บทความพิเศษ

Nucleic Acid Amplification Technology in Blood Donor Screening

ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

การตรวจคัดกรองเลือดด้วยวิธีการทาง Serology ทำให้อุบัติการของการติดเชื้อหลังได้รับเลือดลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะการติดเชื้อไวรัส HIV-1, HCV และ HBV แต่อย่างไรก็ตามจะมีช่วงเวลาที่ผู้บริจาคติดเชื้อแล้วแต่ยังไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีทาง serology ซึ่งเรียกว่า "Seronegative window phase of infection" สำหรับเชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี จะมี window phase ที่ประมาณ 82 วัน HIV มี window phase อยู่ที่ประมาณ 22 วัน และ ไวรัสตับอักเสบ บี มี window phase ที่ประมาณ 60 วัน ดังนั้นถึงจะมีการตรวจทาง Serology อย่างมีประสิทธิภาพแล้วก็ตาม โอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อจากการรับเลือดก็มีได้สูง ซึ่งความเสี่ยงต่อการติดเชื้อชนิดต่างๆ สามารถคำนวณได้จากอุบัติการณ์ของการติดเชื้อนั้นๆในประชากร ตัวอย่าง เช่น ความเสี่ยงของการติดเชื้อ HIV จากการรับเลือดที่ตรวจ anti-HIV negative ในประเทศกำลังพัฒนาจะมีประมาณ 1 ต่อ 1-2 ล้านยูนิต สำหรับ HCV และ HBV จะมีความเสี่ยงสูงกว่ามากเนื่องจากมี window period ยาว ปัจจัยเสี่ยงอื่นๆ เช่น การกลายพันธุ์ของไวรัสหรือไวรัสต่างสายพันธุ์ อาจจะตรวจไม่พบด้วยวิธีการทาง Serology และการบริจาคโลหิตบางรายอาจมีภาวะที่เรียกว่า atypical seroconversion ซึ่งไม่มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อไวรัส ทำให้ตรวจไม่พบด้วยวิธีการที่ใช้อยู่ นอกจากนี้ก็มีความผิดพลาดของห้องปฏิบัติการรวมทั้ง Human error ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะทำให้เลือดที่ได้รับมีความปลอดภัยสูงสุด ประกอบกับมีเทคนิคใหม่ๆทางด้าน Molecular biology ซึ่งเรียกรวมๆ ว่า Nucleic acid amplification technology (NAT) ซึ่งมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสต่างๆ ในช่วง window period ได้ ทำให้ลดความเสี่ยงลงได้บ้าง และสามารถตรวจไวรัสได้ แม้จะมีการกลายพันธุ์ สำหรับไวรัสแต่ละชนิดภายหลังได้รับเชื้อเข้ามาและมีปริมาณไวรัสมากพอที่จะตรวจได้โดยเทคนิค NAT ก็ใช้เวลาระยะหนึ่งเรียกว่า "eclipse phase" ซึ่งระยะนี้เทคนิค NAT ที่มีความไวมากๆ ก็ตรวจไม่พบ ดังนั้นเทคนิค NAT เองก็ไม่สามารถที่จะปิด window phase ได้ทั้งหมด การเริ่มใช้ NAT ในการตรวจกรองเลือด เนื่องจาก FDA ของสหรัฐอเมริกาพบว่า มีผู้ป่วยได้รับเชื้อ HCV จากการได้รับผลิตภัณฑ์จากเลือดที่เป็น immunoglobulin ซึ่งเตรียมจากเลือด Anti-HCV negative จากการตรวจพบว่ามี HCV RNA ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์เลือดนั้น FDA จึงออกกฎเกณฑ์ในปี 1998 ให้ตรวจหา HCV RNA ในผลิตภัณฑ์เลือดที่เตรียมจากการ pool หลายยูนิต ซึ่งต่อมาในยุโรปก็ได้ปฏิบัติเช่นเดียวกัน

เทคนิค NAT เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจกรองเลือดเนื่องจากมีความไว (sensitivity) สูง มีความ

ได้รับต้นฉบับ 23 กันยายน 2548 ให้ลงตีพิมพ์ 30 กันยายน 2548
ต้องการสำเนาต้นฉบับกรุณาติดต่อ ดร.ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

จำเพาะ (specificity) และยังดัดแปลงให้ตรวจเชื้อพร้อมๆกันได้หลายชนิด ใช้เวลารวดเร็วในการตรวจ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการให้บริการของศูนย์บริการโลหิต ประกอบกับเทคนิคนี้สามารถประยุกต์ไปใช้กับเครื่องอัตโนมัติ ทำให้เหมาะสำหรับที่จะนำมาใช้ในการคัดกรองเลือด

