

การใช้การตรวจวินิจฉัยในระดับ อณูโมเลกุลสำหรับเชื้อเอชไอวี ชนิดที่ 1 ในทางคลินิก

สุดารัตน์ หงวนเสียม ปร.ด. อายุรศาสตร์เขตร้อน (พยาธิวิทยาเขตร้อน)*¹

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยในระดับอณูโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้กันมากขึ้นอย่างรวดเร็วในห้องปฏิบัติการทางคลินิก การตรวจวัดปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 ในเลือดและการตรวจการดื้อต่อยาต้านเอชไอวีจัดเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยในระดับอณูโมเลกุลที่นำมาใช้เพื่อติดตามผลการรักษาในผู้ติดเชื้อเอชไอวี การตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในเลือด เป็นการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอของไวรัส ซึ่งนับว่าเป็นการทดสอบที่มีความสำคัญอย่างสูง ตั้งแต่การเริ่มให้ยาต้านเอชไอวี การติดตามการรักษา การพยากรณ์โรค และการดำเนินอาการของผู้ป่วยโรคเอดส์ เนื่องจากการดื้อต่อยาต้านเอชไอวีจัดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การรักษาล้มเหลว ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้การตรวจการดื้อต่อยาต้านเอชไอวีถูกนำมาใช้ในงานบริการเพื่อใช้เป็นแนวทางในการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งสามารถตรวจได้ทั้ง รูปแบบปรากฏ (phenotype) และรูปแบบพันธุกรรม (genotype) โดยสรุปการตรวจวัดปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 ในเลือด และการตรวจการดื้อต่อยาต้านเอชไอวีจัดเป็นการทดสอบมาตรฐานที่ใช้ในการติดตามผลการรักษา การตอบสนองต่อยาต้านเอชไอวี และช่วยให้ผู้ติดเชื้อเอชไอวีมีผลการรักษาทางคลินิกเพิ่มขึ้น

* ภาควิชาพยาธิวิทยาภาควิภาค คณะแพทยศาสตร์วชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราชิต

¹ ผู้ติดต่อ, อีเมล: sudarat@edu.vajira.ac.th

Abstract

Clinical Use of Molecular Diagnostics for Human Immunodeficiency Virus Type 1

Sudarat Nguansangiam Ph.D. (Tropical Medicine)*¹

* Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University

¹ Corresponding authors email address: sudarat@edu.vajira.ac.th

Currently, molecular methods have rapidly become necessary scientific and diagnostic tools that are considered routine in most clinical laboratories. The use of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load and drug resistance testing clearly indicates the essential role that molecular diagnostics play in the management of HIV-1 infected patients. HIV-1 viral load assay refers to the quantification of HIV-1 ribonucleic acid (RNA) which is very useful in determining when to initiate antiretroviral therapy, in monitoring response to therapy, and in predicting time to progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The development of resistant virus is an important cause of treatment failure. As a result, drug resistance testing is now routinely used in management of HIV-1 infected patients. This can be detected by using either genotypic or phenotypic assays. In summary, HIV-1 viral load and drug resistance testing have become the standard of care for monitoring response to antiretroviral therapy and improved clinical outcomes in HIV-1 infected persons.

Keywords: molecular diagnostic, HIV-1, viral load, drug resistant testing

บทนำ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการสำหรับผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์ นอกเหนือจากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีแล้ว การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อติดตามการรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์นับว่าสำคัญมากเช่นกัน ที่นิยมใช้มี 3 การทดสอบ ได้แก่ การตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือด (viral load) การตรวจหาระดับเม็ดเลือดขาวชนิดซีดี 4 (CD4) และการตรวจการดื้อยาด้านเอชไอวี (drug resistant testing)¹⁻³ โดยเฉพาะการตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดและการตรวจการดื้อยาด้านเอชไอวี จัดเป็นการตรวจวินิจฉัยในระดับอนุโมเลกุลที่สำคัญและนิยมใช้กันมากในทางคลินิก การทดสอบทั้งสองวิธีมีความเกี่ยวข้องกันคือการตรวจหาปริมาณไวรัสในเลือดจะเป็นตัวชี้วัดและประเมินประสิทธิภาพของการให้ยาด้านไวรัส ซึ่งถ้าพบว่ามีการรักษาล้มเหลว การตรวจการดื้อยาด้านเอชไอวีก็จะนำมาใช้ในการค้นหาสาเหตุและเป็นข้อมูลนำไปสู่การเปลี่ยนยาตัวใหม่^{2,3} ซึ่งข้อมูลที่จะนำมาใช้

