นิพนธ์ต้นฉบับ

การประเมินความถูกต้องของน้ำยาตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาคที่ตรวจด้วยวิธี NAT

วิลาวัลย์ แซกรัมย์[1] ดวงนภา อินทรสงเคราะห์[1] พีระยา สุริยะ[1] พิชชานันท์ คำสว่าง[1] เกรียงศักดิ์ ไชยวงค์[1] สิณีนาฎ อุทา[1] ภาวิณี คุปตวินทุ[1] และ ยง ภู่วรวรรณ[2]

[1]ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย [2]ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

บทนำ *การตรวจคัดกรองโลหิตบริจาคในประเทศไทยเป็นไปตามมาตรฐานของ WHO คือมีการหาเชื้อซิฟิลิส ไวรัสเอชไอวี ตับอักเสบ บี และ ซี ที่สามารถติดต่อได้จากการรับเลือด บางประเทศในยุโรปมีการตรวจหาไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาคเนื่องจากพบความชุกของโรคสูง จากการศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ที่มากขึ้น รวมถึงพบรายงานการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้ป่วยที่รับเลือดในประเทศไทย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จึงได้ทำการศึกษาครั้งนี้* ***วัตถุประสงค์*** *เพื่อประเมินความถูกต้องของน้ำยาตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาค โดยวิธี NAT* ***วัสดุวิธีการ*** *ประเมินความไว ความจำเพาะ การเกิดปฏิกิริยาข้าม และความแม่นยำ ของน้ำยา Cobas HEV test และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Cobas 6800 system ในตัวอย่างทั้งหมด 345 ตัวอย่าง วิเคราะห์ผลการศึกษาทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS* ***ผลการศึกษา*** *ชุดน้ำยามีความไวในการทดสอบเท่ากับ 27.3 IU/mL (95% limit of detection) และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี จากตัวอย่างยืนยันผลบวก จำนวน 10 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) มีความจำเพาะจากการทดสอบด้วยตัวอย่างยืนยันผลลบจำนวน 65 ตัวอย่าง โดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ทั้ง 65 ตัวอย่าง (ร้อยละ 100) และทดสอบตัวอย่างผู้บริจาคโลหิต จำนวน 211 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นลบทั้งหมด การทดสอบปฏิกิริยาข้ามด้วยตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบ บี และ ซี แต่ตรวจไม่พบ HEV RNA จำนวน 59 ตัวอย่าง ให้ผลเป็นลบทั้งหมด การทดสอบความแม่นยำด้วยตัวอย่างอ้างอิงที่มีค่าความเข้มข้น 60 IU/mL และ 90 IU/mL เท่ากับ 39.91 (95%CI: 39.65-40.17) และ 41.27 (95%CI: 40.87-41.70) ตามลำดับ* ***สรุป*** *ชุดน้ำยา Cobas HEV test มีความไว ความจำเพาะสูง มีความแม่นยำ และไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้าม แสดงว่าเป็นน้ำยาที่มีประสิทธิภาพดี เหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาค*

คำสำคัญ : ● *ไวรัสตับอักเสบ อี* ● *วิธีการตรวจสอบความถูกต้อง* ● *การตรวจคัดกรองผู้บริจาคโลหิต*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2564;31:145-53.

ได้รับต้นฉบับ 19 มีนาคม 2564 แก้ไขบทความ 28 เมษายน 2564 รับลงตีพิมพ์ 24 พฤษภาคม 2564

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ วิลาวัลย์ แซกรัมย์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพ 10330 E-mail : Wilawan.s@redcross.co.th

Original article

The evaluation of hepatitis E detection reagents in donated blood testing by NAT method

Wilawan Saekram[1], Duangnapa Intharasongkroh[1], Peeraya Suriya[1], Pichanan Kamsawang[1], Kriangsak Chaiwong[1], Sineenart Oota[1], Pawinee Kuppatawintu[1] and Yong Poovorawan[2]

[1]National Blood Centre, Thai Red Cross Society; [2]Centre of Excellence in Clinical Virology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Abstract:

Introduction: *WHO guideline recommended that the screening of all blood donations should be mandatory for Syphilis, HIV, Hepatitis B and C virus, however HEV screening was implemented in some European counties that are the area of high prevalence. According to the increase of HEV infection and the case reports of HEV infection from blood transfusion in Thailand, the study of National Blood Centre was implemented.* ***Objective:*** *This study aims to evaluate the Hepatitis E reagents for donated blood screen using NAT.* ***Materials and Methods:*** *Cobas HEV test was tested on Cobas 6800 system by using 345 samples for evaluation with regard to analytical sensitivity, specificity, cross-reactivity and repeatability. Data were analyzed by SPSS.* ***Results:*** *The results showed that Cobas HEV test has analytical sensitivity of 27.3 IU/mL (95% Limit of detection). Additionally, the HEV RNA were detected in all 10 HEV positive samples (100%). The specificity assay was shown to be 100%, when tested with 65 confirmed negative samples and 211 prospective blood donors. The cross-reactivity assay was tested by using HIV RNA, HBV DNA and HCV RNA positive samples which HEV RNA was not detected in these 59 samples. The repeatability assay was tested with reference samples at the concentration 60 IU/mL and 90 IU/mL. The results were 39.91 (95%CI: 39.65-40.17) and 41.27 (95%CI: 40.87-41.70), respectively.* ***Conclusion:*** *The Cobas HEV test had high sensitivity, specificity and precision with no cross-reactivity. Therefore, this reagent was suitable for HEV RNA detection in blood donor screening.*

Keywords : ● *Hepatitis E virus* ● *Validation method* ● *Blood donor screening*

J Hematol Transfus Med. 2021;31:145-53.

