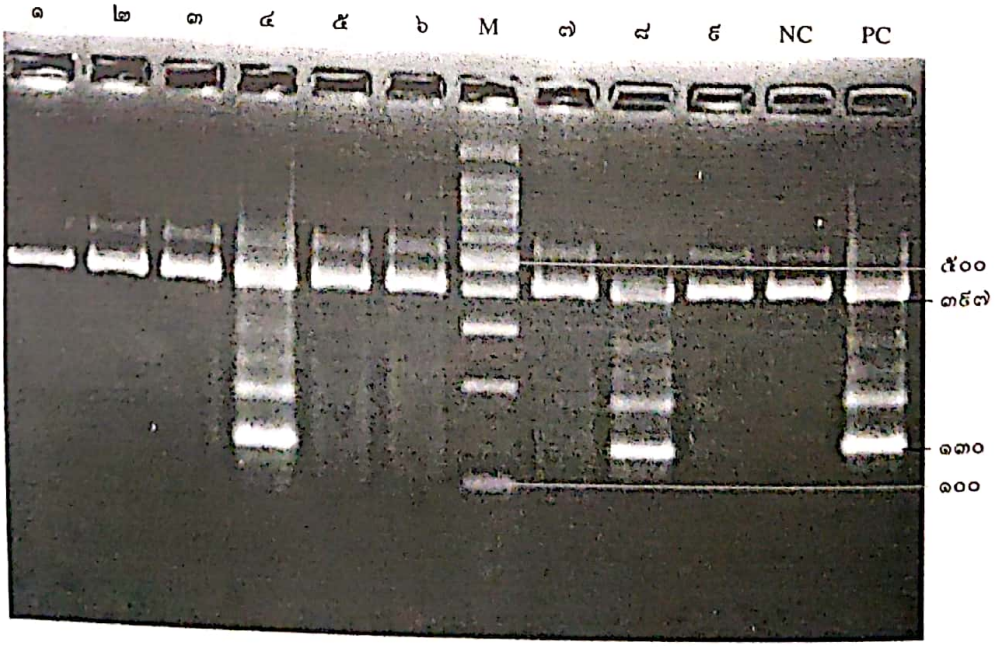
การตรวจหา HIV-1 DNA โดยใช้ 8E5 ที่เจือจางตั้งแต่ ๒๕ เซลล์ต่อปฏิกิริยา จนถึง ๐.๓๑๒๕ เซลล์ต่อปฏิกิริยา พบว่าวิธีนี้ตรวจ HIV-1 DNA ได้ร้อยละ ๕๐ ที่ความเข้มข้นเพียง ๑ เซลล์ต่อปฏิกิริยา ซึ่งใช้หลักการคำนวณจุดยุติร้อยละ ๕๐[๑๔] ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยังตรวจ HIV-1 DNA ได้ร้อยละ ๑๐๐ เป็นขอบเขตความไวของวิธีเป็น ๕ เซลล์ต่อปฏิกิริยา ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ อยู่ระหว่าง ๗๘.๒๐-๑๐๐ (ตารางที่ ๒)

๑.๒ ผลการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 ในตัวอย่าง

ชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด ๓๙๗ คู่เบส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอ จำเพาะต่อยีนบนโครโมโซมคู่ที่ ๕ ของมนุษย์ ใน ตัวอย่างดีเอ็นเอทั้ง ๒๕๕ ตัวอย่างและตรวจพบแถบ ดีเอ็นเอขนาด ๑๓๐ คู่เบส ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pol* ของ เชื้อเอชไอวี-1 ซึ่งระบุผลบวกต่อการติดเชื้อเอชไอวี-1 โดยตรวจพบผลบวก ๒๑ ตัวอย่าง ตรงกับสถานะการ ติดเชื้อเอชไอวี-1 จำแนกเป็นตัวอย่างเด็ก อายุ ๔ เดือน ๑ ราย ที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อในโครงการให้ยา ต้านไวรัสเอดส์ และเป็นตัวอย่างผู้ใหญ่ที่มาตรวจใน งานบริการโลหิต ๒๐ ราย การตรวจพบแถบดีเอ็นเอบน แผ่นเจลอะกาโรส (รูปที่ ๑)

