

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

ประเมินการทดสอบวิธี PCR ที่ใช้วินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กแรกเกิด

Evaluation of PCR-based Protocols for Diagnosis of HIV-1 Infection in Infants

ปานทิพย์ นันทนาวุฒิ, เอกวิวัฒน์ อุณหเลขกะ,

นิพนธ์ อินทรวัดนา, สมเกียรติ บุญญะบัญชา

*ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สมุทรสงคราม

Nantanawoot P, Unahalekhaka A,

Inwattana N, Boonyabancha S.

*Regional Medical Science Center Samut Songkhram,
Thailand.

บทคัดย่อ :

วิธี PCR เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV ในเด็กแรกเกิดอย่างกว้างขวาง เพราะสามารถตรวจวินิจฉัยได้เร็วกว่าการตรวจทางซีโรโลยี ในการนำวิธีนี้มาใช้งานนั้นต้องมีการพัฒนาปรับใช้ให้เหมาะสมและผ่านการพิสูจน์ว่าใช้งานได้จริง (Validation) และ In house PCR ที่ใช้งานอยู่นี้ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีซีโรโลยีในกลุ่มตัวอย่างผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดที่มีความจำเพาะและความไวร้อยละ 100 อย่างไรก็ตามกลุ่มเด็กแรกเกิดมีสภาพทางสรีรวิทยาต่างจากผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดซึ่งเป็นผู้ใหญ่ ซึ่งอาจให้ผลแตกต่างกันถ้านำมาใช้งานกับกลุ่มเด็กแรกเกิด ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาครั้งนี้ขึ้นจากเด็กแรกเกิดที่มารดามีประวัติติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 361 ราย ตัวอย่างทั้งหมดได้ตรวจ Proviral DNA โดย DNA-PCR และได้ตรวจ Viral RNA โดย RNA-PCR 303 ราย ติดตามผลตรวจวิธีซีโรโลยีหลัง 18 เดือนเพื่อใช้เป็นวิธีอ้างอิง (Gold standard) ได้ 144 ราย (ร้อยละ 39.9) พบว่าในตัวอย่างที่ส่งตรวจครั้งแรกเมื่ออายุน้อยกว่า 6 เดือน ให้ผล RNA-PCR สอดคล้องกับซีโรโลยีร้อยละ 100 (จำนวน 103 ตัวอย่าง) ในขณะที่ DNA-PCR ให้ผลลบลง 2 ราย ประเมินความไว, ความจำเพาะ, ความถูกต้อง, ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก และค่าทำนายความแม่นยำของผลลบ เทากับร้อยละ 80, 100, 98.6, 100 และ 98.5 ตามลำดับ ในขณะที่ RNA-PCR ประเมินได้ร้อยละ 100 ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธี PCR ด้วยกันคือ DNA-PCR กับ RNA-PCR พบว่าให้ผลสอดคล้องกันร้อยละ 98 (298 จาก 304 ตัวอย่าง) พบว่าการตรวจ DNA-PCR มีโอกาสเกิดผลลบลงมากกว่า RNA-PCR สรุปว่า in house PCR ที่ดำเนินการอยู่มีความจำเพาะร้อยละ 100 แต่อาจพบผลลบลงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธี DNA-PCR ดังนั้นเพื่อลดโอกาสการเกิดผลลบลง ควรใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกัน

คำสำคัญ : PCR, HIV-1, Infants

ABSTRACT :

PCR-based procedures are now widely used to diagnose human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in infants due to the early diagnosis more than serological methods. However the method protocol must be optimized and validated. In house PCR protocol was compared with serological method which sensitivity and specificity showed 100% concordance in intravenous drug abusers in recent study. However these subjects have different physiological status from the infant group so the different outcome may be found. Thus the evaluation of these PCR-based protocols were studies in 361 infants born to HIV-1 seropositive mothers. All samples were tested for proviral DNA by DNA-PCR and 303 samples for viral RNA by RNA-PCR. There were 144 from 361 samples (39.9%) came back to follow up serological method after 18 months for gold standard. RNA-PCR showed 100% concordance (103 samples) with serological method while DNA-PCR found 2 false negative samples in the first less than 6 month ages. The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value of DNA-PCR were 80, 100, 98.6, 100, 98.5% respectively. While the sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value of RNA-PCR were 100%. The comparison of DNA-PCR and RNA-PCR showed 98% concordance (298 from 304 samples). DNA-PCR has more false negative than RNA-PCR. In conclusion these in house PCR protocols have 100% specificity but false negative could be found especially DNA-PCR. To decrease false negative rate, both DNA-PCR and RNA-PCR should be included in testing.