บทนำ

ในปี ค.ศ. 1957 มีรายงานการพบเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบได้ การระบาดเกิดจากการปนเปื้อนเชื้อในน้ำดื่มที่กรุงนิวเดลี ประเทศอินเดีย ในช่วงแรกสันนิษฐานว่าเกิดจากเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ แต่ผลการตรวจเชื้อในน้ำเหลือง พบว่าเป็นเชื้อชนิดใหม่ไม่ใช่เชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ จึงจัดให้อยู่ในกลุ่มเชื้อ non-A, non-B hepatitis virus[1] เชื้อชนิดใหม่นี้ทำให้อัตราการเสียชีวิตของหญิงตั้งครรภ์หรือทารกที่ติดเชื้อนี้สูงถึงร้อยละ 20 การติดเชื้อใหม่โดยการสัมผัสเชื้อต่ำกว่าการติดเชื้อโดยสัมผัสเชื้อไวรัสตับอักเสบ เอ ในปี ค.ศ. 1989 ได้ตั้งชื่อไวรัสชนิดใหม่นี้ว่า "ไวรัสตับอักเสบ อี"[2,3]

เชื้อไวรัสตับอักเสบ อี มีพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสสายเดี่ยว (single-stranded positive sense RNA genome) ขนาดประมาณ 7.2 กิโลเบส[4] เดิมถูกจัดอยู่ใน Caliciviridae family เนื่องจากมีขนาด รูปร่างลักษณะและความหนาแน่นของเชื้อคล้ายกับ Caliciviruses แต่วิวัฒนาการของเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ไม่มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อในกลุ่ม Caliciviridae family อีกทั้งโครงสร้างของเชื้อก็แตกต่างกับเชื้อในกลุ่ม Caliciviridae family จึงทำให้เชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ถูกถอดออกจาก Caliciviridae family และถูกจัดให้อยู่ใน Hepeviridae family[5,6]

ปัจจุบันเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ที่พบการติดเชื้อในมนุษย์มี 4 จีโนไทป์ ได้แก่ จีโนไทป์ 1 ถึง 4 การติดเชื้อเชื้อจีโนไทป์ 1 และ 2 เกิดจากการรับประทานอาหารและน้ำดื่มที่ไม่สะอาดหรือสัมผัสกับสิ่งสกปรกและอุจจาระที่ปนเปื้อนเชื้อ[7] เชื้อไวรัสตับอักเสบ อี จีโนไทป์ 1 และ 2 จึงมักพบการระบาดในประเทศกำลังพัฒนาที่มีสุขลักษณะไม่ดี ส่วนจีโนไทป์ 3 และ 4 พบในประเทศที่พัฒนาแล้ว และพบว่าเป็นการติดเชื้อจากสัตว์ที่มีเชื้อ (animal reservoirs) เช่น หมูเลี้ยง หมูป่า กวาง และกระต่าย เป็นต้น[8] การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานดีส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการ (asymptomatic) และหายได้เอง (self-limitted) จึงไม่จำเป็นต้องใช้ยาในการรักษา สำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อและมีอาการตับอักเสบเฉียบพลันพบประมาณร้อยละ 5-30 ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี โดยในสัปดาห์แรกผู้ป่วยจะมีอาการไม่สบายตัว มีไข้ ปวดเมื่อยตามร่างกาย คลื่นไส้ และอาเจียน เป็นต้น หากเข้าสู่ระยะ icteric จะพบปัสสาวะเป็นสีเข้มและมีอาการตาเหลืองตัวเหลืองร่วมด้วย[9] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการติดเชื้อไวรัสตับเสบ อี จีโนไทป์ 3 และ 4 จะมีภาวะตับอักเสบเรื้อรัง (chronic hepatitis) พบได้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ (immunocompromised patients) และกลุ่มผู้ป่วยที่ใช้ยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressive drug) เนื่องจากเปลี่ยนถ่ายอวัยวะ (organ transplantation) ผู้ป่วยที่รักษาด้วยการให้เลือด (blood transfusion) ผู้ป่วยโรคเลือด (hematological diseases) ผู้ป่วยโรคเอดส์ (acquired immunodeficiency syndrome) และผู้ป่วยมะเร็ง เป็นต้น[10,11]