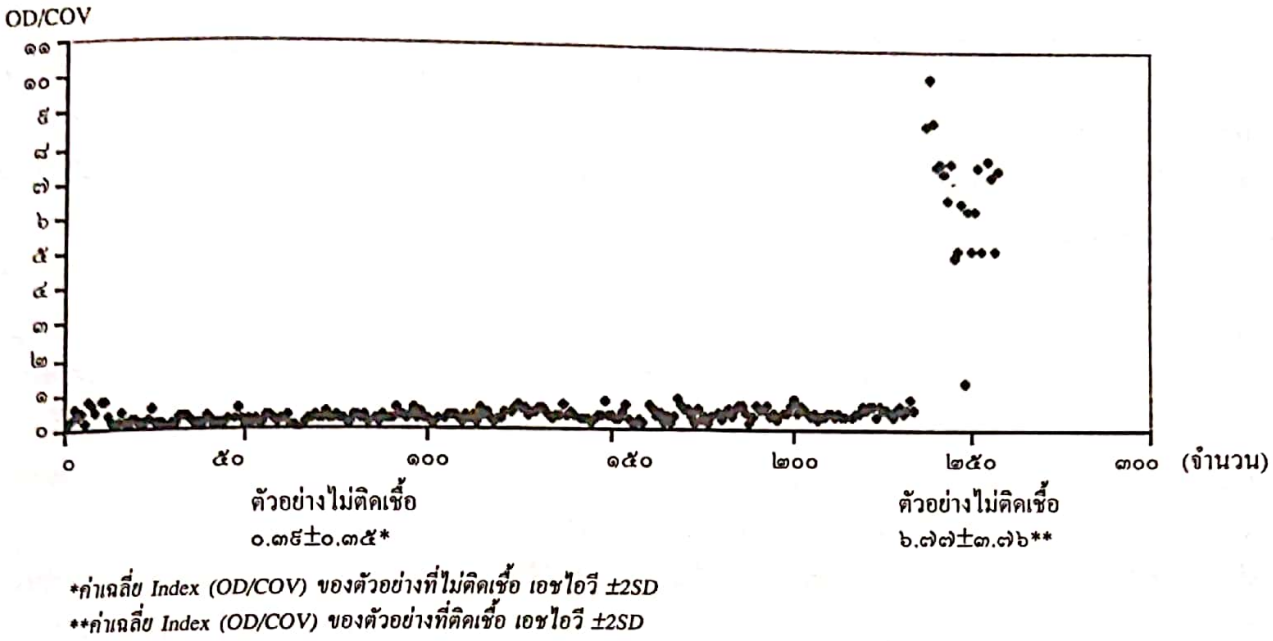
๒. ผลการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 วิธี PCR ด้วย ชุดน้ำยา Amplicor HIV-1 test

อ่านค่า OD ที่ ๔๕๐ นาโนเมตร พบตัวอย่างที่ ไม่ติดเชื้อเอชไอวี-1 จำนวน ๒๓๔ ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ ๐.๑๓๘ (95% CI;. ๐.๑๓๐-๐.๑๔๖) มีค่า SD



รูปที่ ๑ เลนที่ ๔ และ ๘ คือตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 พบแถบดีเอ็นเอขนาด ๑๓๐ และ ๓๙๗ คู่เบส เลน ที่ ๑ ถึง ๓, ๕, ๖, ๗ และ ๙ คือตัวอย่างที่ให้ผลลบต่อการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด ๑๓๐ คู่เบส NC พบแถบดีเอ็นเอขนาด ๑๓๐ คู่เบส และ PC พบแถบดีเอ็นเอขนาด ๑๓๐ คู่เบส และ ๓๙๗ คู่เบส เปรียบเทียบกับดี เอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder marker (M)

Scanned by CamScanner



*ค่าเฉลี่ย Index (OD/COV) ของตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อ เอชไอวี ±2SD
**ค่าเฉลี่ย Index (OD/COV) ของตัวอย่างที่ติดเชื้อ เอชไอวี ±2SD

รูปที่ ๒ ความสัมพันธ์ของ Index (OD/COV) จากตัวอย่างติดเชื้อ และไม่ติดเชื้อเอชไอวี-1