NAT Method

เทคนิค NAT มีหลายแบบ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นขยายหรือเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA ของเชื้อโรคให้มากพอที่จะตรวจสอบได้ โดยทั่วไปแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมตัวอย่าง เช่นการ concentrate virus หรือการสกัดเอา nucleic acid ของเชื้อไวรัสออกจากตัวอย่าง เช่น เลือด หรือ พลาสมา

2. การเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR), Transcription mediated amplification (TMA) เป็นต้น

3. การตรวจสอบหรือวิเคราะห์ผลที่ได้จากการขยายหรือเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA เช่นการใช้ probe หรือใช้วิธีการของ EIA เป็นต้น

PCR base amplification method

PCR เป็นวิธีเพิ่มจำนวน DNA วิธีแรก คิดขึ้นในปี 1985 และถูกนำมาใช้มากที่สุดใน NAT ซึ่ง PCR สามารถขยาย DNA sequence ของไวรัสได้โดยตรง ถ้าเป็น RNA virus ก็เพิ่มขั้นตอน Reverse Transcription อีกขั้นตอนหนึ่งเปลี่ยน RNA virus ให้เป็น complementary DNA (cDNA) จากนั้นก็เพิ่มจำนวน DNA โดยใช้ primer 1 คู่ ที่มี sequence complementary กับ DNA บริเวณที่ต้องการขยายโดยใช้เอนไซม์ DNA Polymerase โดยวิธี PCR จะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ denature โดยใช้อุณหภูมิสูง (94˚C) เพื่อทำให้ target DNA แยกเป็นเส้นเดี่ยว เพื่อจะได้เป็นแม่แบบของการสร้าง DNA จากนั้นลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ primer เข้าไปจับกับ DNA ที่เป็นคู่สม (annealing) ซึ่งการจับกันของ primer กับ target DNA จะมีความจำเพาะมาก ถ้าใช้อุณหภูมิที่เหมาะสม (55-60˚C) จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิไปที่ 72˚C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase) สามารถต่อปลาย primer โดยใช้ DNA target เป็นแม่แบบ (Extension) ทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังกล่าวเป็นรอบๆ ประมาณ 30-35 รอบ ก็จะได้ DNA เพิ่มขึ้นอย่างน้อย 10^9 เท่า DNA ที่ขยายเพิ่มขึ้นสามารถที่จะตรวจวิเคราะห์ได้หลายวิธี เช่น ย้อมด้วยสี Ethidium bromide หลังจากทำ Gel Electrophoresis หรือ ใช้ Labelled probe ก็ได้

บริษัท Roche Molecular System ได้พัฒนาวิธีการ PCR มาตรวจหาหรือวัดปริมาณไวรัสหลายชนิด ซึ่งแต่ละวิธี สามารถตรวจได้ ตั้งแต่ 1-100 copy ของไวรัส และพัฒนาเป็นการตรวจแบบอัตโนมัติ (Cobas) ตั้งแต่ขั้นตอนการแยก Nucleic acid การ amplify และการตรวจสอบผลซึ่งวิธีการ Cobas Ampliscreen HCV 2.0 HIV-1 v.1.5 ใช้ตรวจกรองหาเชื้อไวรัส HCV และ HIV จากเลือดผู้บริจาคในต่างประเทศหลายแห่ง เป็นวิธีที่มีการป้องกันการปนเปื้อนและมี internal control ความไวของ Ampliscreen assay อยู่ที่ 25 IU/ml บางห้องปฏิบัติการมีการปรับปรุง เพิ่มความไวได้อีก โดยวิธีการปั่นตกตะกอนไวรัสก่อน เพื่อเป็นการ concentrate virus แต่เนื่องจากวิธีการ PCR เป็นวิธีที่ใช้ในงานวิจัยตามห้องปฏิบัติการต่างๆ อยู่แล้ว จึงมีบางแห่งใช้วิธี PCR ในการคัดกรองเลือดเรียกว่า In house PCR ซึ่งจะมีความเหมาะสมกับศูนย์บริการโลหิตเหล่านั้น รวมทั้งมีราคาถูกกว่า เนื่องจากไม่ต้องใช้น้ำยาสำเร็จรูปที่รวมค่า Royalty อยู่ด้วย