ความเป็นไปได้ของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ผ่านทางการรับเลือดเป็นสิ่งสำคัญของงานบริการโลหิตเพราะถือเป็นความปลอดภัยสำหรับผู้ป่วยที่จะต้องรับเลือด จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาโดยการนำพลาสมาของผู้บริจาคโลหิตที่ให้ผลการตรวจแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบ อี เป็นบวกด้วยวิธีทางซีโรโลยี (positive anti-HEV IgM และ negative anti-HEV IgG) ให้กับลิงพบว่า ทำให้ลิงติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อีได้[12] นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่นหลังการรับเลือดจากผู้บริจาคโลหิตที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี เป็นรายแรกของโลกที่การติดเชื้อเกิดจากการรับเลือด[13] ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้วจึงให้ความสำคัญต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี และมีการศึกษาเกี่ยวกับความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี มากขึ้นในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต ในปี ค.ศ. 2019 สถานการณ์การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในประเทศไทยพบอัตราการติดเชื้อในผู้ป่วย เท่ากับ 0.05 ต่อประชากรแสนคน แต่ยังไม่มีรายงานผู้เสียชีวิต[14] ในปี ค.ศ. 1996 มีรายงานการศึกษาความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตไทย โดยใช้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในกลุ่มประชาชนและผู้บริจาคโลหิตไทย พบว่ามีความชุกของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี อยู่ระหว่างร้อยละ 9-22[15] นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2000 มีรายงานความชุกการพบเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิตในภาคเหนือ 4 จังหวัด ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี (positive anti-HEV IgG) ประมาณร้อยละ 8.7[16] และในปี ค.ศ. 2019 มีการศึกษาการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ของผู้บริจาคโลหิตไทยในเขตกรุงเทพมหานคร โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี (HEV RNA) ด้วยวิธี inhouse real-time RT PCR ตรวจพบ RNA ของเชื้อประมาณร้อยละ 0.09 หรือคิดเป็น 1 ใน 1,159 ราย และสายพันธุ์ที่พบคือ ไวรัสตับอักเสบ อี จีโนไทป์ 3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มาจากการบริโภคเนื้อสัตว์แบบดิบหรือปรุงไม่สุกที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนอยู่[17]

ปัจจุบันการตรวจคัดกรองโลหิตบริจาค (blood donor screening) ในประเทศไทยเป็นไปตามมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนด กล่าวคือ โลหิตบริจาคทุกถุงจะต้องทำการตรวจหาเชื้อโรคที่สามารถติดต่อทางการให้เลือดได้ (transfusion-transmitted infections) ได้แก่ เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี (HBV) เชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี (HCV) เชื้อเอชไอวี (HIV) และเชื้อก่อโรคซิฟิลิส (Treponema pallidum) ก่อนนำโลหิตนั้นไปให้กับผู้ป่วย แม้ว่าจะมีการตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาคแล้วในบาง

ประเทศแถบยุโรป เพราะพบความชุกของการติดเชื้อสูง[18] แต่สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาค ดังนั้นศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย จึงริเริ่มโครงการนำร่องเพื่อศึกษาการตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิตไทย ทั้งนี้เพื่อจัดหาโลหิตที่ปลอดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี สำหรับผู้ป่วยที่มีภูมิต้านทานต่ำและผู้ป่วยที่ถูกกดภูมิต้านทานเพื่อการรักษา โดยมีแผนการดำเนินงานคือ ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ด้วยวิธี nucleic acid testing (NAT) ถึงแม้ว่าการคัดกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาคนั้น จะทำให้ค่าใช้จ่ายในการตรวจเลือดบริจาคเพิ่มขึ้นก็ตาม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของน้ำยาที่ใช้สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ด้วยวิธี NAT ในโลหิตบริจาค ก่อนนำไปใช้สำหรับงานตรวจประจำวันต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การศึกษาครั้งนี้มีช่วงเวลาดำเนินโครงการ เริ่มตั้งแต่เดือนกันยายน-ธันวาคม พ.ศ. 2562 ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย certificate number NBC 1/2562 และคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย certificate number IRB 228/62

ตัวอย่างสำหรับการทดสอบ

ในการศึกษาได้ทำการทดสอบความไว (sensitivity test) ความจำเพาะ (specificity test) ปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reactivity test) และความแม่นยำ (repeatability test ในตัวอย่าง ดังนี้

1. การทดสอบความไว (sensitivity) ทำการทดสอบและวิเคราะห์หาค่า analytical sensitivity โดยใช้ตัวอย่างสารมาตรฐาน 1st WHO International Standard (IS) รหัส 6329/10 ที่เจือจางด้วย normal negative plasma เพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ และทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้ตัวอย่าง HEV-RNA reference panels (biological quality control, the Netherlands)

2. การทดสอบความจำเพาะ (specificity test) ใช้ตัวอย่าง 2 กลุ่ม คือ ตัวอย่างที่ตรวจหา HEV RNA และให้ผลการตรวจยืนยันเป็นลบ โดยวิธี one-step real-time RT PCR ด้วยเครื่อง ABI ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)[17] ที่มีความไวในการทดสอบประมาณ 53.5 IU/ml (95% confidence interval, 34.3-144) จำนวน 65 ตัวอย่าง (หากพบผลการตรวจเป็นบวกจะถูกคัดออก) และ ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี มาก่อน (prospective donations) จำนวน 211 ตัวอย่าง โดยการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มจากผู้บริจาคโลหิตที่เข้ามาบริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ระหว่างเดือนกันยายน–ธันวาคม พ.ศ. 2562

3. การทดสอบปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reactivity test) ใช้ตัวอย่างเลือดที่ตรวจพบเชื้อไวรัสเอชไอวี ไวรัสตับอักเสบ บี และไวรัสตับอักเสบ ซี จำนวน 20, 20 และ 19 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ด้วยวิธี one-step real-time RT PCR และต้องมีปริมาณเชื้อไวรัสอยู่ในช่วง 10^3 - 10^6 copies/mL หรือ IU/mL จำนวน 59 ตัวอย่าง

4. การทดสอบความแม่นยำ (repeatability test) ใช้ตัวอย่างที่เตรียมจากตัวอย่างอ้างอิง [1st WHO Standard (6329/10)] ที่เจือจางด้วย negative human plasma ให้ได้ความเข้มข้น 2 และ 3 เท่าของค่า LOD ที่ได้จากการทดสอบ analytical sensitivity

วิธีการทดสอบ

ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ด้วยวิธี nucleic acid testing (NAT) หลักการ real-time PCR โดยใช้น้ำยา Cobas HEV test ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Cobas 6800 system (Roche) และรายงานผลการทดสอบเป็นเชิงคุณภาพ

การทดสอบเพื่อประเมินความไวของน้ำยา (sensitivity test)

Analytical sensitivity หรือความไวเชิงวิเคราะห์ เป็นการประเมินความสามารถของน้ำยาที่จะสามารถตรวจพบปริมาณต่ำที่สุดของสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี (HEV RNA) ที่มีในตัวอย่าง (limit of detection; LOD) โดยนำมาทดสอบกับสารมาตรฐาน 1st WHO International Standard (IS) รหัส 6329/10[19] นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 1, 3, 10, 30 และ 90 IU/mL แต่ละความเข้มข้นนำมาทดสอบ 27 ครั้ง วิเคราะห์ผลการทดสอบ analytical sensitivity โดยใช้โปรแกม SPSS version 22.0 (Probit analysis) โดยเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ (acceptance criteria) ของการทดสอบนี้ คือ 95% LOD ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.3 log10 ของค่า LOD ที่บริษัทกำหนด [18.6 IU/mL (95%CI: 15.9-22.6)] หรือเท่ากับ 37.2 IU/mL จึงจะผ่านตามเกณฑ์ที่กำหนด นอกจากนี้ยังทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้ตัวอย่างยืนยัน (HEV-RNA reference panels) จำนวน 10 ตัวอย่าง

การทดสอบเพื่อประเมินความจำเพาะของน้ำยา (specificity test)

Specificity หรือการประเมินความสามารถของน้ำยาในการตรวจหา HEV RNA และให้ผลการทดสอบเป็นลบในผู้ที่ไม่เป็นโรคหรือไม่มีเชื้อ HEV ใช้ตัวอย่างทดสอบ จำนวน 276 ตัวอย่าง เกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ (acceptance criteria) คือ ค่าความจำเพาะมากกว่าหรือเท่ากับ 99.5% และทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการตรวจมาก่อน (prospective donations)

ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างโดยการสุ่มจากผู้บริจาคโลหิตที่เข้ามาบริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ในช่วงเวลาที่ดำเนินโครงการ จำนวน 211 ตัวอย่าง

การทดสอบเพื่อประเมินการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันของน้ำยา (cross reactivity test)

Cross reactivity เป็นการประเมินความสามารถของน้ำยาในการตรวจหา HEV RNA และให้ผลการทดสอบเป็นลบ ในตัวอย่างที่ตรวจพบไวรัสตับอักเสบ บี เชื้อไวรัสตับอักเสบ ซี และเชื้อไวรัสเอชไอวี โดยทดสอบตัวอย่างจำนวน 59 ตัวอย่าง เกณฑ์การยอมรับได้ คือ ผลการตรวจเป็นลบในทุกตัวอย่าง

การทดสอบเพื่อประเมินความแม่นยำของน้ำยา (repeatability test)

การทดสอบนี้ทำโดยนำตัวอย่างที่เตรียมจากตัวอย่างอ้างอิง [1st WHO Standard (6329/10)] ที่เจือจางด้วย negative human plasma ให้ได้ความเข้มข้น 2 และ 3 เท่าของค่า LOD ที่ได้จากการทดสอบ analytical sensitivity โดยแต่ละความเข้มข้นแบ่งเป็น 3 ชุด (ทดสอบ 3 วัน) ใน 1 ชุด แบ่งทำการทดสอบ 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลโดยการพิจารณา จำนวนตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก และค่า cycle threshold value (ค่าจำนวนรอบของการทำ real-time PCR ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซ็นต์ตัดกับเส้น threshold) เพื่อบ่งชี้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้วหาค่าทางสถิติ (mean และ SD) โดยเกณฑ์การยอมรับคือ ทุกตัวอย่างต้องให้ผลการทดสอบเป็นบวก และค่า SD ที่คำนวณได้ต้องไม่เกิน 10.0%

การวิเคราะห์ทางสถิติ

บันทึกข้อมูลและคำนวณค่าพื้นฐานทางสถิติของข้อมูลด้วยโปรแกรม Excel 2017 คำนวณหาค่า LOD โดยการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ให้ผลการทดสอบ HEV RNA เป็นบวกที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 50, 95 และ 99 ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) จากโปรแกรม SPSS version 17