เท่ากับ ๐.๐๖๐, ค่าพิสัยเท่ากับ ๐.๐๒๔-๐.๓๐๗ ในชุดน้ำยาระบุให้ใช้ค่าตัดสิน COV เท่ากับ ๐.๓๕๐ จากผลการทดสอบ พบว่ามีบางตัวอย่างที่ให้ค่าใกล้เคียงกันดังกล่าว ขณะที่ผลของตัวอย่างที่ติดเชื้อจำนวน ๒๐ ตัวอย่าง ให้ค่าเฉลี่ย OD เท่ากับ ๒.๓๖๖ (95% CI; ๒.๐๖๗-๒.๖๖๕) SD เท่ากับ ๐.๖๕๖, ค่าพิสัยเท่ากับ ๐.๔๗๐-๓.๕๗๐ และมีเพียง ๑ ตัวอย่างที่ให้ผลบวกค่อนข้างต่ำที่ OD เท่ากับ ๐.๔๗๐ แต่ก็แปลผลเป็นบวกได้ ได้แสดงค่าความสัมพันธ์ของ Index (OD/COV) จากตัวอย่างติดเชื้อและไม่ติดเชื้อเอชไอวี-1 (รูปที่ ๒)

๓. เปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 วิธี PCR ระหว่างชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR กับ Amplicor HIV-1 test

จากตัวอย่างทั้งหมด ๒๕๕ ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อเอชไอวี-1 จำนวน ๒๐ ตัวอย่าง และไม่ติดเชื้อ จำนวน ๒๓๔ ตัวอย่าง พบว่าชุดน้ำยาทั้งสองให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ ๑๐๐ (Chi Square test, p= 1.00) โดยตรงกับสถานะการติดเชื้อเอชไอวี-1 ของทุกตัวอย่าง

วิจารณ์และสรุป

ชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR ตรวจหาดีเอ็นเอของมนุษย์และเอชไอวี-1 พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน และตรวจหา HIV-1 DNA ได้ร้อยละ ๑๐๐ ที่ความเข้มข้นต่ำสุด ๕ ชุดต่อปฏิกิริยา ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ อยู่ระหว่าง ๗๘.๒๐-๑๐๐ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชุดน้ำยาที่ผลิตขึ้นใช้เองมีความไวในการตรวจสูงเช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานไว้[๖] ชุดทดสอบนี้ได้ออกแบบให้มีการตรวจหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ ๕ ของมนุษย์ การตรวจพบดีเอ็นเอนี้ในตัวอย่างส่งตรวจจึงใช้เป็นการตรวจสอบคุณภาพตัวอย่าง หากตัวอย่างใดไม่ปรากฏดีเอ็นเอแถบนี้แสดงว่ามีปัญหาในการตรวจ ได้แก่ ปริมาณดีเอ็นเอน้อยไปหรือไม่มีดีเอ็นเอพอให้ตรวจ ดีเอ็นเอเสียสภาพ หรืออาจมีตัวยับยั้งเอนไซม์ในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรม จำเป็นต้องมีการเจาะเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างส่งตรวจใหม่

ชุดน้ำยาที่ผลิตขึ้นใช้เองมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่นำเข้าจากต่างประเทศ โดยผลการวิเคราะห์ตรงกัน ๒๕๕ ตัวอย่างและตรงกับ

Scanned by CamScanner

สถานะการติดเชื้อเอชไอวี-1 ของทุกตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 ในกลุ่มตัวอย่างเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อและเด็กที่เจ็บป่วยด้วยเอดส์พบว่าวิธี In-house HIV DNA PCR และ Amplicor HIV-1 มีความไวร้อยละ ๙๕.๒ และร้อยละ ๑๐๐ ตามลำดับ และมีความจำเพาะร้อยละ ๑๐๐ และร้อยละ ๙๘.๔ ตามลำดับ ผลวิเคราะห์ข้อมูลกลุ่มย่อยจากเด็กที่เกิดจากแม่ที่ติดเชื้อเอชไอวี พบว่าวิธี In-house HIV DNA PCR มีความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายโอกาสที่จะเป็นโรคเมื่อผลการทดสอบเป็นบวกและค่าการทำนายโอกาสที่จะเป็นโรคเมื่อผลการทดสอบเป็นลบร้อยละ ๑๐๐[๑๔]

