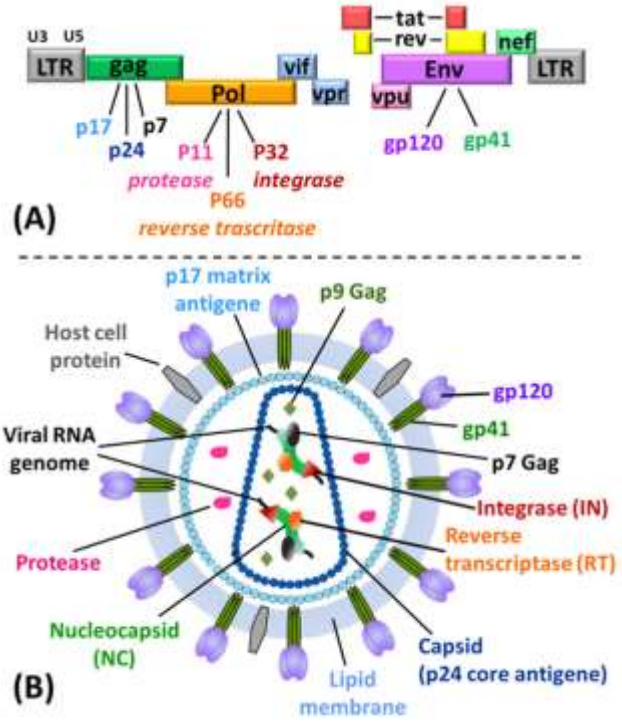
“การทดสอบเชื้อ HIV ด้วยวิธี HIV-1 Provirus”

เชื้อเอชไอวี (HIV; Human Immunodeficiency Virus) เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเอดส์ (AIDS; Acquired Immune Deficiency Syndrome) เชื้อเอชไอวีเป็นไวรัสในกลุ่ม retrovirus โดยมี genome เป็น Ribonucleic Acid Virus (RNA virus) เป็นแบบ positive sense และเป็น diploid ซึ่งจะมียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนหลายชนิด เช่น gag Pol Env rev tat vif vpr vpu โดยการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีจะเป็นการสร้าง provirus ซึ่งเป็น Deoxyribonucleic Acid (DNA) สายคู่ (1)



A : HIV genome

B : Structure of a HIV virion particle with indication of the potential antiviral targets (2).

การตรวจเชื้อเอชไอวี หรือส่วนประกอบของเชื้อเอชไอวี มีหลายวิธี

วิธีในการตรวจหาเชื้อเอชไอวีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน (3-5)

1. การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวี (anti-HIV) เป็นการทดสอบหาแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้าง ใช้เป็นการวินิจฉัยเพื่อบอกสถานภาพการติดเชื้อเอชไอวี เป็นวิธีการมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวี
2. การตรวจหาโปรตีนชนิด p24 antigen เป็นการตรวจหาแอนติเจนส่วนแคปซิด ซึ่งพบได้ในระยะแรกของการติดเชื้อเอชไอวีก่อนที่จะมีการสร้าง Antibody หลังจากนั้น p24 antigen จะลดระดับหายไปและจะพบได้อีกครั้งในระยะท้ายของการติดเชื้อเอชไอวี
3. การตรวจหาสารทางพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี เป็นการตรวจด้วยการใช้เทคนิค NAT (Nucleic Acid Amplification testing)

NAT เป็นวิธีการในการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจะเป็นการตรวจวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีการในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของตัวเชื้อ โดยการเพิ่มขยายจำนวน DNA เฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่เกิดต่อเนื่องเป็นวงจรลูกโซ่ จนทำให้ปริมาณ DNA มากขึ้นเพียงพอที่จะตรวจพบ การตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี มีดังนี้

a. การตรวจหา HIV proviral DNA ในเซลล์ติดเชื้อเป็นการตรวจหา HIV proviral DNA ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ติดเชื้อ ซึ่งมักเป็นเม็ดเลือดขาวที่มีนิวเคลียสเดี่ยว ได้แก่ ลิมโฟไซด์และโมโนไซด์ การตรวจหา proviral HIV DNA ให้ผลไวกว่าการตรวจหา HIV p24 antigen

b. การตรวจหา HIV RNA ในพลาสมา เป็นการตรวจหาจีโนมของอนุภาคไวรัสอิสระที่อยู่ในกระแสเลือด จะมีการตรวจโดยวิธีตรวจเชิงคุณภาพ (Qualitative) และเชิงปริมาณ (Quantitative)

