

รังโรคของเชื้อเอชไอวีและความสำคัญของการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

อชิรญาณ์ ปัทมะ วท.บ.

หน่วยงานบริการอณูจุลชีววิทยา, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10700.

บทนำ

การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีด้วยยาต้านไวรัสแบบ highly active antiretroviral therapy หรือ HAART จะช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสและช่วยให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายดีขึ้น (ปริมาณของ CD4+ T cell มีมากขึ้น) แม้ว่าจะมีการใช้ยาต้านไวรัสในการลดปริมาณของไวรัสในกระแสเลือด แต่ไวรัสยังคงสามารถแอบแฝงอยู่ได้ใน reservoir site (รังโรค) ต่างๆ หากมีการหยุดการใช้ยาต้านไวรัส ปริมาณของไวรัสจะถูกเพิ่มขึ้น โดย reservoir site เป็นอุปสรรคที่สำคัญในการที่จะกำจัดเชื้อเอชไอวีให้หมดไปจากร่างกาย

เชื้อ Human immunodeficiency virus (HIV) จัดอยู่ใน Family *Retroviridae* Genus *Lentivirus*¹ จีโนมของเชื้อเอชไอวี มีความยาวประมาณ 9.8 กิโลเบส ที่ปลายทั้งสองข้างของจีโนมมี long terminal repeated (LTRs) ซึ่งประกอบด้วย enhancer และ promoter สำหรับเกิดกระบวนการ Transcription โดยยีนที่อยู่ระหว่าง LTRs ประกอบด้วยยีน Structural และ Regulatory ซึ่งยีนส่วน structural จะควบคุมการสร้างโปรตีนที่สำคัญสำหรับไวรัส 1) *Gag* gene จะควบคุมการสร้างโปรตีนของไวรัส 4 ชนิด คือ p24 (viral capsid), p17 (viral matrix), p6 และ p7 (nucleotide protein) 2) *Polymerase (Pol)* gene จะควบคุมการสร้างโปรตีนของไวรัส 3 ชนิด คือ protease, reverse transcriptase และ integrase

3) *Env* gene จะควบคุมการสร้างโปรตีนในส่วน spike (glycoprotein 120 และ transmembrane protein (gp41)) ยีนส่วน regulatory จะประกอบด้วย ยีนที่สำคัญคือ 1) *tat* : เกี่ยวข้องกับการทำให้ไวรัสเกิดกระบวนการ transcription 2) *rev* : เป็นตัวนำส่ง unspliced mRNA เข้าสู่ไซโตพลาสซึม 3) *vif* : ช่วยทำให้ไวรัสเกิดการติดเชื้อได้ดี 4) *nef* : จะควบคุม MHC class I/CD4 ให้ลดลง 5) *vpu* : ช่วยส่งเสริมให้ไวรัสออกนอกเซลล์ได้ดี 6) *vpr* : ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะ G2 และช่วยทำให้ไวรัสเกิดกระบวนการ replication ใน macrophage ได้ดี²

คำนิยามของ viral latency และ viral reservoir

เป็นที่รู้กันอยู่ว่ายาด้านไวรัสไม่เพียงพอที่จะกำจัดเชื้อเอชไอวีให้หมดไปจากร่างกายได้ ในร่างกายจะยังคงมีเชื้อไวรัสอยู่ในขณะที่มีการรักษาด้วยยาต้านไวรัส และพบว่าหากมีการหยุดยาด้านไวรัส ไวรัสสามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้อีกครั้ง การเกิดภาวะการติดเชื้อระยะยาว (persistence infection) อาจเกิดเนื่องจากยาไม่สามารถควบคุมไวรัสได้ (ประสิทธิภาพของยาไม่ดี หรือ ยาไม่สามารถแพร่เข้าไปในบริเวณที่มีการติดเชื้อได้)⁴ สำหรับคำนิยามของ viral reservoir จะหมายถึง ชนิดของเซลล์หรือส่วนหนึ่งของร่างกายที่ replication competent form ของเชื้อไวรัสเอชไอวี สามารถที่จะคงอยู่ได้อย่างปลอดภัย โดยอยู่ในรูปของ latent (แอบแฝง) เพื่อสามารถผลิตไวรัสที่สมบูรณ์ได้ในอนาคต ซึ่งเชื้อเอชไอวีสามารถ