Key words : PCR, HIV-1, Infants

บทนำ

วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงจึงนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัย HIV ในเด็กแรกเกิดจากมารดาที่มีประวัติติดเชื้อ HIV กันอย่างกว้างขวาง^{1,2} ช่วยให้สามารถวินิจฉัยเด็กหลังคลอดได้เร็วกว่าการตรวจด้วยวิธีทางซีโรโลยีซึ่งต้องรอ 12-18 เดือน³ วิธี PCR เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยใช้ Oligonucleotide primers ที่ออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับยีนเป้าหมาย (Target sequence) ของ HIV-1 virus เมื่อมีสารตั้งต้น เอ็นไซม์สภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่จากแม่พิมพ์ เมื่อทำซ้ำหลาย ๆ รอบทำให้ได้ผลผลิต PCR product เป็นจำนวนมากจนสามารถ

ตรวจจับได้ จึงเป็นวิธีที่มีความไวสูง และมีโอกาสเกิดผลบวกложงได้ง่ายเช่นกันหากไม่มีการจัดการทางห้องปฏิบัติการที่ดีพอ⁴

จากคุณสมบัติของไวรัส HIV-1 หลังจากเข้าสู่ร่างกายแล้วจะสามารถเปลี่ยน Viral genome ที่เป็น RNA ไปเป็น Complementary DNA (cDNA) แล้วจึงเข้าไปสอดแทรกเป็นส่วนหนึ่งของ chromosomal DNA ของเซลล์เจ้าบ้าน (Host cells) ที่ติดเชื้อเรียกว่า Proviral DNA แฝงอยู่จนกว่าจะมีการกระตุ้นให้สร้างสารพันธุกรรมชนิด RNA และองค์ประกอบอื่น ๆ ของไวรัส HIV อีกจำนวนมาก ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 โดยวิธี PCR สามารถตรวจหาทั้งในรูปของ Proviral DNA โดยวิธี DNA-PCR และในรูปของ Viral RNA

โดยวิธี Reverse-transcription PCR (RT-PCR) หรือ RNA-PCR ทั้ง 2 วิธีนั้นมียุทธวิธีการเตรียมตัวอย่างและขั้นตอนการทำ PCR ต่างกัน ในการตรวจหา Proviral DNA นั้นต้องเตรียม DNA จากเลือดซึ่งโดยทั่วไปมักเตรียมจาก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายที่มักติดเชื้อ หรือเตรียมจาก Whole blood ก็ได้ สำหรับการตรวจหา Viral RNA นั้น ต้องสกัดแยก RNA จากพลาสมา นำมาใช้ในการตรวจ

2 ถึง 18 เดือน มารดามีประวัติติดเชื้อ HIV-1 ที่ส่งตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ระหว่างเดือนเมษายน 2542 ถึงธันวาคม 2543 จากศูนย์ส่งเสริมสุขภาพเขต 4 ราชบุรี โรงพยาบาลศูนย์ โรงพยาบาลทั่วไป และโรงพยาบาลชุมชน ในพื้นที่สาธารณสุขเขต 4 จำนวน 361 ราย เด็กเกือบทั้งหมดเจาะเลือดส่ง 2 ครั้ง มีบางตัวอย่างเจาะครั้งเดียวเพราะติดตามเจาะครั้งที่ 2 ไม่ได้

การเตรียมตัวอย่างก่อนตรวจ : ตัวอย่างเลือดในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA อย่างน้อย 2 มิลลิลิตร ส่งทางไปรษณีย์ด่วนพิเศษหรือมาส่งด้วยตนเอง เตรียม DNA จาก PBMCs โดยแยก PBMCs ด้วยวิธี Ficoll-Paque (Pharmacia) centrifugation บันทึที่ 500g ตามวิธีการที่ระบุของบริษัท แยกเอาชั้น PBMCs มาปั่นตกตะกอน หลังจากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้สารละลาย Lysis buffer (0.32 M Sucrose 0.01 M Tris-HCl pH 7.5 0.005 M MgCl₂ 1% (w/v) Triton® X-100) จนได้ตะกอนของนิวเคลียส แล้วจึงเติม Proteinase K ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37°C ซ้ำมติน หลังจากนั้นจึงต้มให้เดือด 15 นาที แยกเอาส่วนไลโซที่มี DNA มาใช้ในการตรวจ DNA-PCR

ส่วนของพลาสมาที่แยกได้จากเลือดนำเก็บที่ -70°C จนกว่าจะนำมาสกัด RNA ด้วยวิธี Silica extraction⁷ โดยใช้ชุดสกัด High pure viral RNA kit, Boehringer mannheim® และ Roche® ตามวิธีการที่ระบุของบริษัท นำ RNA ที่สกัดได้มาตรวจ RNA-PCR

การตรวจ Proviral DNA หรือ DNA-PCR : โดยวิธี Nested PCR อ้างอิงตามวิธีของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์⁸ ในตัวอย่างทุกราย

การตรวจ Viral RNA หรือ RNA-PCR : วิธี Reverse transcription PCR (RT-PCR) ตามวิธีที่พัฒนาปรับปรุงโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้ Oligonucleotide primer ชุดเดียวกับการทำ DNA-PCR แบ่งขั้นตอนการทำเป็น 2