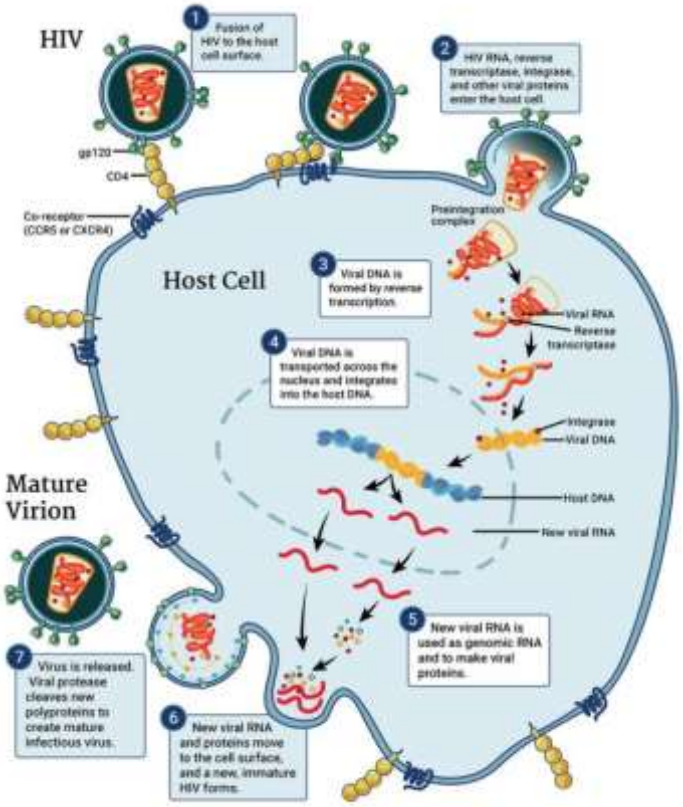
การตรวจหา proviral ด้วยวิธี DNA ในเม็ดเลือดขาว หรือตรวจหา HIV RNA จากพลาสมา สำหรับการตรวจ HIV RNA เชิงคุณภาพ (qualitative HIV RNA) ถูกนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีในระยะแรกที่ยังไม่สามารถตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชวีได้ และยังไม่พบแอนติเจนชนิด p24 เช่น การติดเชื้อเอชไอวีระยะเฉียบพลันหลังจากมีการมี

ความเสี่ยงการติดเชื้อเอชไอวีโดยที่แอนติบอดียังให้ผลการตรวจลบและใช้ในการวินิจฉัยเด็กทารกแรกเกิดที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อเอชไอวีซึ่งจะยังไม่สามารถใช้การตรวจหาแอนติบอดีแปลผลได้ เพราะมีแอนติบอดีผ่านมาจากแม่มายังลูก

Quantitative HIV RNA การตรวจวิธีนี้จะถูกนำมาใช้ในการตรวจหาไวรัสเอชไอวีในเชิงปริมาณ (HIV viral load) เพื่อตรวจติดตามประเมินผลการรักษา และเป็นการตรวจหาปริมาณไวรัสเอชไอวีในผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีเท่านั้น จึงไม่สามารถใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีแต่อาจใช้เป็นชุดตรวจเสริมกรณีผลการวินิจฉัยให้ผลไม่สามารถสรุปผลได้

4. Western Blot Assay เป็นวิธีการตรวจยืนยันการติดเชื้อเอชไอวี โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อแถบโปรตีนของไวรัสที่มาจากส่วนต่างๆของเชื้อเอชไอวี