แอบแฝงตัวอยู่ได้ในเซลล์ CD4+ T cell, monocyte, macrophage เป็นต้น ส่วน viral latency เป็นภาวะที่เชื้อเอชไอวีสามารถแอบแฝงตัวอยู่ในโฮสต์เซลล์ ในรูปของ provirus โดยไม่มีการเกิด transcription หรือการผลิตไวรัสออกมา โดยกระบวนการดังกล่าวสามารถเกิดได้ในช่วง pre integration หรือ post integration นอกจากนี้ได้มีการพบว่าเชื้อเอชไอวีสามารถที่จะติดเชื้อ bone marrow และทำให้เกิดภาวะ active และ latent infection ได้ ซึ่งเซลล์เหล่านี้สามารถที่จะอยู่ได้นานไปตลอดชีวิต⁵

รังโรคในระดับเนื้อเยื่อและเซลล์ของเชื้อเอชไอวี

รังโรคระดับเนื้อเยื่อ (Tissue reservoir)

อวัยวะต่างๆ สามารถเป็นรังโรคในการเพิ่มปริมาณเชื้อเอชไอวีได้ เช่น เนื้อเยื่อน้ำเหลือง ระบบทางเดินอาหาร สมอง/ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบสืบพันธุ์ และ ปอด โดยลักษณะของโครงสร้างเหล่านี้เสมือนเป็นเกราะกำบังสำหรับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหรือมีตัวแบ่งกันจากระบบเลือดและระบบน้ำเหลือง ซึ่งบางแห่งอาจจะไม่ยอมให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเข้าหรือไม่ยอมให้ยาผ่านเข้าไปได้ทำให้เชื้อเอชไอวีสามารถที่จะคงอยู่และเพิ่มจำนวนได้ เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบทางเดินอาหาร ซึ่งรังโรคเหล่านี้จะพบเชื้อเอชไอวีแอบแฝงได้ในระยะแรกที่มีการติดเชื้อและระหว่างที่มีการใช้ยาสูตร HAART⁶ ได้มีการศึกษาถึงวิวัฒนาการของไวรัสในตำแหน่งต่างๆ เหล่านี้ โดยเปรียบเทียบกับไวรัสที่อยู่ในเลือดและพบว่าตำแหน่งต่างๆ เหล่านี้มีความสำคัญในการเพิ่มปริมาณของเชื้อเอชไอวีทั่วร่างกาย⁷

รังโรคระดับเซลล์ (Cellular reservoir)

ในระดับเซลล์ มีเซลล์หลากหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของเอชไอวี ซึ่ง CD4+ T lymphocyte และ macrophage เป็นเซลล์เป้าหมายแรกของเชื้อเอชไอวี เซลล์ชนิดอื่นๆ ที่เชื้อเอชไอวีสามารถที่จะผ่านหรือเข้าไปได้ เช่น monocyte, CD8+ T cell, natural killer cell (NK cell), peripheral blood, dendritic cell และ B cell

แต่ยังมีข้อมูลที่ขัดแย้งกันในเรื่องของ cellular reservoir ที่เชื้อเอชไอวีสามารถติดเชื้อได้

CD4+ T lymphocytes

ลักษณะสำคัญของการติดเชื้อเอชไอวีในเซลล์นี้ คือมีการลดลงของ CD4+ T lymphocyte อย่างรวดเร็ว โดยไวรัสที่เข้าทาง CD4+ T cell พบว่าเป็นสายพันธุ์ X4 (ใช้ co-receptor CXCR4 ในการเข้าสู่เซลล์) ซึ่งมีความสัมพันธ์ในการทำให้เชื้อเอชไอวีมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้น และทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการเชื่อมเข้าหากันที่เรียกว่า syncytium inducing infection นอกจากนี้ co-receptor ดังกล่าวยังพบได้ในเซลล์ naïve และ memory CD4+ T cell เชื้อเอชไอวีสามารถที่จะแอบแฝงได้ใน resting CD4+ T cell subset ที่มีการติดเชื้อในระยะเริ่มต้น ดังนั้น CD4+ T cell ยังคงเป็นรังโรคหลักของเชื้อเอชไอวี