การศึกษาประสิทธิภาพชุดน้ำยาในภาคปฏิบัติการครั้งนี้มีข้อจำกัดที่จำนวนตัวอย่างมีจำนวนจำกัด เนื่องจากราคาชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่มีราคาสูงถึง ๑,๕๐๐ บาทต่อการทดสอบ จำเป็นต้องมีการประเมินประสิทธิภาพของชุดน้ำยาที่ผลิตใช้เองนี้ในภาคสนามโดยมีเครือข่ายห้องปฏิบัติการร่วมประเมินต่อไป

จากสถิติจำนวนเด็กเกิดของประเทศไทย พ.ศ. ๒๕๔๗[๑๖] มี ๘.๑ แสนคน เป็นแม่ที่ติดเชื้อเอชไอวีร้อยละ ๑.๐๘[๑๗] คิดเป็นเด็กที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ๙,๕๕๘ คน ปัจจุบันกระทรวงสาธารณสุขมีนโยบายลดการแพร่เชื้อจากแม่สู่ลูกโดยให้ยาต้านไวรัสแก่แม่ทุกรายทำให้มีเด็กติดเชื้อเหลือเพียงร้อยละ ๔ หรือคิดเป็น ๓๘๒ คนต่อปี หากแม่ไม่ได้รับยาต้านไวรัสคาดว่าจะมีเด็กติดเชื้อร้อยละ ๑๐ หรือคิดเป็น ๙๕๖ คน จึงป้องกันเด็กติดเชื้อได้ ๕๗๔ คนต่อปี การตรวจเพื่อทราบสถานะการติดเชื้อของเด็กที่ถูกต้องและรวดเร็ว โดยเฉพาะเด็กที่ติดเชื้อจะได้รับยาป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาสทำให้การดูแลรักษามีประสิทธิภาพ ส่วนเด็กที่ไม่ติดเชื้อก็จะหยุดการให้ยาป้องกันการติดเชื้อฉวยโอกาส ทำให้เด็กไม่ต้องรับยาโดยไม่จำเป็น ซึ่งยาดังกล่าวมีผลข้างเคียงต่อเด็กอย่างมาก และช่วยให้รัฐบาลประหยัดงบประมาณในการให้ยาในเด็กที่ไม่ติดเชื้อได้จำนวนหนึ่ง

สรุปว่าชุดน้ำยา In-house Multiplex PCR มีประสิทธิภาพทัดเทียมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาแต่มีราคาถูกกว่าถึง ๑๐ เท่าตัว ปัจจุบันได้แปลงผลงานวิจัยและพัฒนาใช้ชุดน้ำยาที่ผลิตใช้เองชนิด Multiplex PCR เป็นการตรวจบริการขั้นพื้นฐานของกระทรวงสาธารณสุข เพื่อติดตามการติดเชื้อเอชไอวี-1 ในเด็กอายุต่ำกว่า ๑๘ เดือนที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ ให้บริการตรวจครอบคลุมทุกพื้นที่โดยผ่านเครือข่ายห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ ๑๑ เขตทั่วประเทศไทย เป้าหมาย ๘,๐๐๐-๑๒,๐๐๐ ราย ซึ่งจะใช้งบประมาณดำเนินการทั้งสิ้นเพียง ๘ ล้านบาทเท่านั้น ในขณะที่หากใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปจากต่างประเทศจะใช้งบประมาณเฉพาะค่าชุดน้ำยาสูงถึง ๒๔ ล้านบาท คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการพัฒนาชุดน้ำยา Inhouse Multiplex PCR ให้ใช้งานได้สะดวกขึ้น ลดขั้นตอนการไปเปตน้ำยาและลดค่าใช้จ่าย เกี่ยวกับวัสดุวิทยาศาสตร์ โดยการเตรียมชุดน้ำยาแบบผสมเสร็จพร้อมใช้ พร้อมทั้งปรับปรุงรูปแบบบรรจุภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานสากลและศึกษาความคงตัวของชุดน้ำยา และศึกษาประสิทธิภาพในภาคสนามเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพที่แท้จริงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนใหญ่จาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และบางส่วนได้รับจากโครงการ Global AIDS Program (GAP 2003-2004) ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานบริการโลหิตจากโรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดชและสถาบันบำราศนราดูรที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาวิจัย รวมทั้งโรงพยาบาลทั่วไปของจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและจังหวัดนครนายกที่เข้าร่วมโครงการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีในเด็กที่คลอดจากมารดาที่ติดเชื้อที่ได้เก็บรวบรวมและนำส่งตัวอย่างดังกล่าว

Scanned by CamScanner

เอกสารอ้างอิง

๑. Shaffer N, Chuachoowong R, Mock PA, Bhadrakom C, Siriwasin W, Yong NL, et al. Short-course zidovudine for perinatal HIV-1 transmission in Bangkok, Thailand: a randomised controlled trial. Bangkok collaborative perinatal HIV transmission study group. Lancet 1999; 353:773-80.