เนื่องจากวิธี PCR ไม่มีสูตรสำเร็จของวิธีการ การนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้งาน ต้องทำการพัฒนาปรับปรุง (Optimization) และศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (Validation) เพื่อพิสูจน์ว่าใช้งานได้จริง⁴ ดังนั้นก่อนที่จะสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จะผลิต In house PCR เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 โดยประยุกต์จากวิธีของ Albert J. และคณะ⁵ ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานทางซีโรโลยี ในกลุ่มตัวอย่างผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดแล้วพบว่ามีความจำเพาะและความไวร้อยละ 100⁶ หลังจากนั้นจึงถ่ายทอดเทคโนโลยีมายังศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อนำมาใช้ในงานในเครือข่ายทั่วประเทศ โดยกลุ่มเป้าหมายที่ให้บริการเป็นเด็กแรกเกิดที่มารดามีประวัติติดเชื้อ HIV-1 อย่างไรก็ดีตามกลุ่มของเด็กแรกเกิดมีสภาพทางสรีรวิทยาและทางของการติดเชื้อที่แตกต่างจากกลุ่มผู้ติดยาเสพติด จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าอาจมีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้ได้ผลต่างกับกลุ่มผู้ติดยาเสพติด ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาครั้งนี้ขึ้นเพื่อประเมินวิธีตรวจ PCR ทั้ง 2 วิธีคือ DNA-PCR และ RNA-PCR กับวิธีทางซีโรโลยีในกลุ่มเด็กแรกเกิด เพื่อให้ทราบความไวและความจำเพาะของ In house PCR ในชุด Primer ตามวิธีดำเนินการที่เลือกใช้ และเพื่อการปรับปรุงวิธีการทดสอบต่อไป

วัสดุและวิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง : เลือกเด็กแรกเกิดที่มีอายุระหว่าง

ขั้นตอนคือ ขั้นตอนการสังเคราะห์สาย Complementary DNA (cDNA) จาก RNA และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากสายแม่พิมพ์ cDNA จนได้ Outer PCR product ในหลอดเดียวกัน และขั้นตอนเพิ่มผลผลิต PCR product ด้วย Primer คู่ใน โดยใส่ RNA sample¹⁰ µl ลงในสารตั้งต้น 45 µl ที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นรวมดังนี้ 0.2 M Potassium phosphate pH 7.2, 0.04% Triton[®] X-100, 0.4 mM DTT, 10% Glycerol, 2 mM each d-NTP, 1 mM MgSO₄, 1 µM Oligonucleotide primer (primer คู่นอก) เติม AMV Reverse transcriptase และ Tfi DNA polymerase อย่างละ 10 unit /100 µl reaction (ชุดเอ็นไซม์ Access RT PCR system Pro-mega[®] test kit) หลังจากนั้นหยด Mineral oil ไว้ด้านบน ตั้งโปรแกรมการสังเคราะห์ผลผลิต Outer PCR product ดังนี้

48 °C 30 นาที 94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 45 วินาที 63 °C 45 วินาที 68 °C 45 วินาที 10 รอบ

88 °C 45 วินาที 58 °C 45 วินาที 68 °C 45 วินาที 20 รอบ

68 °C 5 นาที 1 รอบ

ดูผลผลิต Outer PCR product 2 µl ใส่ลงใน

สารตั้งต้นปริมาตร 18 µl ซึ่งมีองค์ประกอบและความเข้มข้นดังนี้ 10 mM Tris-HCl pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton[®] X-100, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM each d-NTP, 0.2 µM Oligonucleotide primer (primer คู่ใน) Taq DNA polymerase 2 unit/100 µl reaction ตั้งโปรแกรมการสังเคราะห์ผลผลิต Outer PCR product ดังนี้

85 °C 45 วินาที 63 °C 45 วินาที 72 °C 45 วินาที 35 รอบ

72 °C 5 นาที 1 รอบ

ตรวจ PCR product โดยวิธี Gel electrophoresis⁵

การติดตามผลตรวจทางซีโรโลยี : ขอข้อมูลจากโรงพยาบาลที่ส่งตรวจโดยส่งแบบกรอกข้อมูลไปยังแพทย์หรือเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้อง ให้กรอกข้อมูลผลตรวจทางซีโรโลยีหลังจากเด็กอายุเกินกว่า 15 เดือนที่ทางโรงพยาบาลตรวจและอาการทางคลินิก