CD8+ T lymphocytes

ไม่มีการรายงานว่าเชื้อไวรัสเอชไอวีสามารถเข้าสู่ CD8+ T lymphocyte แต่มีการรายงานว่า พบ CD8+ T cell ติดเชื้อเอชไอวีได้ที่ติดเชื้อ⁸ นอกจากนี้ พบว่า การติดเชื้อดังกล่าวเกิดจากกระบวนการ CD4 dependent โดยระหว่างกระบวนการ maturation ใน thymus ที่ซึ่ง CD4 จะ co-express คู่กับ CD8+ T cell⁹

Macrophage

เนื่องจากแมคโครฟาจเป็นเซลล์ที่สำคัญของระบบแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) และ ระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะ (adaptive immunity) ในการกำจัดเชื้อเอชไอวี จึงเป็นอีกเซลล์หนึ่งที่เป็นเป้าหมายของเชื้อเอชไอวีนอกเหนือจาก CD4+ T cell แม้ว่าจำนวนของ macrophage ที่ติดเชื้อเอชไอวีจะมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ CD4+ T cell

Monocyte

ลักษณะของ monocyte ที่มี marker ต่างกันจะตอบสนองต่อการติดเชื้อได้ต่างกันโดยพบว่า monocyte ที่มี CD14++CD16+ สามารถที่จะติดเชื้อเอชไอวีได้

ง่ายกว่าชนิดอื่น โดยเซลล์ชนิดนี้พบอยู่ประมาณ 10% ที่ไหลเวียนในร่างกาย โดยในระยะแรกยังไม่แน่ชัดว่าการติดเชื้อในเซลล์ดังกล่าวเกิดภาวะ latent หรือ productive ต่อมาได้พบว่า เซลล์ monocyte ที่แยกได้จากเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี มี 2 รูปแบบคือ unintegrated circular และ multiple spliced RNA¹⁰

การตรวจหาโรคของเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการ

ปัจจุบันแนวทางในการรักษาผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีแบ่งเป็นหลักๆ ได้ 2 ประเภทคือ 1) Sterilizing cure เป็นการกำจัด replication competent form ของเชื้อเอชไอวีให้หมดไปจากร่างกาย และ 2) Functional cure เป็นการควบคุม viral replication อย่างถาวร โดยไม่มีการใช้ยาต้านไวรัสควบคุม นอกจากนี้ยาต้านไวรัสที่จะพัฒนาในอนาคตจะใช้เพื่อกำจัดหรือลดปริมาณของโรค ดังนั้นการพัฒนาการตรวจหาโรคและขนาดของโรคจึงมีความสำคัญต่อการกำจัดเชื้อไวรัส ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการตรวจที่ดีที่สุดในการใช้วัดโรคของเชื้อเอชไอวี โดยวิธีในอนาคตจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้ 1) สามารถตรวจวัดโรคของไวรัสทั้งหมด โดยมีความจำเพาะต่อไวรัสที่สามารถเพิ่มปริมาณได้เท่านั้น ซึ่งไม่รวมถึงไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ 2) มีความแม่นยำในการระบุถึงปริมาณไวรัสที่เพิ่มปริมาณในเนื้อเยื่อนั้นๆ 3) เป็นวิธีที่มีความเชื่อมั่นสูงในการรายงานผล โดยวิธีที่เป็นมาตรฐานใช้กันอยู่คือ Quantitative viral out growth (QVOA) แต่มีข้อจำกัดหลายอย่าง จึงได้มีการพัฒนาการตรวจหาโรคโดยวิธีต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. Quantitative viral out growth (QVOA)

เป็นการแยก resting CD4+ T cell จากเลือดของผู้ป่วยแล้วเจือจาง resting CD4+ T cell ที่แยกได้ในความเข้มข้นต่างๆ กันและถูกกระตุ้นด้วย Phytohemagglutinin (PHA) ซึ่งการกระตุ้นดังกล่าวจะทำให้เชื้อเอชไอวีออกจากสภาวะ latent โดยสามารถวัดปริมาณของเชื้อได้ด้วยวิธี ELISA (ตรวจหา p24 แอนติเจนในน้ำเลี้ยงเซลล์)¹³ ข้อดีของวิธีนี้สามารถที่จะตรวจวัดไวรัสที่สามารถเพิ่มปริมาณได้เท่านั้น แต่ข้อเสียของวิธีนี้ใช้เวลาประมาณ