5. HIV Replication Cycle (6)



วันที่ทดสอบ 25 มี.ค.2565

1. ทดสอบโดย ศ. ดร.รมิดา วัฒนโภคาสิน และ คณะฯ
2. ที่มา/วัตถุประสงค์ ในการทดลอง

   เพื่อทดสอบหายีนของเชื้อเอชไอวี-1 ด้วยการตรวจหา HIV proviral DNA ในตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร
3. วิธีดำเนินการ

   3.1 กลุ่มตัวอย่าง อาสาสมัคร 2 รายคือ

   <u>รายที่ 1 คุณเค</u>

   - เดือนพ.ค.2560 ทราบว่าติดเชื้อ HIV จากการตรวจด้วยวิธี Anti-HIV Testing
   - เดือนม.ค.2562 เริ่มใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด APCO
   - 14 ก.พ.2562 – 6 มี.ค.2565 ตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือด HIV-1 Viral Load Test พบว่า HIV-1 RNA detected, less than 20 copies/ml

   <u>รายที่ 2 คุณแอล</u>

   - เดือนพ.ค.2562 ทราบว่าติดเชื้อ HIV จากการตรวจด้วยวิธี Anti-HIV Testing
   - เดือนมิ.ย.2562 เริ่มใช้ภูมิคุ้มกันบำบัด APCO
   - 15 ก.ย.2562 – 13 มี.ค.2565 ตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสที่อยู่ในกระแสเลือด HIV-1 Viral Load Test พบว่า HIV-1 RNA detected, less than 20 copies/ml

   3.2 การจัดเก็บตัวอย่าง

   ทำการจัดเก็บตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร 2 ราย ด้วย EDTA tube โดยอาสาสมัครสามารถที่จะทานอาหารมาได้ปกติ ไม่ต้องงดน้ำและอาหาร

   3.3 วิธีการทดสอบ / วิเคราะห์

   การเตรียมตัวอย่าง การแยก Peripheral blood mononuclear cell (PMMC) จากเลือดครบส่วน หลักการ การแยก PBMC ออกจากเลือดครบส่วน โดยอาศัยคุณสมบัติที่เซลล์ต่างชนิดมีความหนาแน่นแตกต่างกัน จึงสามารถแยกออกจากกันได้โดยการปั่นเหวี่ยงบน density gradient นำตัวอย่างเลือดปั่นที่อุณหภูมิห้อง 3,000 rpm 10 นาที และแยก plasma เก็บในหลอด cryotube พร้อมจัดเก็บที่กล่องเก็บตัวอย่าง

อาสาสมัคร	plasma
คุณเค	
คุณแอล	

1. ทำการ dilute เม็ดเลือดที่ปั่นตกด้วย 1xPBS โดยให้ได้ปริมาตรเท่ากับปริมาณของ Plasma ที่ได้ทำการแยกไป
2. นำเลือดที่ dilute แล้วใส่ลงในหลอดที่มีน้ำยาแยกเม็ดเลือดขาวอยู่ในอัตราส่วน ปริมาณเลือดที่ dilute:ต่อน้ำยาแยก 5:2.
3. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิห้อง 2000 rpm 20 นาที
4. แยกเอาส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาวออกมา และทำการปั่นล้างด้วย 1xPBS ที่อุณหภูมิห้อง 2000 rpm 10 นาที และเท supernatant ทิ้ง
5. เติม 10 ml 1xPBS ลงใน PBMC pellet ตรวจวัดปริมาณเม็ดเลือดขาว โดยการย้อมด้วย trypan blue ในอัตราส่วน 1 ส่วน PBMC pellet in PBS 10 ml : 9 ส่วน trypan blue และนำไปวัดที่ Fast read 1 ช่อง ซึ่งจะได้จำนวนของ cell = จำนวนที่นับได้คูณกับล้านเซลล์