การวิเคราะห์ข้อมูล : โดยใช้ร้อยละสำหรับจำนวนที่แสดงผลบวก ผลลบ ผู้ป่วยที่ติดตามผลซีโรโลยีได้ ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติ Chi-square test ที่ $p < 0.05$ และประเมินคุณสมบัติของวิธีทดสอบแต่ละวิธีเทียบกับวิธีมาตรฐานดังนี้

$$\text{ความไว (\%Sensitivity)} = \frac{\text{จำนวนที่ให้ผลบวกจริงจากวิธีที่ทดสอบ}}{\text{จำนวนที่ให้ผลบวกจากวิธีมาตรฐาน}} \times 100$$

$$\text{ความจำเพาะ (\%Specificity)} = \frac{\text{จำนวนที่ให้ผลลบจริงจากวิธีที่ทดสอบ}}{\text{จำนวนที่ให้ผลลบจากวิธีมาตรฐาน}} \times 100$$

$$\text{ความถูกต้อง (\%Accuracy)} = \frac{\text{จำนวนที่ให้ผลบวกจริง} + \text{จำนวนที่ให้ผลลบจริงจากวิธีทดสอบ}}{\text{จำนวนที่ทดสอบทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก (\%Positive predictive value)} = \frac{\text{จำนวนที่ให้ผลบวกจริงจากวิธีที่ทดสอบ}}{\text{จำนวนที่ให้ผลบวกทั้งหมดจากวิธีที่ทดสอบ}} \times 100$$

ค่าทำนายความแม่นยำของผลลบ (%Negative predictive value)

$$= \frac{\text{จำนวนที่ให้ผลลบจริงจากวิธีทดสอบ}}{\text{จำนวนที่ให้ผลลบทั้งหมดจากวิธีทดสอบ}} \times 100$$

ผลการศึกษา

จากตัวอย่าง 361 ราย ได้ทำการตรวจ DNA-PCR ทุกราย และตรวจ RNA-PCR ร่วมกับ DNA-PCR 303 ราย สามารถติดตามผลตรวจทางซีโรโลยีได้ 144 ราย (ร้อยละ 39.9) ตามตารางที่ 1 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลตรวจ DNA-PCR กับวิธีซีโรโลยี ในตัวอย่างที่ส่งตรวจครั้งแรกให้ผลบวกสอดคล้องกัน 8 ราย และให้ผลลบสอดคล้องกัน 134 ราย และพบตัวอย่างที่ให้ผลไม่สอดคล้อง 2 ราย คือผู้ป่วย A และผู้ป่วย B ที่แสดงในตารางที่ 6 คำนวณร้อยละของความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ความถูกต้อง (Accuracy), ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายความแม่นยำของผลลบ (Negative predictive value) สำหรับการตรวจครั้งแรกเท่ากับร้อยละ 80, 100, 96.8, 100 และ 98.5 ตามลำดับ แต่เมื่อตรวจในตัวอย่างที่เจาะครั้งหลังพบว่ามี 1 ตัวอย่างที่เคยให้ผลลบในครั้งแรกแต่กลับให้ผลบวกในครั้งหลัง คือผู้ป่วย B ที่แสดงในตารางที่ 6 คำนวณร้อยละของความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ความถูกต้อง (Accuracy), ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายความแม่นยำของผลลบ (Negative predictive value) สำหรับการเจาะเลือดครั้งหลังเท่ากับร้อยละ 90, 100, 99.3, 100 และ 99.3 ตาม

ลำดับ ตามรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบผลตรวจ RNA-PCR กับวิธีซีโรโลยี 103 ราย พบว่าให้ผลบวกสอดคล้องกัน 8 ราย และผลลบสอดคล้องกัน 95 ราย ไม่มีรายใดที่ให้ผลไม่สอดคล้องกับวิธีซีโรโลยีทั้งในครั้งแรกและครั้งหลัง คิดเป็นร้อยละของความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (Specificity), ความถูกต้อง (Accuracy), ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก (Positive predictive value) และค่าทำนายความแม่นยำของผลลบ (Negative predictive value) เท่ากับร้อยละ 100 ตามที่แสดงในตารางที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก และค่าทำนายความแม่นยำของผลลบของทั้ง 2 วิธี จะเห็นว่าการติดตามเลือดครั้งหลังมีความไวและความถูกต้องในการตรวจ DNA-PCR เพิ่มขึ้น ตามตารางที่ 4

ดูความสัมพันธ์ของวิธี DNA-PCR และ RNA-PCR จำนวน 304 ราย ให้ผลสอดคล้องกัน 298 ราย (ร้อยละ 98) ประกอบด้วยผลบวก 29 ราย และผลลบ 269 ราย ตามตารางที่ 5 มีตัวอย่าง 6 ราย (ร้อยละ 2) ที่ให้ผลไม่สอดคล้องกันคือ ผู้ป่วย A, B, C, D, E และ F ที่แสดงในตารางที่ 6 โดยพบว่า DNA-PCR ให้ผลลบในขณะที่ RNA-PCR ให้ผลบวกถึง 4 ใน 6 ราย แม้ว่า จะไม่มีข้อมูลซีโรโลยีของผู้ป่วย C, D และ E มาสนับสนุน ก็เป็นข้อมูลประกอบที่สามารถบอกได้ว่าการพบผลลบลง