๒. ปานทิพย์ นันทนาวุฒิ, สุธัญญา บรรจงภาค, ชุมพล เดชะอำไพ, พิมพ์ประไพ ธนาศิริ, พรสวรรค์ อัตตวินิจตระการ, สมชัย นิจพานิช และคณะ. การติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กแรกเกิดจากมารดาที่ได้รับ zidovudine ในเขตภาคกลางตอนล่าง. วารสารการแพทย์เขต ๔ ๒๕๔๔; ๒๐:๗๓-๕.

๓. สุทัศนีย์ วิมลเศรษฐ, จีรภา ถนอมไทย, ปริศนา วงศ์วีรขันธ์, ชวนชม สกนธวัฒน์. การตรวจหาอัตราการถ่ายทอดเชื้อ HIV-1 จากแม่สู่ลูกโดยเทคนิค PCR ในจังหวัดขอนแก่น. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๔๔; ๑:๗๖-๘๒.

๔. อัจฉรา เชาวะวณิช, การุณย์ คุณติรานนท์, รุจนี สุนทรชจิต, สุธน วงษ์ชีรี, ศิริรัตน์ ลิกานนท์สกุล, มณฑาสวัสดิ์ รัตนศรีทอง และคณะ. การศึกษาการใช้ zidovudine ระยะสั้นเพื่อป้องกันการแพร่เชื้อ HIV จากมารดาสู่ทารกในโรงพยาบาลบำราศนราดูร. วารสารโรคติดต่อ ๒๕๔๒; ๒๕:๓๕๑-๕๘.

๕. Vongsheree S, Ruchusatsawat N, Saguanwongse S, Warachit P. Diagnosis of perinatal HIV-1 infection by In-house PCR. Asian Pac J Allergy Immunol 1997; 15: 199-204.

๖. บุษราวรรณ ศรีวรรธนะ, นวลฉวี เวชประสิทธิ์, สุภาพร เจริญสุข, นภวรรณ เจนใจ, วิยดา เจริญศิริวัฒน์. การตรวจวินิจฉัยและการศึกษาความคงตัวของ HIV-1 DNA จากหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับ. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๔๔; ๔๓:๑๕๖-๒๐๕.

๗. ปานทิพย์ นันทนาวุฒิ, เอกวัฒน์ อุณหเลขกะ, นิพนธ์ อินทรวัฒนา, สมเกียรติ บุญญะบัญชา. ประเมินการทดสอบวิธี PCR ที่ใช้วินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กแรกเกิด. วารสารแพทย์เขต ๔ ๒๕๔๔; ๒๐: ๒๓-๓๓.

๘. Young NL, Shaffer N, Chaowanachan T, Chotpitayasunondh T, Vanparapar N, Mock PA, et al. Early diagnosis of HIV-1-infected infants in Thailand using RNA and DNA PCR assays sensitive to non-B subtype. J Acquir Immune Defic Syndr 2000; 49:401-7.

๙. หรรษา ไทยศรี, สุธน วงษ์ชีรี, อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์, พงษ์นุวัฒน์ ศรีงาม, รัชณีกร ใจซื่อ. อัตราติดเชื้อเอชไอวีในทารกซึ่งมารดารับยาต้านไวรัส ผลจากการศึกษาของเครือข่ายห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่าง พ.ศ. ๒๕๔๐-๒๕๔๗. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการสาธารณสุข ครั้งที่ ๑๒ เมืองไทยสุขภาพดี วิถีพัฒนาที่มั่นยืน; ๒๔-๒๗ สิงหาคม ๒๕๔๗; ณ โรงแรมรอยัล ภูเก็ต ซิตี้, จังหวัดภูเก็ต. กรุงเทพมหานคร: องค์การรับส่งสินค้าและพัสดุภัณฑ์; ๒๕๔๗.