อาสาสมัคร	จำนวนของ cell
คุณเค	
คุณแอล	

6. นำ PBMC pellet in PBS 10 ml ไปปั่นที่อุณหภูมิห้อง 2000 rpm 10 นาที
7. เก็บ PBMC ที่ทำการล้างแล้ว หยด 1 ml FBS ลงในหลอดที่มีตะกอนอยู่และตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
8. หลังจากนั้นเติม 20% DMSO in FBS และทำการผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10% DMSO in FBS
9. แบ่งใส่ Cryotube และนำไปเก็บในที่ -80 องศาเซลเซียล 4-24 ชั่วโมง และเก็บที่ Liquid Nitrogen ต่อไป

การสกัด DNA จาก PBMC

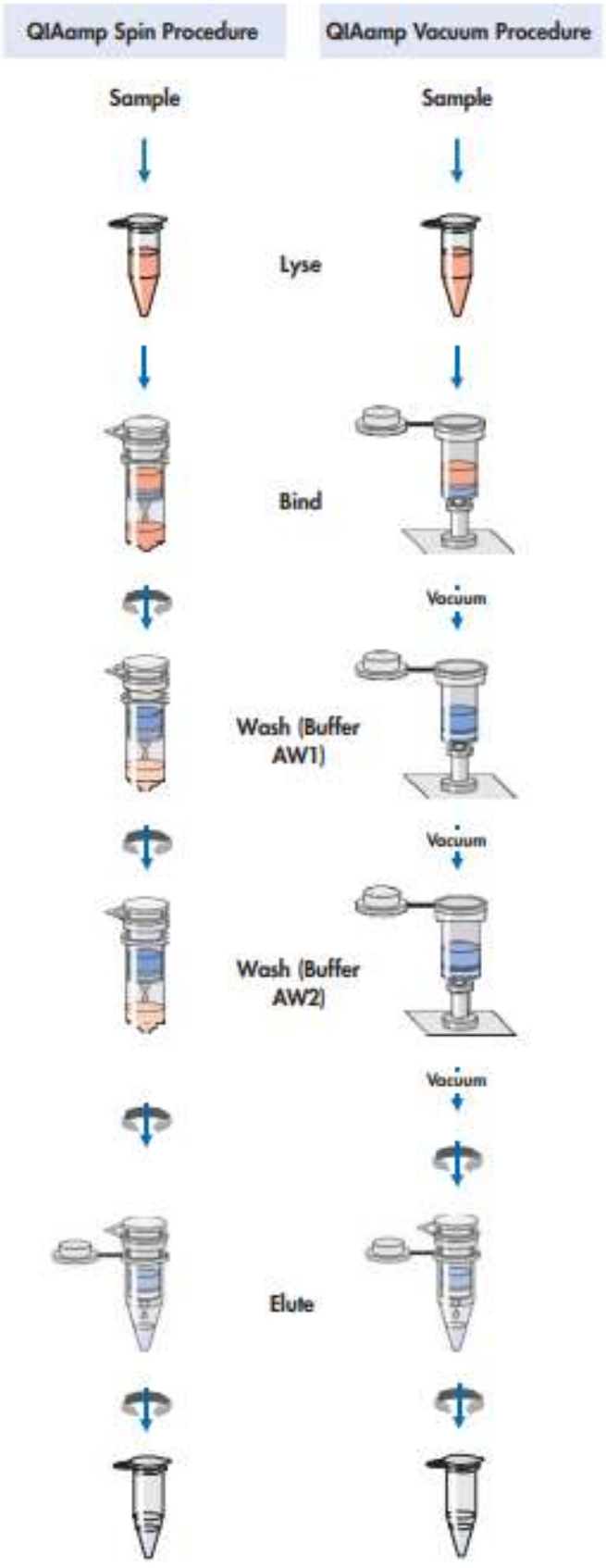
หลักการ ทำการทำลายผนังเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้เอนไซม์ Proteinase K ควบคู่กับ Lysis Buffer เพื่อให้ DNA ของเชื้อออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาว แล้วให้ DNA ของเชื้อจับอยู่บน Column แล้วจึงล้างเศษเซลล์ที่เหลือออกจาก DNA ด้วย Buffer AW1 และ AW2 หลังจากนั้นทำการ Elute เพื่อนำ DNA ออกมาจาก Column ด้วย Buffer AE

