บทความฟื้นวิชา

NAT for Addition Markers : Implication for Blood Safety

รัชนี โอเจริญ

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

โลหิตและส่วนประกอบของโลหิตมีประโยชน์อย่างใหญ่หลวงในการรักษาผู้ป่วยโรคต่างๆ แต่ในขณะเดียวกันผลเสียหรือผลกระทบจากการให้โลหิตหรือส่วนประกอบของโลหิตก็มีมากเช่นกัน ผลกระทบที่สำคัญเรื่องหนึ่งคือการติดเชื้อโรคต่างๆ จากโลหิตของผู้บริจาค (transfusion transmitted infection - TTI) ซึ่งเชื้อที่สำคัญที่ถ่ายทอดได้จากการให้โลหิตคือ ซิฟิลิส ตับอักเสบบี ตับอักเสบซี และเอดส์

ความปลอดภัยของโลหิตบริจาคหรือ safety of blood supply จะขึ้นกับ

1. Educate, motivate, recruit and retain voluntary non remunerated blood donors from low risk population

หน่วยงานที่ทำหน้าที่เจาะเก็บโลหิตจากผู้บริจาคต้องให้ความรู้แก่ประชาชนทั่วไป และกลุ่มเป้าหมายที่เป็นผู้บริจาคโลหิตว่า ผู้ที่จะบริจาคได้จะต้องมีคุณสมบัติอย่างไรบ้าง พฤติกรรมอย่างไร ที่ถือว่าเป็นพฤติกรรมเสี่ยงในการที่จะติดเชื้อโรคต่างๆ และถ้ามีพฤติกรรมเสี่ยงต้องไม่บริจาคโลหิต เพื่อป้องกันไม่ให้ผู้บริจาคเหล่านี้มีเชื้อต่างๆ ในระยะ window period ซึ่งจะไม่สามารถตรวจพบเชื้อหรือ antibody ในการตรวจกรองทางห้องปฏิบัติการ ซึ่งโลหิตที่มีเชื้อในระยะ window period เหล่านี้สามารถ transmitt โรคไปยังผู้ป่วยได้

2. Screen all donated blood for HIV and other transfusion transmissible agents

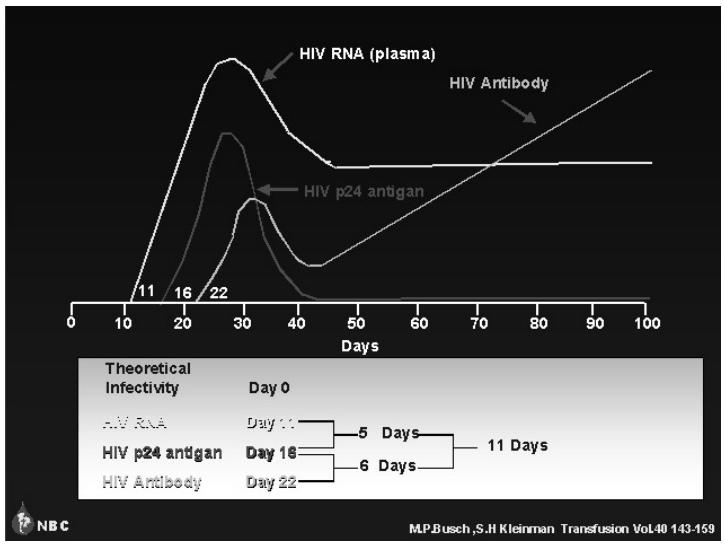
ในประเทศไทย ตามนโยบายระดับชาติเรื่องการบริการโลหิต โลหิตทุกยูนิตก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วยต้องตรวจ Syphilis (TPHA), HBsAg (EIA), anti-HCV (EIA), anti-HIV (EIA) และ HIV P24 antigen (EIA)