๑๐. ไพจิตร์ วราชิต, สุธน วงษ์ชีรี, สุรางค์ สงวนวงศ์, นวลจันทร์ ฤชุศาศวัต, จินตรา อุ่นเอกลาภ. การตรวจ Proviral DNA ของเชื้อ HIV-1 โดยวิธี Nested PCR. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ๒๕๓๗; ๓๖:๑๑-๘.

๑๑. ไกรฤกษ์ ไตรรัตนาภา, ศิริราช พัวพันวัฒนะ, รวิวรรณ หาญสุทธิเวชกุล, พัชราพร เอ้า, ระวี เนตตกุล, สุรางค์ สงวนวงศ์ และคณะ. อัตราการติดเชื้อเอชไอวีจากมารดาสู่ทารกตรวจโดยวิธีโพลีเมอเรส เชน รีแอคชั่น ในโรงพยาบาลเชียงรายประชานุเคราะห์. วารสารกุมารเวชศาสตร์ ๒๕๔๐; ๓๖:๑๗๕-๘๕.

๑๒. หรรษา ไทยศรี, อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์, พงษ์นุวัฒน์ ศรีงาม, รัชณีกร ใจซื่อ, สุธน วงษ์ชีรี. อัตราการติดเชื้อเอชไอวีในทารกซึ่งมารดารับยาต้านไวรัส ผลการศึกษาของเครือข่ายห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประจำปี ๒๕๔๗. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการกลุ่มภารกิจด้านสนับสนุนงานบริการสุขภาพครั้งที่ ๓ ประจำปี ๒๕๔๘; ๑-๒ กันยายน ๒๕๔๘; ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพคเมืองทองธานี. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; ๒๕๔๘.

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

๑๔. Reed RJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent and points. Amer J Hygiene 1998; 27: 493-7.

๑๕. Puthanakit T, Apichartpiyakul C, Sirisanthana V. An in-house HIV DNA PCR assay for early diagnosis of HIV infection in children in Thailand. J Med Assoc Thai 2003; 86:758-65.

๑๖. สำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. สถิติสาธารณสุข ๒๕๔๗. [สืบค้นเมื่อ ๒๐ ธ.ค. ๒๕๔๗]; แหล่งข้อมูล: http://203.157.19.191

๑๗. กลุ่มงานโรคเอดส์ สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. ผลการเฝ้าระวังการติดเชื้อ HIV เฉพาะพื้นที่ประเทศไทย รอบที่ ๒๑ (มิถุนายน ๒๕๔๖). [สืบค้นเมื่อ ๒๐ ธ.ค. ๒๕๔๗]; แหล่งข้อมูล: http://epid.moph.go.th

Scanned by CamScanner

Abstract **Performance of an In-house Multiplex PCR and Comparison of Amplicor HIV-1 Test for Diagnosis of HIV-1 Infection in Thailand**

Hansa Thaisri, Pongnuwat Sri-ngam, Archawin Rojanawiwat, Ratchaneekorn Jaisue, Suthon Vongsheree

National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health

Journal of Health Science **2006; 15:215-24.**

This study compared laboratory performance of an in-house HIV-1 DNA-PCR to an Amplicor HIV-1 test in the detection of HIV-1 DNA in 255 blood specimens from 35 infants born to HIV infected mothers, 40 individuals at risk undergoing HIV testing and 180 blood donors. The specimens were collected during December 2003 - July 2004. The in-house multiplex PCR simultanously detected both HIV-1 DNA and human DNA at chromosome 5. The latter PCR product was used as a marker indicating the quality of blood specimens for PCR testing. This in-house multiplex PCR has limit of detection of 5 copies 8E5 per reaction with 100 percent detection [95% confidence interval (CI); 78.2-100]. Both PCR gave 100 percent concordant results, as compared to HIV-infection status of 255 samples (chi-square test, p= 1.00).

The in-house multiplex PCR has comparable sensitivity and specificity to the Amplicor HIV-1 test in detecting HIV infection status.

The test has been implemented to support HIV-1 diagnostic services in Thailand for 8,000-12,000 under-18-month infants born to infected mothers and further field assessment should be carried out in order to verify the effectiveness of the test.

Key words: **HIV-1, DNA-PCR, Amplicor HIV-1 test, in-house multiplex DNA-PCR**

Scanned by CamScanner