ชุดสกัดที่ใช้ QIAamp DNA Mini Kit

Kit Contents

QIAamp DNA Kits	Blood Mini (50)	Blood Mini (250)	Mini (50)	Mini (250)
Catalog no.	51104	51106	51304	51306
Number of preps	50	250	50	250
QIAamp Mini Spin Columns	50	250	50	250
Collection Tubes (2 ml)	150	750	150	750
Buffer AL*	12 ml	2 x 33 ml	12 ml	2 x 33 ml
Buffer ATL	–	–	14 ml	50 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml	98 ml	19 ml	98 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml	66 ml	13 ml	66 ml
Buffer AE	15 ml	60 ml	2 x 15 ml	128 ml
QIAGEN® Protease	1 vial‡	1 vial§	–	–
Protease Solvent†	1.2 ml	5.5 ml	–	–
Proteinase K	–	–	1.25 ml	6 ml
Selection Guide	1	1	1	1

นำ PBMC ที่ทำการปรับจำนวนเซลล์ได้ 5 ล้านเซลล์ในปริมาตร 200 uL มาทำการสกัด และ elute 200 uL


QIAamp Spin Procedure
QIAamp Vacuum Procedure
Sample
Sample
Lyse
Bind
Vacuum
Wash (Buffer AW1)
Vacuum
Wash (Buffer AW2)
Vacuum
Elute
Pure genomic or viral DNA

การทำ PCR

1. ส่วนผสมสำหรับ PCR Reaction mix ในแต่ละหลอดดังนี้
   (ปริมาตรรวมในแต่ละหลอด = 25 µl)

	ปฏิกิริยารอบที่ 1	ปฏิกิริยารอบที่ 2
Go *Taq* Green MM	12.5 µl	12.5 µl
gag 728	0.5 µl	-
gag 1146	0.5 µl	-
gag 844	-	0.5 µl
gag 1070	-	0.5 µl
JA 17	0.5 µl	-
JA 20	0.5 µl	-
JA 18	-	0.5 µl
JA 19	-	0.5 µl
Nuclease-Free Water	0.5 µl	8.5 µl
Total	15 µl	23 µl
DNA template (DNA ที่สกัด)	10 µl	(Product จากรอบ 1) 2 µl

หมายเหตุ DNA template คือ ตัวอย่าง DNA ที่ได้ทำการสกัดไว้

2. เมื่อผสม Reaction mix แล้ว นำไปใส่เครื่อง Thermal Cycle สำหรับทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิในแต่ละรอบของปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยารอบที่ 1		ปฏิกิริยารอบที่ 2	
94°C 5 min		94°C 5 min	
94°C 30 sec	40 cycles	94°C 30 sec	30 cycles
50°C 30 sec		52°C 30 sec	
72°C 30 sec		72°C 30 sec	
72°C 7 min		72°C 7 min	

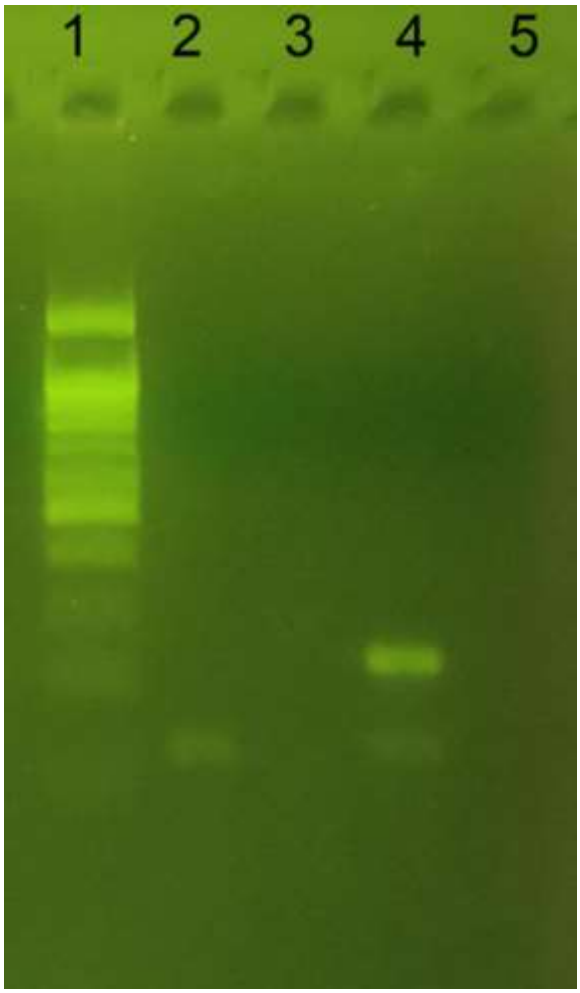
3. หลังจากทำปฏิกิริยา ครบทั้ง 2 รอบแล้ว นำ PCR Product ที่ได้ไปตรวจสอบโดยการ Run Electrophoresis โดย agarose gelelectrophoresis โดยเตรียมเจลดังนี้