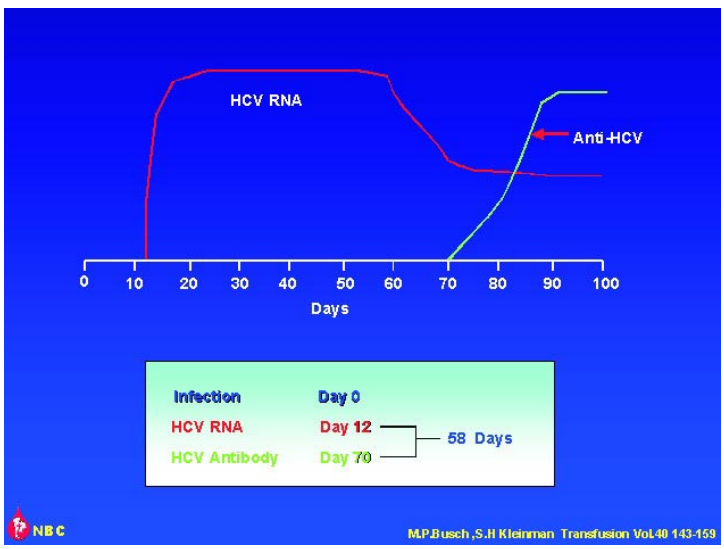
EIA หรือ Enzyme Immune Assay เป็นเทคนิคการตรวจมาตรฐานสูงสุดที่องค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้ในการตรวจเชื้อหรือ antibody ของเชื้อไวรัสต่างๆ ในโลหิตผู้บริจาคก่อนนำไปใช้กับผู้ป่วย

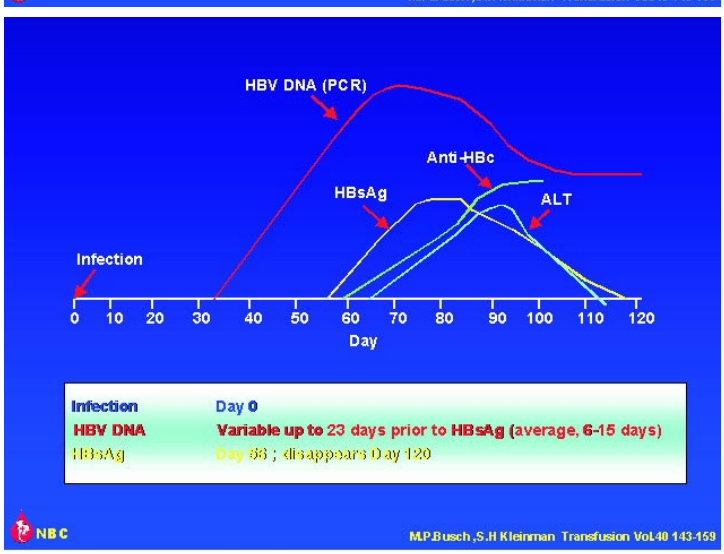
จากการศึกษาของ M.P.Busch, S.H Kleinman ตีพิมพ์ใน Transfusion vol. 40 หน้า 143-159 พบว่าสำหรับ HIV การตรวจ anti-HIV ด้วยเทคนิค EIA จะพบ anti-HIV ประมาณ 22 วัน หลังการติดเชื้อ เมื่อเพิ่มการตรวจ HIV p24 antigen ด้วยเทคนิค EIA จะพบเชื้อได้ 16 วันหลังการติดเชื้อ ดังนั้นช่วง window period ของ HIV ในการตรวจโดยเทคนิค EIA คือประมาณ 16 วัน แต่ถ้าตรวจหาเชื้อไวรัส (HIV RNA) ในพลาสมาโดยเทคนิค Nucleic Acid Amplification Testing (NAT) เราจะตรวจพบ HIV RNA 11 วันหลังการติดเชื้อ ทำให้สามารถลด window period จาก 16 วัน เป็น 11 วัน

สำหรับ HCV ซึ่งจะตรวจ anti-HCV โดยเทคนิค EIA จะพบ anti-HCV ภายหลังการติดเชื้อประมาณ 70 วัน แต่ถ้าใช้เทคนิค NAT เพื่อตรวจ HCV RNA เราจะตรวจพบได้ประมาณ 12 วันหลังการติดเชื้อ ทำให้ลด window period จาก 70 วัน เหลือเพียง 12 วัน

สำหรับ HBV จะตรวจพบ HBsAg โดยเทคนิค EIA ประมาณวันที่ 56 หลังการติดเชื้อ แต่ถ้าตรวจ


HIV RNA (plasma)
HIV Antibody
HIV p24 antigan
11
16
22
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Days
Theoretical Infectivity
Day 0
HIV RNA
Day 11
HIV p24 antigan
Day 16
HIV Antibody
Day 22
5 Days
6 Days
11 Days
NBC
M.P.Busch ,S.H Kleinman Transfusion Vol.40 143-159


HCV RNA
Anti-HCV
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Days
Infection
Day 0
HCV RNA
Day 12
HCV Antibody
Day 70
58 Days
NBC
M.P.Busch ,S.H Kleinman Transfusion Vol.40 143-159


