การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 จากตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับโดยตรงด้วยวิธี real-time PCR

วิโรจน์ พวงทับทิม[1] รัชณีกร ใจซื่อ[1] นวลจันทร์ วิจักษณ์จินดา[2] และ อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์[3]

[1]สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

[2]สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

[3]สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000

บทคัดย่อ การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อโดยวิธี real-time PCR ด้วยตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับ (dried blood spot: DBS) ทำให้เข้าถึงการบริการการตรวจได้ง่าย เพื่อให้ได้วิธีตรวจที่สะดวกและประหยัดเวลามากขึ้นโดยตัดขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรม คณะผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการตรวจตัวอย่าง DBS โดยตรงด้วยวิธี real-time PCR (direct DBS real-time PCR) และเปรียบเทียบวิธีดังกล่าวที่ใช้ชุดน้ำยา Coyote Bioscience กับวิธีปัจจุบันที่มีการสกัดตัวอย่างก่อนการตรวจด้วยชุดน้ำยา KAPA Probe Fast qPCR kit โดยใช้ primer และ probe ชุดเดียวกัน ประเมินขีดจำกัดของการทดสอบ (limit of detection: LOD) โดยการตรวจสารพันธุกรรม HIV-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยง 8E5 ประเมินความไวและความจำเพาะโดยการตรวจ DBS ที่เหลือจากงานบริการที่ส่งตรวจวินิจฉัย ณ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2559–2561 รวม 287 ตัวอย่าง ประกอบด้วยตัวอย่างติดเชื้อ 88 ตัวอย่าง ไม่ติดเชื้อ 199 ตัวอย่าง พบว่า LOD ของวิธี direct DBS real-time PCR และวิธีปัจจุบันเท่ากับ 200 และ 500 cells/mL ของเลือด ตามลำดับ โดยวิธี direct DBS real-time PCR มีความไวร้อยละ 100 (88/88) ความจำเพาะร้อยละ 90.5 (180/199) และมีความสอดคล้องกับสภาวะการติดเชื้อร้อยละ 93.4 (268/287) ที่ kappa เท่ากับ 0.853 ($p < 0.001$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธี direct DBS real-time PCR นอกจากลดระยะเวลาการตรวจวิเคราะห์ได้แล้ว ยังมี LOD ดีกว่าวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องผลบวกปลอม การพัฒนาปรับปรุงให้วิธีนี้มีความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 99.5 ตามมาตรฐานกำหนดของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา จะทำให้สามารถนำวิธีนี้มาใช้งานบริการได้ในอนาคต

คำสำคัญ: การตรวจวินิจฉัย HIV-1, real-time PCR, ตัวอย่างหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับโดยตรง

Corresponding author E-mail: wiroj.p@dmsc.mail.go.th

Received: 30 September 2021 *Revised: 8 December 2021* *Accepted: 3 Feburaury 2022*

บทนำ

การให้บริการตรวจวิเคราะห์หาการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์และเครือข่ายศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 12 แห่ง ในปัจจุบันใช้วิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง (in-house)[1-3] ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ คือ การสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างส่งตรวจ การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายและการตรวจวัดสัญญาณแบบ real-time เป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถใช้ตรวจตัวอย่างที่มีปริมาตรน้อย เช่น ตัวอย่างชนิดหยดเลือดแห้งบนกระดาษซับ (dried blood spot: DBS) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ผู้ใช้บริการตรวจทางห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยม เนื่องจากมีความสะดวกในการเก็บรักษาสภาพและการขนส่งตัวอย่าง อีกทั้งยังลดโอกาสการปนเปื้อนเชื้อโรคและอันตรายที่เกิดจากการแตกหักของหลอดบรรจุตัวอย่าง ทำให้เพิ่มโอกาสในการเข้าถึงบริการตรวจของประชาชน

การตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR มีข้อดีกว่าวิธี PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) คือ ลดเวลาในการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากไม่มีขั้นตอนการทำเจลอิเล็กโทรโฟเรซีส (gel electrophoresis) เพื่อตรวจสอบสารพันธุกรรมเป้าหมายที่เพิ่มจำนวน และลดโอกาสการเกิดผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนของ PCR product อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจวิเคราะห์ของเครือข่ายห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้บริการในปัจจุบันยังมีช่องว่างที่สามารถพัฒนา เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการให้บริการ โดยขั้นตอนที่มีความเป็นไปได้ คือ ขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมจากสิ่งส่งตรวจชนิด DBS ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญและใช้ระยะเวลาในการปฏิบัติงานประมาณหนึ่งชั่วโมง

ปัจจุบัน DBS เป็นตัวอย่างที่ได้รับการยอมรับในการตรวจวินิจฉัยโรคในเด็ก[4-6] เช่น การตรวจหาภาวะพร่องไทรอยด์ฮอร์โมน และการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อ HIV-1 เพราะมีความสะดวกในการเก็บและขนส่งตัวอย่าง แต่ตัวอย่าง DBS มีสารยับยั้ง PCR (inhibitor) จากเลือด เช่น โปรตีน โลหะหนัก ฮีโมโกลบิน หรือเยื่อกระดาษที่นำมาใช้เป็นกระดาษซับเลือด ขั้นตอนการสกัด DNA ออกจากกระดาษจะลดความคลาดเคลื่อนของผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ[7] มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ตัวอย่างจากเลือด (whole blood) หรือ DBS โดยตรงในการทำ PCR โดยไม่มีขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมออกจากตัวอย่าง[8-11] จำเป็นต้องใช้น้ำยา PCR ชนิดพิเศษ เช่น ใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถทนต่อสารยับยั้ง และปรับปรุงชนิดส่วนประกอบ ความเข้มข้นของเกลือ (salt composition) และกลุ่มสาร detergent รวมทั้งเพิ่มขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกออกและ DNA หลุดจากนิวเคลียส เพื่อทำให้ประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายเกิดได้ดีขึ้น

แม้ว่าเทคโนโลยีน้ำยา PCR แบบใหม่นี้จะสามารถลดขั้นตอนการปฏิบัติงานในส่วนของการสกัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจแบบ DBS ได้ และอาจมีความไวเพียงพอที่จะใช้การตรวจวิเคราะห์ในงานบริการประจำ แต่ยังขาดข้อมูลประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคการตรวจ DBS โดยตรงในกลุ่มตัวอย่างศึกษาทางคลินิก[12] ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยใช้ตัวอย่าง DBS ของเด็กไทยอายุน้อยกว่า 24 เดือน ที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ HIV-1 เพื่อประเมินประสิทธิภาพการตรวจในด้านความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจตัวอย่าง DBS โดยตรงด้วยวิธี real-time PCR (direct DBS real-time PCR) เปรียบเทียบกับวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างศึกษา

ชุดตัวอย่างเพื่อประเมินขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์

เตรียมชุดตัวอย่าง (sample panel) โดยนำเซลล์ 8E5 (CRL-8993, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) ซึ่งเป็น Human Lymphoblastic Leukemia ที่มีสารพันธุกรรม whole genome ของเชื้อไวรัส HIV-1 จำนวน 1 ชุดต่อเซลล์ (1 copy/cell) มานับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง

อัตโนมัติ (Sysmex XT-1800i cell counter, Sysmex Coperation, Chuo-ku, Kobe, Japan) แล้วจึงเตรียมความเข้มข้นเซลล์ 8E5 ที่ 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 cells/mL ด้วยการเติมเซลล์ 8E5 ลงในเลือดครบส่วน (whole blood) จากผู้บริจาคที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่น้อยกว่า 4,000 cells/μL และมีผลตรวจการติดเชื้อ HIV-1 เป็นลบ (negative) ด้วยวิธีมาตรฐานการตรวจคัดกรองเลือดบริจาคของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ผสมเซลล์ 8E5 และเลือดให้เข้ากันดีแล้วหยดส่วนผสมปริมาตร 50 μL ลงบนกระดาษซับเลือด 903 Thailand NBS card (Eastern Business Forms Inc, Mauldin, SC, USA) ที่มีรอยพิมพ์วงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 mm จำนวน 6 วงต่อกระดาษซับเลือด 1 แผ่น ผึ่งตัวอย่างให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ในที่ร่ม ไม่น้อยกว่า 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างศึกษาทางคลินิก (clinical samples)

ตัวอย่าง DBS ของเด็กที่มีการส่งตัวอย่างตรวจอย่างน้อย 2 ครั้ง ในช่วงอายุระหว่าง 1 วัน ถึง 12 เดือน และมีผลตรวจทางซีโรโลยี เพื่อสรุปสถานะการติดเชื้อรายบุคคลที่อายุ 24 เดือน[13-15] โดยเป็นสิ่งส่งตรวจที่เหลือ (left over samples) จากงานบริการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 จากแม่สู่ลูก ของสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ระหว่างปี พ.ศ. 2559-2561 จำนวน 287 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ตัวอย่างที่มีผลการตรวจเป็นบวก (positive) ต่อเชื้อ HIV-1 วิธี PCR ติดต่อกันอย่างน้อย 2 ครั้ง ร่วมกับข้อมูลสถานะการติดเชื้อของเด็กที่อายุ 24 เดือน จำนวน 88 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) และตัวอย่างที่มีผลการตรวจเป็นลบ (negative) ต่อเชื้อ HIV-1 วิธี PCR ติดต่อกันอย่างน้อย 3 ครั้ง ร่วมกับข้อมูลสถานะการไม่ติดเชื้อของเด็กที่อายุ 24 เดือน เพื่อศึกษาความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) จำนวน 199 ตัวอย่าง

ตัวอย่างควบคุมคุณภาพการทดสอบ (control samples)

ตัวอย่างกระดาษซับเลือดควบคุมคุณภาพชนิดลบ (DBS negative control sample) เตรียมจากเลือดผู้บริจาคที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่น้อยกว่า 4,000 cells/μL และผลตรวจต่อเชื้อ HIV-1 เป็นลบด้วยวิธีมาตรฐานการตรวจคัดกรองเลือดบริจาค ของศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย แล้วหยดลงบนกระดาษซับเลือด 903 Thailand NBS card จำนวน 6 วงเลือดต่อ 1 แผ่น

ตัวอย่างกระดาษซับเลือดควบคุมคุณภาพชนิดบวก (DBS positive control sample) เตรียมโดยเจือจางเซลล์มาตรฐาน 8E5 (ATCC CRL-8993) ด้วยเลือดผู้บริจาคที่ไม่ติดเชื้อ HIV-1 ให้มีจำนวน 1 cell/μL แล้วหยดลงบนกระดาษซับเลือด 903 Thailand NBS card จำนวน 6 วงเลือดต่อ 1 แผ่น

การขออนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคน

การใช้ตัวอย่างเลือดที่เหลือจากงานบริการการตรวจวิเคราะห์ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาการวิจัยในคน กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลขที่ EC116/62

การตรวจหาเชื้อ HIV-1 วิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง

การเตรียมตัวอย่าง DNA

สกัดตัวอย่าง DBS ที่ใช้เป็นตัวอย่างศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่างศึกษาทางคลินิก และตัวอย่างควบคุมคุณภาพการทดสอบตัวอย่างละ 2 วง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 mm) หรือคิดเป็นปริมาตรของเลือด 100 μL ด้วยวิธีมาตรฐานชุดน้ำยา QIAsymphony DSP DNA (QIAGEN, Hilden, Germany) ด้วยเครื่องสกัดอัตโนมัติ QIAsymphony® Automate Extraction (QIAGEN, Hilden, Germany) ได้ตัวอย่าง DNA ปริมาตร 50 μL เก็บที่ -20˚C จนกว่าจะใช้งาน

การตรวจ real-time PCR

การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัส HIV-1 ใช้การตรวจ *LTR* gene และใช้การตรวจ human *RNAseP* gene เพื่อเป็น internal control ด้วยวิธี Duplex real-time PCR[1] โดยผสมน้ำยาสำเร็จรูป KAPA Probe Fast qPCR kit (KAPA Biosystems, MA, USA) กับ HIV-1 *LTR* primer/probe และ human *RNAseP* primer/probe ในปริมาตร 15 μL รายละเอียดลำดับนิวคลิโอไทด์และความเข้มข้นของ primers และ probes ดังแสดงในตารางที่ 1 เติม

DNA 5 µL รวมเป็นส่วนผสมทั้งหมด 20 µL นำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและอ่านผลด้วยเครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) โดยตั้งการทำงาน pre-amplification ที่ 50˚C นาน 2 นาที และ 95˚C นาน 2 นาที หลังจากนั้นทำ PCR จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย denature step ที่ 95˚C นาน 15 วินาที annealing และ extension step ที่ 52˚C นาน 30 วินาที

การควบคุมคุณภาพและแปลผล

การตรวจตัวอย่างทดสอบ มีการตรวจตัวอย่างควบคุมชนิดบวกและชนิดลบควบคู่ด้วยทุกครั้ง โดยใช้ตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่มี HIV-1 DNA ที่ 5 copies/reaction ต้องพบสัญญาณของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ HIV-1 *LTR* gene ที่มีค่า Cycle threshold (Ct) ต่ำกว่า 35 และพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ human *RNAseP* gene มีค่า Ct ต่ำกว่า 25 ส่วนตัวอย่างควบคุมชนิดลบ พบเฉพาะสัญญาณการเพิ่มปริมาณของ human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่าง DNA ที่พบค่า Ct ใน *LTR* gene และ human *RNAseP* gene ครบทั้ง 2 ยีน จะถูกแปลผลตรวจเป็นบวก ส่วนตัวอย่างตรวจลบจะตรวจพบเฉพาะ Ct ของ human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบค่า Ct ของทั้ง 2 ยีน จะรายงานผลว่าตรวจวิเคราะห์ไม่ได้ (invalid)

การตรวจหาเชื้อ HIV-1 ด้วยวิธีการตรวจตัวอย่าง DBS โดยตรงด้วยวิธี real-time PCR (direct DBS real-time PCR)

การเตรียมตัวอย่าง DNA

เจาะ DBS ที่เป็นตัวอย่างศึกษา LOD ตัวอย่างศึกษาทางคลินิก และตัวอย่างควบคุมคุณภาพชนิดบวกและชนิดลบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 mm (คิดเป็นปริมาตรของเลือด 3 µL/ตัวอย่าง)[16,17] จำนวนตัวอย่างละ 1 วง เพื่อนำไปทำ PCR ในขั้นตอนถัดไป

การตรวจ real-time PCR

ผสมน้ำยา DirectDetect™ QRT-PCR kit (Coyote Bioscience, Beijing, China) กับ primers และ probes ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นเช่นเดียวกับวิธีการที่ใช้ชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง ในปริมาตร 50 µL ใส่ DBS ที่เจาะไว้ 1 วง นำไปเพิ่ม

ตารางที่ 1 รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของ primers/probes ที่ใช้การศึกษา[1]

Target gene	Final concention (nM)	Primer and probe sequence (5'-3')	GenBank Accession no.
HIV-1 *LTR* gene (89 bp)			**AF033819.3**
forward primer	300	TGCTTAAGCCTCAATAAAGCTT-GCCTTGA	61- 89
reverse primer	500	TCTGAGGGATCTCTAGTTACCAG	127-149
probe	400	FAM-AAGTAGTGTGTGCCC-GTCTGT-BHQ	97-117
Human *RNAseP* gene (65 bp)			**AK296196.1**
forward primer	100	AGATTTGGACCTGCGAGCG	28-46
reverse primer	200	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	73-92
probe	400	HEX-TTCTGACCTGAAGGCTCT-GCGC-TAMRA	49-71

ปริมาณสารพันธุกรรมและอ่านผลด้วยเครื่อง Mini8 Real-Time PCR System (Coyote Bioscience, Beijing, China) ซึ่งตั้งการทำงานไว้เพื่อทำ pre-amplification ที่ 95˚C นาน 5 วินาที ที่ 45˚C นาน 5 วินาที จำนวน 15 รอบ ที่ 95˚C นาน 60 วินาที อีก 1 รอบ แล้วจึงทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วย denature step 95˚C นาน 5 วินาที annealing และ extension step ที่ 52˚C นาน 30 วินาที จำนวน 45 รอบ

การควบคุมคุณภาพและแปลผล

การตรวจตัวอย่างทดสอบ มีการตรวจตัวอย่างควบคุมชนิดบวกและชนิดลบควบคู่ด้วยทุกครั้ง โดยตัวอย่างควบคุมชนิดบวกที่มี HIV-1 DNA ที่ 3 copies/reaction ต้องพบสัญญาณของการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ HIV-1 *LTR* gene มีค่า Ct ต่ำกว่า 21 และพบสัญญาณการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ human *RNAseP* gene มีค่า Ct ต่ำกว่า 13 ส่วนตัวอย่างควบคุมชนิดลบ พบเฉพาะสัญญาณการเพิ่มปริมาณของ human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่าง DNA ที่พบค่า Ct ใน *LTR* gene และ human *RNAseP* gene ครบทั้ง 2 ยีน จะถูกแปลผลตรวจเป็นบวก ส่วนตัวอย่างตรวจลบจะตรวจพบเฉพาะ Ct ของยีน human *RNAseP* gene เท่านั้น ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบค่า Ct ของทั้ง 2 ยีน จะรายงานผลว่าตรวจวิเคราะห์ไม่ได้

การประเมินผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การประเมินความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity)

หาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HIV-1 วิธี real-time PCR ในชุดตัวอย่างสำหรับศึกษาขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ที่มีความเข้มข้นเซลล์ 8E5 ระหว่าง 25–600 cell/mL ตรวจวิเคราะห์ 10 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น โดยค่า LOD คือ ค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ต่ำสุด ที่ยังคงให้ผลการทดสอบเป็นบวกในทุกครั้งของการตรวจวิเคราะห์ซ้ำ

การประเมินความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) ความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) และความสอดคล้องของวิธีการตรวจ (agreement)

ประเมินความไวทางคลินิก ความจำเพาะทางคลินิก และความสอดคล้องของการทดสอบ โดยเปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เชื้อ HIV-1 ด้วยวิธี real-time PCR ในตัวอย่าง DBS ที่เหลือจากงานบริการกับผลอ้างอิง (สถานะการติดเชื้อ HIV-1 ของเด็ก) คำนวณค่าร้อยละของความไว ความจำเพาะ ความสอดคล้อง และระดับของความสอดคล้องของวิธีการตรวจ ด้วยสถิติสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน (Cohen's kappa coefficient) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ รายละเอียดวิธีการคำนวณความไว ความจำเพาะ และความสอดคล้องของวิธีการตรวจดังแสดงในตารางที่ 2

ความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) คือ วิธีการทดสอบแสดงผลเป็นบวก เมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิงที่มีสถานภาพติดเชื้อ คำนวณได้จาก

$$\%\text{sensitivity} = \{a/(a+b)\} \times 100$$

ความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) คือ วิธีการทดสอบแสดงผลเป็นลบ เมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้างอิงที่มีสถานภาพไม่ติดเชื้อ คำนวณได้จาก

$$\%\text{specificity} = \{d/(c+d)\} \times 100$$

ความสอดคล้องของวิธีการตรวจ คือ วิธีการทดสอบแสดงผลตรงกันกับสถานภาพของตัวอย่างอ้างอิง คำนวณได้จาก

$$\%\text{agreement} = \{a+d/(a+b+c+d)\} \times 100$$

ตารางที่ 2 วิธีการคำนวณความไวทางคลินิก ความจำเพาะทางคลินิก และความสอดคล้องของการวิธีการตรวจ

		ผลอ้างอิง (สถานะการติดเชื้อ HIV-1 ของเด็ก)		
		ติดเชื้อ	ไม่ติดเชื้อ	รวม
ผลการทดสอบที่ได้จากวิธีการตรวจ	ผลบวก	a	c	a+c
	ผลลบ	b	d	b+d
	รวม	a+b	c+d	a+b+c+d

ผล

ความไวเชิงวิเคราะห์ (analytical sensitivity) ของการตรวจหาเชื้อ HIV-1 ด้วยวิธี direct DBS real-time PCR

การตรวจเซลล์ 8E5 ที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-600 cells/mL พบว่าขีดจำกัดของการตรวจวิเคราะห์ (LOD) วิธี real-time PCR โดยวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง มี LOD อยู่ที่ 500 cells/mL หรือคิดเป็น 5 DNA copies/reaction ในขณะที่วิธี direct DBS real-time PCR มี LOD อยู่ที่ 200 cells/mL หรือคิดเป็น 0.6 DNA copies/reaction ดังแสดงในตารางที่ 3

ความไวทางคลินิก (clinical sensitivity) ความจำเพาะทางคลินิก (clinical specificity) ความสอดคล้องของวิธีการตรวจ (agreement) และค่าสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน (Cohen's kappa coefficient)

จากตัวอย่างกระดาษซับเลือดทั้งหมด 287 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 88 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่ติดเชื้อจำนวน 199 ตัวอย่าง วิธีการตรวจหาเชื้อ HIV-1 ด้วย direct DBS real-time ให้ผลการตรวจตรงกับสถานะการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่อายุ 24 เดือน จำนวน 88 ตัวอย่าง คิดเป็นความไวทางคลินิก ร้อยละ 100 แต่ให้ผลลบตรงกับสถานการณ์ไม่ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 180 ตัวอย่าง คิดเป็นความจำเพาะ

ตารางที่ 3 ความไวในการตรวจวิเคราะห์ (analytical sensitivity) ของการตรวจหาเชื้อ HIV-1 real-time PCR โดยวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เองและวิธี direct DBS real-time PCR

ความเข้มข้นของเซลล์ 8E5 ที่เจือจางด้วยเลือด (cells/mL)	วิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง			วิธี direct DBS real-time PCR		
	ความเข้มข้น DNA จากปริมาตรเลือด 10 µL (copies/reaction)	Positive (n/n)	% positive	ความเข้มข้น DNA จากปริมาตรเลือด 3 µL (copies/reaction)	Positive (n/n)	% positive
25	0.25	0/10	0	0.075	0/10	0
50	0.5	0/10	0	0.15	5/10	50
100	1.0	0/10	0	0.3	7/10	70
200	2.0	4/10	40	0.6*	10/10	100
300	3.0	6/10	60	0.9	10/10	100
400	4.0	8/10	80	1.2	10/10	100
500	5.0**	10/10	100	1.5	10/10	100
600	6.0	10/10	100	1.8	10/10	100

*วิธี direct DBS real-time PCR มี LOD ที่ 0.6 DNA copies/reaction หรือคิดเป็นความเข้มข้นของเซลล์ที่ติดเชื้อ 200 cells/mL

**วิธี real-time PCR โดยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเองที่ให้บริการในปัจจุบัน มี LOD ที่ 5.0 DNA copies/reaction หรือคิดเป็นความเข้มข้นของเซลล์ที่ติดเชื้อ 500 cells/mL

ร้อยละ 90.5 คิดเป็นค่าสอดคล้อง (agreement) ร้อยละ 93.4 (95% CI: 89.9-96.0) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์แคปปาของโคเฮน (Cohen's kappa coefficient) เท่ากับ 0.853 ($p < 0.001$) โดยพบผลบวกปลอมจำนวน 19 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 9.5 (95% CI: 5.8-14.5) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสอดคล้องของผลการตรวจหาเชื้อ HIV-1 วิธี real-time PCR โดยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเองที่ให้บริการในปัจจุบันและวิธี direct DBS real-time PCR ในตัวอย่างส่งตรวจ (clinical samples ที่ทราบสถานภาพการติดเชื้อ HIV-1 ของเด็กที่อายุ 24 เดือน

วิธีการตรวจ		สถานภาพการติดเชื้อ HIV-1 ในตัวอย่างส่งตรวจ (n = 287)	
		ติดเชื้อ (n = 88)	ไม่ติดเชื้อ (n = 199)
วิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง	ผลบวก	88	0
	ผลลบ	0	199
วิธี direct DBS real-time PCR	ผลบวก	88*	19
	ผลลบ	0	180**

*sensitivity = 100%, **specificity = 90.5%, agreement = 93.4%, kappa = 0.853 ($p < 0.001$)

วิจารณ์

จากการทดสอบด้วยเซลล์ 8E5 ที่ใช้เป็นตัวแทนของการตรวจหายีนเป้าหมายของเชื้อ HIV-1 ในตัวอย่างหยดเลือดแห้งที่เก็บบนกระดาษซับ น้ำยาตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ HIV-1 วิธี direct DBS real-time PCR มีค่า LOD เท่ากับ 200 cells/mL ดีกว่าวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง ที่มี LOD เท่ากับ 500 cells/mL ซึ่งใช้ตัวอย่าง DBS ขนาด 3 mm เพียง 1 ชิ้น หรือเท่ากับปริมาตรเลือดเพียง 3 µL โดยใส่ตัวอย่างส่งตรวจลงไปในน้ำยาทำ PCR ได้โดยตรง ไม่ต้องมีกระบวนการสกัด DNA ทำให้ได้สารพันธุกรรมทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างนั้น ต่างจากการตรวจด้วยวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เอง ที่มีกระบวนการสกัดตัวอย่างหลายขั้นตอน ตั้งแต่การละลายสารพันธุกรรมออกจากกระดาษ การกำจัดสารรบกวนปฏิกิริยา การล้างทำความสะอาดและการชะสารพันธุกรรมออกในรูปแบบสารละลายที่พร้อมนำมาใช้ในการทำ PCR ซึ่งอาจทำให้เกิดการสูญหายของ DNA ในระหว่างกระบวนการดังกล่าว[18]

การตรวจหาการติดเชื้อ HIV-1 วิธี direct DBS real-time PCR ในตัวอย่าง clinical samples จากเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ พบผลตรวจเป็นบวกปลอมจากตัวอย่างที่มีสถานะไม่ติดเชื้อ HIV-1 ร้อยละ 9.5 (19/199 ตัวอย่าง) ในปัจจุบัน วิธีที่ให้บริการด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เองให้ผลตรงกับสถานภาพการติดเชื้อ HIV-1 ของทุกตัวอย่าง ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดย direct DBS real-time PCR ที่ขัดแย้งกับสถานะการติดเชื้ออาจเกิดจากขั้นตอนการทำ pre-amplification จำนวน 15 รอบ จากการทำ amplification จำนวน 45 รอบ จึงเหมือนกับเป็นการทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำถึง 2 ครั้ง รวม 60 รอบ ในขณะที่การทำปฏิกิริยา PCR ด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นเอง มีการทำ amplification จำนวน 45 รอบ ครั้งเดียวเท่านั้น ซึ่งโดยทั่วไปการทำ PCR มีข้อแนะนำให้ทำการเพิ่มจำนวนไม่เกิน 45 รอบ[19,20] และการมีขั้นตอน pre-amplification อาจทำให้เกิด amplification bias เนื่องจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณสัญญาณของ target gene เป็นจำนวนหลายเท่า (fold) จากจำนวนของ gene target

ที่มีอยู่จริงในตัวอย่าง ทำให้เกิดการอ่านผลแบบการเป็นตัวแทนมากเกินไป (overrepresentation) ซึ่งมีแนวโน้มที่ทำให้เกิดสัญญาณการอ่านเป็นผลบวกปลอมได้[21] อย่างไรก็ตามชุดน้ำยาที่มีขั้นตอนการทำ pre-amplification มีข้อดีในกรณีที่ตัวอย่างมีสารพันธุกรรมเป้าหมายปริมาณน้อยหรือจำกัด

การอ่านผลการตรวจด้วยเครื่อง Mini8 Real-Time PCR System ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับน้ำยาตรวจ DirectDetect™ QRT-PCR kit ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากผู้ผลิตเดียวกัน โดยตัวรับสัญญาณแสง fluorescence (detector) เป็นเทคโนโลยีและความลับของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งตัวรับสัญญาณแสงถูกออกแบบให้มีความจำเพาะและความไวของการตรวจจับสัญญาณ fluorescence ที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ด้วยน้ำยาของบริษัทในระดับสูง[22] ซึ่งแตกต่างจากวิธีที่ให้บริการในปัจจุบันด้วยชุดน้ำยาตรวจที่พัฒนาขึ้นใช้เองที่ใช้เครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้กันแพร่หลาย โดยพบว่าเมื่อใช้ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของจำนวนยีนเป้าหมายที่เท่ากัน เครื่อง Mini8 Real-Time PCR System ให้ค่า Ct ต่ำกว่าค่าที่อ่านได้จากเครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System ประมาณ 10 cycles (ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งเป็นการอ่านค่า Ct แบบอัตโนมัติที่ไม่สามารถปรับค่า threshold แบบ manual ได้ นอกจากนี้ เครื่อง Mini8 Real-Time PCR System มีระบบการอ่านสัญญาณแสงในแนวระนาบที่สูงกว่าตำแหน่งกระดาษ DBS ที่อยู่ก้นหลอด ทำให้ใช้ได้กับหลอดปฏิกิริยาแบบแถว (strip tube) หรือแบบหลอดที่วางในแนวแถวเดี่ยวเท่านั้นและจำกัดจำนวนตัวอย่างตรวจสูงสุดได้เพียง 8 ตัวอย่าง และวิธี direct DBS real-time PCR ด้วย ในขณะที่เครื่อง ABI 7300 Real-Time PCR System มีระบบการอ่านสัญญาณแสงในแนวดิ่งเหมือนเครื่อง real-time PCR ทั่วไป ซึ่งจะไม่สามารถอ่านค่าสัญญาณแสง fluorescence จากวิธี direct DBS real-time PCR เพราะถูกบังด้วยกระดาษ DBS ที่อยู่ก้นหลอด

การนำวิธี direct DBS real-time PCR มาใช้ในการให้บริการของสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ให้เหมาะสม เช่น ปรับลดรอบของการทำ amplification หรือ pre-amplification อาจทำให้ลดโอกาสเกิดผลบวกปลอม และยังลดเวลาในการทำปฏิกิริยาให้สั้นลงได้อีก

การเพิ่มตัวอย่างศึกษาทางคลินิก (clinical samples) ให้เป็นไปตามมาตรฐานการประเมินชุดน้ำยาที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนด (ตัวอย่างติดเชื้ออย่างน้อย 100 ตัวอย่าง และตัวอย่างไม่ติดเชื้ออย่างน้อย 700 ตัวอย่าง)[23] แม้ว่าจากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพันธุกรรม primer/probe ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความจำเพาะต่อเป้าหมาย HIV-1 *LTR* gene (in silico analysis) และไม่จับกับยีนของเชื้ออื่น ๆ (ข้อมูลที่ไม่ได้เผยแพร่) คณะผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษาการเกิด cross reactivity ของวิธีการตรวจที่อาจเกิดจากการติดเชื้ออื่น ๆ เพิ่มเติมต่อไป เช่น Hepatitis B virus, Hepatitis C virus และ Dengue virus เป็นต้น

สรุป

วิธี direct DBS real-time PCR มีความไวในเชิงวิเคราะห์สูง เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวกรวดเร็ว และไม่มีขั้นตอนสกัดสารพันธุกรรม จึงลดเวลาการตรวจวิเคราะห์ มีความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ทางห้องปฏิบัติการสำหรับเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อ การพัฒนาและปรับปรุงให้วิธีการมีความจำเพาะที่สูงขึ้น รวมทั้งประเมินวิธีการตรวจด้วยจำนวนตัวอย่างตามที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยากำหนดในเรื่องชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งกำหนดเกณฑ์การทดสอบหรือวิเคราะห์ชุดตรวจที่ตรวจหากรดนิวคลิอิกเพื่อการวินิจฉัยรายบุคคล กำหนดเกณฑ์ความไวเชิงวิเคราะห์ที่ 100% ของจำนวนตัวอย่างไม่น้อยกว่า 100 ตัวอย่าง และความจำเพาะเชิงวินิจฉัยที่ 99.5% ของจำนวนตัวอย่าง ไม่น้อยกว่า 700 ตัวอย่าง[23] จะทำให้สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในการให้บริการได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และขอขอบคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างโลหิตบริจาคผู้ไม่ติดเชื้อ สถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติ รวมทั้งโรงพยาบาลทั่วไปที่ส่งตรวจตัวอย่างตรวจการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่คลอดจากแม่ที่ติดเชื้อในการให้ข้อมูลสถานะการติดเชื้อของเด็กที่ใช้ในการศึกษานี้

ผลประโยชน์ทับซ้อน

การศึกษาวิจัยนี้ สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ไม่ได้มีผลประโยชน์ทับซ้อน (conflict of interest) ที่เป็นส่วนได้ส่วนเสีย หรือ การรับทุนสนับสนุนการวิจัยจากน้ำยาบริษัท KAPA Probe Fast qPCR kit (KAPA Biosystems, MA, USA) และ น้ำยาบริษัท DirectDetect™ QRT-PCR kit (Coyote Bioscience, Beijing, China) ที่ได้นำมาใช้ในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Luo W, Yang H, Rathbun K, Pau CP, Ou CY. Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1851-7.
2. วิโรจน์ พวงทับทิม, หรรษา ไทยศรี, รัชณีกร ใจซื่อ, สุพรรณี กงแก้ว, ปิ่นทอง นะบาล, นวลจันทร์ วิจักษณ์จินดา และคณะ. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชุดน้ำยาสำหรับการตรวจหาเชื้อเอชไอวี-1 ด้วยวิธี real-time PCR. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ ครั้งที่ 21. วันที่ 16-18 มิถุนายน 2556. โรงแรมเซ็นทาราศูนย์ราชการและคอนเวนชันเซ็นเตอร์ กรุงเทพมหานคร. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2556.
3. หรรษา ไทยศรี, พงษ์นุวัฒน์ ศรีงาม, อาชวินทร์ โรจนวิวัฒน์, รัชณีกร ใจซื่อ, สุธน วงษ์ชีรี. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี-1 วิธีพีซีอาร์ ระหว่างชุดน้ำยาผลิตใช้เอง กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Amplicor HIV-1 test. ว วิชาการสาธารณสุข 2549; 15(2): 215-24.
4. World Health Organization. WHO recommendations on the diagnosis of HIV infection in infants and children. Genève, Switzerland: World Health Organization; 2010.
5. Smit PW, Elliott I, Peeling RW, Mabey D, Newton PN. An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases. Am J Trop Med Hyg 2014; 90(2): 195-210.
6. Jani IV, Meggi B, Mabunda N, Vubil A, Sitoe NE, Tobaiwa O, et al. Accurate early infant HIV diagnosis in primary health clinics using a point-of-care nucleic acid test. J Acquir Immune Defic Syndr 2014; 67(1): e1-4.
7. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. Anal Bioanal Chem 2018; 410(10): 2569-83.
8. Nishimura N, Nakayama T, Tonoike H, Kojima K, Kato S. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. Ann Clin Biochem 2000; 37(Pt 5): 674-80.
9. Mercier B, Gaucher C, Feugeas O, Mazurier C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction. Nucleic Acids Res 1990; 18(19): 5908.
10. Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. Human DNA extraction methods: patents and applications. Recent Pat DNA Gene Seq 2011; 5(1): 1-7.
11. Grunenwald H. Direct PCR from dried blood without DNA extraction using the Failsafe™ PCR system. Epicenter Forum 2001; 8: 4-6.
12. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 2009; 55(4): 611-22.

13. สำนักโรคเอดส์ วัณโรค และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. แนวทางการตรวจรักษาและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีประเทศไทย ปี 2560. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด; 2560.
14. Lolekha R, Boonsuk S, Plipat T, Martin M, Tonputsa C, Punsuwan N, et al. Elimination of mother-to-child transmission of HIV - Thailand. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016; 65(22): 562-6.
15. Naiwatanakul T, Voramongkol N, Punsuwan N, Lolekha R, Gass R, Thaisri H, et al. Uptake of early infant diagnosis in Thailand's national program for preventing mother-to-child HIV transmission and linkage to care, 2008-2011. J Int AIDS Soc 2016; 19(1): 20511. (9 pages).
16. Mei JV, Zobel SD, Hall EM, De Jesús VR, Adam BW, Hannon WH. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. Bioanalysis 2010; 2(8): 1397-403.
17. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. J Nutr 2001; 131(5): 1631S-6S.
18. Rohland N, Hofreiter M. Comparison and optimization of ancient DNA extraction. Biotechniques 2007; 42(3): 343-52.
19. Kadri K. Polymerase chain reaction (PCR): principle and applications. In: Synthetic Biology-New Interdisciplinary Science. London: IntechOpen; 2020. p. 147-163.
20. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp 2012; (63): e3998. (15 pages).
21. Okino ST, Kong M, Sarras H, Wang Y. Evaluation of bias associated with high-multiplex, target-specific pre-amplification. Biomol Detect Quantif. 2016; 6: 13-21.
22. Zhang XA, Li S, Ching J, Feng HY, Yang K, Dolinger DL, et al. A sensitive and specific point-of-care detection assay for Zaire Ebola virus. Emerg Microbes Infect 2017; 6(1): e5. (3 pages).
23. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ชุดตรวจที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อเอชไอวี. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 126 ตอนพิเศษ 179 ง. (วันที่ 14 ธันวาคม 2552). หน้า 17.

HIV-1 Diagnosis from Direct Dried Blood Spot Samples Using real-time PCR

Wiroj Puangtabtim,[1] Ratchaneekorn Jaisue,[1] Nuanjun Wichukchinda,[2] and Archawin Rojanawiwat[3]

[1]*Medical Life Sciences Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

[2]*Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

[3]*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

ABSTRACT Perinatal HIV-1 diagnostic testing by real-time PCR using a dried blood spot (DBS) sample is easily accessible for service delivery. We proposed a novel method, using DBS samples without DNA extraction (direct DBS real-time PCR), which is convenient and less time-consuming. A comparison between the new method using Coyote Bioscience reagent and the current one using KAPA Probe Fast reagent with DNA extraction was performed with the same set of primer/probe. Limit of detection (LOD) was determined by using 8E5 cell line, while clinical sensitivity and specificity were done on 287 leftover DBS specimens sent to the Medical Life Science Institute, Department of Medical Sciences, during 2016 to 2018. Of all the leftover samples, 88 were HIV-1 infected and 199 were non-infected. The LOD of the direct DBS real-time PCR and the current assays were 200 and 500 cells/mL of blood, respectively. The novel method had 100% (88/88) sensitivity and 90.5% (180/199) specificity with 93.4% (268/287) concordant results at kappa score 0.853 ($p < 0.001$). This study showed that the direct DBS real-time PCR was not only less time-consuming, but also more sensitive (lower LOD) than the currently used method. However, optimization to raise the specificity to be higher than 99.5% as per the Thai FDA criteria is needed for use in routine services.

Keywords: HIV-1 diagnosis, real-time PCR, direct dried blood spot samples