Real-Time PCR

Real-time PCR เป็นเทคนิคใหม่ที่มีพัฒนามาจากวิธีการ PCR กล่าวคือ มีการตรวจสอบผลในขณะที่มีการเพิ่มจำนวน DNA วิธีการก็ใช้หลักของ fluorescence และ probe หรือการใช้สี SYBR I ซึ่งไปแทรกตัวอยู่ใน DNA เส้นคู่ และเรืองแสงได้ เป็นการลดขั้นตอนของ PCR ลงเหลือแค่ 2 ขั้นตอน คือ extraction และ

amplification, detection วิธีการตรวจวิเคราะห์ว่ามี DNA เพิ่มขึ้นอาจใช้ได้หลายวิธี เช่น Taq Man PCR โดยใช้หลักการของ fluorogenic probes ถูกทำลายได้ด้วย

5' exonuclease activity ของ DNA Polymerase โดยการ Labelled ปลายข้างหนึ่งของ probe ด้วยสี fluorescein และปลายอีกข้างด้วย quencher ถ้ามีการ amplify เกิดขึ้น probe จะถูกย่อย (Hydrolyze) ทำให้เกิดการเรืองแสง ซึ่งการเรืองแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ PCR Product ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ทันทีในขณะที่มีการ amplify วิธีการ Real-time PCR มีข้อดีกว่า PCR ธรรมดาก็ คือ สามารถบอกปริมาณได้ (Quantitative) และป้องกันการปนเปื้อนในตัว เพราะไม่ต้องเอา PCR product ออกมาตรวจสอบ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด ผลบวกปลอมได้ นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจสอบผลแบบ realtime อีกหลายวิธี เช่น

- Molecular Beacon ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบ PCR Product ด้วยวิธีการ Real-time PCR โดยออกแบบ probe ให้มีลักษณะเป็น hairpin ที่ปลายข้างหนึ่งติดสารเรืองแสง ปลายอีกข้างติด Quencher และใส่ลงไปในปฏิกิริยา PCR ตั้งแต่เริ่มต้น เมื่อมี PCR Product เกิดขึ้น probe ก็จะกางออกในลักษณะเป็นเส้นตรงหรือพันไปตามรูปร่าง helix ของ DNA ทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นเพราะสารเรืองแสงจะอยู่ห่างจาก Quencher การเรืองแสงก็จะเพิ่มมากขึ้นตามจำนวน PCR Product ที่เพิ่มขึ้น
- FRET Probe เป็นการใช้ probe 2 เส้นพร้อมกันโดยการออกแบบให้ probe จับกับเส้น DNA ในลักษณะที่ต่อเรียงกัน ห่างกัน 1-2 nucleotides โดยที่ปลายด้าน 3' ของ probe ด้านหน้าจะ label ด้วยสารเรืองแสง และปลายด้าน 5' ของ probe ด้านหลังจะติดกับสารเรืองแสงอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเมื่อมี PCR Product เกิดขึ้น probe ทั้ง 2 เส้นจะเข้าไปเกาะกับ PCR Product เมื่อสารเรืองแสง 2 ชนิดมาอยู่ติดกัน เนื่องจากตำแหน่งของ probe ก็จะส่งพลังงานให้กัน ทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นด้วยวิธีการนี้เรียกว่า Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)

Roche Molecular System กำลังพัฒนาวิธีการ Taq Man เพื่อนำมาใช้ในการตรวจกรองเลือด และเริ่มมีใช้ในต่างประเทศแล้ว RT PCR โดยบริษัท National Genetic Institutes ได้รับการรับรองจาก FDA ในการนำเทคนิค RT-PCR มาตรวจหา HIV และ HCV จาก pooled plasma (500 unit) ซึ่งทำให้ลดค่าใช้จ่ายได้มาก และในปัจจุบันบางบริษัทมีเครื่อง fully automate สำหรับการตรวจหาเชื้อไวรัสในเลือดโดยรวม 3 ขั้นตอนข้างต้นไว้ในเครื่องเดียวกัน เช่น Ampliscreen ของ Roche หรือ Trigis ของ GenProbe

Transcription-based amplification methods

Transcription-mediated amplification (TMA) และ Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) เป็นวิธีการเดียวกัน คือ เลียนแบบ Transcription process ของ DNA โดยการเพิ่มจำนวนของ RNA ที่อุณหภูมิเดียว โดยใช้เอนไซม์ Reverse Transcriptase และ RNA Polymerase เพื่อเพิ่มจำนวน RNA target โดยการใส่ Promoter ของ RNA Polymerase ลงไปใน DNA sequence ที่ต้องการจากนั้นก็ใช้ enzyme RNA Polymerase ให้ทำหน้าที่ transcribe DNA ออกเป็น RNA RNA ที่เกิดขึ้นสามารถวนกลับเข้าไปในขบวนการ transcription ใหม่ได้อีก โดยผ่านทาง Reverse Transcriptase ทำให้มีจำนวน RNA เพิ่มขึ้นในปริมาณมากพอที่จะวัดได้ด้วยวิธี Hybridization Protection Assay (HPA) ทำให้แยก internal control กับ target RNA ออกจากกันได้โดยใช้ Probe ต่างกัน

TMA HIV/HCV assay พัฒนาขึ้นโดย Gen Probe Inc. และมีชื่อทางการค้าว่า Procleix HIV-1/HCV ใช้หลักการของ TMA ในการตรวจกรองหาเชื้อ HIV และ HCV พร้อมๆ กันในเลือดผู้บริจาค

GenProbe และ Chiron ได้พัฒนา Semiautomated สำหรับทำ TMA ในการตรวจคัดกรองเลือดผู้

บริจาค และในอนาคตก็จะมีเครื่องอัตโนมัติที่สามารถตรวจเชื้อได้ 3 ชนิด พร้อมกัน คือ HIV, HCV และ HBV

นอกจากเทคนิค PCR และ TMA ที่กล่าวมาแล้วยังมี NAT วิธีการอื่นๆ เช่น

- Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)
- Ligase Chain Reaction (LCR)
- Branched DNA signal amplification assay (bDNA)

ซึ่งเทคนิค NAT เหล่านี้ได้มีการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสต่างๆ ได้ และมีศักยภาพพอที่จะนำมาตรวจกรองเลือดได้เช่นเดียวกันกับวิธี PCR หรือ TMA แต่ยังไม่มีการพัฒนาออกมาใช้

เนื่องจาก NAT เป็นเทคนิคใหม่และมีลิขสิทธิ์มาเกี่ยวข้องทำให้มีราคาสูงมากเกินกว่าที่ประเทศกำลังพัฒนาจะนำมาใช้ได้ แต่สามารถลดค่าใช้จ่ายโดยวิธีการ Pool และ concentrate ไวรัสก่อนที่จะเข้าขบวนการ Nucleic acid extraction นอกจากนี้การนำมาใช้ในประเทศไทยควรมีการ evaluate เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมกับประเทศกำลังพัฒนา ตัวอย่าง เช่น ในต่างประเทศส่วนใหญ่จะพัฒนาวิธีการขึ้นเองทำให้ไม่ต้องเสียค่า Royalty หรือค่าลิขสิทธิ์ เป็นต้น

อีกประการหนึ่งเทคนิคนี้ก้าวหน้ารวดเร็วมาก ในอนาคตราคาน่าจะถูกลงกว่านี้มาก หรืออาจมีเทคนิคใหม่ๆ เช่น การใช้สารเคมี inactivate virus อาจทำให้ค่าใช้จ่ายในการคัดกรองเลือดถูกลง

เอกสารอ้างอิง

1. *Busch MP, Kleinman SH. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases (Report of the interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors). Transfusion 2000;40:143-59.*
2. *Grant PR, Busch MP. Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening. Transfusion Medicine 2002;12:229-42.*
3. *Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, et al. Detection of HIV-1 and HCV infections among Antibody Negative Blood Donor by Nucleic Acid-Amplification Testing. N Eng J Med 2004;351:760-68.*
4. *Busch MP, Dodd RY. NAT and Blood Safety. What is the paradigm? Transfusion 2000;40:1157-60.*
5. *Kricka LJ. Nucleic Acid Detection Technologies Labels, Strategies and Formats. Clin Chem 1999;45: 453-58.*
6. *Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. CMAJ 2000;163:301-9.*
7. *Holland R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (New York) 1993;11: 1026-30.*
8. *Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquatious DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1999;88:7276-80.*
9. *Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Koselitz JJ. The risk of Transfusion transmitted viral infections. The NHLBI Retrovirus Epideriology Blood Donor Study. N Engl J Med 1996;334:1685-90.*
10. *Roth WK, Weber M, Seifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donation for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. Lancet 1999;353:359-63.*
11. *Busch MP, Lee LLL, Satten GA, et al. Time course of detection of viral and serologic markers proceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion; implications for screening of blood and tissue donors. Transfusion 1995;35:91-7.*
12. *Hewlett IK, Epstein JS. Food and Drug Administration Conference on the Feasibility of Genetic Technology to Close the HIV Window in Donor Screening Transfusion 1997;37:346-51.*