HBV DNA (PCR)
Anti-HBc
HBsAg
ALT
Infection
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Day
Infection
Day 0
HBV DNA
Variable up to 23 days prior to HBsAg (average, 6-15 days)
HBsAg
Day 58 ; disappears Day 120
NBC
M.P.Busch ,S.H Kleinman Transfusion Vol.40 143-159

HBV DNA ด้วยเทคนิค NAT จะตรวจพบเชื้อได้ประมาณวันที่ 33 ของการติดเชื้อ

จากผลการศึกษาดังกล่าวรวมถึงผลการศึกษาจากศูนย์บริการโลหิตต่างๆ ในต่างประเทศ จึงเริ่มมีการใช้ NAT มาเป็น screening test ของโลหิตผู้บริจาคเพิ่มมากขึ้น เช่น ในสหรัฐอเมริกา แคนาดา ประเทศต่างๆ ในยุโรป ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย ฮ่องกง สิงคโปร์ เป็นต้น

สำหรับประเทศไทย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้ศึกษาผลเสียจากการให้โลหิตแก่ผู้ป่วย โดยการส่งแบบสอบถามไปยังโรงพยาบาลต่างๆ ทั่วประเทศ (Hemovigilance survey) ในปี ค.ศ. 2001 ผลสรุปจากคำตอบของโรงพยาบาลต่างๆ เฉพาะในเรื่องที่ผู้ป่วยติดเชื้อจากการรับโลหิตพบว่าอัตราการติดเชื้อ HIV พบประมาณ 1 : 1,000,000 ยูนิต ติดเชื้อ HCV ประมาณ 1 : 500,000 ยูนิต และ HBV ประมาณ 1 : 200,000 ยูนิต

รายงานการติดเชื้อ HIV และ HCV ในผู้ป่วย Hemophilia 60 คน ซึ่งรวบรวมตั้งแต่ปี ค.ศ. 1981-2000 จากคณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี พบ HIV seropositive 3 ราย (5%), HCV seropositive 36 ราย (60%) และมี 2 ราย (1.2%) ซึ่งพบ seropositive ทั้ง HIV และ HCV สำหรับผู้ป่วย Thalassemia 150 ราย ซึ่งรักษาที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล รายงานปี ค.ศ. 2003 ไม่พบ HIV seropositive แต่พบ HCV positive 14 ราย (9.3%) สำหรับกระทรวงสาธารณสุข โดยกองโรคเอดส์ กรมควบคุมโรคติดต่อ ซึ่งได้ให้โรงพยาบาลต่างๆ ของกระทรวงสาธารณสุข รายงานผู้ป่วย HIV ที่เสียชีวิตพบว่าตั้งแต่ ค.ศ. 1984-2003 มีผู้ป่วย HIV ที่ติดเชื้อจากการรับโลหิต 15 ราย ที่เสียชีวิตไปแล้ว

Nucleic Acid Amplification testing (NAT) เป็นเทคนิคการตรวจซึ่งตรวจหาที่ Nucleic Acid ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ประกอบเป็น DNA หรือ RNA ได้อย่างจำเพาะโดยอาศัยหลักการการเพิ่มจำนวน (Amplification) สารพันธุกรรมเป้าหมาย ให้มีปริมาณมากในช่วงเวลาสั้นๆ จนมีระดับที่สามารถตรวจพบได้ เชื้อ HBV เป็น DNA virus ส่วน HIV และ HCV เป็น RNA virus เทคนิคการ amplify DNA หรือ RNA ของไวรัสมีสองเทคนิคใหญ่ๆ คือ

1. เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้กระบวนการสังเคราะห์ DNA จาก DNA ต้นแบบ โดยใช้เทคนิค PCR โดยอาศัย enzyme DNA polymerase สำหรับ HIV และ HCV ซึ่งเป็น RNA virus ต้องเปลี่ยน RNA เป็น DNA ก่อน โดยเพิ่มขั้นตอน Reverse Transcription โดยใช้ enzyme reverse transcriptase บริษัทที่ผลิตน้ำยา NAT โดยใช้หลักการ PCR คือบริษัท Roche

2. เทคนิค Transcription Mediated Amplification (TMA) ซึ่งใช้กระบวนการสัง เคราะห์ RNA จาก DNA (HBV) หรือ RNA ต้นแบบ (HIV, HCV) โดยใช้หลักการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription) ซึ่งต้องอาศัย enzyme RNA polymerase และ reverse transcriptase บริษัทที่ผลิตน้ำยา NAT โดยใช้หลักการ TMA คือบริษัท Chiron