ตารางที่ 1 จำนวนทารกเกิดจากมารดาติดเชื้อ HIV-1 ที่ได้รับการตรวจโดยวิธี DNA-PCR, RNA-PCR และซีโรโลยี

	ตรวจ DNA-PCR เพียงวิธีเดียว	ตรวจ DNA-PCR ร่วมกับ RNA-PCR	รวม
จำนวนที่ตรวจ	58	303	361
จำนวนที่ติดตามผลซีโรโลยีได้	41	103	144

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาวิธีการตรวจ DNA-PCR เทียบกับวิธีซีโรโลยี ในตัวอย่างที่เจาะได้ครั้งแรก และครั้งหลังของเด็ก
แรกเกิด 144 คน

ผลตรวจ DNA-PCR	ผลตรวจวิธีทางซีโรโลยี		รวม
	Positive	Negative	
Positive ^a	8	0	8
Negative ^a	1 ^A	134	135
Inconclusive ^b	1 ^B	0	1
รวม	10	134	144

a ผล PCR ที่ให้ผลบวก หรือ ผลลบสอดคล้องกันในตัวอย่างครั้งแรกและครั้งหลัง

b ผลการตรวจ PCR ครั้งแรกให้ผลลบ และครั้งหลังให้ผลบวก ตัดสินให้ Inconclusive

A ผู้ป่วย A ดูรายละเอียดในตารางที่ 6

B ผู้ป่วย B ดูรายละเอียดในตารางที่ 6

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาวิธีการตรวจ RNA-PCR เทียบกับวิธีซีโรโลยี ในตัวอย่างที่เจาะได้ครั้งแรก และครั้งหลัง
ของเด็กแรกเกิด 103 คน

ผลตรวจ RNA-PCR	ผลตรวจวิธีซีโรโลยี		รวม
	Positive	Negative	
Positive ^a	8	0	8
Negative ^a	0	95	95
รวม	8	95	103

a ผล PCR ที่ให้ผลบวก หรือผลลบสอดคล้องกันในตัวอย่างครั้งแรกและครั้งหลัง

$$\% \text{Sensitivity} = \frac{8 \times 100}{8} = 100\%$$

$$\% \text{Specificity} = \frac{95 \times 100}{95} = 100\%$$

$$\% \text{Accuracy} = \frac{8 + 95}{103} \times 100 = 100\%$$

$$\% \text{Positive predictive value} = \frac{8 + 0}{8} \times 100 = 100\%$$

$$\% \text{Negative predictive value} = \frac{0 + 95}{95} \times 100 = 100\%$$

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการประเมินวิธี DNA-PCR และ RNA-PCR จำนวน 144 และ 103 ราย ตามลำดับ กับวิธีซีโรโลยี ในเด็กแรกเกิด จากตัวอย่างที่เจาะครั้งแรกและครั้งหลัง

	DNA-PCR ที่เจาะ ครั้งแรก (ก่อน 6 เดือน)	DNA-PCR ที่เจาะ ครั้งหลัง (ตั้งแต่ 6 เดือน)	RNA-PCR ที่เจาะ ทั้งครั้งแรกและครั้งหลัง
%Sensitivity	80	90	100
%Specificity	100	100	100
%Accuracy	98.6	99.3	100
%Positive predictive value	100	100	100
%Negative predictive value	98.5	99.3	100

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการตรวจ DNA-PCR กับ RNA-PCR ในเด็กแรกเกิดจำนวน 304 ราย

วิธีตรวจ		DNA-PCR			รวม
		Positive ^a	Negative ^a	Inconclusive ^b	
RNA-PCR	Positive ^a	29	4 A,C,D,E	0	33
	Negative ^a	1 ^F	269	1 ^B	271
	รวม	30	273	1	304

^a ผล PCR ที่ให้ผลบวก หรือ ผลลบสอดคล้องกันในตัวอย่างครั้งแรกและครั้งหลัง

ผลการตรวจ PCR ครั้งแรกให้ผลลบ และครั้งหลังให้ผลบวก

A, C, D, E ผู้ป่วย A, C, D และ E ดูรายละเอียดในตารางที่ 6

B ผู้ป่วย B ดูรายละเอียดในตารางที่ 6

F ผู้ป่วย F ดูรายละเอียดในตารางที่ 6

ในการทำ DNA-PCR ตามวิธีการที่เลือกใช้นี้มีผลลบลงสูงกว่า RNA-PCR มากและอาจยังคงให้ผลลบลงได้แม้ว่าเด็กจะอายุเกิน 2 เดือน (ผู้ป่วย A และ D) นอกจากนั้นในเด็กบางรายยังอาจให้ผลลบทั้ง DNA-PCR และ RNA-PCR ที่ 2 เดือน แต่เมื่อได้ตัวอย่างในครั้งต่อมาจึงให้ผลบวก (ผู้ป่วย G)

รายที่ให้ผลบวกโดยวิธี PCR มีความสัมพันธ์กับ

อาการทางคลินิกหรือเสียชีวิตก่อน 18 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึง 19 ใน 26 ราย (ร้อยละ 73) และสามารถติดตามการตรวจซีโรโลยีในกลุ่มที่ให้ผลบวกโดยวิธี PCR ได้น้อยกว่ากลุ่มที่ให้ผลลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่ให้ผลลบและผลบวกโดยวิธี PCR ติดตามได้ 134 จาก 315 ราย (ร้อยละ 42.5) และ 8 จาก 40 ราย (ร้อยละ 20) ตามลำดับ ตามตารางที่ 7

ตารางที่ 6 แสดงผลตรวจซีโรโลยีและอาการทางคลินิกของเด็กแรกเกิดในตัวอย่างที่ให้ผล DNA-PCR และ RNA-PCR ไม่สอดคล้องกันหรือผลตรวจครั้งแรกและครั้งหลังแตกต่างกัน

ผู้ป่วย	อายุ (เดือน)	DNA-PCR	RNA-PCR	ผลตรวจทาง ซีโรโลยี	อาการทาง คลินิก
A	4	Negative	Positive	Positive	ปกติ
	5	Negative	Positive		
B	2	Negative	Positive	Positive	ปกติ
	6	Positive	Positive		
C	-	Negative	Positive	เสียชีวิตก่อน 18 เดือน	มีอาการ
D	6	Negative	Positive	ติดตามไม่ได้	ไม่มีข้อมูล
E	3	Negative	Positive	ติดตามไม่ได้	ไม่มีข้อมูล
F	2	Positive	Negative	ติดตามไม่ได้	ไม่มีข้อมูล
G	2	Negative	Negative	ติดตามไม่ได้	ไม่มีข้อมูล
	6	Positive	Positive		
	12	Positive	Positive		

ตารางที่ 7 ผลตรวจ PCR ในทารกเกิดจากมารดาติดเชื้อ HIV-1 กับอาการทางคลินิกและจำนวนที่ติดตามผลซีโรโลยี
หลัง 15 เดือนได้

อาการ	ผล PCR			รวม
	Positive ^a	Negative ^a	Inconclusive ^b	
มีอาการหรือเสียชีวิต	19*	0	1	20
ไม่มีอาการ	7	222	2	231
ไม่ทราบข้อมูล	14	92	4	110
รวม	40	314	7	361
จำนวนที่ตามผลซีโรโลยีได้	8*	134	2	144

^a DNA-PCR และ RNA-PCR ให้ผลบวกหรือผลลบสอดคล้องกัน ทั้งในตัวอย่างที่เจาะครั้งแรกและครั้งหลัง

^b DNA-PCR และ RNA-PCR ให้ผลไม่สอดคล้องกัน หรือให้ผลบวกในตัวอย่างที่เจาะครั้งแรกและให้ผลลบในครั้งหลัง

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ให้ผลลบ PCR ($P < 0.005$)

วิจารณ์

วิธี PCR ทั้ง DNA-PCR และ RNA-PCR ตามวิธีการที่ใช้อยู่นี้มีความจำเพาะร้อยละ 100 โดยต้องมีการจัดการป้องกันการปนเปื้อนของ PCR product เป็นอย่างดี สำหรับเรื่องความไวนั้น DNA-PCR มีความไวต่ำกว่า RNA-PCR การที่ DNA-PCR มีโอกาสเกิดผลลบลงได้สูงกว่าการตรวจ RNA-PCR ดังกล่าวมีรายงานมาแล้วจากการศึกษาอื่น ๆ⁹ และจากการศึกษาของ Zazzi และคณะ พิสูจน์ว่าการเกิดผลลบลงจากการตรวจ DNA-PCR ที่เตรียม DNA จาก PBMCs ส่วนใหญ่เกิดจากผู้ป่วยมีปริมาณไวรัสในเลือดต่ำ (Low viral burden)¹⁰ นอกจากนั้นยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลกระทบต่อการแยก PBMCs ที่ทำให้ได้ปริมาณน้อย เช่น ปริมาณเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย ปริมาณตัวอย่าง สภาพตัวอย่างที่มี Partial clot ทำให้โอกาสได้เซลล์ที่ติดเชืือน้อย โดยเฉพาะในเรื่องปริมาณตัวอย่างซึ่งเป็นปัญหายากมากในการเจาะเลือดในเด็กแรกเกิด ดังนั้นการเปลี่ยนวิธีเตรียมตัวอย่าง DNA ใหม่โดยไม่ต้องแยก PBMCs น่าจะช่วยลดปัญหาเรื่องปริมาณตัวอย่างที่จะใช้ตรวจ DNA-PCR ลง และลดโอกาสการสูญเสียเซลล์ที่ติดเชื้อบางส่วนไปในขั้นตอนการแยก PBMCs และอาจทำให้ผลลบลงน้อยลง