ใส่ส่วนผสมลงในภาชนะสำหรับละลายเจล นำไปละลายในเตาไมโครเวฟให้ใสจนเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน นำออกจากเตาไมโครเวฟ จากนั้นเติม 10000 X SYBR Safe DNA gel stain (สีย้อมเจลเพื่อใช้ในการตรวจวัดสารพันธุกรรมจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ในเจล) 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้สีทั่วในสารละลายเจล เทสารละลายเจล ลงในถาดที่อยู่บนแม่พิมพ์สำหรับทำการ run electrophoresis รอให้เจลเย็นจึงแกะถาดเจลออกจากแม่พิมพ์ แล้วนำมาใช้งาน

4. ปิเปต PCR product มา 5 uL ใส่ลงในหลุมของเจล แต่ละหลุมตามจำนวนของ PCR product ที่มี run โดยใช้กระแสไฟฟ้า 90-100 volt นาน 30 นาที แล้วนำเจล มาดูภายใต้เครื่องสำหรับดูเจล (Transilluminator)

5. ผลการทดสอบ

5.1 ตาราง / ภาพ



5.2 คำอธิบาย

ผล run gel electrophoresis ดังภาพแนบค่ะรายละเอียด ดังนี้

Lane 1 100bp DNA ladder

Lane 2 Sample L; found pol PCR product

Lane 3 Sample K; not found

Lane 4 PC; found gag+pol PCR product

Lane 5 NC; not found

6. สรุปผลการทดสอบ

จากการทดลองพบตัวอย่างเลือดของ Sample L มีการตรวจพบ pol gene ของเชื้อเอชไอวี (HIV-1) แต่ ใน Sample K ตรวจไม่พบ pol และ gag gene ของเชื้อเอชไอวี (HIV-1)

การแปลผลการตรวจด้วยวิธีการหา proviral DNA

- กรณีที่ตรวจพบทั้งยีน pol และ gag จะแปลว่ามีการติดเชื้อเอชไอวี
- กรณีที่ตรวจพบยีน pol หรือ gag ยีนใดยีนหนึ่งจะยังไม่สามารถสรุปผลการตรวจได้ว่ามีการติดเชื้อเอชไอวี
- กรณีที่ตรวจไม่พบทั้งยีน pol และ gag จะสามารถแปลผลเป็น ไม่มีการติดเชื้อเอชไอวี หรือ มีการติดเชื้อเอชไอวี แต่ปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อต่ำกว่าขีดความสามารถของเทคนิคการทดสอบ หรือ มีการติดเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ที่วิธีการตรวจไม่สามารถครอบคลุมถึง

7. Discussion

a. ตัวอย่างที่ทำการทดสอบควรทำการตรวจการติดเชื้อเอชไอวีตามมาตรฐานกำหนดก่อนเพื่อดูว่ามีการติดเชื้อหรือไม่

b. การได้รับยาต้านจะส่งผลให้การตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสน้อยลง และส่งผลต่อความไวในการตรวจลดน้อยลง