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำ NAT มาใช้ในการตรวจกรองโลหิตผู้บริจาคของศูนย์บริการโลหิตฯ ทั้งในแง่เทคนิคการตรวจ, sensitivity, specificity ของน้ำยา เวลาที่ใช้ในการตรวจ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการแจกจ่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตให้ทันการโดยเฉพาะเกร็ดโลหิต และ cost benefit ของการเพิ่มการตรวจ NAT เป็น routine blood screening ของศูนย์บริการโลหิตฯ และของประเทศไทยต่อไป

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติฯ ได้เริ่มทำการศึกษาตรวจ NAT เชื้อ HIV และ HCV ตั้งแต่มิถุนายน 2000 ถึงพฤษภาคม 2001 โดยแพทย์หญิงศรีวิไล ตันประเสริฐ ซึ่งเป็นผู้อำนวยการในช่วงเวลาดังกล่าว เทคนิคที่ใช้คือเทคนิค PCR โดยใช้น้ำยา Cobas Ampliscreen HIV

v.1.5 และ HCV v.2.0 ของบริษัท Roche ตัวอย่างโลหิตต้องนำมา pool รวมกันก่อน 24 sample/pool โดยได้ศึกษาจำนวนตัวอย่างโลหิตทั้งหมด 108,768 samples หรือยูนิต จำนวน pool คือ 4,532 pools (เนื่องจากราคาน้ำยาแพงมาก จึงต้องเอา samples มา pool รวมกันก่อนเพื่อลดราคาค่าใช้จ่าย)

ผลการศึกษาในช่วงเวลาดังกล่าว จากตัวอย่างโลหิตของผู้บริจาค 108,768 ราย เราพบ window period ของ HIV 1 ราย และ HCV 1 ราย ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้โดยเทคนิค EIA ทำให้อุบัติการณ์การพบ window period ของ HIV และ HCV สูงถึง 1:108,768 ยูนิต

ถึงแม้ความเสี่ยงของผู้ป่วยที่จะติดเชื้อ HIV และ HCV สูงมากโดยเฉพาะผู้ป่วยกลุ่มที่จำเป็นต้องใช้โลหิตและส่วนประกอบโลหิตเป็นจำนวนมากเช่น hemophilia และ thalassemia แต่ค่าน้ำยาในการตรวจโดยเทคนิค NAT ก็สูงมากเช่นกัน และโรงพยาบาลต่างๆ ต้องพยายามลดค่าใช้จ่ายจากนโยบายประกันสุขภาพของรัฐบาล ทำให้โรงพยาบาลส่วนใหญ่ของรัฐบาลยังลังเลที่จะเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในการตรวจ NAT ศูนย์บริการโลหิตฯ จึงได้เปิดบริการการตรวจ NAT เฉพาะโรงพยาบาลที่จะขอเพิ่มการตรวจ NAT เป็นกรณีพิเศษตั้งแต่วันที่ 3 มิถุนายน 2002 เป็นต้นมา โดยคิดค่าตรวจตัวอย่างละ 500 บาท ในระยะแรกยังคงใช้น้ำยาตรวจ Cobas Ampliscreen HIV v.1.5 และ HCV v.2.0 ของ Roche และเป็นการตรวจโดย pool 24 samples ต่อ 1 pool ต่อมาทางศูนย์บริการโลหิตฯ ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพและเทคนิคการตรวจโดยวิธี TMA ของ Chiron ซึ่งเป็นเทคนิคที่ USFDA ให้การรับรอง และถ้าใช้น้ำยานี้สามารถลดการทำ HIV p24Ag โดยเทคนิค EIA ได้ รวมถึงความสามารถในการ detect subtype O ได้ และในราคาน้ำยาที่ใกล้เคียงกันเราสามารถตรวจเป็น individual test ได้ โดยไม่ต้อง pool samples ให้เป็น 24 samples ทำให้เพิ่ม sensitivity ของการตรวจและความรวดเร็วในการที่จะแจกจ่ายโลหิตและส่วนประกอบของโลหิตให้ทันต่อการใช้ของผู้ป่วย

นับตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2002 จนกระทั่งถึงกลางเดือนกุมภาพันธ์ 2004 มีโรงพยาบาลต่างๆ ที่ขอตรวจเพิ่มเติม HIV และ HCV NAT จำนวน 40,586 ยูนิต เราได้ตรวจพบ HIV window period เพิ่มอีก 1 ราย ในเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งทำให้ความเสี่ยงของ HIV window period สูงถึง 1 : 40,586