ประกอบรวมกันในการวางแผนการดูแลรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์

เชื้อเอชไอวี พยาธิกำเนิด และการกลายพันธุ์

เชื้อเอชไอวีแบ่งเป็น 2 ชนิดคือเชื้อเอชไอวีชนิดที่ 1 และ 2 (human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV1 และ HIV 2))⁴ เชื้อเอชไอวีชนิดที่ 1 แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือกลุ่ม M (major), O (outlier) และ N (non-major-non-outlier) เชื้อเอชไอวีชนิดที่ 1 กลุ่ม M ยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (subtypes/clades) อีก 10 กลุ่มคือ A-D, F-H, J-K และ CRF (circulating recombinant form) ตามความแตกต่างของยีนโดยมีลำดับเบสที่แตกต่างกัน^{5,6} ผู้ติดเชื้อส่วนใหญ่ทั่วโลกมักติดเชื้อเอชไอวีชนิดที่ 1 กลุ่ม M^{7,8} ดังนั้น การตรวจวินิจฉัยเพื่อติดตามการรักษาจึงนิยมทำการตรวจหาปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 และตรวจหาการดื้อยาด้านเอชไอวีชนิดที่ 1 ส่วนเชื้อเอชไอวีชนิดที่ 2 แบ่งเป็น 8 กลุ่มคือ A-H ส่วนใหญ่พบในทวีปแอฟริกา⁹

พยาธิกำเนิดของเชื้อเอชไอวีเกิดจากการที่เชื้อไวรัสเกาะติดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดซีดี 4 โดยใช้ glycoprotein 120 (gp120) เข้ายึดกับตัวรับหลัก (receptor) และตัวรับร่วม (co-receptor) ชนิด CCR5 และ/หรือ CXCR4 ของซีดี 4 และเกิดการหลอมรวมของไกลโคโปรตีน gp41 ของเชื้อและไกลโคลิพิดบนผิวเซลล์เมื่อเชื้อเอชไอวีเข้าไปในเซลล์ จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่กระบวนการ reverse transcription เพื่อสร้างสาย DNA สายแรกโดยอาศัย RNA จีโนมของเอชไอวีเองเป็นต้นแบบ จากนั้นจะเกิดการ integration โดยสอดสาย DNA ที่สร้างขึ้นแทรกเข้า DNA ในนิวเคลียสของเม็ดเลือดขาวซีดี 4 ของผู้ติดเชื้อ ซึ่งเป็นแหล่งแพร่เชื้อในร่างกาย¹⁰ การกลายพันธุ์เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมบนจีโนมของเชื้อเอชไอวี ทำให้การสร้างเอนไซม์ reverse transcriptase, protease และ integrase ต่างไปจากไวรัสสายพันธุ์เดิม (wild-type virus) โดยไวรัสที่กลายพันธุ์จะไม่ไวต่อยาต้านไวรัสและจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นในร่างกายผู้ติดเชื้อ ทำให้เกิดการดื้อยาขึ้น¹¹

การตรวจหาปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 ในเลือด (HIV-1 viral load)

เป็นการตรวจหาปริมาณสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอของเอชไอวี ชนิดที่ 1 (HIV-1 RNA) ในพลาสมา¹² ประโยชน์ของการตรวจวิธีนี้คือ เพื่อใช้ในการตรวจติดตามผลการรักษา บอกถึงความล้มเหลวของการรักษาและการเปลี่ยนสูตรยาต้านไวรัส² การวัดปริมาณไวรัสในเลือดจะเป็นดัชนีที่บ่งประสิทธิภาพในการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวีได้แม่นยำกว่าการวัดระดับเม็ดเลือดขาวชนิดซีดี 4 ในเลือด¹³

การรายงานผลในการตรวจหาปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 ในเลือด

การรายงานผลของการตรวจมี 2 รูปแบบคือ ก๊อบปี/มิลลิลิตร (copies/ml) และค่า $\log_{10}$ equivalence^{14,15} เช่น เมื่อปริมาณไวรัสในเลือดมีค่าเท่ากับ 100,000 ก๊อบปี/มิลลิลิตร จะมีค่า $\log_{10}$ equivalence เท่ากับ 5.0 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 3 เท่า หรือ 0.5 $\log_{10}$ equivalence ในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านไวรัสถือว่ามีความสำคัญ^{14,15}

วิธีการตรวจวัดปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 ในเลือด

ทำได้หลายวิธี นิยมทำโดยการตรวจหาปริมาณ HIV-1 RNA ในพลาสมา อาศัยเทคนิคของการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัส หลักการที่ใช้ในการตรวจวัด มีหลายหลักการหรือเทคนิคในการตรวจสอบโดยสรุป ดังนี้คือ¹⁵

1. หลักการพีซีอาร์ชนิด reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

2. หลักการของ branched deoxyribonucleic acid (bDNA)

3. หลักการของ nucleic acid sequence based amplification (NASBA)

4. หลักการเรียลไทม์ พีซีอาร์ (Realtime PCR)

สำหรับรายละเอียดของเครื่องมือชุดการทดสอบสำหรับการตรวจหาปริมาณเอชไอวี ชนิดที่ 1 ในเลือดที่ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและใช้ในห้องปฏิบัติการในปัจจุบัน มีคุณสมบัติที่เหมือนและแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 1¹⁶ ส่วนใหญ่มีราคาแพง การบริการยังไม่ทั่วถึง และมีเฉพาะในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ ต้องใช้เครื่องมือและเทคนิคพิเศษในการตรวจวิเคราะห์ในระดับอิมมูโนเลกุล ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำคัญของกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา ในประเทศไทยค่าใช้จ่ายส่วนนี้ขึ้นกับสิทธิประโยชน์ในระบบประกันสุขภาพของผู้ป่วยแต่ละราย

การเตรียมผู้ป่วยและวิธีการเก็บสิ่งส่งตรวจเพื่อวัดปริมาณเอชไอวีชนิดที่ 1 ในเลือด

ไม่ควรตรวจหาปริมาณไวรัสในผู้ป่วยที่อยู่ระหว่างมีการติดเชื้อต่าง ๆ เช่นการติดเชื้อ herpes simplex virus (HSV) การติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infections) การติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอย่างเฉียบพลัน (acute respiratory infections) หรือได้รับวัคซีนต่าง ๆ เช่น influenza, tetanus และการติดเชื้อพวก pneumococcus เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันจะถูกกระตุ้นทำให้ผลการตรวจที่ได้ผิดจากความเป็นจริง เพราะในช่วงนั้นไวรัสจะเพิ่มจำนวนเท่ากับหรือมากกว่า 10 เท่า (1 $\log_{10}$)^{15,17-19} ควรใช้พลาสมาในการตรวจและหลอดเก็บตัวอย่างเลือดต้องให้หลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และใช้หลอดพลาสติกปราศจากเชื้อ ห้ามใช้สารเฮพาริน (heparin) เพราะจะมีผลต่อขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์²⁰ และต้องทำการปั่นแยกพลาสมาออกจากหลอดเลือด EDTA ภายใน 4-6 ชั่วโมง ถ้าช้ากว่านี้จะทำให้ปริมาณไวรัสที่วัดได้ต่ำกว่าความเป็นจริง เนื่องจากการเสื่อมสลายของ HIV-1 RNA สามารถเก็บพลาสมาที่ปั่นแยกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานหลายวัน ถ้าเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่านี้จะเก็บได้นานหลายปี^{21,22} นอกจากนี้ยังมีการใช้หลอดสูญญากาศที่เจาะเก็บเลือดแบบขั้นตอนเดียวชนิด plasma preparation tube (PPT) มาใช้ เพื่อความสะดวกเพราะมีขั้นตอนการเก็บเลือด การแยกพลาสมา และนำส่งพลาสมาในหลอดเดียวกันโดยวิธีนี้จะช่วยคงสภาพของ HIV-1 RNA ได้นานถึง 30 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 4 องศาเซลเซียส²³

ตารางที่ 1 รายละเอียดของชุดตรวจหาปริมาณเอชไอวีในเลือดที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ¹⁶

ชื่อชุดตรวจ	Abbott RealTime HIV-1 (m2000rt)	COBAS [®] AmpliPrep/COBAS [®] TaqMan HIV- 1,v2.0 (Roche)	NucliSense [®] HIV-1 v 1.2 (bioMérieux)	VERSANT [®] HIV-1 RNA 1.0 (kPCR) (Siemens)	Artus HI Virus-1 QS-RGO (Qiagen)
ตำแหน่งของยีนที่ตรวจ	HIV-pol gene	HIV-gag gene (p41), LTR region	HIV-gag gene (p24)	HIV-pol gene	5' LTR region
หลักการของชุดตรวจ	Real-time PCR (Taqman)	Real-time PCR (NASBA)	Real-time PCR (Taqman)	Real-time PCR (Taqman)	Real-time PCR
วิธีการตรวจวัด	Fluorescence	Fluorescence	Fluorescence- Molecular beacons	Fluorescence	Fluorescence
ช่วงค่าความไวที่ตรวจ (copies/ml)	40-11,000,000 copies/ml	20-10,000,000 copies/ml	24-1,000,000 copies/ml	37-11,000,000 copies/ml	112.5-45,000,000 copies/ml
ค่าความไว (%) 95% CI	100 (99.28-100)	100 (99.3-100)	100	99.7 (99.3-100)	100
กลุ่มของเชื้อเอชไอวี ที่ตรวจสอบ (subtypes/HIV-2)	Group M- subtypes A-D, F-H, various CRFs, including CRF01_AE and CRF02_AG; Group N, O, P Does not detect HIV-2	Group M- subtypes A-D, F-H, various CRFs, including CRF01_AE; group O Does not detect HIV-2	Group M- subtypes A-D, F-H, J Does not detect HIV-2	Group M- subtypes A-D, F-H, CRF01_ H, CRF01_AE and CRF02_AG; group O Does not detect HIV-2	Group M- subtypes A-D, F-H Does not detect HIV-2
ชนิดของตัวอย่างตรวจ	Human plasma with ACD solution or EDTA, DBS	Human plasma with EDTA, DBS	Human plasma with EDTA, DBS, tissues	Human plasma with ACD solution or EDTA, DBS	Human plasma with EDTA

ACD = citric acid-citrate-dextrose; CRF = circulating recombinant form; DBS = dried blood spots; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; gag = group specific antigen; HIV = human immunodeficiency virus; LTR = long terminal repeat; NASBA = nucleic acid sequence based amplification; PCR: polymerase chain reaction; pol = polymerase

ตารางที่ 2 เกณฑ์การเริ่มยาต้านเอชไอวีในประเทศไทย^{24,27,28}

อาการทางคลินิก	ระดับซีดี 4 (เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร)	คำแนะนำ
มีความเจ็บป่วยของระยะเอดส์ (AIDS-defining illness)*	เท่าใดก็ตาม	เริ่มยาต้านเอชไอวี
มีอาการ**	เท่าใดก็ตาม	เริ่มยาต้านเอชไอวี
ไม่มีอาการ	< 350	เริ่มยาต้านเอชไอวี
ไม่มีอาการ	≥ 350	ยังไม่เริ่มยาต้านไวรัสให้ติดตามอาการ และตรวจระดับซีดี 4 ทุก 6 เดือน
หญิงตั้งครรภ์	เท่าใดก็ตาม	เริ่มยาต้านเอชไอวีและหยุดยาหลังคลอด ถ้าก่อนการรักษาด้วยยาต้านไวรัสมีระดับซีดี 4 ≥ 350 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร

* ดูตารางที่ 3 ความเจ็บป่วยของระยะเอดส์ (AIDS-defining illness)²⁶

** อาการดังกล่าว ได้แก่ เชื้อราในปาก ตุ่มคันทั่วตัวโดยไม่ทราบสาเหตุ ไข้เรื้อรังไม่ทราบสาเหตุ อูจจาระร่วงเรื้อรัง ไม่ทราบสาเหตุนานกว่า 14 วัน น้ำหนักลดมากกว่าร้อยละ 10 ใน 3 เดือน และ herpes zoster มากกว่า 2 dermatomes

กลุ่มของยาต้านเชื้อเอชไอวี

ปัจจุบันยาต้านเอชไอวี ที่ใช้กันแพร่หลายในประเทศไทย สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่คือ²⁴

1. Nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) ได้แก่ zidovudine (AZT), stavudine (d4T), lamivudine (3TC), didanosine (ddI) และ abacavir (ABC)
2. Non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NNRTIs) ได้แก่ nevirapine (NVP), efavirenz (EFV), etravirine (ETR)
3. Protease inhibitors (PIs) ได้แก่ darunavir (DRV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV), saquinavir (SQV), lopinavir/ritonavir (LPV/r), atazanavir (ATV)
4. Integrase inhibitors ได้แก่ raltegravir (RAL)

ข้อบ่งชี้ในการเริ่มให้ยาต้านเอชไอวี

จุดประสงค์ของการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวีในผู้ที่ไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสมาก่อนคือต้องลดปริมาณไวรัสหรือยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสในพลาสมาให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้คือน้อยกว่า 50 ก๊อปปี้/มิลลิลิตรในเวลา 6 เดือนมิฉะนั้นจะถือว่า

รักษาล้มเหลว^{25,26} สำหรับประเทศไทยเกณฑ์การพิจารณาการเริ่มยาต้านเอชไอวีจะพิจารณาเช่นเดียวกับสากลคือพิจารณาจากทั้งอาการและระดับซีดี 4 เป็นสำคัญ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2 และ 3^{24,27,28}

การวินิจฉัยการรักษาด้วยยาต้านไวรัสล้มเหลว

โดยทั่วไปความล้มเหลวในการรักษาแบ่งเป็น 3 ประเภทคือ ความล้มเหลวทางไวรัสวิทยา (virological failure) ความล้มเหลวทางภูมิคุ้มกัน (immunological failure) และความล้มเหลวทางคลินิก (clinical failure) ซึ่งสามารถตรวจพบความล้มเหลวทางไวรัสได้เร็วที่สุด มีความไวมากที่สุด และเชื่อถือได้มากที่สุด²⁴ โดยมีเกณฑ์การวินิจฉัยคือ เมื่อตรวจพบปริมาณไวรัสในเลือดมากกว่า 400 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร หลังรับประทานยาสม่ำเสมอ 6 เดือนหรือพบว่าไวรัสในเลือดมากกว่า 50 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร หลังรับประทานยาต้านไวรัสอย่างสม่ำเสมอ 12 เดือน²⁴ หรือเมื่อเคยตรวจพบว่าปริมาณไวรัสในเลือดน้อยกว่า 50 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร แล้วกลับมามีค่ามากกว่า 50 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร ในขณะที่รับประทานยาต้านไวรัสอยู่^{24,29} ในกรณีที่ผู้ติดเชื้อมีปริมาณไวรัสอยู่ในช่วง 51–1,000 ก๊อปปี้/มิลลิลิตร อาจเป็นระยะเริ่มของ

ตารางที่ 3 ความเจ็บป่วยของระยะเอดส์ (AIDS-defining illness)^{24,27,28}

Candidiasis of bronchi, trachea or lungs
 Candidiasis, esophageal
 Cervical cancer, invasive
 Coccidioidomycosis, disseminated or extrapulmonary
 Cryptococcosis, extrapulmonary
 Cryptosporidiosis, chronic intestinal (มากกว่า 1 เดือน)
 Cytomegalovirus disease (other than liver, spleen or nodes)
 Cytomegalovirus retinitis (with loss of vision)
 Encephalopathy, HIV-related
 Herpes simplex, chronic ulcer(s) (มากกว่า 1 เดือน) or bronchitis, pneumonitis or esophagitis
 Histoplasmosis, disseminated or extrapulmonary Isosporiasis, chronic intestinal (มากกว่า 1 เดือน)
 Kaposi's sarcoma
 Lymphoma, Burkitt's (or equivalent term)
 Lymphoma, immunoblastic (or equivalent)
 Lymphoma, primary, of brain
 Mycobacterium avium complex or M. Kansasii, disseminated or extrapulmonary
 Mycobacterium tuberculosis, any site (pulmonary or extrapulmonary)
 Mycobacterium, other species or unidentified species, disseminated or extrapulmonary
 Pneumocystis pneumonia
 Pneumonia, recurrent
 Progressive multifocal leukoencephalopathy
 Salmonella septicemia, recurrent
 Toxoplasmosis of brain
 Wasting syndrome due to HIV

สำหรับในประเทศไทย ให้นับ penicillosis เป็นหนึ่งในความเจ็บป่วยของระยะเอดส์ (AIDS-defining illness) ด้วย²⁷

การรักษาล้มเหลวจริงหรือเป็นการเพิ่มปริมาณเพียงชั่วคราว (viral blip) ซึ่งยังไม่ใช่การรักษาที่ล้มเหลว^{24,30} การตรวจ genotypic resistance testing จะช่วยให้ทราบว่าเชื้อไวรัสมีการกลายพันธุ์และมีการดื้อต่อยาต้านไวรัส ซึ่งการตรวจนี้ควรมีปริมาณไวรัสมากกว่า 2,000 ก๊อปปี้/มิลลิลิตรจึงจะตรวจสอบได้²⁴

การตรวจการดื้อยาต้านเอชไอวีชนิดที่ 1 ทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาการดื้อต่อยาต้านเอชไอวีชนิดที่ 1 ด้วยการตรวจวิเคราะห์ยีนที่ดื้อยา (HIV-1 drug resistant) มีความสำคัญสำหรับแพทย์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประกอบการตัดสินใจการพิจารณา

เลือกและหรือเปลี่ยนสูตรยารักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี ข้อบ่งชี้ในการตรวจคือเมื่อพบว่ามีการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวีล้มเหลวโดยดูจากปริมาณไวรัสในเลือด หรือจากการรักษาด้วยยาต้านเอชไอวีแล้วปริมาณไวรัสไม่ลดลง¹⁵ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการตรวจการดื้อต่อยาต้านเอชไอวียังมีข้อจำกัดคือ ทำได้ในห้องปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งในประเทศไทย มีราคาแพงเพราะต้องใช้เครื่องมือและเทคนิคพิเศษและการแปลผลมีความซับซ้อน วิธีตรวจการดื้อต่อยาต้านเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการที่นิยมใช้กันทั้งในและต่างประเทศมี 3 วิธี ดังนี้คือ^{15,31-34}

1. การตรวจรูปแบบพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ (Genotypic drug resistant testing): เป็นการหาลำดับเบสของยีนของเอชไอวีที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ reverse transcriptase และ protease ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มักเกิดการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อการรักษาด้วยยา เป็นที่นิยมมากในประเทศไทยเนื่องจากมีราคาไม่สูงมากและใช้เวลาในการวิเคราะห์ผลสั้น ปัจจุบันชุดการตรวจจีโนไทป์ที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและถูกออกแบบขึ้นมาให้ใช้กับ เชื้อเอชไอวีกลุ่ม HIV-subtype B มีอยู่ 2 แบบคือ HIV-1 TRUGEN™ Genotyping Assay และ ViroSeq® HIV-1 Genotyping System โดยมีการแปลผลไม่แตกต่างกัน³⁵

2. การตรวจรูปแบบปรากฏหรือฟีโนไทป์ (Phenotypic drug resistant testing): เป็นการวัดความไวของเชื้อเอชไอวีที่แยกมาจากผู้ป่วยต่อต้านเอชไอวีในหลอดทดลอง เป็นการวัดเชิงปริมาณโดยค่าของความไวต่อยาต้านเอชไอวีแต่ละชนิดจะถูกคำนวณออกมาเป็นความเข้มข้นของยาที่สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเอชไอวีในหลอดทดลองได้ร้อยละ 50 หรือร้อยละ 90 ค่าความเข้มข้นของยานี้ถูกเรียกว่า 50% inhibitory concentration (IC50) หรือ 90% inhibitory concentration

3. การตรวจรูปแบบปรากฏเสมือน (Virtual phenotype testing): นำการตรวจฟีโนไทป์ที่สามารถระบุจำนวนเท่าของการดื้อยา (fold resistance) มาใช้ร่วมกับการแปลผลจีโนไทป์ที่สามารถระบุตำแหน่งการกลายพันธุ์บนยีนที่สร้างเอนไซม์ reverse transcriptase และ protease ได้โดยการนำโปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยในการทำนายการดื้อยาต้านเอชไอวี

การแปลผลการดื้อยาต้านเอชไอวีจากผลการตรวจจีโนไทป์

เนื่องจากในปัจจุบันการตรวจที่ส่วนใหญ่คือการตรวจจีโนไทป์ เนื่องจากราคาถูกและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น การวิเคราะห์และแปลผลใช้เทคนิค rules-based algorithm ซึ่งจะทำนายว่าผู้ป่วยจะดื้อยาตัวใดบ้างแต่ไม่สามารถบอกค่าในเชิงปริมาณของการดื้อยาต้านไวรัสแต่ละตัวได้ โดยการแปลผลแบ่งเป็น 4 ระดับ ดังนี้^{34,36}

1. No evidence of resistance: ไม่พบตำแหน่งการกลายพันธุ์ (mutation) ที่สัมพันธ์กับการดื้อยาต้านเอชไอวี
2. Possible resistance: ตรวจพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่มีข้อมูลระบุว่าอาจเกี่ยวข้องกับการดื้อยาโดยในผู้ป่วยบางรายที่พบการกลายพันธุ์ดังกล่าวมีปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นแต่ไม่มาก
3. Resistance: พบตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่ระบุว่าเกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านเอชไอวี โดยในผู้ป่วยแทบทุกรายจะมี

ปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นสูงมาก

4. Insufficient evidence: ยังไม่มีข้อมูลที่จะสามารถนำมาใช้ระบุตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการดื้อยาต้านเอชไอวี

ข้อดีและข้อเสียของการตรวจการดื้อยาต้านเอชไอวีแบบจีโนไทป์³⁷

ข้อดีคือ ทำได้เร็วกว่า ราคาถูกกว่า สามารถตรวจพบการดื้อยาได้เร็วกว่าการตรวจแบบฟีโนไทป์ เพราะอาจตรวจพบการกลายพันธุ์ได้ก่อนเกิดการดื้อยาจริง ข้อเสียคือ เป็นการตรวจการดื้อยาทางอ้อม ไม่สามารถแปลผลที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นหลายตำแหน่งพร้อมกันได้ ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ใหม่และเชื้อในกลุ่ม non-B HIV subtypes ได้

ข้อดีและข้อเสียของการตรวจการดื้อยาต้านเอชไอวีแบบฟีโนไทป์³⁷

ข้อดี คือ เป็นการตรวจการดื้อยาโดยตรงและเป็นการวัดในเชิงปริมาณแปลผลง่าย ใช้ตรวจหาการดื้อยากับยาทั้งชุดเก่าและยาชุดใหม่ สามารถบอกถึงผลที่เกิดจากปฏิริยาของการเกิดการกลายพันธุ์ (interaction of mutation) หลายตำแหน่งพร้อมกันได้ และสามารถตรวจเชื้อในกลุ่ม non-B HIV subtypes ได้ ข้อเสียคือราคาแพงมาก เทคนิคการทำซับซ้อนและใช้เวลานานไม่สามารถแสดงได้ว่าเกิดการกลายพันธุ์ของไวรัสหรือไม่

สรุป

การตรวจวินิจฉัยในระดับอนุโมเลกุลเพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อเอชไอวีในพลาสมาและการตรวจการดื้อยาต้านเอชไอวี มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์เพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาการตัดสินใจของแพทย์ผู้ดูแลรักษาในการติดตามผลการรักษา และการเลือกใช้และ/หรือปรับเปลี่ยนสูตรยาต้านเอชไอวี อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวมีข้อจำกัดคือ มีค่าใช้จ่ายสูงต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและเทคนิคพิเศษทางอนุโมเลกุล สถานที่ให้บริการมีน้อยทั้งในประเทศไทยและประเทศกำลังพัฒนาอื่นๆ ในอนาคตยังต้องการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ใหม่ๆ ให้มีความเหมาะสมและใช้ได้อย่างทั่วถึงกับผู้ติดเชื้อเอชไอวีและผู้ป่วยโรคเอดส์ทุกราย

เอกสารอ้างอิง

- Korenromp EL, Williams BG, Schmid GP, Dye C. Clinical prognosis value of RNA viral load and CD4 cell counts during untreated HIV-1 infection—a quantitative review. *PloS One* 2009; 17: 4: e5950.
- Marschner IC, Collier AC, Coombs RW, D' Aquila RT, DeGruttola V, Fischl MA, et al. Use of changes in plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA to assess the clinical benefit of antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1998; 177: 40–7.
- Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Hammer SM, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society–USA panel. *Clin Infect Dis* 2008; 47: 266–85.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Ray MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343–6.
- Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Li Y, Bailes E, Kostrikis LG, et al. An isolate of human immunodeficiency virus type I originally classified as subtype I represents a complex mosaic comprising three different group M subtypes (A, G, and I). *J Virol* 1998; 72: 10234–41.
- Anderson JP, Rodrigo AG, Learn GH, Madan A, Delahunty C, Coon M, et al. Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E. *J Virol* 2000; 74: 10752–65.
- McCutchan FE. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 2000; 14 (suppl 3): S31–44.
- Binley JM, Wrin T, Korber B, Zwick MB, Wang M, Chappey C. et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* 2004; 78: 13232–52.
- Chen Z, Luckay A, Sodora DL, Telfer P, Reed P, Gettie A. et al. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus–infected sooty mangabeys. *J Virol* 1997; 71: 3953–60.
- Weiss RA. Gulliver's travels in HIVland. *Nature* 2001; 410 (6831): 963–7.
- Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267: 483–9.
- Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR Jr, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, et al. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122: 573–9.
- Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsly S, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society–USA panel. *JAMA* 2008; 300: 555–70.
- Saag MS, Holodniy M, Kuritzkes DR, O' Brien WA, Coombs R, Poscher ME, et al. HIV viral load markers in clinical practice. *Nat Med* 1996; 2: 625–9.
- Caliendo AM, Hill CE. Molecular diagnostics for HIV-1. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, Silverman LM, editors. *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. 2nd ed. New Jersey: Human Press; 2006. p.453–9.
- Alvarez M, Chueca N, Guillot V, Bernal Mdel, Garcia F. Improving clinical laboratory efficiency: Introduction of systems for the Diagnosis and Monitoring of HIV infection. *Open Virol J* 2012; 6: 135–43.
- Donovan RM, Bush CE, Markowitz NP, Baxa DM, Saravolatz LD. Changes in virus load markers during AIDS– associated opportunistic diseases in human immunodeficiency virus– infected persons. *J Infect Dis* 1996; 174: 401–3.

18. O' Brian WA, Grovit-Ferbas K, Namazi A, Namazi A, Ovcak-Derzic S, Wang HJ, et al. Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood* 1995; 86: 1082–9.
19. Staprans SI, Hamilton BL, Follansbee SE, Elbiek T, Banbosa P, Grant RM, et al. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1 infected individuals. *J Exp Med* 1995; 182: 1727–37.
20. Boom R, Sol CJ, Salimans M, Jansen C, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495–503.
21. Sebire K, McGavin K, Land S, Middleton T, Birch C. Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 493–8.
22. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, Bremer J, Ganai R, Cassol S, et al. Determinations of levels of human immunodeficiency virus type I RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome. TUBE Meeting Workshop Attendees. Technology Utilization for HIV-1 Blood Evaluation and Standardization in Pediatrics. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1471–9.
23. Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, Muligan G, Witt D, Romano JW, et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2886–93.
24. Sungkanuparph S, Techasathit W, Utaipiboon C, Chasombat S, Bhakeechep S, Leechawengwongs M, et al. Thai national guidelines for antiretroviral therapy in HIV-1 infected adults and adolescents 2010. *Asian Biomed* 2010; 4: 515–28.
25. Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, Schooley RT, Jacobsen DM, et al. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendation of the International AIDS Society USA panel. *Top HIV Med* 2006; 296: 827–43.
26. Rabound JM, Rae S, Hogg RS, Yip B, Sherlock CH, Harrigan PR, et al. Suppression of plasma viral load below the detection limit of a human immunodeficiency virus kit is associated with longer virologic response than suppression below the limit of quantitation. *J Infect Dis* 1999; 180: 1347–50.
27. CDC 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992; 41(RR-17): 1–19.
28. Supparatpinyo K, Chiewchanvit S, Hirunsri P, Uthammachai C, Nelson KE, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 871–4.
29. Greub G, Cozzi-Lepri A, Ledergerber B, Staszewski S, Perrin L, Miller V, et al. Intermittent and sustained low-level HIV viral rebound in patients receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16: 1967–9.
30. Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, Monie D, Han Y, Parsons T, et al. Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 2005; 293: 817–29.
31. Dunne AL, Mitchell FM, Coberly SK, Hellmann NS, Hoy J, Mijch A, et al. Comparison of genotyping and phenotyping methods for determining susceptibility of HIV-1 to antiretroviral drugs. *AIDS* 2001; 15: 1471–5.
32. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Spring 2008. *Top HIV Med* 2008; 16: 62–8.
33. Demeter L, Haubrich R. International perspectives on antiretroviral resistance. Phenotypic and genotypic resistance assays: methodology, reliability, and interpretations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26 (suppl 1) : S3–9.

34. Sen S, Tripathy SP, Paranjape RS. Antiretroviral drug resistance testing. *J Postgrad Med* 2006; 52: 187-93.
35. Fontaine E, Riva C, Peeters M, Schmit JC, Delaporte E, Van Laethem K, et al. Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28: 254-8.
36. Caliendo AM. Human immunodeficiency virus type 1. In: Leonard DGB, Bagg A, Caliendo AM, Kaul KL, Van Deerlin VM, editors. *Molecular pathology in clinical practice*. New York: Springer; 2007. p. 399-424.
37. Wilson LE, Gallant JE. HIV/AIDS: the management of treatment-experienced HIV-infected patient: new drugs and drug combinations. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 214-21.