ผลการศึกษา

การทดสอบเพื่อประเมินความไวของน้ำยา (sensitivity test) การทดสอบ analytical sensitivity ด้วยตัวอย่างสารมาตรฐานเจือจางที่ความเข้มข้น 1, 3, 10, 30 และ 90 IU/mL ให้ผลการทดสอบเป็นบวกคิดเป็นร้อยละ 15, 33, 70, 100 และ 100 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 ผลการคำนวณหาค่า LOD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าชุดน้ำยา Cobas HEV test มีความไวของในการทดสอบเท่ากับ 27.3 IU/mL (95%CI: 16.62-62.36) ดังแสดงใน Table 2 การทดสอบตัวอย่างยืนยันผลตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี เป็นบวก จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยน้ำยา Cobas HEV test และเครื่อง Cobas 6800 ให้ผลเป็นบวก ทั้ง 10 ตัวอย่าง

Table 1 Number and percentage of reactive result of HEV RNA testing by using Cobas HEV test on Cobas 6800 (n = 135)

Concentration of HEV RNA (IU/mL)	Number of valid replicates	Number of HEV RNA reactive	Percentage (%)
90	27	27	100
30	27	27	100
10	27	19	70
3	27	9	33
1	27	4	15

Table 2 Results of PROBIT analysis on Limit of Detection (LOD) data collected with 1st WHO International Standard in HEV negative plasma

Detection limit estimates*	LOD (IU/mL)	Lower 95% confidence limit	Upper 95% confidence limit
ED_{50}	4.25	3.00	5.94
ED_{95}	27.30	16.62	62.36
ED_{99}	59.00	30.98	180.24

*HEV RNA concentrations that were a positive result by using Cobas HEV tests in 50 (ED_{50}), 95 (ED_{95}), and 99 (ED_{99}) percent of cases

การทดสอบเพื่อประเมินความจำเพาะของน้ำยา (specificity test)

การประเมินความจำเพาะของการทดสอบ โดยใช้ตัวอย่างยืนยันผลตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี เป็นลบ จำนวน 65 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลเป็นลบทุกตัวอย่าง และผลการตรวจตัวอย่าง prospective donations จำนวน 211 ตัวอย่าง พบว่าตรวจไม่พบเชื้อทั้ง 211 ตัวอย่าง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าชุดน้ำยา Cobas HEV test มีความจำเพาะของการทดสอบเท่ากับร้อยละ 100 ดังแสดงใน Table 3

การทดสอบเพื่อประเมินการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันของน้ำยา (cross reactivity test)

การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันด้วยตัวอย่างยืนยันผลตรวจเชื้อไวรัสเอชไอวี เชื้อไวรัสตับอักเสบ บี และ ซี เป็นบวกอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่ตรวจไม่พบเชื้อ HEV RNA จำนวน 59 ตัวอย่าง พบว่าการตรวจหา HEV RNA ด้วยน้ำยา Cobas HEV test ไม่พบปฏิกิริยาข้ามกันทั้ง 59 ตัวอย่าง ดังแสดงใน Table 4

การทดสอบเพื่อประเมินความแม่นยำ (repeatability test)

การทดสอบความแม่นยำจากการวิเคราะห์ซ้ำโดยใช้ตัวอย่างอ้างอิงที่ค่าความเข้มข้น 60 IU/mL (2xLOD) และ 90 IU/mL (3xLOD) ซึ่งมีค่าความเข้มข้นเป็น 2-3 เท่าของค่าปริมาณ HEV RNA ที่ต่ำที่สุดที่น้ำยาสามารถตรวจวัดได้ (LOD = 27.3 IU/mL) พบว่า ที่ความเข้มข้น 90 IU/mL มีค่า ct value เท่ากับ 39.91 (95%CI: 39.65-40.17) และที่ความเข้มข้น 60 IU/mL มีค่า ct value เท่ากับ 41.27 (95%CI: 40.87-41.70) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด จึงสรุปได้ว่าน้ำยา Cobas HEV test มีความแม่นยำในการตรวจวิเคราะห์ ดังแสดงใน Table 5

Table 3 Summary of specificity in HEV RNA negative samples

Source of samples	Number of samples (Samples)	Number of HEV RNA reactive (Samples)	Percentage of HEV RNA non-reactive	Two-sided 95% Confidence Interval
HEV RNA negative plasma	65	0	100	93.0- 00%
Prospective donor samples at National Blood Centre, TRCS	211	0	100	97.8-100%

Table 4 Summary of cross reactivity results in HIV, HBV and HCV positive samples

Source of samples	Number of samples (Samples)	Number of HEV RNA reactive (Samples)	Percentage of HEV RNA non-reactive
HIV positive samples	20	0	100
HBV positive samples	20	0	100
HCV positive samples	19	0	100

Table 5 Summary of repeatability in 1st WHO International Standard in HEV negative plasma

Conc.	Day	Percentage of HEV RNA non-reactive	Two-side 95%CI	Mean of Ct value	SD of Ct value	Imprescision (CV, %)	95%CI
3xLOD	1st	100% (9/9)	87.54-100%	39.91	0.770	1.93	39.65-40.17
	2nd	100% (9/9)					
	3rd	100% (9/9)					
2xLOD	1st	100% (9/9)	87.54-100%	41.27	1.102	2.67	40.87-41.70
	2nd	100% (9/9)					
	3rd	100% (9/9)					

Conc. = concentration; CI = confidence interval; SD = standard deviation

วิจารณ์

ความปลอดภัยของผู้ป่วยที่รับเลือดถือเป็นเป้าหมายสำคัญตามนโยบายบริการโลหิตแห่งชาติ (National blood policy) การตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการ (laboratory testing) จึงเป็นขั้นตอนสำคัญและจำเป็นที่จะช่วยลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อจากโลหิตบริจาค แต่ถึงอย่างไร ผลตรวจคัดกรองทางห้องปฏิบัติการที่เป็นลบก็ยังมีโอกาสที่ผู้ป่วยจะได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนในโลหิตบริจาคได้ (residual risk)[21] ดังนั้น การเลือกใช้วิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อคัดกรองเชื้อกลุ่ม TTIs ในโลหิตบริจาคจึงมีความสำคัญอย่างมาก กล่าวคือวิธีที่ใช้ในการตรวจควรจะต้องมีความไวและความจำเพาะที่สูง อีกทั้งต้องพิจารณาถึงขีดความสามารถของน้ำยาที่จะสามารถตรวจพบเชื้อปริมาณน้อยและในระยะเวลาได้เร็วที่สุด รวมถึงต้องทราบข้อจำกัดต่างๆ เพื่อช่วยในการแปลผลการทดสอบให้ถูกต้องและน่าเชื่อถือ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เป็นหน่วยงานหลักของประเทศในการรับบริจาคโลหิตและกระจายโลหิตให้ทั่วถึงผู้ป่วยทั่วประเทศ และเป็นแม่แบบในการวางแผนการปฏิบัติงานทางด้านงานบริการโลหิตของประเทศไทย อีกทั้งเป็นหน่วยงานอ้างอิงสำหรับห้องปฏิบัติการธนาคารเลือดของประเทศไทยและประเทศเพื่อนบ้าน ดังนั้น ในการเลือกใช้วิธีการตรวจ น้ำยา และเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการต่างๆ จึงต้องมีขั้นตอนและหลักการที่ถูกต้องเหมาะสม เพื่อสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้ปฏิบัติงานและเครือข่ายห้องปฏิบัติการ โรงพยาบาลต่างๆ รวมถึงผู้ป่วยที่ต้องรับเลือด

เนื่องจากมีรายงานการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี จากการรับเลือด ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2004 ทำให้บางประเทศในทวีปยุโรปเริ่มการตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิต[22] ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับนโยบายด้านสาธารณสุขและการพิจารณาความชุกของการตรวจพบ HEV RNA ในผู้บริจาคโลหิตของแต่ละประเทศ สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาความชุกการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิต ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2017 ซึ่งพบความถี่ของการติดเชื้อประมาณ 1 ใน 1,158[17] ทำให้ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติเห็นถึงความสำคัญของการตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสตับเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิต แต่เนื่องจากการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ยังพบได้ไม่มากนักในประเทศไทย และมีข้อจำกัดหลายอย่างที่จะทำการตรวจคัดกรองโลหิตบริจาค ในเบื้องต้นนี้ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติจึงได้ดำเนินการเพื่อคัดเลือกน้ำยาและเครื่องมือสำหรับการตรวจกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตบริจาค การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) โดยคำนึงถึงความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้ทันความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์โลหิต โดยเลือกน้ำยา Cobas HEV test ของบริษัทโรชไดแอกโนติกส์ (Roche diagnostic) มาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจเคราะห์ (analytical performance) ได้แก่ ความไว ความจำเพาะ ความถูกต้อง และการเกิดปฏิกิริยาข้ามของน้ำยา โดยใช้เครื่อง Cobas 6800 system เปรียบเทียบผลการศึกษากับข้อมูลอ้างอิงที่บริษัทได้ระบุไว้ในเอกสารประกอบน้ำยา (package insert) เพื่อใช้เป็นข้อมูลตัดสินใจเลือกใช้น้ำยาสำหรับตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิต

ผลการทดสอบความไวของชุดน้ำยาพบว่าสามารถตรวจพบ HEV RNA ในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำสุด (LOD) คือ 27.3 IU/ml เมื่อเทียบกับที่บริษัทได้ระบุไว้ที่ 18.6 IU/mL[23] มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยเกณฑ์ที่ยอมรับได้กำหนดให้ค่า 95% LOD ต้องน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.3 log10 ของค่า LOD ที่บริษัทกำหนด ซึ่งเท่ากับ 37.2 IU/mL ดังนั้น ค่า LOD ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาครั้งนี้กับการศึกษาในต่างประเทศที่ศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการตรวจหา HEV RNA คือน้ำยาสำหรับตรวจด้วยวิธี real-time RT-PCR ของ 3 บริษัท ได้แก่ RealStar HEV reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay ของบริษัท Altona Diagnostic Technologies (ADT) ประเทศเยอรมนี น้ำยา hepatitisE@ceeramTools™ ของบริษัท Ceeram S.A.S. ของประเทศฝรั่งเศส และน้ำยา amplicube HEV RT-PCR kit ของบริษัท Mikrogen ประเทศเยอรมนี ในตัวอย่าง 1st WHO International Standard ซึ่งเป็นมาตรฐาน[19] พบว่ามีความไวของการตรวจหา HEV RNA (LOD) เท่ากับ 37.8 IU/mL (95%CI: 64.9-205.9 IU/mL), 86.8 IU/mL (95%CI: 68.9-124.7 IU/mL) และ 180.4 IU/mL (95%CI: 128.5-355.2 IU/mL) ตามลำดับ[24] จะเห็นได้ว่าผลจากการศึกษาครั้งนี้น้ำยา Cobas HEV test มีความไวสูงกว่าเช่นเดียวกันกับการตรวจแบบเดี่ยว (individual test) และใกล้เคียงกับการทดลองน้ำยา Syntura real-time PCR ที่มีค่า LOD อยู่ที่ 25.2 IU/mL (95%CI: 19.2-44.1 IU/mL)[25] และเนื่องจากยังไม่มีรายงานการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี จากการรับเลือดในกรณีที่มีปริมาณเชื้อต่ำแต่สามารถทำให้ติดเชื้อได้ (infectious dose) ทำให้ไม่สามารถกำหนดได้ว่าน้ำยาที่เหมาะจะนำมาใช้ในงานตรวจกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในโลหิตได้นั้นจะต้องมีค่า LOD เท่าไร การเลือกน้ำยาที่มีความไวสูงจึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมที่สุด[26] สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในตัวอย่างยืนยันได้ร้อยละ 100

ผลการทดสอบน้ำยา Cobas HEV test กับตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อ HEV RNA ตัวอย่างผู้บริจาคโลหิต ณ ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่คัดเลือกมาศึกษาแบบสุ่ม พบ

ว่าน้ำยามีความจำเพาะสูง (ร้อยละ 100 ที่ระดับ 95%CI: 93.0-100%, 95%CI: 97.8-100% ตามลำดับ) ต่อการตรวจหาเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี และสอดคล้องกับการทดสอบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกันกับเชื้อ TTIs อื่น ได้แก่ HIV, HBV และ HCV ที่ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาข้ามกัน แสดงให้เห็นว่าไพร์เมอร์และโพรบในชุดน้ำยา Cobas HEV test มีความจำเพาะสูงต่อเชื้อ HEV RNA อีกทั้งยังแสดงถึงคุณภาพของน้ำยาว่าสามารถยับยั้งการปนเปื้อนจากขั้นตอนการสกัดสารพันธุกรรมและสามารถตรวจจับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HEV RNA ได้อย่างดีอีกด้วย

ผลการทดสอบความแม่นยำของน้ำยาในการตรวจ HEV RNA โดยใช้ตัวอย่างที่ทราบค่าความเข้มข้น 2 ระดับ (ความเข้มข้น 3 เท่าและความเข้มข้น 2 เท่าของ LOD เป็นระยะเวลา 3 วัน) ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวกทั้งหมด ด้วยค่า ct value ที่ความเข้มข้น 3 เท่า และ 2 เท่าของ LOD มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39.91 และ 41.27 ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเท่ากับร้อยละ 1.93 และ 2.67 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (น้อยกว่าร้อยละ 20)[27] และเนื่องจากเป็นชุดน้ำยาตรวจเชิงคุณภาพ (qualitative assay) ดังนั้น ค่า ct value จึงเป็นค่าที่ใช้ในการประมาณความเข้มข้นของเชื้อว่ามีเชื้ออยู่ในปริมาณมากหรือน้อย

ผลการคำนวณค่า LOD ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ายังไม่ตรงตามที่บริษัทระบุไว้ ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากสารมาตรฐานที่ใช้ในการทดสอบวิเคราะห์เพื่อคำนวณค่า LOD นั้นเป็นสารชีวภาพที่ติดเชื้อและมีปริมาณตัวอย่างที่จำกัด อีกทั้งการสั่งและนำเข้าจากบริษัทผู้ผลิตต่างประเทศทำให้มีค่าใช้จ่ายสูง ส่งผลให้ไม่สามารถทำการทดสอบได้ในจำนวนครั้งที่มากพอ จึงส่งผลถึงค่าการคำนวณค่า LOD แต่อย่างไรก็ตาม ค่า LOD ที่คำนวณได้ยังอยู่ในช่วงที่สามารถยอมรับได้ ดังนั้น ผลการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า ชุดน้ำยา Cobas HEV test ที่ทำการตรวจด้วยเครื่อง Cobas 6800 มีความจำเพาะและความแม่นยำเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการตรวจคัดกรองเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี ในผู้บริจาคโลหิตต่อไป และยังเป็นแนวทางให้กับผู้ที่สนใจจะทำการศึกษาในลักษณะเดียวกันอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ศึกษาวิจัยขอขอบคุณนาวาโทหญิง แพทย์หญิงอุบลวัณณ์ จรูญเรืองฤทธิ์ อดีตผู้อำนวยการศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้เพื่อพัฒนาการตรวจคัดกรองโลหิต ขอขอบคุณนางสาวกัลยา เกิดแก้วงาม ผู้เชี่ยวชาญนักวิทยาศาสตร์การแพทย์ นางสาวต้องใจ แสวงทรัพย์ ผู้ชำนาญการนักเทคนิคการแพทย์ และนางสาววชิรญาย์ อธิมัง อาจารย์ประจำคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้คำแนะนำการเขียนนิพนธ์ต้นฉบับ และขอขอบคุณคณะผู้บริหารศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย รวมถึงเจ้าหน้าที่ฝ่ายตรวจคัดกรองโลหิตทุกท่านที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกระหว่างทำวิจัยโครงการนี้จนบรรลุวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางไวรัสวิทยาคลินิก ที่ให้ความรู้และสนับสนุนการตรวจทางห้องปฏิบัติการยืนยันการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ อี จนทำให้ผู้วิจัยสามารถทำการทดลองและดำเนินโครงการวิจัยจนเสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

1. *Viswanathan R, Sidhu A. Infectious hepatitis; clinical findings. Indian J Med Res. 1957;45:49.*
2. *Hussaini S, Skidmore S, Richardson P, Sherratt L, Cooper B, O'Grady J. Severe hepatitis E infection during pregnancy. J Viral Hepat. 1997;4:51-4.*
3. *Kane MA, Bradley DW, Shrestha SM, Maynard JE, Cook E, Mishra RP, et al. Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal: recovery of a possible etiologic agent and transmission studies in marmosets. JAMA. 1984;252:3140-5.*
4. *Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. Rev Med Virol. 2003;13:145-54.*
5. *Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang C-C, Bradley DW, Fry KE, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. Virology. 1991;185:120-31.*
6. *Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng X-J, Okamoto H, Van der Poel W, et al. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae. J Gen virol. 2017;98:2645.*
7. *Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, et al. Transfusion transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. Transfus Med. 2006;16:79-83.*
8. *Dalton HR, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E in developed countries: current status and future perspectives. Future Microbiol. 2014;9:1361-72.*
9. *Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Clinical manifestations, pathogenesis and treatment of hepatitis E virus infections. J Clin Med. 2020;9:331.*
10. *Kamar N, Rostaing L, Izopet J, editors. Hepatitis E virus infection in immunosuppressed patients: natural history and therapy. Semin Liver Dis: Thieme Medical; 2013.*
11. *Aggarwal R, Jameel S. Hepatitis e. Hepatology. 2011;54:2218-26.*
12. *Xia N, Zhang J, Zheng Y, Qiu Y, Ge S, Ye X, et al. Detection of hepatitis E virus on a blood donor and its infectivity to rhesus monkey. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2004;12:13-5.*
13. *Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, et al. Transfusion transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. Transfusion. 2004;44:934-40.*

14. *Department of Disease Control, Ministry of Public Health (Thailand) Situation of Hepatitis E in Thailand 2019. Retrieved May 13, 2020. Available from: https://ddc.moph.go.th/brc/news.php?news=13303&deptcode=brc&news_views=2117*
15. *Poovorawan Y,Theamboonlers A,Chumdermpadetsuk S,Komolmit P, Thong C. Prevalence of hepatitis E virus infection in Thailand. Ann Trop Med Parasitol. 1996;90:189-96.*
16. *Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Jiviriyawat W, Yousukh A, Hayashi S, Itakura H, et al. Seroprevalence of antibody to hepatitis E virus in voluntary blood donors in Northern Thailand. Trop Med. 2000;42:135-9.*
17. *Intharasongkroh D, Thongmee T, Sa-nguanmoo P, Klinfueng S, Duang in A, Wasitthankasem R, et al. Hepatitis E virus infection in Thai blood donors. Transfusion. 2019;59:1035-43.*
18. *Goel A, Vijay HJ, Katiyar H, Aggarwal R. Prevalence of hepatitis E viraemia among blood donors: a systematic review. Vox Sang. 2020;115:120-32.*
19. *Baylis SA, Blümel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, et al. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. Emerg Infect Dis. 2013;19:729-35.*
20. *Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng X, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J Virol Methods. 2006;131:65-71.*
21. *Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd RY, Brander C. Transfusion-transmitted infections. J Transl Med. 2007;5:1-11.*
22. *Boland F, Martinez A, Pomeroy L, O'Flaherty N. Blood donor screening for hepatitis E virus in the European Union. Transfus Med Hemother. 2019;46:95-103.*
23. *Thodou V, Bremer B, Anastasiou OE, Cornberg M, Maasoumy B, Wedemeyer H. Performance of Roche qualitative HEV assay on the Cobas 6800 platform for quantitative measurement of HEV RNA. J Clin Virol. 2020;129:104525. doi: 10.1016/j.jvc.2020.104525.*
24. *Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Comparison of real-time PCR and antigen assays for detection of hepatitis E virus in blood donors. J Clin Microbiol. 2014;52:2150-6.*
25. *Germer JJ, Ankoudinova I, Belousov YS, Mahoney W, Dong C, Meng J, et al. Hepatitis E virus (HEV) detection and quantification by a real-time reverse transcription-PCR assay calibrated to the World Health Organization standard for HEV RNA. J Clin Microbiol. 2017;55:1478-87.*
26. *Juhl D, Baylis SA, Blümel J, Görg S, Hennig H. Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus infection in German blood donors. Transfusion. 2014;54:49-56.*
27. *Shankar G, Fourrier MS, Grevenkamp MA, Lodge PA. Validation of the COSTIM bioassay for dendritic cell potency. J Pharm Biomed Anal. 2004;36:285-94.*