หลังจากเดือนมีนาคม 2547 ซึ่งทางศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ได้จัดประชุมวิชาการประจำปี พร้อมทั้งมี workshop ในเรื่องการตรวจ HIV และ HCV ด้วย NAT ทำให้โรงพยาบาลต่างๆ มีความเข้าใจเพิ่มมากขึ้น และขอให้มีการตรวจโลหิตผู้บริจาคที่จะเบิกไปใช้กับผู้ป่วยเพิ่มขึ้น สถิติจนถึงเดือนสิงหาคม 2547 มีการตรวจไปแล้ว 80,825 ราย พบ HIV window period ในเดือนสิงหาคม 2547 2 ราย และ HCV window period 1 ราย จึงทำให้ความเสี่ยงของ HIV window period สูงถึง 3 : 80,825 ราย และ HCV 1 : 80,825 ราย ซึ่งทำให้ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ ต้องนำผลการพบนี้มาพัฒนาการสื่อข้อมูลให้ผู้บริจาคให้คัดกรองตัวเอง, การเสริมสร้างความเข็มแข็งของเจ้าหน้าที่ผู้ทำหน้าที่คัดกรองผู้บริจาคโลหิต และขอนโยบายจากสภากาชาดในการตรวจกรองโลหิตเพิ่มเติมด้วยวิธี NAT ของศูนย์บริการโลหิตฯ ในปีงบประมาณ 2548 และดำเนินการให้ได้ทั่วถึงในโลหิตบริจาคทั่วประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. *Busch M.P., Kleinman S.H. Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplication Testing of Blood Donors. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. Transfusion 2000;40:143-59.*
2. *ศรีวิไล ตันประเสริฐ. Nucleic Acid Technique Screening มีความเป็นไปได้เพียงไร. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2544;11:173-7.*
3. *รัชนี โอเจริญ. NAT for Addition Markers : Implication for Blood Safety. ใน : วิชัย ประยูรวิวัฒน์, จันทราภา ศรีสวัสดิ์, แสงสุรีย์ จูฑา, บรรณาธิการ. Advanced Hematology. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : นำอักษรการพิมพ์, 2547:313-5.*
4. *Busch MP, Stramer SL. The efficiency of HIV p24 antigen screening of US blood donors: projections versus reality. Infusionther Transfusionmed 1998;25: 194-7.*
5. *Grant PR, Busch MP. Nucleic acid amplification technology methods used in blood donor screening. Transfus Med 2002;12:229-42.*

CME Credit

จงเลือกข้อที่ถูกต้องที่สุดเพียงข้อเดียวลงในแบบส่งคำตอบ CME Credit ท้ายเล่ม

1. Transfusion transmitted infection ที่สำคัญและมีการตรวจกรองทั่วประเทศ คือ
   A. HIV, HCV, HBV, Syphylis, Malaria
   B. HIV, HCV, HBV, Syphylis
   C. HIV, HCV, HBV, CMV
   D. HIV, HCV, CMV, West Nile Virus
   E. HIV, HCV, CMV, SARS

2. Factor ที่สำคัญมากที่สุดที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิด Window period ของเชื้อต่างๆ คือ
   A. การเพิ่มการตรวจโดยวิธี NAT
   B. การเพิ่มการตรวจเชื้อแบคทีเรีย
   C. ความเข้าใจของผู้บริจาค และผู้ทำหน้าที่คัดกรองผู้บริจาค
   D. การเพิ่มการกรองเม็ดโลหิตขาวออกไป
   E. การเพิ่มการทำ inactivation

3. Window period ของ HIV ก่อนการตรวจพบ anti HIV คือ
   A. 16 วัน
   B. 11 วัน
   C. 3 สัปดาห์
   D. 3 เดือน
   E. 22 วัน

4. Window period ของ HCV ก่อนการตรวจพบ anti HCV คือ
   A. 12 วัน
   B. 6 เดือน
   C. 70 วัน
   D. 58 วัน
   E. 3 เดือน

5. สถิติล่าสุดจนถึงเดือนสิงหาคม 2547 ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ พบ Window period ดังนี้
   A. HIV และ HCV 1 : 108,768 ยูนิต
   B. HIV 1 : 27,000 ยูนิต
   C. HCV 1 : 27,000 ยูนิต
   D. HIV และ HCV 1 : 80,825 ยูนิต
   E. ถูกทั้ง A และ B