การที่ RNA-PCR มีความไวสูงกว่าเนื่องจากจำนวน Copy numbers ของไวรัสตั้งต้นในการสังเคราะห์ PCR มีปริมาณมากกว่าหลายเท่า ซึ่งมีข้อมูลจากการศึกษาอื่น ๆ สนับสนุนเช่นกัน¹¹ และแม้ว่า RNA-PCR มีความไวสูงกว่า ก็ไม่ควรใช้วิธี RNA-PCR เพียงวิธีเดียว เพราะจากการศึกษานี้พบผู้ป่วย 1 รายที่ให้ผลบวกเฉพาะ DNA-PCR แต่กลับให้ผลลบต่อการทดสอบ RNA-PCR (ผู้ป่วย F) แม้ไม่มีข้อมูลทางซีโรโลยีสนับสนุนก็ตาม และยังมีรายงานจากการศึกษาอื่น ๆ ว่าการให้ยาด้านไวรัสกับผู้ป่วย มีผลต่อระดับของ Viral RNA แต่ไม่มีผลต่อระดับของ Proviral DNA ในกระแสเลือด¹² นอกจากนั้นวิธี DNA-PCR ยังมีต้นทุนในการทดสอบต่ำกว่า RNA-PCR มาก จึงควรใช้ควบคู่กันไปทั้ง 2 วิธีในการทดสอบ ปัจจัย

อีกประการหนึ่งที่มีผลต่อความไวของวิธี RNA-PCR คือชุดสกัด RNA พบว่าชุดสกัดแต่ละบริษัทอาจมีประสิทธิภาพในการแยก RNA ได้ต่างกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูลในการศึกษานี้) ซึ่งความไวที่ต่างกันนี้จะเห็นความแตกต่างได้ชัดเจนในรายที่มีปริมาณไวรัสในกระแสเลือดต่ำ ๆ (Low viral burden) หรือรายที่เพิ่งติดเชื้อในระยะเริ่มแรก (Early infection)

การเจาะเลือดเพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ HIV-1 ในเด็กที่อายุ 2 เดือน ยังมีความเสี่ยงจากผลลบลงได้อยู่ เพราะในการศึกษานี้มีผู้ป่วย 1 รายที่ยังคงให้ผลลบต่อการตรวจทั้ง DNA-PCR และ RNA-PCR เมื่ออายุ 2 เดือน และในเด็กบางราย การทดสอบ DNA-PCR เมื่ออายุ 5 เดือนยังอาจให้ผลลบลงได้ด้วย จึงเป็นข้อที่ต้องระมัดระวังในการตรวจ DNA-PCR ในเด็กที่อายุต่ำกว่า 6 เดือนซึ่งควรใช้การตรวจ RNA-PCR ควบคู่ไปด้วย เพื่อลดโอกาสผลลบลงจากวิธี DNA-PCR การส่งตัวอย่าง 2 ครั้งเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการตรวจวินิจฉัยเป็นอย่างยิ่งเพื่อลดโอกาสความผิดพลาดจากระบบและความผิดพลาดจากคน (Human error) นอกจากผลลบลงที่เกิดจากปัญหาต่าง ๆ ที่กล่าวถึงข้างต้น ยังมีผลลบลงที่เกิดจากความไม่จำเพาะของชุด Primers ที่ใช้ (Primer-template mismatch) แต่การศึกษานี้ไม่พบปัญหาดังกล่าว

การติดตามเด็กที่ติดเชื้อมาตรวจโดยวิธีซีโรโลยีหลังจาก 15 เดือน มีโอกาสติดตามให้ครบได้ยาก ส่วนใหญ่ไม่สามารถติดตามได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยเด็กติดเชื้อมีโอกาสตามได้ยากกว่า เท่าที่สังเกตจากการดำเนินการที่ผ่านมา พบว่าเด็กที่ติดเชื้อจำนวนหลายรายไม่สามารถติดตามเลือดครั้งที่ 2 มาตรวจซ้ำได้ และไม่สามารถติดตามผลซีโรโลยีได้ด้วย อาจเป็นเพราะผู้ป่วยส่วนหนึ่งเสียชีวิตก่อนครบ 18 เดือน และยังมีกรณีอื่น ๆ ที่ไม่ทราบสาเหตุ ดังนั้นวิธี PCR ยังคงมีประโยชน์มากในการช่วยวินิจฉัยภาวะการติดเชื้อในเด็กแรกเกิด แม้จะมีโอกาสเกิดผลลบลงจากปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวข้างต้นบ้าง แต่ผลลบ

ลวงที่เกิดขึ้นจะเกิดน้อยหากใช้ควบคู่กันทั้ง 2 วิธี ทั้ง DNA-PCR และ RNA-PCR และเลือกกระยะการเจาะเลือดที่อายุเกินกว่า 2 เดือนขึ้นไป การเจาะครั้งหลังเพื่อยืนยันผลลบและผลบวกควรอายุไม่ต่ำกว่า 6 เดือน

ผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากกลุ่มผู้ติดยาเสพติดชนิดฉีดซึ่งเป็นผู้ใหญ่ ปัจจัยที่ทำให้ผลแตกต่างกันน่าจะมาจากระยะการเก็บตัวอย่างในผู้ใหญ่เป็นระยะที่ติดเชื้อนานแล้ว เพราะร่างกายสร้าง Anti-HIV จนสามารถตรวจวินิจฉัยได้ แต่การเก็บตัวอย่างในเด็กแรกเกิดนั้นเป็นระยะที่ติดเชื้อยังไม่นาน จึงทำให้มีโอกาสเกิดผลลบลวงได้สูงกว่า

สรุป

การตรวจ DNA-PCR เมื่อเด็กมีอายุก่อน 6 เดือนตามวิธีการนี้มีความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง ค่าทำนายความแม่นยำของผลบวก และค่าทำนายความแม่นยำของผลลบ ร้อยละ 80, 100, 98.6, 100 และ 98.5 ตามลำดับ ส่วนวิธี RNA-PCR มีร้อยละ 100 ทั้งหมดและความไวของการตรวจ DNA-PCR จะสูงขึ้นเมื่อเด็กมีอายุมากขึ้น เพื่อให้ลดโอกาสผลลบลวงในการตรวจ DNA-PCR ควรปรับวิธีการเตรียมตัวอย่าง DNA และใช้การตรวจ RNA-PCR ควบคู่ไปด้วย

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนวัสดุ น้ำยา และเครื่องมือ จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข และขอขอบคุณ พญ. สุรัฎฐา บรรจงภาค, พญ. พรสวรรค์ อัดตวิจิตรระการ, พญ. พิมพ์ประไพ ธนาศิริ, นพ. ชุมพล เดชะอำไพ, นพ. วัชร อาวุธวิทยา, คุณรพีพรรณ ธนศักดิ์ศิริ, คุณงามจิตร เอี่ยมชาญบรรจง, คุณนุชบา เตชะชัยนิรันดร์ และผู้เจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านจาก รพ. นครปฐม, รพ. พหลพลพยุหเสนา, รพ. สมุทรสาคร, รพ. พระจอมเกล้า, รพ. บ้านโป่ง, ศูนย์ส่งเสริมสุขภาพ เขต 4 จ.ราชบุรี ที่ให้ความร่วมมือในการกรอกข้อมูลผล

การติดตามทางซีโรโลยีและอาการของผู้ป่วย

เอกสารอ้างอิง

1. Midani S, Rathore MH. Polymerase chain reaction testing for early detection of HIV infection in children. South Med J 1997; 90(3) : 294-5.
2. Dunn DT, Brandt CD, Krivine A, et al. The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. AIDS 1995 ; 9(9) : F7-11.
3. Husson RN, Comeau AM, Hoff R. Diagnosis of HIV infection in infants and children. Pediatrics 1990 ; 86 : 1-10.
4. วัชร อัดตวิจิตรคุณ, มนตรี อัดตวิจิตรคุณ, บรรณาธิการ. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์เรือนแก้ว. 2536.
5. 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.
6. ไพจิตร วราจิต, สุธน วงษ์ศิริ, สุรางค์ สงวนวงศ์, นวลจันทร์ ฤๅศาสตร์, จินตรา ชื่นเอกลาภ. การตรวจ Proviral DNA ของเชื้อ HIV-1 โดยวิธี Nested PCR. ว.กรมวิทย์. พ.2537 ; 36(1) : 11-18.
7. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin. Microbiol 1990 ; 28 (3) : 495-503.
8. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข. การอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการตรวจการติดเชื้อเอชไอวี-1 วิธี RNA-PCR. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ 15- 17 ธันวาคม 2542 "ไม่ได้ตีพิมพ์".

9. Bieniasz PD, Ariyoshi K, Bourelly MA, et al. Variable relationship between proviral DNA load and infectious virus titer in the peripheral blood mononuclear cells of HIV-1 infected individuals. *AIDS* 1993 ; 7 : 803-6.
10. Zazzi M, Romano L, Catucci M, et al. Low human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA burden as a major cause for failure to detect HIV-1 DNA in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33(1) : 205-8.
11. Young NL, Shaffer N, Chaowanachan T, et al. Early diagnosis of HIV-1 infected in Thailand using RNA and DNA PCR assay sensitive to non-B subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000 ; 24(5) : 401-7.
12. Verhofstede C, Reniers S, Wanseele FV, Plum J. Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV-1 infection : correlation with virological and immunological markers of disease. *AIDS* 1994 ; 8(10) : 1421-7.