2-3 สัปดาห์ ใช้ปริมาณเลือดที่ค่อนข้างมาก (120-180 มิลลิลิตร) และไม่สามารถตรวจวัดปริมาณไวรัสได้ทุกตัว¹¹ จึงได้มีการพัฒนา cell line ชนิด MOLT-4/CCR5 แทนการใช้เซลล์จากเม็ดเลือดขาว (donor cells) ในการเพิ่มปริมาณไวรัสซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการเลี้ยงไวรัส¹² นอกจากนี้ได้มีการตรวจวัดสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวีแทนการใช้วิธี ELISA (HIV-1 RNA)¹² ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยใช้ Humanized mice (MVOA) ซึ่งทำให้ได้โดยใช้ CD4+ T cell หรือ Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) จากคนที่ติดเชื้อเข้าไปในหนูที่ตัดแปลงพันธุกรรมจากนั้นจะทำการวัดปริมาณ HIV-1 RNA วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถตรวจคัดกรองเซลล์โรคชนิดเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น gut-associated lymphoid tissue และ lymph node¹³

2. Real Time PCR เป็นวิธีที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณของเชื้อไวรัสเอชไอวี ที่แอบแฝงอยู่โดยการหาปริมาณ HIV DNA สามารถใช้ในการทำนายการดำเนินของโรคในผู้ป่วยที่อยู่ในช่วงแรกของการติดเชื้อ (primary infection) หรือ ช่วงต้นๆ ของการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน (early seroconversion) เนื่องจากเป็นช่วงที่ระดับ HIV RNA และปริมาณ CD4+ T cell ต่ำกว่าความสามารถในการตรวจวัด จึงยังไม่สามารถนำค่าดังกล่าวมาใช้ในการพยากรณ์โรคได้²⁰ นอกจากนี้ในช่วงของการติดเชื้อเรื้อรัง (chronic phase infection) การลดลงของ HIV DNA ระหว่างการรักษาด้วยยาต้านไวรัสร่วมกับ HIV RNA และการลดลงของปริมาณ proviral สามารถใช้ในการทำนายการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้¹⁴ ซึ่งการหาปริมาณไวรัส HIV DNA เป็นที่นิยมแพร่หลายโดยมีเป้าหมายการตรวจวัดที่ยีน pol, gag และ 2-LTR ที่ง่ายและรวดเร็ว

3. Alu PCR เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณของ HIV DNA ที่แทรกตัวอยู่ในจีโนมของคน เนื่องจาก Alu เป็น replicative element ที่พบทุกๆ 5,000 เบส หรือประมาณ 5% ของจีโนมคน (ประมาณ 2,000,000 copies)¹⁵ เชื้อเอชไอวีในระยะที่เป็น proviral DNA จะแทรกตัวอยู่ในจีโนมของคน จึงอาจมีโอกาสที่มีตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับ Alu element ทำให้สามารถตรวจวัดได้โดยอาศัยหลักการ

ของ PCR โดย HIV-1 ที่แทรกตัวอยู่นั้น สามารถตรวจวัดได้จาก PBMC หรือ purified resting CD4+ T cells โดยการออกแบบไพรเมอร์เริ่มต้นการในเพิ่มจำนวนจาก Alu elements ที่มีปลายข้างหนึ่งจับกับ Alu elements ของจีโนมคน ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจับกับ HIV-1 ตรงส่วนของยีน gag เมื่อทำการเพิ่มจำนวน Alu-gag เสริมจิ้น จะทำการเพิ่มจำนวนรอบที่สองโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จับกับ LTR เพื่อเพิ่มจำนวน HIV-LTR (ตั้งแต่ R-U5) และใช้ probe เป็นตัวติดตามปริมาณการเพิ่มขึ้นของ DNA จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณของ HIV-1 ที่แทรกตัวอยู่โดยการเปรียบเทียบกับกราฟเส้นตรงมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสที่แทรกตัวอยู่ในเซลล์ที่ทราบค่าแน่นอน (copy number) กับค่า cycle thresholds Alu PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถวัดปริมาณ HIV-1 ที่แทรกตัวอยู่ในจีโนมของคนได้ตั้งแต่ 0.5 provirus ใน 10,000 จีโนมของคน¹⁶ แต่วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถบอกได้ว่าจำนวนเชื้อเอชไอวีที่วัดได้นั้นสามารถแพร่เชื้อต่อไปได้หรือไม่ (replication competent form) หรือเป็นเพียงเชื้อเอชไอวี ที่ไม่สมบูรณ์ (defective form) นอกจากนี้ อาจมีความเป็นไปได้ที่ เชื้อเอชไอวีจะแทรกตัวห่างจากบริเวณที่มี Alu element ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ หรือเพิ่มจำนวนได้ในปริมาณต่ำกว่า limit of detection

4. Digital droplet PCR (ddPCR) เป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งมีความไวสูงและถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณ HIV ที่แอบแฝงอยู่ในเซลล์ โดยการเป็นการวัด ดีเอ็นเอ HIV-1 ทั้งหมดเทคนิคนี้จะคล้ายกับวิธี real-time PCR แต่แตกต่างที่วิธี ddPCR เป็นการวัด absolute quantification ของดีเอ็นเอ ที่ไม่ต้องการการทำกราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบ โดย ddPCR จะทำการวัดที่ผลการเกิดปฏิกิริยาที่แสดงออกในรูปแบบของสารฟลูออเรสเซนต์ในขั้นสุดท้ายของการทำปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการสร้าง droplet ขนาดเล็กเพื่อแบ่งส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบเป็น partition แล้วจึงทำปฏิกิริยา PCR จากนั้นตรวจวัดจำนวนของ partition ที่ให้ผลบวก และทำการคำนวณออกมาโดยอาศัยหลักการทางสถิติ (Poisson) ทำให้มีความไวและความแม่นยำมาก¹⁷ การทำ ddPCR

ในปัจจุบันนั้นสามารถสามารถวัดเชื้อเอชไอวีที่มีดีเอ็นเอ เป้าหมายได้หลายรูปแบบ อาทิ HIV RNA, cell-associated HIV RNA, total HIV DNA และ HIV DNA 2-LTR circles

5. TILDA (*tat/rev* Induced Limiting dilution assay) เป็นวิธีที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณของเชื้อเอชไอวีที่แอบแฝงอยู่ในแหล่งของ reservoir¹⁸ โดยแหล่งที่เชื้อแอบแฝงอยู่ในระยะยาว (long live reservoir) ที่สำคัญของเชื้อเอชไอวี ที่ใหญ่ที่สุดในร่างกายก็คือ CD4+ T-cell¹⁹ โดยหลักการของ TILDA นั้น จะเป็นการวัดปริมาณของ multiply-splicing HIV RNA ซึ่งจะไม่พบในระยะที่เชื้อเอชไอวี กำลังแอบแฝงอยู่ แต่จะสามารถตรวจพบเมื่อเชื้อเอชไอวี ในระยะแฝงถูกกระตุ้น²⁰ นอกจากนี้พบว่าเชื้อเอชไอวี ที่มีจีโนมที่ไม่สมบูรณ์ (defective viral genome) จะไม่มีการแสดงออกของยีน *tat/rev*¹³ ทำให้ยีน *tat/rev* multiply-splicing HIV RNA จึงเป็นตัวแทนที่เป็นเป้าหมายสำคัญในการตรวจติดตามปริมาณของเชื้อเอชไอวี ในระยะแฝงที่ถูกกระตุ้นแล้วและสามารถประกอบตัวเองเป็นไวรัสที่มีความสมบูรณ์ต่อไปได้ (replication competent form) โดยเริ่มต้นด้วยการแยก PBMC จากคนไข้ จากนั้นทำการแยกเอา CD4+ ออกมาโดยใช้ negative selection เพื่อแยกเอาเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่ใช่ CD4+ ออกก่อน จากนั้นตามด้วยการแยกเก็บเฉพาะ CD4+ ด้วย flow cytometry เพื่อให้ได้เซลล์ที่บริสุทธิ์ และเลี้ยงเซลล์ต่อในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารกระตุ้นให้ CD4+ ให้ออกจากสภาวะพัก (resting CD4+) และบ่มเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมงเพื่อกระตุ้นเชื้อเอชไอวี ให้ออกจากภาวะแฝงและกระตุ้นการแสดงออกของยีน *tat/rev* หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาเจือจางเป็นลำดับในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำเซลล์ดังกล่าวในความเข้มข้นแต่ละลำดับที่แตกต่างกันมาทำ nested RT-PCR ใน 96 wells plate โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *tat/rev* และวัดผลบวกของแต่ละหลุมในแต่ละความเข้มข้นของเซลล์ที่เจือจางโดยใช้ real-time PCR ซึ่งผลบวกในแต่ละความเข้มข้นจะถูกนำไปคำนวณด้วย maximum likelihood เพื่อออกมาเป็นค่าความถี่ของเซลล์เชื้อเอชไอวี mRNA ที่ถูกกระตุ้น¹⁸

สรุป

วิธีการตรวจหาไวรัสของเชื้อเอชไอวีเพื่อใช้ในการดูประสิทธิภาพสำหรับแนวทางที่ใช้ในการกำจัดไวรัส ออกจากร่างกายนั้นมีความสำคัญ โดยวิธีดังกล่าวจะต้อง มีความไวค่อนข้างสูง มีความจำเพาะ และมีความแม่นยำ เพื่อให้ได้ผลที่มีความน่าเชื่อถือ แม้ว่าจะมีการพัฒนา วิธีต่าง ๆ ขึ้นมาช่วยแต่วิธีดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบพบว่า มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างต่ำและไม่มีวิธีใดที่สามารถ วัดปริมาณได้ใกล้เคียงกับขนาดของไวรัสจริง ดังนั้น ในการทดสอบทางคลินิกในการตรวจหาไวรัสควรใช้ ร่วมกันระหว่างการเพาะเลี้ยงไวรัส (culture based) และ PCR ในการวัดการเปลี่ยนแปลงของไวรัส

เอกสารอ้างอิง

- Ozel M, Pauli G, Gelderblom H. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch Virol* 1988;100:255-66.
- Gummuru S, Emerman M. Cell cycle- and Vpr-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression in primary and transformed T-cell lines. *J Virol* 1999;73:5422-30.
- Montaner J, Harris M, Mo T, Harrigan P. Rebound of plasma HIV viral load following prolonged suppression with combination therapy. *Aids* 1998;12:1398-9.
- Dahl V, Josefsson L, Palmer S. HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral Res* 2010;85:286-94.
- Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999;5:512-7.
- Saksena N, Potter S. Reservoirs of HIV-1 in vivo: implications for antiretroviral therapy. *AIDS Rev* 2003;5:3-18.
- van't Wout AB, Ran L, Kuiken C, Kootstra N, Pals S, Schuitemake H. Analysis of the temporal relationship between human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J Virol* 1998;72:488-96.
- McBreen S, Imlach S, Shirafuji T, Scott GR, Leen C, Bell J E, Simmonds P. Infection of the CD45RA+(naive) subset of peripheral CD8+lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J Virol* 2001;75:4091-102.
- Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bell JE, Simmonds P. Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet* 1996;348:649-54.
- McElrath MJ, Steinman RM, Cohn ZA. Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. *J Clin Invest* 1991;87:27-30.
- Laird G, Eisele E, Rabi S, Lai J, Chioma S, Blankson J, et al. Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003398.
- O'Doherty U, Swiggard W, Jeyakumar D, McGain D, Malim MH. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration. *J Virol* 2002;76:10942-50.
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth L, Buck C, Chaisson R. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997;278:1295-300.
- Yu J, Wu T, Liszewski M, Dai J, Swiggard W. A more precise HIV integration assay designed to detect small differences finds lower levels of integrated DNA in HAART treated patients. *Virology*.2008; 379: 78-86
- Hatzakis A, Touloumi G, Pantazis N, Anastassopoulou C, Katsarou O, Karafoulidou A, et al. Cellular HIV-1 DNA load predicts HIV-RNA rebound and the outcome of highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2004;18:2261-7.
- Yerly S, Günthard H, Fagard C, Joos B, Perneger T, Hirschel B, et al. Swiss HIV Cohort Study, 2004. Pro viral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions. *AIDS* 2014;18: 1951-53.
- Mighell AJ, Markham AF, Robinson PA. Alu sequences. *FEBS Lett* 1997;417:1-5.
- Eriksson S, Graf E, Dahl V, Strain M, Yokl S, Lysenka E. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*.2013;9:e1003174.
- Strain M, Lada S, Luong T, Rought S, Gianella S, Terry V, et al. Highly precise measurement of HIVDNA by droplet digital PCR. *PLoS One* 2013; 8: e55943
- Procopio F, Fromentin R, Kulpa D, Brehm J, Bebin A, Strain M, et al. A novel assay to measure the magnitude of the inducible viral reservoir in HIV-infected individuals. *EBio Medicine* 2015; 2: 874-83.