การตรวจหา HIV proviral DNA ในเซลล์ติดเชื้อเป็นการตรวจหา HIV proviral DNA ที่แทรกอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ การตรวจวิเคราะห์จะทำการตรวจหายีน pol และ gag ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อเชื้อเอชไอวี และเพิ่มความจำเพาะต่อการตรวจหาเชื้อเอชไอวี ชนิด HIV-1 จะทำการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยใช้หลักการ Nested PCR ซึ่งจะใช้ primer จำนวน 2 ชุดคือ outer primer และ inner primer ต่อยีน pol และ gag การตรวจพบเฉพาะยีน pol หรือ gag จะยังไม่สามารถสรุปผลการตรวจได้ว่ามีการติดเชื้อเอชไอวีหรือไม่ อาจจำเป็นต้องหาวิธีการตรวจวิธีอื่นรวมด้วยเพื่อช่วยในการวินิจฉัย

อาสาสมัครเคยได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อเอชไอวีแล้วแต่ตรวจไม่พบทั้งยีน pol และ gag ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อเอชไอวี ชนิด HIV-2 ที่วิธีการตรวจไม่สามารถครอบคลุมถึง ถ้ามีการบ่งชี้ตั้งแต่การตรวจวินิจฉัยว่าอาสาสมัครติดเชื้อเอชไอวี ชนิด HIV-1 ก็แสดงว่าปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อต่ำกว่าขีดความสามารถของเทคนิคการทดสอบ

ในผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีและได้รับยาต้านจะมีกลไกของยาในการที่จะลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อเอชไอวีในขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่การที่มีกลุ่มยา entry inhibitor ในการขัดขวางการเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของเชื้อไวรัส การใช้ยากลุ่ม reverse transcriptase ในการยับยั้งไม่ให้มีการสร้าง cDNA หรือกลุ่มยา integrase ในการป้องกันไม่ให้ dsDNA แทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์เป้าหมาย ในกรณีที่มีการเพิ่มจำนวน proviral DNA จะมีการถอดรหัสเพื่อสร้าง mRNA เพื่อสร้างไวรัส แต่ถ้าเป็นช่วงที่มีการแฝงตัวและไม่มีการสร้างไวรัส proviral DNA ก็จะอยู่ในโครโมโซมของเซลล์ แม้จะใช้ยาก็ไม่มีผลต่อการแฝงตัวของเชื้อไวรัสในโครโมโซมทำให้ไม่สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกายได้แม้ว่าจะตรวจไม่พบ RNA virus แล้ว แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงจากการแฝงตัวเป็นการเพิ่มไวรัสก็จะมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการที่ตรวจปริมาณ HIV viral load ไม่พบไม่ได้แสดงว่าไม่มีเชื้อเอชไอวีในร่างกายและการตรวจ proviral DNA จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะบ่งชี้ว่ามี viral DNA อยู่ในร่างกาย

8. เอกสารอ้างอิง

1. อณูชีววิทยาทางการแพทย์, Molecular Biology in Medicine, รศ.นพ.นเรศวร สุขเจริญ, ผศ. ดร.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ; กรกฎาคม 2541.
2. G-Quadruplex Forming Oligonucleotides as Anti-HIV Agents - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/A-HIV-genome-B-structure-of-a-HIV-virion-particle-with-indication-of-the-potential_fig2_282153346 [accessed 13 Sep, 2023].
3. การตรวจวินิจฉัยเอชไอวี/เอดส์ทางห้องปฏิบัติการ HIV/AIDS Laboratory Diagnosis สำนักโรคเอดส์ วัณโรคและโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข 2548 ISBN : 974-297-463-2
4. แนวทางการรักษาและป้องกัน Thailand National Guidelines on HIV/AIDS Diagnosis, Treatment and Prevention กองโรคเอดส์ และโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข 2565 ISBN : 978-616-11-4936-9
5. ไวรัสวิทยา Virology พิไลพันธ์ พุธวัฒนะสมาคมไวรัสวิทยา (ประเทศไทย) 2559 ISBN : 978-616-91232-5-5
6. https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle