


รูปแบบของภูมิทัศน์ด้านทานชนิดไอจีจีและไอจีเอ ต่อเชื้อ เอชไอวี-1 ในปัสสาวะ
และความสัมพันธ์ระหว่างภูมิทัศน์ด้านทานชนิดไอจีจีต่อส่วนต่าง ๆ ของเชื้อ เอชไอวี-1
ในปัสสาวะกับจำนวนซีดี 4 เซลล์ในเลือด



นางสุวันดี บัญชรเทวกุล

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-130-858-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PATTERNS OF HIV-1 IgG AND IgA ANTIBODIES IN URINE AND CORRELATION OF
URINARY ANTI-HIV-1 IgG TO DIFFERENT ANTIGENS TO CD4 CELL COUNT IN BLOOD

MRS. SUWANDEE BUNCHONTEVAKUL



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter- Departmental Program in Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-130-858-2

สุวันดี บัญชรเทวกุล : รูปแบบของภูมิต้านทานชนิดไอจีจี และไอจีเอ ต่อเชื้อเอชไอวี-1 ในปัสสาวะ และความ
สัมพันธ์ระหว่างภูมิต้านทานชนิดไอจีจีต่อส่วนต่าง ๆ ของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะกับจำนวน ซีดี 4 เซลล์ในเลือด.

(PATTERNS OF HIV-1 IgG AND IgA ANTIBODIES IN URINE AND CORRELATION OF URINARY ANTI-
HIV-1 IgG TO DIFFERENT ANTIGENS OF CD4 CELL COUNT IN BLOOD) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พรเทพ
เทียนสิวกุล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ. นพ. ไพรัช ตีสุจิต, 76 หน้า. ISBN 974-130-858-2.

ศึกษารูปแบบแอนติบอดีชนิดไอจีจี โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง แอนติบอดีต่อโปรตีน
โครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 ในปัสสาวะกับจำนวน เซลล์ ซีดี 4 ในเลือด โดยวิธี โฟลไซโตมิเตอร์ และศึกษาแอนติบอดีต่อเชื้อ
เอชไอวี-1 ในปัสสาวะชนิดไอจีเอ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต เพื่อให้ทราบว่ามีแอนติบอดีดังกล่าวต่อโปรตีนส่วนใดบ้างของเชื้อ
เอชไอวี-1 โดยศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างจำนวน 100 ราย ที่ได้รับการยืนยันผลจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ว่าติดเชื้อเอชไอวี

ผลการศึกษา ในส่วน GAG พบแอนติบอดี ต่อ p24 ร้อยละ 93 แอนติบอดี ต่อ p17 ร้อยละ 24 ในส่วน POL พบ
แอนติบอดีร้อยละ 60-85 (p31 ร้อยละ 60, p51 ร้อยละ 76, p66 ร้อยละ 85) ส่วน ENV พบแอนติบอดี ต่อ gp41 ร้อยละ 63
แอนติบอดี ต่อ gp120 ร้อยละ 78 และแอนติบอดี ต่อ gp160 ร้อยละ 98 ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี ชนิดไอจีจีต่อ
โปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะกับจำนวนเซลล์ CD4 ในเลือด และกับอัตราส่วนระหว่าง CD4/CD8 เป็นไปใน
ทำนองเดียวกัน คือพบแอนติบอดี ต่อ GAG ได้แก่ p17, p39 และ p55 พบน้อย เมื่อ เซลล์CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม.
หรือ CD4/CD8 >0.5 ขึ้นสูงสุดในช่วง เซลล์ CD4 อยู่ระหว่าง 200-500 เซลล์/ลบ.มม. (CD4/CD8 ในช่วง 0.1-0.5) และ
ลดลง เมื่อเซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. (CD4/CD8 <0.1) แต่ยังคงพบ p24 ร้อยละ 91 - 95 ในส่วน POL และ
ENV พบแอนติบอดี ในรูปแบบที่ไม่ชัดเจน ยกเว้นแอนติบอดี ต่อ gp160 ซึ่งยังคงสูงทุกกลุ่มของจำนวนเซลล์ CD4 หรือทุก
อัตราส่วน CD4/CD8 โดยพบร้อยละ 89 -100 ส่วนแอนติบอดี ชนิดไอจีเอต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะพบ
เพียงร้อยละ 7

ผลจากการศึกษานี้เป็นข้อสนับสนุนที่จะนำ gp160 และ p24 มาใช้เป็นแอนติเจนในการตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อ
เอชไอวีในปัสสาวะ ส่วนแอนติบอดีชนิดไอจีเอต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะพบน้อยมากไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัย
ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2543

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4075265530 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: HIV/IgG ANTIBODIES/IgA ANTIBODIES/WESTERN BLOT/URINE

SUWANDEE BUNCHONTEVAKUL: THESIS TITLE. (PATTERNS OF HIV-1 IgG AND IgA ANTIBODIES IN URINE AND CORRELATION OF DIFFERENT ANTIGENS TO CD4 CELL COUNT IN BLOOD.) THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. DR. PORNTHEP TIENSIWAKUL, THESIS COADVISOR: PROF. DR. PHAIRAJ DESUDCHIT, 76 p.p. ISBN 974-130-858-2.

The patterns of HIV-1-IgG antibodies in urine by Western blot assay and the correlation with CD4 cell count were studied. In addition, urinary HIV-1-IgA antibodies were also investigated. The urine samples were collected from 100 patients confirmed seropositive for HIV-1 at the STD-clinic, Chulalongkorn Hospital.

We found that urinary HIV-1 antibodies to GAG protein was 24 -93% (p24 93%, p55 25%, p17 24%); antibodies to POL protein ranging from 60-85 % (p31 60%, p51 76%, p66 85%), and for the ENV, 63-98 % (gp41 63%, gp120 78%, and gp160 98%. Correlation of urinary HIV-1-IgG antibodies to CD4 cell counts and to CD4/CD8 cells ratio were similar. Positivity of antibodies to GAG (p17, p39, p55) were low in the group of patients having CD4 cell counts more than 500 cells/cu.mm. or CD4/CD8 ratio > 0.5. In the group of patients having CD4 cell counts 200-500 cells/cu.mm. or CD4/CD8 ratio ranging from 0.1-0.5, higher positivity of antibodies was demonstrated. The positivity decreased while the CD4 cell counts less than 50 cells/cu.mm. or CD4/CD8 ratio less than 0.1, but p24 antibody remained high ranging 91-95%. Patterns of antibodies to POL and ENV were not consistency, except gp160 antibody ranging 89-100 %. Urinary HIV-1-IgA antibodies was found in 7 percents of the studied patients.

For noninvasive diagnosis of HIV infection, detection of HIV-1 antibodies to gp160 and p24 in urine would be useful. Detection of urinary HIV-1-IgA antibody is not sensitive and can not be used as a diagnostic marker.

Department...Medical Microbiology.....

Field of study...Medical Microbiology.....

Academic year...2000.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาจากหลายฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ บุคคลที่สำคัญที่สุดซึ่งต้องยกความดีทั้งหมดให้ท่าน คือ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ เทียนสีวากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ช่วยจัดสรรเงินทุนโครงการรณรงค์ต่อต้านโรคเอดส์ เพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น กำลังใจและแรงผลักดัน

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ไพรัช ดีสุดจิต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือและ แนะนำตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดร.วิมลมาศ ลิปิพันธ์ และรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงจันทพงษ์ วะสี ประธานกรรมการและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลามาสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้พร้อมทั้งชี้แนะ ให้คำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความกรุณาจาก ศาสตราจารย์แพทย์หญิง เต็มศรี ชำนิจารกิจ และอาจารย์สมรัตน์ เลิศมหาฤทธิ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำในเรื่องสถิติและการวิเคราะห์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สหสาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทางการแพทย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้โอกาส ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ปวยนอกแผนกเวชศาสตร์ป้องกัน เจ้าหน้าที่ภาคจุฬาลงกรณ์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสหเวชศาสตร์ เจ้าหน้าที่หอสมุดคณะแพทย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความสะดวกและให้ความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาล หัวหน้าแผนกพยาธิวิทยาคลินิก และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลพระนั่งเกล้าที่ให้โอกาสและเป็นกำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ สหสาขาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้งสมาชิกในครอบครัวที่รัก ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ด้วยดีตลอดเวลา

สุวันดี บัญชรเทวกุล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์.....	๗
บทที่	
1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ในการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ประวัติความเป็นมาโรคเอดส์.....	4
ระบาดวิทยาของการติดเชื้อเอชไอวี/โรคเอดส์ และผลกระทบต่อประเทศไทย.....	5
ลักษณะของเชื้อเอชไอวี.....	7
พยาธิกำเนิดของโรค.....	16
การดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวี.....	19
ลักษณะทางคลินิก และระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อเอชไอวี.....	22
การตรวจหาการติดเชื้อเอดส์ทางห้องปฏิบัติการ.....	25
การตรวจหาเอชไอวี-1 ในปัสสาวะชนิดไอจีจี.....	28
การตรวจหาเอชไอวี-1 ในปัสสาวะชนิดไอจีเอ.....	33
ความสำคัญของ CD4+ cell count.....	33
หลักการและการตรวจวัดเซลล์ของโพลีไซโตเมเตอร์.....	36
3. วัสดุและวิธีการ.....	39
กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา.....	39

	หน้า
การเก็บสิ่งส่งตรวจ.....	40
ขั้นตอนการทำโฟลโซโตเมตรี.....	40
วิธีทดสอบเพื่อตรวจหาไอจีจีแอนติบอดี.....	41
วิธีทดสอบเพื่อตรวจหาไอจีเอแอนติบอดี.....	42
การอ่านผล.....	43
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	44
4.1 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปีสภาวะต่อโปรตีน โครงสร้างของเชื้อเอชไอวี.....	44
4.2 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปีสภาวะต่อเชื้อเอชไอวี ในกลุ่มผู้ป่วยแบ่งตามจำนวนเซลล์ CD4 ในเลือด.....	46
4.3 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปีสภาวะต่อ เชื้อเอชไอวี-1 กับอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ในเลือด	50
4.4 ผลบวกจำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีเอในปีสภาวะต่อ โปรตีน โครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1	50
4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปีสภาวะ ต่อโปรตีน โครงสร้างของเชื้อเอชไอวีกับจำนวนเซลล์ CD4 ในเลือด	52
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	55
5.1 แอนติบอดีชนิดไอจีจีในปีสภาวะต่อโปรตีน โครงสร้างของเชื้อเอชไอวี.....	55
5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปีสภาวะต่อโปรตีน โครงสร้าง เชื้อเอชไอวีกับจำนวนเซลล์ CD4 ในเลือด.....	56
5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปีสภาวะต่อ เชื้อเอชไอวี-1 กับอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ในเลือด	58
5.4 แอนติบอดีชนิดไอจีเอในปีสภาวะต่อ โปรตีน โครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1.....	58
5.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปีสภาวะต่อโปรตีน โครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1 กับ จำนวนเซลล์ CD4ในเลือด	58

รายการอ้างอิง	61
ภาคผนวก	68
ภาคผนวก ก. ส่วนประกอบและขั้นตอนการเตรียมน้ำยา ชุดตรวจเอชไอวีบีลือด	69
ภาคผนวก ข. การเครื่องโพลไซโตมิเตอร์.....	72
ประวัติผู้วิจัย	76



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

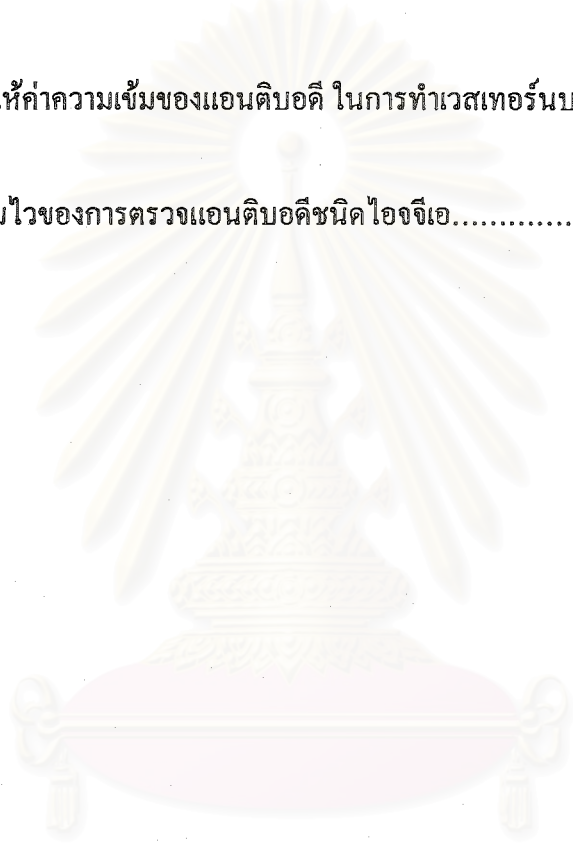
สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 2.1 รายงานผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทยแบ่งตามเพศและปัจจัยเสี่ยง พ.ศ. 2527 ถึง 31 มกราคม 2543	7
ตารางที่ 2.2 ตารางเลือกวิธีทดสอบ.....	30
ตารางที่ 4.1 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี.....	44
ตารางที่ 4.1.1 ความเข้มของแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี.....	45
ตารางที่ 4.2 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อเชื้อเอชไอวี-1 ในกลุ่มผู้ป่วยแบ่งตามจำนวน เซลล์ CD4 ในเลือด.....	48
ตารางที่ 4.3 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปัสสาวะต่อเชื้อเอชไอวี-1 กับอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ในเลือด	49
ตารางที่ 4.4 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีและไอจีเอในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1	52
ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีน โครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวีกับจำนวนเซลล์ CD4.....	53

ภาพประกอบ

หน้า

ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของเชื้อเฮชไอวี.....	10
ภาพที่ 2.2 แสดงภาวะการดำเนินของโรคเอดส์.....	21
ภาพที่ 4.1 แสดงการให้ค่าความเข้มของแอนติบอดี ในการทำเวสเทอร์นบล็อต.....	45
ภาพที่ 4.2 แสดงความไวของการตรวจแอนติบอดีชนิดไอจีเอ.....	51



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อที่ใช้ในวิทยานิพนธ์

ลบ.มม.	= ลูกบาศก์มิลลิเมตร = มิลลิลิตร
AIDS	= Acquired Immune Deficiency Syndromes
ARC	= AIDS related condition
CA	= capsid protein
CBC	= complete blood count
CDC	= Centers for Disease Control and Prevention
CD4	= T-helper/inducer cells
CD8	= T-suppressor/cytotoxic cells
CMI	= Cell mediated immunity
EDTA	= Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	= enzyme linked immunosorbent assay
FITC	= Fluorescein isothiocyanate
gp	= glycoproteins
gp120	= โกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 120,000
HIV	= Human Immunodeficiency Virus
HMI	= humoral mediated immunity
IC	= Immunochromatography
NC	= nucleocapsid protein
ng	= nanogram (10^{-9} g)
p	= protein
p24	= โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 24,000
PCR	= Polymerase chain reaction
PE	= Phycoerythrin
Per CP	= Peridimin Chlorophyll Protein
pg	= picogram (10^{-12} g)
PGL	= Persistent generalized lymphadenopathy
Pr	= precursor protein
r	= correlation = ความสัมพันธ์

RT = reverse transcriptase = RNA dependent DNA polymerase
SDS = sodium dodecyl sulphate



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

HIV (Human Immunodeficiency Virus) เป็นสาเหตุโรคเอดส์ (AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome) ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของโลกและของประเทศไทยบน ทอนทั้งทาง เศรษฐกิจ สังคมและความมั่นคงของประเทศ การตรวจกรองเพื่อการวินิจฉัย (screening test) การตรวจเพื่อการยืนยัน (Confirmatory test) การตรวจ เพื่อติดตาม ผลการรักษาหรือการดำเนินของโรค โดยตรวจจาก plasma หรือ serum ต้องมีการเจาะเลือด ซึ่งมี ผลที่ไม่พึงปรารถนา (negative drawback) อยู่หลายประการเช่น ผู้ป่วยต้องเจ็บตัว อาจติดเชื้อ จากอุปกรณ์เจาะเลือด เกิด hematoma รวมทั้งเจ้าหน้าที่ผู้ทำการเจาะเลือด อาจเกิดความเสี่ยง ต่อการติดเชื้อจากเลือดและน้ำเหลืองของผู้ป่วย จากอุบัติเหตุการทิ่มแทงของเข็มเจาะเลือด มีผู้ พยายามหาวิธีตรวจโดยวิธี noninvasive⁽⁴⁹⁾ จากสารคัดหลั่งอื่น ๆ⁽⁵⁰⁾ เช่น น้ำลาย น้ำตา น้ำนม สารคัดหลั่งจากช่องคลอด และปัสสาวะ^(50,51,52,53,54,55,56) ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่า แอนติบอดี ที่พบ ได้จากสารคัดหลั่งเกิดจากการหลั่งของเซลล์ที่บุช่องปาก ช่องคลอด หรือทางเดินปัสสาวะ การ ตรวจจากน้ำลายได้รับการยอมรับในการตรวจเพื่อทำประกันชีวิตซึ่งเป็นตัวอย่างที่ไม่ทำให้ผู้ป่วย เกิดผลที่ไม่พึงปรารถนาและไม่ทำให้เกิดภาวะเสี่ยงต่อเจ้าหน้าที่ที่ทำการตรวจ เป็นประโยชน์แก่ ผู้ป่วยและมีผู้รับการตรวจเป็นจำนวนมาก แต่การตรวจน้ำลายต้องใช้อุปกรณ์มีราคาแพง และน่า รังเกียจแก่ผู้ปฏิบัติ ทำให้มีแนวคิดที่จะใช้สารคัดหลั่งอื่น ๆ มาตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวี และ ศึกษาการดำเนินโรค

ปัสสาวะได้รับการพิจารณาเป็นทางเลือกหนึ่งของตัวอย่างส่งตรวจเพื่อการวินิจฉัยโรค เอดส์ เนื่องจากความสะดวกในการเก็บตัวอย่างส่งตรวจ และไม่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างส่ง ตรวจก่อนทำการตรวจ และสำคัญที่สุด ปัสสาวะไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อแก่ผู้ปฏิบัติการตรวจ⁽⁵⁷⁾

มีการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหา anti-HIV-1 IgG ในตัวอย่างเลือดและตัวอย่าง ปัสสาวะของผู้ป่วยโรคเอดส์ โดยวิธี Enzyme-Linked Fluorescent,⁽⁶⁰⁾ EIA, Immuno-dotblot (SUDS), Immunochromatographic assay และ เวสเทิร์นบลอต วิธีดังกล่าวให้ความไว และ ความจำเพาะ เป็นที่น่าพอใจ แต่วิธีเวสเทิร์นบลอต จำนวนตัวอย่างที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อย ทางผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาให้ครอบคลุมมากขึ้น โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่าง พร้อมทั้งศึกษา ความสัมพันธ์ระหว่าง แอนติบอดีของเอชไอวี-1 ต่อแอนติเจนส่วนต่าง ๆ ในปัสสาวะ กับจำนวน เซลล์ซีดี4 ในเลือด ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนว่า แอนติบอดีที่พบในปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับ จำนวนเซลล์ ซีดี 4 ในเลือดหรือไม่ ดังนั้นการศึกษานี้จะเป็นทางเลือกใหม่ในการเลือกใช้ แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะเพื่อศึกษาภาวะการดำเนินของโรคเอดส์

จากรายงานของ Chargelegue และคณะ ปี พ. ศ . 2538 ⁽⁶⁶⁾ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ซีดี 4 กับแอนติบอดีต่อเอชไอวี-1 ในเลือด โดยศึกษาเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ แอนติบอดีต่อส่วน p17 และ p24 ในน้ำเหลือง โดยวิธี RIA กับ จำนวนเซลล์ซีดี 4 ในเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี จากรายงานนี้พบว่า กลุ่มที่ไม่แสดงอาการ จะมีจำนวนแอนติบอดี ต่อ p17 และ p24 ของเชื้อเอชไอวีในเลือด สูงกว่ากลุ่มที่แสดงอาการโรคเอดส์ และมีจำนวนเซลล์ซีดี 4 มากกว่า 200 เซลล์/มม³ ส่วนกลุ่มที่แสดงอาการโรคเอดส์ มีจำนวน เซลล์ซีดี 4 น้อยกว่า 200 เซลล์/มม³ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้นี้เป็นการศึกษาที่ใช้จำนวนตัวอย่างเพียง 15 ตัวอย่างเพื่อศึกษาแอนติบอดี ต่อ p17 และ p24 ของเชื้อเอชไอวี ไม่ได้ศึกษาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ทุกส่วน และการศึกษาดังกล่าว เป็นการศึกษาน้ำเลือด ไม่ได้ศึกษาในปัสสาวะเพื่อหาความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ซีดี 4

เป็นที่น่าสังเกตว่ารายงานส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นในการตรวจแอนติบอดีชนิดไอจีจี ทั้ง ๆ ที่โดยทั่วไปแล้ว มากกว่า 90% ⁽⁶⁷⁾ ของการติดเชื้อเอชไอวี เกิดจากเพศสัมพันธ์ นอกจากนั้นเป็นที่ทราบกันทั่วไปว่า แอนติบอดีจากสิ่งคัดหลั่งส่วนใหญ่มากกว่า 60% จะเป็น IgA ดังนั้นแอนติ-บอดีต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ น่าจะมีส่วนที่เป็นไอจีเอ รายงานที่มีจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษา แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ชนิดไอจีเอ อย่างเป็นทางการในระบบในปัสสาวะ มีเฉพาะ O' Shen และคณะ ⁽⁶⁹⁾ รายงานการใช้ captured radioimmuno assay ในการตรวจหา HIV-1- IgA antibodies ในผู้ป่วยเอดส์ โดยตรวจจาก plasma, semen, vaginal secretion, และ ใน saliva ส่วน Akerlund และคณะ⁽⁶⁸⁾ ใช้วิธี อิไลซ่า วัดปริมาณ sIgA ในปัสสาวะของคนปกติ เปรียบเทียบกับ sIgA ในนม และในน้ำลาย พบว่า ถ้าใช้เทคนิคที่จำเพาะต่อการตรวจหา ปริมาณ sIgA พบว่า secretory component และ Free secretory component จะไม่มารบกวนการตรวจวัด ยิ่งไปกว่านั้นการเปลี่ยนแปลง ของ pH และ osmolarity ไม่มีผลต่อค่าที่ได้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษา แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี-1 ชนิดไอจีเอในปัสสาวะ โดยใช้วิธีเวสเทิร์นบลอต ซึ่งจะเป็นเทคนิคที่สามารถตอบคำถามดังกล่าวพร้อมกัน ทั้งอุบัติการณ์ของ แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ชนิดไอจีเอ และเพื่อให้ทราบว่า มีแอนติบอดีดังกล่าว ต่อโปรตีนส่วนใดบ้าง ของเชื้อเอชไอวี

ดังนั้นแนวการศึกษาในการวิจัยนี้ จะแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นการตรวจหาแอนติบอดีชนิดไอจีเอ ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ เพื่อหาความไวเป็นจำนวนร้อยละ ที่ให้ผลบวกโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต ส่วนที่ 2 ตรวจหาแอนติบอดีชนิดไอจีจี ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ โดยวิธีเวสเทิร์นบลอต และวัดปริมาณเซลล์ ซีดี 4 ในเลือด โดยวิธี โฟลไซโตเมทรี พร้อมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีชนิดไอจีจี ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ กับจำนวนเซลล์ซีดี 4 ในเลือด

สมมุติฐาน

แอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ในปัสสาวะ มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ซีดี 4 ในเลือด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษารูปแบบของไอจีจี และไอจีเอ แอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 ในปัสสาวะของผู้ติดเชื้อเอชไอวี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ไอจีจี แอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 ในปัสสาวะ กับจำนวนเซลล์ซีดี 4 ในเลือด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบรูปแบบของแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีทั้งชนิด ไอจีเอ และ ไอจีจี ในปัสสาวะ และหาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ชนิดไอจีจี ในปัสสาวะ กับจำนวน CD4 ในเลือดของผู้ป่วย ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ($CD4 >500$, $200-500$, $50-199$, <50) ซึ่งไม่มีรายงานมาก่อน
2. ทราบอุบัติการณ์ การเกิดแอนติบอดีชนิดไอจีเอ ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ในปัสสาวะ ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ซึ่งไม่มีรายงานมาก่อน
3. อาจนำความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี และ ปริมาณ เซลล์ CD4 มาเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้ในการศึกษาการดำเนินโรค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การทบทวนวรรณกรรมได้จากการศึกษาหนังสือ เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งจะได้ นำเสนอตามลำดับหัวข้อต่อไปนี้

1. ประวัติความเป็นมาโรคเอดส์
2. ระบาดวิทยาของ การติดเชื้อเอชไอวี/โรคเอดส์ และผลกระทบต่อประเทศไทย
3. ลักษณะของเชื้อเอชไอวี พยาธิกำเนิดของโรค ลักษณะทางคลินิก และระยะต่าง ๆ ของ การติดเชื้อเอชไอวี
4. การตรวจภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ
5. ระดับของ CD4 เซลล์ ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี และผู้ติดเชื้อโรคเอดส์

โรคเอดส์ (AIDS หรือ Acquired Immune Deficiency Syndromes) เป็นกลุ่มอาการ ของโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันในร่างกายเสื่อมหรือบกพร่อง

ประวัติความเป็นมาของโรคเอดส์^(1,2,3,4)

พ.ศ. 2524 Dr. Gottlieb และคณะ^(5,6) รายงานผู้ป่วยชายรักร่วมเพศ ในลอสแอนเจลิสป่วยเป็นโรคปอดอักเสบจากเชื้อ Pneumocystis carinii (Pneumocystis carinii pneumonia, PCP) ทุกคนมีประวัติแข็งแรงก่อนเจ็บป่วย

พ.ศ. 2524 ปีเดียวกันศูนย์ควบคุมโรคของสหรัฐอเมริกา⁽⁷⁾ รายงานผู้ป่วย PCP และมะเร็งของ เซลล์บุหลอดเลือด (Kaposi's sarcoma, KS) ในชายรักร่วมเพศจากนิวยอร์กและแคลิฟอร์เนีย ผู้ป่วยมี ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ (cell mediated immunity, CMI) จำนวน T-helper/inducer cell (CD4+) ลดลงมาก อาการรุนแรงและเสียชีวิตในเวลา 6 เดือนถึง 1 ปี

พ.ศ. 2525 พบผู้ป่วยในกลุ่มผู้ฉีดยาเสพติด ผู้ป่วยฮีโมฟีเลียที่ได้รับผลิตภัณฑ์จากเลือด ผู้ป่วยที่ได้รับเลือดทารกที่เกิดจากมารดาฉีดยาเสพติดและหญิงที่มีเพศสัมพันธ์กับผู้ติดเชื้อ ทำให้สันนิษฐานได้ว่าการติดต่อเกิดได้ทางเลือด ศูนย์ควบคุมโรคของสหรัฐอเมริกา⁽⁸⁾ ได้ตั้งชื่อโรคนี้ว่า

AIDS หรือ Acquired Immune Deficiency Syndromes หลังจากที่มีรายงานในสหรัฐอเมริกา เวลาต่อมา มีรายงานผู้ป่วยจากประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก

พ.ศ. 2526 Dr. Luc Montagnier และคณะ⁽⁹⁾ จากสถาบันปาสเตอร์ ประเทศฝรั่งเศส เพาะเลี้ยงแยกเชื้อไวรัสก่อโรคเอดส์ได้เป็นครั้งแรก จากต่อมน้ำเหลืองของชายรักร่วมเพศที่มีอาการต่อมเหลือง โต หลายตำแหน่งให้ชื่อเชื้อที่พบว่า lymphadenopathy associated virus (LAV) สายพันธุ์ Bru (LAV BRU)

พ.ศ. 2527 Dr. Robert Gallo และคณะ⁽¹⁰⁾ จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ประเทศสหรัฐอเมริกา เพาะเลี้ยงแยกเชื้อได้จากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อระยะต่าง ๆ ตั้งชื่อเชื้อว่า human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) สายพันธุ์ B (HTLV-IIIB) ซึ่งก่อนหน้านี้เคยแยกเชื้อ retroviruses 2 ตัว ได้จากเซลล์ผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Hairy T-cell leukemia) ให้ชื่อว่า human T-cell leukemia virus type I และ II (HTLV-1, HTLV-II)

พ.ศ. 2527 ปีเดียวกัน Jay Levy และคณะ⁽¹¹⁾ แยกเชื้อได้จากเม็ดเลือดขาวผู้ป่วยโรคเอดส์ ตั้งชื่อว่า AIDS- associated retrovirus (ARV) สายพันธุ์ SF2

จากการศึกษาเปรียบเทียบ LAV, HTLV-III และ ARV พบว่า เป็นเชื้อเดียวกัน จึงตกลงใช้ชื่อเดียวกันใหม่ว่า HIV (Human Immunodeficiency Virus)⁽¹²⁾ และเรียกเชื้อ HIV ที่พบครั้งแรกว่า HIV-1

พ.ศ. 2528 สหรัฐอเมริกาสามารถผลิตน้ำยาสำเร็จรูป จากเชื้อ HTLV-IIIB ตรวจแอนติบอดีทางการติดเชื้อ HIV ในการตรวจกรองโลหิตบริจาค

พ.ศ. 2529 Clavel และคณะ⁽¹³⁾ จากประเทศฝรั่งเศส แยกเชื้อ HIV-2 ได้จากผู้ป่วยเอดส์ที่มาจากประเทศในแอฟริกาตะวันตก มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อเดิมราวร้อยละ 50-60

ปัจจุบันนี้พบเชื้อ HIV สองชนิด คือ HIV-1 และ HIV-2 ซึ่ง HIV-1 เป็นเชื้อที่เป็นปัญหาก่อโรครุนแรงและแพร่กระจายทั่วโลก ส่วน HIV-2 มีความรุนแรงในการก่อโรคและแพร่กระจายน้อยกว่า

ระบาดวิทยาของเชื้อเอชไอวี/เอดส์ และผลกระทบต่อประเทศไทย^(14,15)

พ.ศ. 2529-2530 ในประเทศไทยได้มีการสำรวจหาความชุกของการติดเชื้อ ในกลุ่มที่มีพฤติกรรมเสี่ยงต่าง ๆ ได้แก่ หญิงขายบริการทางเพศ ชายขายบริการทางเพศ และผู้ที่รักษาามโรคตลอดจน ผู้ป่วยธาลัสซีเมีย พบอัตราการติดเชื้อต่ำกว่าร้อยละ 1 ได้มีการประมาณการไว้ว่าในปี พ.ศ. 2534 ผู้ป่วย เอดส์ครองเตียงประมาณร้อยละ 1 ของเตียงสถานพยาบาลทั้งหมดในประเทศไทย และ

ในปี พ.ศ. 2543 จะเป็นร้อยละ 12 ซึ่งโรคเอดส์ก่อให้เกิดผลกระทบทั้งทางตรง และทางอ้อม ต่อการพัฒนาการด้านเศรษฐกิจ และสังคม

พ.ศ. 2527 กองระบาดวิทยาได้กำหนดให้เอดส์และการติดเชื้อเอชไอวี เป็นโรคที่ต้องเฝ้าระวังและรายงาน ต่อมา พ.ศ. 2534 มีการยกเลิกการรายงานผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการ รายงานเฉพาะผู้ป่วยเอดส์เท่านั้น เนื่องจากพบว่าการรายงานผู้ติดเชื้อที่ไม่มีอาการไม่ก่อให้เกิดผลดีต่อการควบคุม ป้องกันการแพร่ระบาดของโรค บางครั้งก่อให้เกิดแรงต่อต้านและขัดขวางความร่วมมือระหว่างผู้ติดเชื้อกับเจ้าหน้าที่ควบคุมโรค จากรายงานของกองระบาดวิทยากระทรวงสาธารณสุข⁽¹⁵⁾ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 ถึง วันที่ 31 มกราคม 2543 (จากตารางที่ 2.1) พบผู้ป่วยเอดส์จากสถานบริการภาครัฐและเอกชน เป็นจำนวนทั้งสิ้น 135,950 ราย มีผู้เสียชีวิต 37,416 ราย เป็นเพศชาย 106,425 ราย (ร้อยละ 78.3) เพศหญิง 29,525 ราย (ร้อยละ 21.7) อัตราส่วนเพศชาย ต่อ เพศหญิงเท่ากับ 3.6:1 ผู้ป่วยที่พบมาก เป็นกลุ่มวัยทำงานอายุ ระหว่าง 20-39 ปี โดยมีผู้ป่วยสูงสุดในกลุ่ม อายุ 25-29 ปี คิดเป็นร้อยละ 28.4 รองลงมาอายุ 30-34 ปี ร้อยละ 24.0 กลุ่มอายุ 35-39ปี ร้อยละ 14.5 อายุ 20-24 ปีร้อยละ 11.8 ส่วนในกลุ่มเด็กทารกอายุ 0-4 ปี มีผู้ป่วยเอดส์ ร้อยละ 4.3

ผู้ป่วยเอดส์เป็นผู้ประกอบอาชีพรับจ้างมากที่สุด ร้อยละ 44.0 รองลงมาคือเกษตรกร ร้อยละ 21.1 ค้าขาย ร้อยละ 4.3 งานบ้าน ร้อยละ 3.0 และข้าราชการพลเรือน ร้อยละ 2.7 ติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์สูงสุด 82.9 รองลงมาคือยาเสพติดชนิดฉีดเข้าเส้นเลือดร้อยละ 5 ติดเชื้อจากมารดา ร้อยละ 4.8 และรับเลือด ร้อยละ 0.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 รายงานผู้ป่วยเอดส์ในประเทศไทย แบ่งตามเพศและปัจจัยเสี่ยง พ.ศ. 2527 ถึง 31 มกราคม 2543

ปี พ.ศ.	รวมทั้งหมด	ชาย			หญิง		
		เพศสัมพันธ์	ยาเสพติด	อื่น ๆ	เพศสัมพันธ์	ยาเสพติด	อื่น ๆ
2527-2533	256	166	39	21	19	1	10
2534	589	396	52	56	48	1	36
2535	1,755	1,180	147	171	172	3	82
2536	6,866	4,474	502	851	742	12	285
2537	13,803	9,217	891	1,422	1,696	22	555
2538	20,489	13,470	1,295	1,881	3,142	21	680
2539	24,248	16,091	1,054	1,892	4,450	20	741
2540	26,073	16,590	1,047	2,082	5,473	34	847
2541	25,439	15,418	1,086	2,126	5,981	17	811
2542	16,432	9,715	587	1,285	4,277	24	544
รวม	135,950	86,717	6,700	11,787	26,000	155	4,591

ลักษณะของเชื้อ HIV ^(2,16,17,18,19)

HIV (Human Immunodeficiency Virus) เป็น RNA virus ลักษณะเป็นทรงกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 100-200 นาโนเมตร แกนกลางเป็นรูปทรงกระบอก จัดอยู่ใน Family *Retroviridae*, Genus *Lentivirus* มี เอนไซม์ reverse transcriptase (RT) ในการเพิ่มจำนวน ต้องสร้าง DNA จาก RNA ก่อน หลังจากนั้นจึงมีขบวนการเพิ่มจำนวนต่อไป การติดเชื้อ HIV ใช้เวลานาน กว่าที่จะแสดงอาการของโรคเอดส์ เชื้อนี้สามารถถูกแยกตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ env gene ได้เป็น 2 สายพันธุ์ (types) คือ HIV type 1 (HIV-1) และ HIV type 2 (HIV-2) สายพันธุ์ HIV-1 แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

คือ กลุ่ม M (major), O (outlier) และ กลุ่ม N (new) กลุ่ม M สามารถแยกย่อยต่อไป ตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 20-35% ได้เป็น 10 subtypes คือ A-J แต่ HIV-1 กลุ่ม O ยังไม่มีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ส่วนกลุ่ม N เป็นกลุ่มที่เพิ่งพบเมื่อเร็ว ๆ นี้⁽²⁰⁾ ที่คาเมอรูน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่างไปจากกลุ่ม M และกลุ่ม O ส่วน HIV-2 แบ่งย่อยเป็น 5 subtypes (A-E) และมีลำดับเบสเหมือนกับ HIV-1 ประมาณ 55-60% โดยที่ HIV-1 กลุ่ม M พบได้ทั่วโลก ทั้งใน อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ แอฟริกา ยุโรป เอเชียรวมทั้งประเทศไทย กลุ่ม O พบใน คาเมอรูนและกาบอง โดยแยกเชื้อได้จากทั้งคนและลิง ส่วน HIV-2 พบมากในแอฟริกาตะวันตก⁽²¹⁾

ยีนของเชื้อ HIV

ยีนของ HIV-1 มีขนาด 9 KB จะทำหน้าที่ควบคุมการสร้างส่วนประกอบของไวรัส โดยแบ่งยีนออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. ยีนกำกับรูปร่าง (structural gene) ซึ่งประกอบด้วย

1.1 ENV gene สร้าง envelope protein ที่เป็นส่วนที่ไวรัสสร้างขึ้นคือ gp41 และ gp120 โปรตีนที่ส่วน knob หรือ surface protein คือ gp120 เป็นส่วนที่สำคัญของเชื้อ HIV ที่ได้รับความสนใจมาก เพราะมีความจำเพาะต่อการเกาะติดผนังเซลล์ CD4 gp120 นี้ มีส่วนซึ่งมีความแปรเปลี่ยนได้เรื่อยๆ อยู่ 5 บริเวณ (V1-V5) โดยที่ส่วน V3 อยู่ตรงยอดสุดของ gp120, มีความจำเพาะต่อการจับติดกับ CD4 นอกจากนี้ยังพบกันว่าแอนติบอดีต่อ V3 สามารถ neutralize ไวรัสทำให้ไม่สามารถติดเซลล์ได้ จึงเป็นจุดที่ถูกศึกษา มาก โดยเฉพาะในด้านการพัฒนาวัคซีน และส่วนก้าน transmembrane protein คือ gp41 โดยสร้างเป็น precursor protein คือ gp160 ส่วนของ ENV gene เป็นส่วนที่มี mutation บ่อย และสำคัญเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิด โดยมีบทบาทเกี่ยวกับ cell tropism และการเกิด syncytial cell formation

1.2 GAG gene สร้าง fragment of p55 (p39), core protein (p24), matrix protein (p17) และ nucleocapsid protein (p7) โดยมี precursor protein คือ p55

1.3 POL gene ทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ reverse transcriptase (RT), integrase และ protease ซึ่งได้แก่ p66, p51 และ p32

2. ยีนที่กำกับการทำงาน (regulatory gene) ซึ่งประกอบด้วย

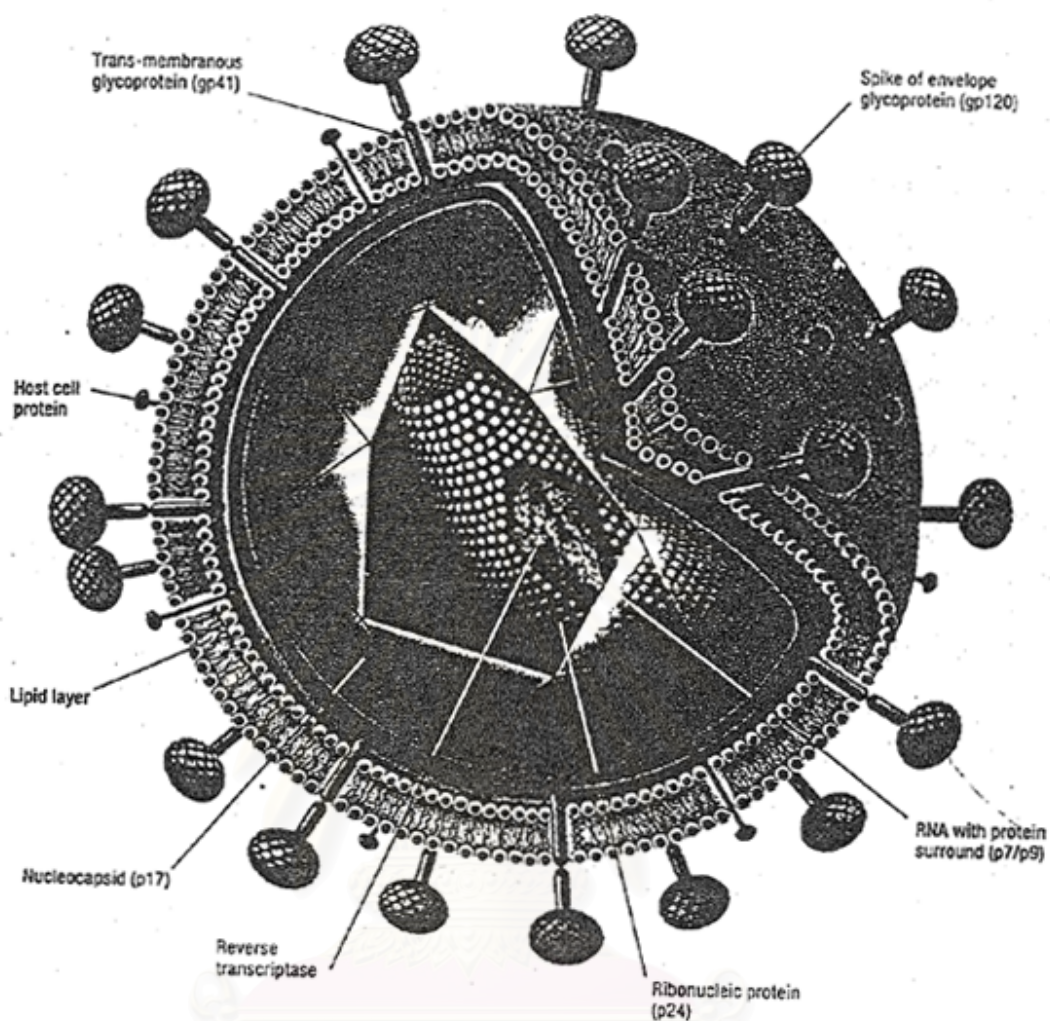
2.1 Positive regulatory genes คือ ทำให้ไวรัสแบ่งตัวเพิ่มขึ้น ได้แก่ ยีน tat (transactivator of transcription) ทำให้มีการเพิ่มของ HIV transcription ทำให้เชื้อ HIV เพิ่มจำนวน, rev (regulatory of virion protein expression) สร้างโปรตีนที่ไปควบคุมการสร้าง viral structural proteins และ vpr (viral protein r) อาจทำหน้าที่คล้าย tat กระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนโดยมี transcription

2.2 Negative regulatory genes คือควบคุมไม่ให้ไวรัสแบ่งตัวมากเกินไป ได้แก่ ยีน nef (negative regulatory factor) สร้างโปรตีนที่เป็น nef gene product ยับยั้ง HIV transcription อาจเป็นตัวที่ทำให้เกิด latency

2.3 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัส (vpu = viral protein u) มีผลต่อการสร้าง envelope glycoprotein และยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ (vif = virion infectivity factor)

3. Long terminal repeats (LTR)

ในส่วนปลายทั้ง 2 ข้างของ proviral DNA จะมี segment ของยีนที่เหมือนกัน และทำหน้าที่ในการควบคุมยีนอื่น ให้มี viral gene transcription และให้หยุดการ transcribe mRNA กระตุ้นการทำงานของ tat และ nef gene ได้ด้วย cellular transcriptional factors เช่น NFkB, SP1, TF II D ทำให้มี HIV transcription เกิดขึ้น นอกจากนี้พบว่า coinfection หรือ superinfection ของเซลล์ด้วยเชื้อ HTLV-I, EBV, CMV, HBV และ HHV-6 จะกระตุ้นส่วน LTR ทำให้ HIV เพิ่มจำนวน



ภาพที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี

(จาก Boncher, C.A. and Larder, B.A. Viral variation and therapeutic strategies in HIV infection, p. 6. MediTech Media Ltd, London, U.K., 1994.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลไกการเข้าสู่เซลล์ของ HIV ^(16,22)

กลไกแรกเชื้อ HIV เข้า cell ได้โดยอาศัยการจับกัน (binding) ระหว่าง gp120 ของเปลือกนอกของไวรัสกับ CD4 molecule ที่อยู่บนผิวของเซลล์ ซึ่งนอกจาก T helper (CD4) cells แล้ว CD4 molecule ยังพบได้บนผนังของ B cells, monocytes, macrophages และเซลล์บางอย่างของระบบประสาทส่วนกลาง เมื่อ gp120 จับกับ CD4 จะทำให้เกิดการแยกตัวของ gp41 ออกจาก gp120 ซึ่ง gp41 ของไวรัสเอชไอวี มีส่วนปลายด้าน NH₂ มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ fusogenic domain ของ paramyxovirus ดังนั้น เมื่อ gp120 ของ HIV จับกับ CD4 molecule บน cell จะทำให้ fusogenic epitope ของ gp41 กับ specific fusion receptor บนผิวเซลล์ที่ HIV ไปเกาะ และเกิด fusion ระหว่าง HIV envelope กับผนังเซลล์ ทำให้ HIV เข้าเซลล์ได้ HIV จะมีเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) เกาะติดอยู่กับ Viral RNA เมื่อ RNA ของไวรัสเข้าไปในเซลล์ จะสร้าง DNA ขึ้นมา และถูก incorporate ในนิวเคลียสของเซลล์

อีกกลไกหนึ่งที่ HIV เข้า cell ได้ โดยอาศัยแอนติบอดี (Enhancing Antibody) โดยแอนติบอดีต่อ HIV จะจับกับ HIV แล้ว Antibody-coated HIV จะถูก phagocyte ที่มี Fc Receptors จับกินเข้าไป โดยที่ไวรัสไม่ถูกทำลายใน phagocytes แต่กลับอาศัยอยู่ใน phagocytes

เชื้อเอชไอวีที่แยกได้ใหม่ ๆ จากผู้ป่วยโดยทั่วไปสามารถแบ่งใหญ่ ๆ ได้ 2 กลุ่ม เรียก HIV-tropism คือ macrophage-tropic (M-tropic) และ T cell line tropic (T-tropic) โดยที่กลุ่มแรก (M-tropic) สามารถติดเชื้อเข้าไปในเซลล์ชนิด macrophage ได้ดี ถึงแม้ว่ากลุ่มนี้อาจเจริญได้ใน CD4 T-cell ได้ แต่ไม่ดีเท่า macrophage โดยปกติเชื้อเอชไอวี ชนิด M-tropic จะไม่ทำให้เกิด syncytial formation ใน T-cell lines เช่น MT-2 ดังนั้นจึงเรียกเชื้อกลุ่มนี้ว่า nonsyncytium-inducing (NSI) phenotype. ส่วนเชื้อเอชไอวีในกลุ่มที่สอง เรียก T-tropic strain ซึ่งเข้าใจว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ในช่วงของการดำเนินของโรคในผู้ป่วยและสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี โดยเชื้อกลุ่มนี้เจริญได้ไม่ดีใน macrophage แต่จะเจริญได้ดีใน T-cell lines และทำให้เกิด syncytia ดังนั้นจึงเรียกเชื้อเอชไอวีในกลุ่มนี้ว่า syncytium-inducing (SI) stain แต่ปัจจุบันยังมีกลุ่มที่สาม ซึ่งสามารถเจริญได้ดีใน macrophage และ T-cell lines ซึ่งเรียกกลุ่มสุดท้ายเป็น Dual tropic เพิ่มเติมจาก M-tropic และ T-tropic strains ต่อไปเราทราบว่า M-tropic ใช้ CCR-5 เป็น coreceptor จึงเรียก R5 strain ส่วน T-tropic ไวรัส ใช้ CXCR4 เป็น coreceptor จึงเรียก X4 strain และ เรียก dual tropic เป็น R5/X4 strain

Classification of chemokines

Chemokinesทำหน้าที่เกี่ยวข้อง ในขบวนการของ acute และ chronic inflammation ในปัจจุบันสามารถแบ่ง Chemokines ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของสองตัวแรกใน cystein 4 ตัว ที่ใช้ cystein เป็นหลักในการแบ่งกลุ่มเนื่องจาก cystein เป็นกรดอะมิโนที่มีค่อนข้างยาก ดังนั้นถ้า cystein เรียง 2 ตัวติดกันจัดเป็นกลุ่ม cc chemokines แต่ถ้าถูกขั้้นด้วยกรดอะมิโนอื่น 1 ตัว ก็จัดเป็น CXC chemokines ซึ่งในปัจจุบันแบ่ง CXC chemokines ออกเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ CXCR1 ถึง 4 ในหลอดทดลอง สามารถแยกคุณสมบัติของ chemokines แต่ละกลุ่มได้โดยที่ CXC chemokines มีคุณสมบัติในการดึงดูด (attract) เซลล์จำพวก lymphocytes และ neutrophils แต่กลุ่ม cc chemokines ไม่มีคุณสมบัติในการดึงดูด neutrophils แต่จะดึงดูด เซลล์จำพวก monocytes, macrophage, eosinophils, basophils, dendritic cells และ lymphocytes ในร่างกาย chemokine มีคุณสมบัติในการส่งสัญญาณกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวมากระจุกตัวในที่มีการติดเชื้อและในที่มี tissue injury นอกจากนี้ chemokines ยังสามารถควบคุม trafficking ของเม็ดเลือดขาว, hemopoiesis, angiogenesis และอื่น ๆ

ในปัจจุบัน chemokines ของคนที่มีคุณสมบัติทำหน้าที่ต่าง ๆ จับกับ chemokine receptors บนผิวของเซลล์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 12 human chemokine receptors โดยที่ 4 receptors (CXCR1 ถึง CXCR4) จับกับ CXC chemokines และ 8 receptors (CCR1 ถึง CCR8) จับกับ CC chemokines ส่วนมากแต่ละ receptor จะจับกับ chemokines มากกว่า หนึ่งชนิด chemokines ส่วนมากจะจับกับสองหรือมากกว่าสอง receptors

Coreceptor of HIV

Chemokine receptors เป็น 7 transmembrane spanning G-protein coupled receptors (7 TMR) ซึ่งมีส่วนสำคัญสำหรับหน้าที่ต่าง ๆ ของเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับ cell migration การส่งสัญญาณ ของ chemokines ผ่านทาง receptors ทำให้เซลล์เคลื่อนไปยัง tissue ต่าง ๆ และอาจก่อให้เกิดการ activation ของเม็ดเลือดขาว อันจะมีผลต่อการยอมรับการติดเชื้อเอชไอวีสายพันธุ์ต่าง ๆ

Expression ของ receptors ต่าง ๆ แตกต่างกันในเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด เช่น CCR3 จะ express ส่วนใหญ่บน eosinophils IL-8 receptor แสดงออกบน neutrophils ส่วนการแสดงออกบน T cell เกี่ยวข้องกับ CCR1, CCR2, CCR4 และ CCR5 รวมทั้ง CXCR4 พบว่า CCR-5 expression พบสูงใน subpopulation of T cell ชนิด CD26 hi-effector/memory subset เช่นเดียวกับ macrophage chemokine receptors อาจมีส่วนเป็น coreceptors สำหรับการติดเชื้อเอชไอวี พบว่า

RANTES, MIP-1, MIP-1B สามารถ suppress การติดเชื้อ HIV-1 สายพันธุ์ macrotropic (พบใน primary isolates) ซึ่ง ligand ทั้งสามจับกับ CCR-5 นอกจากนี้พบว่ามี chemokine receptor ชนิด CXCR4 สามารถช่วยการติดเชื้อและการ fusion ของ เซลล์ CD4 ส่วน CCR3 จะจับกับทั้ง primary isolates และ laboratory strain จะมีเชื้อส่วนน้อยเท่านั้นที่จะจับกับ CCR2b ในขณะที่สามารถสรุปได้ว่า chemokines receptors ซึ่งเกี่ยวข้องกับติดเชื้อเอชไอวีได้แก่ CCR2b, CCR3, CCR5 และ CXCR4

การเพิ่มจำนวนของเชื้อ HIV

เชื้อ HIV เข้าสู่เซลล์โดยใช้ปุ่ม gp120 จับกับ CD4 ที่ผิวเซลล์^(23,24) หรือเข้าสู่เซลล์โดยกลไกทางอื่น อาจเป็น Fc receptor เมื่อ gp120 จับกับ CD4 แล้ว จะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโปรตีน ทำให้ส่วนของ cryptic region ที่อยู่ระหว่าง gp120 และ gp41 expose ทำให้ส่วนของ gp41 สามารถจับกับ fusion receptor (Fc receptor) บนผิวเซลล์ ทำให้ส่วนของ core protein และ ส่วนประกอบภายในเข้าสู่เซลล์ เชื้อไวรัสอาจเข้าทาง Fc receptor โดยการ fusion กับผิวเซลล์ก็ได้ หลังจากนั้น core protein สลายตัว ปลดปล่อย viral RNA สร้าง complementary DNA สายเดี่ยวโดยใช้ enzyme RT โดย DNA ที่สร้างขึ้นยังคงจับกับ RNA ต่อจากนั้นสร้างสาย DNA ที่เป็น complementary กับสายแรกทีสร้างขึ้น ได้เป็น DNA สายคู่ โดยเอนไซม์ RT ของเซลล์ และมี viral RNase H สลายสาย RNA เดิม DNA สายคู่ที่สร้างขึ้นนี้จะประกอบด้วยยีนโนมทั้งหมด และขดตัวเป็น circular DNA เรียกว่า proviral DNA เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์ รวมตัวเข้ากับ cellular DNA โดย enzyme integrase และคงอยู่ภายในเซลล์ในสภาพ latency

การติดเชื้อ HIV ใน monocytes/macrophage พบว่า HIV อยู่ในสภาพ proviral DNA โดยไม่แสดงลักษณะแอนติเจนออกมาได้เป็นเวลานานและเดินทางเข้าสู่ระบบประสาท ในบางสภาวะอาจขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ สภาพของเซลล์ และการถูกกระตุ้นโดยปัจจัยร่วม (cofactor) มีการกระตุ้นให้เกิด viral transcription มีการสร้าง mRNA และ viral RNA ทำให้มีการสร้าง protein ที่เป็น ส่วนประกอบของไวรัสเป็น polyproteins precursor และประกอบเข้าเป็นอนุภาคใหม่แล้วจึงปลดปล่อยออกจากเซลล์โดยการ budding ได้ส่วน envelope จากเซลล์โดยมีส่วนของ gp120 อยู่บนผิวเซลล์บริเวณนั้น เชื้อ HIV ที่ออกจากเซลล์จะยังไม่มีคุณสมบัติในการติดเชื้อ ต้องอาศัย protease enzyme มาย่อย precursor polyproteins ให้เป็น biologically active protein เชื้อ HIV จะติดต่อยังเซลล์อื่นได้ทั้งในสภาพ cell free virus ที่อยู่นอกเซลล์ และ cell associate virus โดยการที่ gp120 ที่อยู่บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อจับกับ CD4 บนเซลล์ตัวใหม่ และมีการ fusion เข้าสู่เซลล์โดยตรง โดยไม่ต้องออกนอกเซลล์

ขั้นตอนต่าง ๆ ในการเพิ่มจำนวนไวรัส ถูกขัดขวางได้โดยแอนติบอดีและสารบางอย่าง ซึ่งอาจนำมาใช้เป็นยาต้านไวรัสได้ ดังเช่น neutralizing antibody จับกับส่วนของ gp120 ส่วนที่สำคัญคือ V3 loop ซึ่งเรียกว่า primary neutralizing determinant (PND) หรือ soluble CD4 (SCD4) ไปจับกับ gp120 ขัดขวางไม่ให้จับ CD4 บนผิวเซลล์

ยาด้านไวรัส HIV

พวก antiretroviral agents ส่วนมากเป็น nucleoside analogues ซึ่งไม่มี 3' hydroxyl group พวกนี้จะถูก cellular kinase ทำให้เป็น triphosphate forms โดยจะแข่งกับ nucleoside triphosphate ซึ่งปกติใช้ในการสร้าง viral DNA ของ HIV reverse transcriptase แต่เนื่องจาก nucleoside analogues ไม่มี 3' hydroxyl group ดังนั้นจึงทำให้ chain elongation ถูก terminate จึงต่อกันเป็น chain ไม่ได้ ทำให้ไม่เกิด proviral DNA ที่จะ integrate เข้าไปใน host chromosome

1. AZT (3'-azido-2'-deoxythymidine) หรือ Zidovudine หรือ Retrovir (Burroughs Wellcome)

ซึ่งสังเคราะห์ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2507 โดย Horwitz และคณะ พ.ศ. 2530 ได้ผ่านการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในผู้ป่วย AIDS และ advanced ARC ที่ติดเชื้อ *pneumocystis carinii* pneumonia หรือมี CD4+ lymphocyte ต่ำกว่า 200/ ลบ.มม. โดยทั่วไปยานี้ช่วยให้ผู้ป่วยที่มีอาการเอดส์มีชีวิตยืนยาวขึ้นและช่วยลดอัตราการ progress ไปเป็นเอดส์ของผู้ป่วยที่ไม่มีอาการ (asymptomatic) โดยลดกว่าครึ่ง กลไกของ AZT อยู่ที่ยับยั้ง HIV-1 reverse transcriptase โดยที่ AZT จะถูก cellular thymidine kinase เปลี่ยนเป็น monophosphate form (AZTMP) และ diphosphate form (AZTDP) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะถูก cellular enzyme อื่น ๆ เปลี่ยนรูปให้เป็น triphosphate form (AZTTP) AZTTP จะจับกับ HIV-reverse transcriptase ได้ดีกว่า polymerase alpha ของเซลล์ประมาณ 100 เท่า ดังนั้น AZT จึงถูก incorporate เข้าไปใน DNA ของเชื้อ HIV แต่ เนื่องจาก AZT ไม่มี 3' OH group ดังนั้น จึงทำให้เกิด chain termination ซึ่งทำในการสร้าง HIV-DNA ไม่ครบสมบูรณ์ นอกจากนั้น AZTMP ยังมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง thymidine -5-triphosphate (dTTP) โดยการแข่งเข้าจับกับ thymidine kinase ระดับของ AZT สูงสุดในซีรัมในเวลา 30-90 นาที ภายหลังจากรับประทานยา โดยมี half-life ประมาณ 1 ชม. ผลจากการรักษาด้วย AZT มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ของ CD4+ lymphocyte สูงขึ้น และระดับ p24 antigen ต่ำลง รวมทั้งการลดอัตราการตายของผู้ป่วยเอดส์ที่ได้รับยา AZT โดยพบว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยา AZT จะเสียชีวิตประมาณ 39.3% ในขณะที่ มีการประมาณว่าอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่รักษาด้วย AZT จะมีประมาณ 10.3% ภายใน 1 ปีผลข้างเคียงของยานี้ทำให้เกิด macrocytic anemia และ

granulocytopenia รวมทั้ง fever rash และ nail pigmentation การใช้ AZT ร่วมกับยาอื่นพบว่ามี synergy กับ อินเตอร์เฟอรอน และ colony-stimulating factor (GM-CSF) และมี antagony ต่อ ribavirin ปัจจุบันขนาดของยาที่แนะนำให้ใช้ คือ 200 mg ทุก 4 ชม. ของผู้ป่วยเอดส์ที่มี CD4+ lymphocytes ต่ำกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. และสำหรับการป้องกันของผู้ได้รับเชื้อแต่ไม่มีอาการ (asymptomatic) แต่มี CD4+ lymphocytes ต่ำกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. ให้ใช้ 500 mg ต่อวัน จนกระทั่ง พ.ศ. 2532 Larder และคณะ รายงานการดื้อยาของ HIV ในผู้ป่วยที่ใช้ AZT เป็นเวลานาน จึงได้มีการค้นคว้าหายาตัวใหม่เพื่อใช้ทดแทน หรือร่วมกับยา AZT เช่น dideoxycytidine (ddc), dideocyinosine (ddi), dideoxydidehydrothymidine (D4T) azidouridine (Azdu) และ foscarnet ซึ่งมีผลต่อ viral DNA synthesis โดยการ inhibit reverse transcriptase รวมทั้ง souble CD4 ซึ่งเป็น receptor ของ HIV เพื่อหลอกให้ HIV มาจับจะได้ไม่ไปทำลาย Tcells และ castanospermine ซึ่งจะไป block การ maturation ของ viral glycoprotein

2. Dideoxycytidine (ddC)

ยานี้เป็น nucleosides analogue ซึ่งก่อให้เกิด chain termination เช่นเดียวกับ AZT มี toxicity น้อยกว่า AZT และเป็นพิษน้อยกว่า ddi โดยที่ ddi ทำให้เกิด severe pancreatitis 20 % แต่อาการข้างเคียงของ ddC เช่น stomatitis rash fever และ arthritis/arthralgia ขนาดที่ให้บริการ 0.01-0.06 mg/Kg ทุก 8 ชม. ยานี้มีผลทำให้ p24 antilen ในซีรัมลดลงกว่า 70 %

3. Dideoxyadenosine (ddA) and dideoxyinosine (ddi)

Nucleosides analogues ทั้งสองตัวเป็น purine base ซึ่งต่างจากตัวอื่น ๆ ซึ่งเป็น pyrimidine bases ddA เป็น prodrug ของ ddi Active form ของ ddA เมื่อ ddA ถูก deamination จะได้ ddi สารทั้งสองชนิด เป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า AZT แต่เนื่องจาก ddi ไม่ stable เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรด เช่น น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ดังนั้นการใช้ในสภาพของยากินต้องอยู่ในรูปของ buffer พบว่า ddi ทำให้ 40% ของคนไข้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีอาการทางคลินิกดีขึ้น 28% ของคนไข้มีเซลล์ CD4 +lymphocytes เพิ่มขึ้น 50 % ของคนไข้มีระดับ HIV-p24 antigen ลดลง

4. 2', 3' – didehydrodideoxythymidine (D4T)

D4 T เป็น nucleoside analog มีกลไกคล้ายกับ AZT แต่เป็นพิษต่อไขกระดูกน้อยกว่า AZT นอกจากนั้นสายพันธุ์ของเชื้อ HIV ที่ดื้อต่อยา AZT จะไม่ดื้อต่อยา D4T

5. Azidouridine (AZdU)

AZdU เป็น pyrimidine nucleoside analogue เช่นเดียวกับ AZT ddC และ D4T ความเข้มข้นของ AZdU ที่จะยับยั้ง HIV reverse transcriptase สูงกว่า AZT จึงมีประสิทธิภพน้อยกว่า

AZT แต่ AZdU เป็นพิษน้อยกว่า AZT และมีประสิทธิภาพสูงกว่า AZT ในเซลล์ monocytes และ macrophage

6. Soluble CD4

CD4 เป็น glycoprotein ซึ่งเป็น receptor ของ HIV อยู่บนผิวของ T lymphocyte การใช้ CD4 เป็นสารต้านเชื้อไวรัส เป็นกลยุทธ์ใหม่แตกต่างจากการใช้ nucleoside analog ในหลอดทดลอง CD4 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการจับกับ envelope protein ของ HIV ทำให้ความสามารถในการติดเชื้อของ HIV หดไป

7. สารอื่น ๆ เช่น foscarnet ซึ่งใช้ได้ผลดีกับ cytomegalovirus เป็นที่น่าสนใจที่จะใช้กับ HIV รวมทั้ง อินเตอร์เฟอรอนหรือโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อทั้งเชื้อ HIV และต่อ CD4 receptor บน T lymphocytes และ การใช้ HIV-vaccine

พยาธิกำเนิดของการเกิดโรคเอดส์

เมื่อเชื้อ HIV เข้าสู่ร่างกาย จะไปจับกับเซลล์ CD4+ ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมาย โดยไวรัสใช้ gp120 บนผิวนอกเซลล์จับกับ CD4 receptor บนผิวของ T cell หลังจากเชื้อ HIV จะเข้าไปในเซลล์ DNA แล้วใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ของตัวมันเองเปลี่ยน RNA ของมันให้เป็น DNA เพื่อจะแทรกเข้าไปอยู่ใน CD4 ของ T cell ยีนอมของ HIV จะแฝงตัวอยู่ใน T cell จนกว่า T cell นั้นจะโดนกระตุ้น เมื่อ T cell ถูกกระตุ้นด้วยวิธีการใดก็ตามมันจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและจะทำให้ยีนอมของ HIV มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนตามไปด้วย เชื้อ HIV ที่สมบูรณ์จำนวนมากจะถูกสร้างขึ้น และถูกปลดปล่อยออกมาจาก T cell เหล่านั้น เพื่อไปเข้าเซลล์ CD4+ อื่น ๆ ต่อ ๆ ไป ทำให้เซลล์ CD4+ ในร่างกายติดเชื้อและอาจถูกทำลายลงในเวลาอันรวดเร็ว

ยังมีเซลล์ของร่างกายชนิดอื่น ๆ ที่มีโปรตีนบนผิวคล้ายคลึงกับ CD4 ของ T cell ซึ่งจะกลายเป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อ HIV และถูกทำลายด้วยเชื้อ HIV ได้เช่นกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวี

1. เซลล์สร้างเม็ดเลือด (hematopoietic cells) ได้แก่ helper/inducer T-lymphocytes, monocytes/macro-phage, Kuffers cells, ฯลฯ
2. เซลล์สมอง (brain cells) ได้แก่ astrocytes/oligodendrocytes, fetal neuron cells, neuron, brain capillary endothelium, microglial cells
3. เซลล์อื่น ๆ (Other cells) ได้แก่ Langerhans (dendritic) cells, bowel epithelium, fibroblasts

จะเห็นได้ว่า เซลล์ส่วนใหญ่ของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกทำลายโดยเชื้อ HIV คือ CD4+ cell ซึ่งมีหน้าที่สำคัญที่สุดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ดังนั้น ผู้ป่วยโรคเอดส์ซึ่งมีจำนวนเซลล์ CD4 เหลืออยู่น้อยมาก^(24,25) จึงไม่สามารถกำจัดจุลชีพต่าง ๆ ที่บุกรุกเข้าร่างกายหรือกำจัดเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นในร่างกายได้ เซลล์ที่ติดเชื้อ HIV จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ซึ่งกลไกการแตกทำลายของ CD4 cells มีได้หลายทาง ได้แก่

1. แตกทำลายโดยตรงใน CD4 infected cell เมื่อเชื้อ HIV budding ออกจากเซลล์ หลายตำแหน่งพร้อมกัน
2. เกิดจากการ จับกันของ gp120 บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ กับ CD4 บนผิวเซลล์ที่ยังไม่ติดเชื้อ ทำให้รวมเป็น syncytial cell ทำงานไม่ได้และถูกทำลาย
3. เกิดจาก free gp120 มาเกาะบนผิว CD4 และมีแอนติบอดีต่อ gp120 มาจับอีกทีหนึ่ง ทำให้เซลล์ถูกทำลายโดย antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) หรือ CTL
4. เกิดจากกลไกทำลายเซลล์ตนเอง โดยพบ autoantibodies ต่อ MHC class II protein ในซีรัม ผู้ติดเชื้อเอดส์ที่มีอาการป่วยในเวลารวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากมีลักษณะของ gp120 ที่คล้ายกับบางส่วนของ MHC class II protein
5. อาจเกิดจากการติดเชื้อบางอย่างร่วม เช่น mycoplasma ซึ่งจัดเป็น superantigen จับกับ T-cell receptor ทำให้เกิด T-cell dysfunction และเซลล์ตาย

พยาธิกำเนิดที่เกิดในการติดเชื้อ HIV นอกจากผลการทำงาน CD4 ทำหน้าที่ผิดปกติและลดจำนวนลงแล้ว ยังมีผลต่อการทำงานของ CD8 cells ด้วย ในผู้ติดเชื้อ HIV ในระยะที่ยังไม่แสดงอาการ จะมีจำนวน CD4 ลดต่ำลง แต่จำนวน CD8 จะเพิ่มขึ้น และในระยะสุดท้ายเมื่อแสดงอาการโรค CD8

จะลดต่ำลงด้วย ในผู้ติดเชื้อ HIV ที่เริ่มแสดงอาการโรค พบการทำงานของ cytokine ผิดปกติ มีการสร้าง tumor necrosis factor (TNF), IL-6, gamma IFN และ cytokines อื่นเพิ่มขึ้น ทำให้ HIV เพิ่มจำนวนได้ดีขึ้น และเชื้อที่เพิ่มมากขึ้นกลับกระตุ้นให้มีการสร้าง cytokines มากขึ้น และพบการสร้าง enhancing antibody ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่จับกับ HIV และทำให้เข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้นโดยผ่านทาง Fc-receptor และ complement receptor และ CD4 molecule

การตอบสนองของร่างกายในการป้องกันโรค

ในผู้ที่ติดเชื้อ HIV จะตรวจพบแอนติบอดีต่อโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัส และภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ ในระยะแรกของการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการ ระบบภูมิคุ้มกันสามารถควบคุมการติดเชื้อ HIV ได้ การเพิ่มจำนวนไวรัสมีไม่มาก เนื่องจากเชื้อ HIV มีการกลายพันธุ์ (mutation) เกิดขึ้นตลอดเวลา เชื้อที่กลายพันธุ์ใหม่สามารถหลบหลีกการทำลายของแอนติบอดีและเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันได้ การเพิ่มจำนวนของไวรัสที่มีความรุนแรง (virulence) มากขึ้น และพบการทำลายเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันในระยะต่อมา จึงมีโอกาสเกิดอาการโรครุนแรงมากขึ้นเรื่อย

ในคนและลิงชิมแปนซีที่ติดเชื้อ HIV พบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญในการป้องกันโรค คือ

1. Neutralizing antibodies สามารถ neutralize เชื้อ HIV ต่างสายพันธุ์ได้ในหลอดทดลอง และสามารถป้องกันการรวมตัวของเซลล์ที่ติดเชื้อมีเซลล์ปกติ (fusion) แอนติบอดีต้องมีทั้ง neutralizing antibody ป้องกันเชื้อที่อยู่นอกเซลล์ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ และมี fusion inhibition activity และ CD4 blocking activity ป้องกันไม่ให้เชื้อในเซลล์เข้าสู่เซลล์ใหม่โดยการรวมตัว นอกจากนี้จำเป็นต้องมี cell mediated immunity ทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อมีด้วย

Neutralizing antibodies มีบทบาทสำคัญที่สุดในการป้องกันการติดเชื้อ แต่ถ้าได้รับเชื้อไวรัสจำนวนมาก neutralizing antibody ไม่สามารถป้องกันได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) เป็นแอนติบอดีที่ร่วมกับ natural killer cell (NK) ทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ นอกจากนี้ยังมีแอนติบอดีที่จับกับ complement แล้ว ทำให้มีการสลายของเซลล์ที่ติดเชื้อ (complement-mediated cytolysis antibody)

3. ในผู้ติดเชื้อโดยไม่มีอาการส่วนใหญ่จะตรวจพบ Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) ที่จะไม่ถูก recognized แอนติเจนของไวรัสโดยผ่าน major histocompatibility complex (MHC) ในผู้ติดเชื้อโรคไม่แสดงอาการจะพบ CTL ในระดับสูงเมื่อเทียบกับผู้ที่ไม่ติดเชื้อ และเมื่อผู้ป่วยแสดงอาการ โรคเอดส์ มักจะไม่พบ CTL

ดังนั้นผู้ติดเชื้อ HIV จะมีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นทั้งใน humoral mediated immunity (HMI) และ cell mediated immunity (CMI) ในผู้ติดเชื้อจะพบว่า CMI มีส่วนสำคัญที่สุดในการทำลาย viral infectious agents เซลล์ที่สำคัญและเกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อ HIV คือ natural killer cells, T helper/inducer cells (CD4) และ T suppressor/cytotoxic cells (CD8) เป็นที่ทราบกันแล้ว T helper cells เป็นเซลล์ที่สำคัญมี 2 ชนิด คือ T helper 1 (TH1) และ T helper 2 (TH2)^(26,27) โดย TH1 จะเป็นตัวควบคุม CMI มีการผลิตและหลั่ง interleukin (IL)-2 และ gamma interferon (IFN-) ส่วน TH2 จะผลิตและปล่อย IL-4, IL-6 และ IL-10 ใช้ควบคุม MHI การมี CMI จะก่อให้เกิด protection ส่วน HMI ถ้าเป็นชนิด neutralizing antibodies จะก่อให้เกิด protection แต่ถ้าเป็น enhancing antibodies จะก่อให้เกิดการ กระจายของเชื้อ HIV

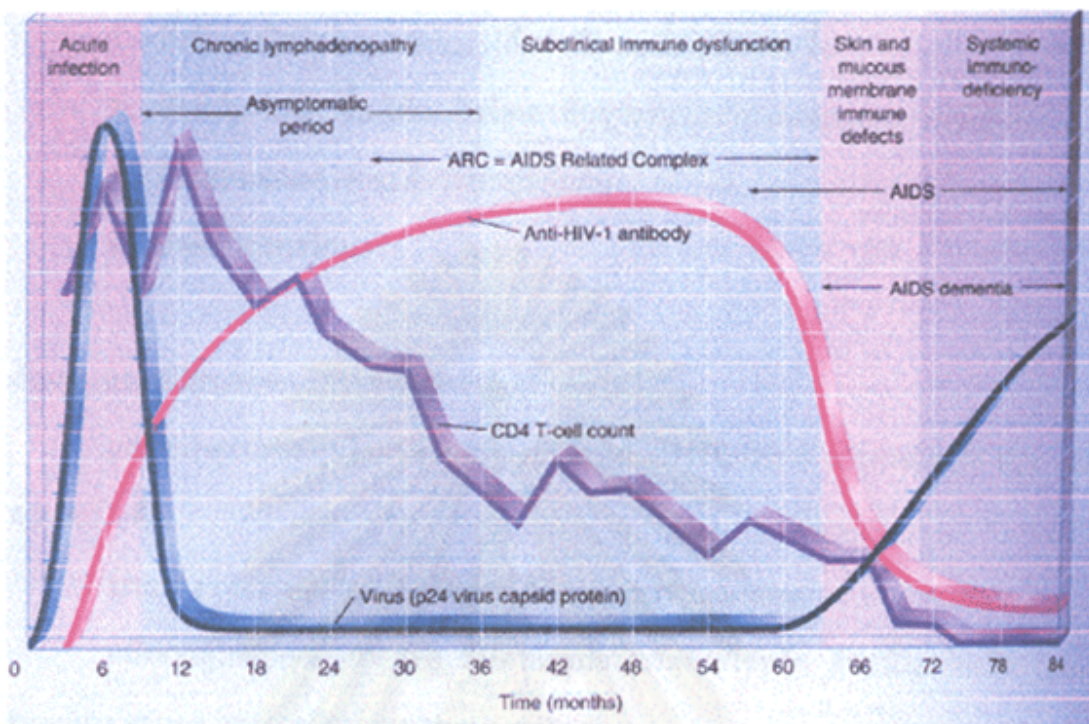
การดำเนินโรคของการติดเชื้อ HIV

จากการศึกษาของคณะ Munoz และ Bacchetti^(28,29) พบว่าระยะเวลาตั้งแต่ได้รับเชื้อ HIV จนป่วยเป็นโรคเอดส์ เฉลี่ยประมาณ 10 ปี ในประเทศไทยจากข้อมูลงานวิจัยของ Sirivichayakul และคณะ⁽³⁰⁾ พบว่าผู้ติดเชื้อเอชไอวี เฉลี่ยต่อปีจนกลายเป็นเอดส์ร้อยละ 6.8 และพบอัตราการดำเนินโรคจนเป็นเอดส์โดยอาศัยระดับเซลล์ CD4 พบว่า ผู้ป่วยคนไทยที่มีระดับเซลล์ CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. จะมีความเสี่ยงกลายเป็นโรคเอดส์ 9 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. และจากการศึกษาของ เกียรติ รัชชวงษ์ธรรมและคณะ⁽³¹⁾ พบว่าอัตราการลดลงของ เซลล์ CD4 ของคนไทย 50 เซลล์/ลบ.มม. ต่อปี ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ E กับ B และศึกษารูปแบบการดำเนินโรคของการติดเชื้อเอชไอวีในคนไทย ได้แบ่งรูปแบบของการดำเนินโรคของเอชไอวีเป็น 4 ระยะ

1. Intermediate (or Average) Progressors ผู้ติดเชื้อเอชไอวี ส่วนใหญ่ ประมาณร้อยละ 80-90 จะมีการดำเนินโรคเฉลี่ย 8-10 ปี ในการแสดงอาการของโรคเอดส์
2. Rapid Progressors เป็นระยะที่ผู้ติดเชื้อมีการดำเนินโรคที่รวดเร็วไม่เกิน 3 ปี จะเกิดอาการโรคเอดส์ พบได้ร้อยละ 5
3. Long-term Nonprogressors เป็นระยะที่ผู้ติดเชื้อมีการดำเนินโรคที่ช้ามากหรือคงสภาพเดิมไม่มีการดำเนินของโรค และ เซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. แม้จะติดเชื้อเอชไอวีมานานกว่า 10 ปีและไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ซึ่งพบได้น้อยกว่าร้อยละ 5
4. Long-term survivors เป็น ระยะที่ผู้ติดเชื้อมีชีวิตอยู่ได้นานกว่า 10-15 ปี ภายหลังจากการติดเชื้อ ทั้งๆ ที่ ไม่ได้รับการรักษา ผู้ติดเชื้อบางรายในกลุ่มนี้อาจมีระดับเซลล์ CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์ /ลบ.มม. แต่คงมีสภาพของโรคคงที่หลาย ปี ไม่มีตัวเลขผู้ติดเชื้อในกลุ่มนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 แสดงภาวะการดำเนินของโรคเอดส์

(จาก McKane, L. and Kandel, J. Microbiology essentials and applications, International edition. P 620 Mc Graw Hill College, New York, U.S.A., 1996.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินโรค ^(31,32)

การที่ผู้ติดเชื้อจะมีการดำเนินของโรคในรูปแบบใด รวดเร็ว ช้า หรือคงที่เป็นเวลากว่า 10 ปีโดยไม่มีอาการเปลี่ยนแปลง พบว่า ขึ้นอยู่กับปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างดังต่อไปนี้

1. ปัจจัยทางไวรัส (viral factor) ได้แก่ ปริมาณเชื้อ ชนิดของเชื้อ
2. ปัจจัยในตัวผู้ติดเชื้อ ได้แก่ ปัจจัยทางพันธุกรรม และการตอบสนองของทางภูมิคุ้มกัน
3. ปัจจัยร่วมและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน
4. ปัจจัยด้านการรักษา

ลักษณะทางคลินิกและระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อเอชไอวี

แต่เดิมมาศูนย์ควบคุมโรคของสหรัฐอเมริกา ได้แบ่งระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อ HIV ออกเป็น 4 ระยะ⁽³²⁾ คือ

ระยะที่ 1 : ระยะติดเชื้ออย่างเฉียบพลัน (Acute HIV infection)

หลังจากผู้ได้รับเชื้อ HIV 2-3 สัปดาห์จะมีอาการคล้ายไข้หวัด ต่อม่าน้ำเหลืองโต (glandular fever-like illness) และอาจมีอาการของ encephalitis, meningitis, myelopathy และ neuropathy อาการต่าง ๆ เหล่านี้หายไปได้เองภายใน 1-2 สัปดาห์

ระยะที่ 2 : ระยะติดเชื้อโดยไม่มีอาการ (Asymptomatic infection)

เริ่มพบแอนติบอดีหรือภูมิคุ้มกันต่อไวรัสเอชไอวีประมาณ 6-8 สัปดาห์ หลังได้รับเชื้อ มีแอนติบอดี ต่อ HIV ตลอดชีวิต แต่อาจเนิ่นนานออกไปถึง 3 เดือนก็ได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานในกลุ่มชายรักร่วมเพศในอเมริกาว่าอาจต้องรอไปนานถึง 3 ปี anti-HIV จึงจะให้ผลบวก

ระยะที่ 3: ระยะต่อมน้ำเหลืองโตทั่วไป(Persistent generalised lymphadenopathy, PGL)

พบต่อมน้ำเหลืองโตทั่วตัว ระยะนี้คนไข้ไม่มีอาการ แต่ถ้าตรวจร่างกายจะ CDC ให้คำจำกัดความของ PGL ว่า ต้องเป็นต่อมน้ำเหลืองขนาดตั้งแต่ 1 ซม. ขึ้นไป และจะต้องโตอยู่นานเกิน 1 เดือน ตั้งแต่ 2 บริเวณขึ้นไป โดยไม่นับรวมต่อมน้ำเหลืองที่บริเวณขาหนีบ และต่อมน้ำเหลือง 2 บริเวณนี้จะต้องไม่เป็น draining chain ซ้ำกันและกัน

ระยะที่ 4 : ระยะติดเชื้อมีอาการ (symptomatic HIV infection) แบ่งย่อยได้เป็น

ระยะที่ 4.1 : Constitutional disease มีอาการน้ำหนักลดไม่ทราบสาเหตุโดยน้ำหนักลดเกิน 10 กิโลกรัม หรือลดเกิน 10% ของน้ำหนักเดิม อาจมีไข้ (เกิน 38° ซ) เรื้อรัง (เกิน 4 สัปดาห์) โดยไม่ทราบสาเหตุ อาจมีท้องเสียเรื้อรังโดยไม่ทราบสาเหตุ อาจมีเชื้อราในช่องปาก (Oral candidiasis) อาจมีงูสวัด (Herpes zoster) ตรงกับระยะ AIDS related complex หรือ AIDS related condition (ARC) เดิม

ระยะ 4.2 : Neurological disease มีอาการทางจิตประสาท หรือมีอาการของระบบประสาทส่วนกลาง encephalitis, meningitis, myelopathy และ neuropathy เรียกว่า "HIV encephalopathy" หรือ "AIDS demantia" ลักษณะของสมองเหี่ยว (brain atrophy)

ระยะที่ 4.3 : Secondary infectious disease

4.3.1 : Specified secondary infectious disease listed in CDC surveillance definition⁽³³⁾

4.3.2 : Other unspecified secondary infectious disease เป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสอื่น ๆ ที่มีได้รวมอยู่ใน surveillance definition

ระยะที่ 4.4 : Secondary cancers ส่วนใหญ่ พบKaposi's sarcoma อาจพบ primary central nervous system lymphoma และ non-Hodgkin's disease

ระยะที่ 4.5 : Other conditions เป็นกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่สามารถจัดเข้าไว้ใน 4 กลุ่มข้างต้น เช่น มีโรคติดเชื้อที่ไม่ได้ระบุในกลุ่ม 4.3 หรือมีอาการนอกเหนือที่ระบุในกลุ่ม 4.1

การติดเชื้อ HIV ในระยะต่าง ๆ จะมี severity ต่างกัน ผู้ป่วยระยะที่ 4 จะมีความผิดปกติทางภูมิคุ้มกันมากกว่าคนที่ เป็นระยะที่ 3 และ 2 ตามลำดับ

นิยามผู้ป่วยโรคเอดส์ที่ใช้ในการเฝ้าระวัง⁽³⁴⁾

นับตั้งแต่ พ.ศ. 2527 ที่ประเทศไทยมีผู้ป่วยโรคเอดส์รายแรก ได้ใช้แนวทางการวินิจฉัยโรคเอดส์ ที่ดัดแปลงมาจาก ศูนย์ควบคุมโรคแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control : CDC) โดยอาศัยการตรวจพบโรค หรือกลุ่มอาการที่แสดงถึง ภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกายเสื่อม ร่วมกับการตรวจพบว่า อัตราส่วนของ T-helper lymphocyte ต่อ T-suppressor lymphocyte (CD4/CD8) ต่ำกว่า 1

เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2530 ศูนย์ควบคุมโรคแห่งชาติสหรัฐอเมริกาได้ทบทวนค่านิยามโรคเอดส์ใหม่เพื่อให้ครอบคลุมกรณีต่าง ๆ ได้กว้างขวางขึ้น โดยยอมรับผู้ป่วยที่ไม่มีผลการตรวจหาการติดเชื้อเอดส์ หรือผลกำกวมหรือแม้รายที่มีผลการตรวจหาการติดเชื้อเอดส์เป็นลบ ค่านิยามดังกล่าวประกาศใช้ในเดือนกันยายนปีเดียวกัน คณะกรรมการประสานงานการควบคุมโรคเอดส์ ของกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย จึงได้ปรับปรุงนิยามขึ้นใหม่และเริ่มใช้ตั้งแต่ปลายปี พ.ศ.2530 เป็นต้นมา โดยดัดแปลงจากของ CDC แต่ยังไม่ยอมรับกรณีที่ไม่มีผลการตรวจหาการติดเชื้อเอดส์ หรือผลกำกวม หรือมีผลเป็นลบ

เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2532 กระทรวงสาธารณสุขร่วมกับแพทย์ และนักวิชาการผู้ทรงคุณวุฒิ ด้านโรคเอดส์ปรับปรุงนิยามใหม่ เพื่อให้การเฝ้าระวังโรคเอดส์มีความครอบคลุมกว้างขวางขึ้น โดยยึดตามค่านิยามของ CDC เกือบทั้งหมด มีการดัดแปลงน้อยที่สุด และได้ประกาศใช้อย่างเป็นทางการในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2532

เนื่องจากนิยามที่ใช้ในปัจจุบันยังไม่ครอบคลุมโรคติดเชื้ออวัยวะบางตัวที่สำคัญ และไม่เหมาะกับการวินิจฉัยในเด็ก กระทรวงสาธารณสุข จึงได้แต่งตั้งคณะทำงานขึ้นมาชุดหนึ่งเพื่อทำการทบทวนนิยามโรคเอดส์ที่ใช้อยู่ และนำเสนอร่างนิยามเพื่อให้แพทย์ผู้ทรงคุณวุฒิและมีประสบการณ์ในการดูแลผู้ป่วยโรคเอดส์ในผู้ใหญ่และในเด็กจำนวนหนึ่งพิจารณาถ้อยแถลง ทั้งนี้จากการประชุมกลุ่มผู้ทรงคุณวุฒิดังกล่าว เมื่อวันที่ 30 มีนาคม 2536 ที่ประชุมส่วนใหญ่เห็นชอบกับร่างนิยามใหม่ ซึ่งมีความแตกต่างกับนิยามที่ใช้อยู่เดิมค่อนข้างมาก และยกเลิก การวินิจฉัย ARC (AIDS Related Complex) เรียกเป็นผู้ติดเชื้อที่มีอาการ (HIV Symptomatic Patient) โดยอาจสรุปได้ดังนี้คือ

การวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรคเอดส์ อาจทำได้ 3 ประเภท โดยทุกประเภทต้องยืนยันได้ว่าผู้ป่วยมีการติดเชื้อ HIV แน่ชอน⁽³⁵⁾

ประเภทที่ 1 อาศัยการตรวจพบโรคหรือกลุ่มอาการที่บ่งชี้ถึงความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย โรคใดโรคหนึ่งใน 25 โรค จะถือว่าผู้ป่วยเป็นโรคเอดส์⁽³²⁾

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประเภทที่ 2 อาศัยการตรวจนับเม็ดเลือดขาวชนิด CD4 ได้น้อยกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. อย่างน้อย 2 ครั้ง โดยห้องชันสูตรที่มีความชำนาญ ในกรณีนี้ผู้ป่วยอาจจะมีโรครวมหรือกลุ่มโรคใดโรคหนึ่ง หรือมีแต่ยังไม่แน่นอนว่าใช่หรือไม่

ประเภทที่ 3 ใช้เฉพาะเด็กที่ติดเชื้อ HIV จากมารดา โดยพบ Major signs อย่างน้อย 2 อย่าง และ Minor signs อีกอย่างน้อย 2 อย่าง แต่ในกรณีที่ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนอายุ 15 เดือน การพบเพียง 1 Major sign และ 1 minor sign ก็จัดเป็นผู้ป่วยโรคเอดส์

การตรวจหาการติดเชื้อเอชไอวีทางห้องปฏิบัติการ ^(36,37,38,39)

การติดเชื้อ HIV เกิดได้ โดยการได้รับเชื้อที่อยู่ในเลือด ส่วนประกอบของเลือด เยื่อเมือกที่บุอวัยวะต่าง ๆ หรือสารคัดหลั่งต่าง ๆ ของผู้ที่มีเชื้อเข้าสู่ร่างกาย หลังจากได้รับเชื้อ HIV เข้าสู่ร่างกายประมาณ 2-3 สัปดาห์ จึงจะมีการแสดงออกแบบชนิดเฉียบพลัน (acute retroviral syndrome) คือมีอาการไข้ เจ็บคอ ต่อมทอนซิลโต มีอาการเหมือนเป็นไข้หวัด (acute infection mononucleosis-like illness) ซึ่งจะมีอาการอยู่ประมาณ 1-2 สัปดาห์ ช่วงนี้เป็นช่วงที่มีเชื้อไวรัส (viremia) และตรวจพบแอนติเจน (antigenemia)⁽⁴⁰⁾ ได้ ซึ่งอาจมีเวลา 2-6 สัปดาห์เท่านั้น หลังจากนั้นอีกระยะหนึ่งจึงจะเริ่มตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV (anti-HIV) ในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังมีผู้ป่วยอีกจำนวนมาก อาจจะไม่มีอาการอะไรเลยในช่วงที่มีเชื้อไวรัสและแอนติเจน

ดังนั้น หลังจากได้รับเชื้อ HIV ร่างกายจะสร้างแอนติบอดีตอบสนองและตรวจพบในซีรัมตั้งแต่ระยะแรกของการติดเชื้อ จนถึงระยะที่มีอาการโรคเอดส์ ระยะหลังติดเชื้อจนถึงตรวจพบแอนติบอดีใช้เวลานาน 3-12 สัปดาห์ (ส่วนใหญ่ประมาณ 8 สัปดาห์) บางรายอาจนานถึง 6 เดือน เรียกช่วงที่ก่อนตรวจพบแอนติบอดีนี้ว่า "window period" ในระยะ window period นี้หากต้องการตรวจว่ามีเชื้อ HIV หรือไม่ อาจใช้วิธีการตรวจหาแอนติเจนช่วย

วิธีการตรวจเพื่อบ่งบอกการติดเชื้อ

การตรวจเพื่อบ่งบอกการติดเชื้อ HIV นั้น มี 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. Indirect method เป็นการตรวจภูมิคุ้มกันที่ร่างกายตอบสนองต่อเชื้อไวรัส ก็คือ การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV
2. Direct method เป็นการตรวจหาตัวเชื้อไวรัสโดยตรง ส่วนใหญ่ยังเป็นวิธีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ได้แก่ การตรวจหาแอนติเจนชนิด p24 และการตรวจหาจีโนมไวรัส

วิธีการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV^(37, 41)

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV เป็นวิธีที่ใช้ทั่วไป แอนติเจนที่ใช้ตรวจหาแอนติบอดี อาจเป็นแอนติเจนของเชื้อไวรัสที่สกัดจากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ หรือเป็นแอนติเจนที่เป็นโปรตีนที่สร้างโดยยีนจำเพาะของไวรัส เตรียมด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม หรือเป็นแอนติเจนที่ได้จากการสังเคราะห์เปปไทด์ ซึ่งนำยาส่วนใหญ่จะประกอบด้วยแอนติเจนของ core antigen (p24) และส่วนของ gp41 หรือ gp120 ของเชื้อ HIV-1 และส่วนของ gp36 ของเชื้อ HIV-2 วิธีการตรวจจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การตรวจกรองเบื้องต้น⁽⁴²⁾ (screening test)
2. การตรวจยืนยัน (confirmatory test)

การตรวจกรองเบื้องต้น (screening test)

เป็นวิธีที่มีความไวสูง ทำได้ง่ายใช้เวลาไม่นาน มีหลายวิธีให้เลือกใช้ให้เหมาะสมสำหรับตรวจตัวอย่างตรวจในห้องปฏิบัติการระดับต่าง ๆ

1. **วิธีอีไลซ่า (ELISA)** นำยารุ่นแรกที่เกิดใช้ เรียกว่า first generation ใช้แอนติเจน เตรียมจากเชื้อไวรัส HIV-1 ที่เพาะเลี้ยงใน cell line ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-cell ตัวอย่างเช่น H9/HTLV III ต่อมาได้พัฒนาให้มีความไวและความจำเพาะมากขึ้น ใช้แอนติเจนที่เตรียมโดยเทคนิค recombinant DNA เรียกน้ำยานี้ว่า second generation เมื่อพัฒนาโดยใช้แอนติเจนเป็น synthetic peptide ทำให้มีความไวมากขึ้น สามารถตรวจแอนติบอดีได้ทั้งชนิด IgM และ IgG จึงช่วยลดระยะ Window period เรียกน้ำยานี้ว่า third generation และแอนติเจนที่ใช้มีส่วน core protein และ envelope protein ของ HIV-1 ร่วมกับ envelope protein ของ HIV-2 ทำให้สามารถตรวจได้ทั้งแอนติบอดีต่อ HIV-1 และ HIV-2

หลักการทดสอบอิลไลซ่า ที่ใช้มีดังนี้

1.1 Indirect enzyme immunoassay ทำโดยเคลือบภาชนะหรือเม็ดพลาสติกด้วยแอนติเจนในซีรัมลงไปทำปฏิกิริยา อบอุ่นไว้ระยะหนึ่งแล้วล้างออกหลาย ๆ ครั้ง เติม anti human gamma globulin ที่ conjugate กับแอนติบอดี ลงทำปฏิกิริยา อบอุ่นไว้ระยะหนึ่งล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกให้หมด แล้วเติม chromogenic substrate ลงทำปฏิกิริยาดูการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น อ่านค่าด้วยเครื่องอ่าน เปรียบเทียบกับค่า negative และ positive control ถ้าค่าที่ได้สูงกว่าค่า cut-off ถือว่าตัวอย่างนั้น ให้ผลบวก (reactive)

1.2 Competitive enzyme immunoassay ทำโดยเคลือบแอนติเจนในหลุมของภาชนะพลาสติก ใส่ซีรัมทดสอบลงในหลุมพร้อม ๆ กับเติมแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ที่ conjugate กับแอนติบอดี อบอุ่นให้ทำปฏิกิริยาไว้ระยะหนึ่ง ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกเติม chromogenic substrate ลงไปอบอุ่นไว้ระยะหนึ่ง ดูการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นถ้าในซีรัมทดสอบมีแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV จะแย่งจับแอนติเจนทำให้แอนติบอดีต่อเชื้อ HIV conjugate ที่เติมลงไปพร้อมกัน จับกับแอนติเจนได้น้อยลง การเปลี่ยนสีจะเกิดน้อยกว่าหลุมที่ไม่มีแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV นำเข้าเครื่องอ่าน อ่านผลเปรียบเทียบกับค่า negative และ positive control คำนวณค่า cut-off ถ้าค่าของตัวอย่างต่ำกว่าค่า cut-off ถือว่า ตัวอย่างนั้น ให้ผลบวก (reactive)

1.3 Antigen double sandwich immunoassay ทำโดยเคลือบแอนติเจนในภาชนะหรือเม็ดพลาสติก ใส่ซีรัมลงไปทำปฏิกิริยาอบอุ่นไว้ระยะหนึ่ง ล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมแอนติเจนที่ conjugate กับแอนติบอดีลงไปทำปฏิกิริยาล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วใส่ chromogenic substrate ลงไปทำปฏิกิริยา อบอุ่นดูการเปลี่ยนสี อ่านผลถ้าค่าสูงกว่า cut-off แสดงว่าในตัวอย่างนั้นมีแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV

2. วิธี gelatin particle agglutination (GPA) หลักการของการตรวจโดยดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติบอดี และแอนติเจน โดยเคลือบแอนติเจนของเชื้อเอชไอวีที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว ลงบนเม็ด gelatin เรียกว่า sensitized particles ส่วนเม็ด gelatin ที่ไม่ถูกเคลือบด้วยแอนติเจนของไวรัสเอชไอวี เรียกว่า unsensitized particles ซึ่งเป็นแอนติเจนควบคุม ในการทดสอบนำซีรัมมาเจือจางเป็น 1:8 และ 1:16 ใน microtiter plate หยด unsensitized particles ลงในซีรัมที่เจือจาง 1:8 หยด sensitized

particles ลงในซีรัมที่เจือจาง 1:16 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง อ่านผลด้วยตาเปล่าโดยดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มของแอนติเจน-แอนติบอดี เป็นวงกลมกว้าง ขอบไม่เรียบ สีชมพูจาง ถ้าไม่มีปฏิกิริยาของแอนติเจน-แอนติบอดีเกิดขึ้นจะเห็นเป็นวงกลมเล็ก ขอบเรียบคล้ายเม็ดกระดุมสีแดงอยู่กันหลวม

3. วิธี dot immunobinding assay เป็นวิธีตรวจที่ดัดแปลงจากวิธีอิลไลซ่า โดยใช้แอนติเจนหยดให้จับบนเมมเบรน (membrane) เหมาะสำหรับตรวจจำนวนน้อยและใช้เวลารวดเร็ว

การตรวจยืนยัน (confirmatory test)

วิธีทดสอบยืนยันที่ใช้อุปกรณ์ 2 วิธี คือ immunoblot และ immunofluorescent assay (IFA) แต่ที่นิยมใช้ในขณะนี้คือ immunoblot หรือเรียกว่า Western blot (WB) ทำโดยนำเชื้อไวรัสที่เพาะเลี้ยงไว้มาทำให้อนุภาคแตก แยกโปรตีนของไวรัสออกมาด้วยวิธี PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) แล้วย้ายโปรตีนที่แยกได้นั้นไปไว้บน nitrocellulose membrane นำไปทดสอบโดยใช้หลักการ indirect ELISA ในปัจจุบันมีน้ำยาที่มีแถบโปรตีนของ HIV-1 และ HIV-2 อยู่ใน เมมเบรนขึ้นเดียวกัน และใช้ synthetic peptide แทนโปรตีนจากเชื้อไวรัส วิธีนี้จะบ่งบอกว่าแอนติบอดีที่ตรวจพบเป็นแอนติบอดีต่อโปรตีนส่วนใดของไวรัส เหมาะในการศึกษาวิจัยดู cross reaction ที่เกิดขึ้นในภาวะต่าง ๆ และติดตามลักษณะของแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ที่เกิดขึ้นในระยะต่าง ๆ การแปรผลให้ยึดแบบใดแบบหนึ่ง⁽⁴³⁾

ลำดับขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV

ขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV จะมีการตรวจขั้นแรกด้วยวิธี ELISA และ particle agglutination หรือการตรวจโดยวิธีรวดเร็ว (rapid/simple test) ทุก ๆ ตัวอย่างตรวจ ที่ให้ผลบวกในการทดสอบต้องนำไปตรวจยืนยันด้วยวิธี Western blot ซึ่งมีราคาแพง องค์การอนามัยโลกได้แนะนำวิธีการทดสอบขั้น 3 แนวทาง เพื่อจะได้ลดค่าใช้จ่ายในการทดสอบด้วย Western blot ลง ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดสอบ และความชุกของภาวะติดเชื้อ HIV ในกลุ่มประชากรนั้น ๆ

วิธีที่ 1

ตรวจทุกตัวอย่างตรวจโดยวิธี ELISA หรือวิธี rapid/simple assay หนึ่งการทดสอบ ถ้าให้ผล reactive ก็ให้ถือว่าการตรวจหา แอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ให้ผลบวก ถ้าผลเป็น non-reactive ก็ให้ถือว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ให้ผลลบ

วิธีที่ 2

ตรวจทุกตัวอย่างโดยวิธี ELISA หรือ rapid/simple assay สองการทดสอบที่ใช้แอนติเจน หรือหลักการที่แตกต่างกัน

ถ้าผลการตรวจในครั้งแรกให้ผล non-reactive ให้ถือว่าได้ผลลบ โดยไม่ต้องทำการตรวจครั้งที่สอง

ถ้าผลการตรวจครั้งแรกให้ผล reactive ก็ต้องตรวจครั้งที่สอง ถ้าผล reactive อีกให้ถือว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ให้ผลบวก แต่ถ้าให้ผล non-reactive ในครั้งที่สอง ก็ให้ถือว่าการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV ให้ผลลบ

วิธีที่ 3

ตรวจทุกตัวอย่างโดยวิธี ELISA หรือ rapid/simple assay สามการทดสอบที่ใช้แอนติเจน หรือหลักการที่แตกต่างกัน

ถ้าผลการตรวจในครั้งแรกให้ผล non-reactive ให้ถือว่าได้ผลลบ โดยไม่ต้องทำการตรวจครั้งต่อไป

ถ้าผลการตรวจครั้งแรกให้ผล reactive แต่ครั้งที่สองให้ผล non-reactive ก็ให้ถือว่าให้ผลลบ

ถ้าผลการตรวจสองครั้งให้ผล reactive แต่ให้ผล non-reactive ในครั้งที่สามให้ถือว่าได้ผลกำกวม (equivocal หรือ borderlines) อาจพิจารณาทำการทดสอบด้วย Western blot ต่อ

ถ้าให้ผล reactive ทั้งสามครั้ง ให้ถือว่าได้ผลบวก

การที่จะเลือกทดสอบโดยใช้ วิธีที่ 2 และ 3 การทดสอบครั้งแรกควรจะใช้การทดสอบที่ให้ความไวสูงสุด การทดสอบครั้งที่ 2 และ 3 ให้เลือกใช้ชุดการทดสอบที่ให้ความจำเพาะสูงชันกว่าครั้งแรก แต่อย่างไรก็ตาม ในการตรวจเพื่อให้การวินิจฉัย ให้เจาะเลือดใหม่และทำการตรวจใหม่อีกทุกรายของผู้ป่วยใน batch ในทำนองเดียวกับที่ทำการตรวจตัวอย่างแรก เพื่อป้องกันความผิดพลาดทางห้องปฏิบัติการ และความผิดพลาดอันเกิดจากการสับเปลี่ยนหลอดตัวอย่างเลือด

ตารางที่ 2.2 ข้อแนะนำขององค์การอนามัยโลกในการเลือกใช้วิธีต่าง ๆ ในการทดสอบโดยมีวัตถุประสงค์ในกลุ่มความชุกของภาวะติดเชื้อต่าง ๆ ^(34,39)

วัตถุประสงค์	ความชุก	วิธีในการตรวจ
ตรวจเลือดบริจาค	ทุกอัตราความชุก	วิธีที่ 1
เฝ้าระวังโรค	>10%	วิธีที่ 1
"	<10%	วิธีที่ 2
วินิจฉัย เมื่อผู้ป่วยมีอาการ เอดส์/ติดเชื้อเอชไอวี	ทุกอัตราความชุก	วิธีที่ 2
วินิจฉัย เมื่อผู้ป่วยไม่มีอาการเอดส์/ติดเชื้อเอชไอวี	>10%	วิธีที่ 2
"	<10%	วิธีที่ 3

การตรวจหาแอนติเจน (p24 antigen)

p24 antigen เป็นโปรตีนที่อยู่ในส่วนแกน (core protein) ของเชื้อ HIV ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ขึ้นในเซลล์ที่การติดเชื้อ HIV และปล่อยออกมาสู่กระแสเลือดในระยะเริ่มแรกของการติดเชื้อ และระยะท้าย ๆ ของการดำเนินโรคเอดส์ ทำให้สามารถตรวจ p24 antigen ได้ในเลือดของผู้มีการติดเชื้อ HIV ซึ่งจะมีรูปแบบของแอนติเจนในกระแสเลือดได้ 4 ลักษณะ^(44, 45) คือ

1. พบทั้งแอนติเจนอิสระ (free antigen) และแอนติเจนอยู่รวมกับแอนติบอดี (antigen-antibody complex)

2. ไม่พบแอนติเจนในรูปแบบอิสระในระยะแรก แต่จะมีแอนติเจนรวมอยู่กับแอนติบอดี
3. พบแต่แอนติเจนอิสระ แต่ไม่พบแอนติเจนอยู่รวมกับแอนติบอดี
4. ไม่พบทั้งแอนติเจนอิสระและแอนติเจนอยู่รวมกับแอนติบอดี

นอกจากรูปแบบที่แตกต่างกันทั้ง 4 อย่างนี้แล้ว ยังพบว่าระดับแอนติเจนชนิด p24 ในกระแสเลือด ยังมีการเปลี่ยนแปลงระดับขึ้น ๆ ลง ๆ (fluctuation) ได้ในเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้เกิดความสับสน ในการตรวจหาและแปลผลที่ได้

ในปัจจุบันเทคนิคการตรวจแอนติเจนที่ใช้ยู่คือ วิธีอีไลซ่า (ELISA: enzyme-linked immuno-sorbent assay) เท่านั้น ซึ่งสามารถตรวจหาแอนติเจนอิสระได้ดี แต่ความไวไม่มีพอตรวจหาแอนติเจนที่อยู่รวมกับแอนติบอดี ต้องใช้เทคนิคแยกแอนติเจนออกจากแอนติบอดีก่อนทำการตรวจ (ICD: immune complex dissociation)⁽⁴⁶⁾

การตรวจหาอีโนมของไวรัส

การตรวจหาอีโนมของไวรัสเป็นการตรวจหายีนหรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอาจตรวจหาไวรัส RNA หรือ proviral DNA วิธีเดิมที่ใช้คือการทำให้ hybridization ซึ่งพบว่าไวไม่เพียงพอ ในปัจจุบันพบว่าวิธีที่ดีที่สุดคือการตรวจหา proviral DNA ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR)

PCR เป็นเทคนิคใหม่ที่ถูกค้นพบในปี พ.ศ. 2526 โดย Kary Mullis⁽⁴⁷⁾ และต่อมา Randall Saiki และ Henry Erlich⁽⁴⁸⁾ ได้นำเทคนิคนี้มาใช้และรายงานเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2528 หลังจากนั้นได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจหาจุลชีพต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อไวรัส HIV ซึ่งนำมาใช้ในการวินิจฉัยผู้ติดเชื้อเอดส์ในระยะแรกที่รับเชื้อที่ระดับแอนติบอดียังไม่พบ และไม่สามารถตรวจพบแอนติเจนชนิด p24 นอกจากนี้ยังใช้วินิจฉัยทารกที่เกิดจากมารดาติดเชื้อเอดส์ เพราะทารกเหล่านี้จะมีแอนติบอดีจากมารดาอยู่ในกระแสเลือดของทารก ทำให้ไม่สามารถแยกได้ว่าทารกติดเชื้อเองจนกว่าอายุ 15 เดือนไปแล้ว Rogers และคณะ ได้รายงานวิธี PCR สามารถให้การวินิจฉัยว่าทารกติดเชื้อเอดส์ได้ภายใน 2-3 เดือนหลังคลอด และจะให้ผล 100% เมื่อทารกอายุ 6 เดือนไปแล้ว จึงนับว่าเป็นวิธีที่ไวที่สุดในการวินิจฉัยที่เกิดจากมารดาติดเชื้อเอดส์ ว่ามีการติดเชื้อเอดส์จริงหรือไม่

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี-1 ในปัสสาวะชนิดไอจีจี

ปัสสาวะได้รับการพิจารณาเป็นทางเลือกหนึ่งของตัวอย่างส่งตรวจ เพื่อวินิจฉัยโรคเอดส์ เนื่องจากความสะดวกในการเก็บตัวอย่างส่งตรวจไม่มีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างส่งตรวจก่อนทำการตรวจ และที่สำคัญที่สุด ปัสสาวะไม่สามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อแก่ผู้ปฏิบัติการตรวจ⁽⁵⁷⁾ มีการศึกษา Urinary HIV-1 Antibody ในปัสสาวะด้วยวิธีอื่น ๆ เปรียบเทียบกับผลของเลือด ให้ผลที่น่าพอใจ เช่น ด้วยวิธี EIA โดย Calypte Biomedical พบว่ามีความไว 96.66% และความจำเพาะ 99.18% ส่วนการตรวจด้วยวิธี Immunodotblot (SUDS) โดย Constantine และคณะ⁽⁵⁸⁾ พบว่ามีความไว 100% มีความจำเพาะ 100% และการตรวจด้วยวิธี immunochromatographic assay ซึ่งสร้างมาสำหรับตรวจเลือดเมื่อนำมาตรวจจากปัสสาวะโดย Vallari และคณะ⁽⁵⁹⁾ พบว่ามีความไว 97.87% และมีความจำเพาะ 100% โดยวิธี Enzyme-Linked Fluorescent⁽⁶⁰⁾ มีความไว 95.2% และความจำเพาะ 97.4% โดยวิธีอิลูซ่า⁽⁶¹⁾ มีความไว 99.83% และความจำเพาะ 99.76% การตรวจ HIV-1 ในปัสสาวะผู้ป่วยโรคเอดส์ในต่างประเทศและในประเทศไทย⁽⁶¹⁾ โดยวิธี Western Blot (WB) เปรียบเทียบกับการตรวจเลือด การตรวจปัสสาวะในต่างประเทศซึ่งได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาสหรัฐ^(63,64) พบการตรวจด้วยปัสสาวะมีความจำเพาะ 100% และมีความไว 99.7% ในพวก Low-Risk ไม่มีปัญหา แต่พบว่า 2 ใน 748 ตัวอย่างให้ผลลบโดยวิธีเวสต์เทิร์นบลอต จากการตรวจสอบในรายละเอียดในกรณีดังกล่าวพบว่าเป็นผู้ป่วย seropositive ที่เป็นเอดส์ที่กำลังได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส ส่วนในประเทศไทยจากรายงานของ Tiensiwakul และคณะ⁽⁶⁵⁾ พบการตรวจด้วยปัสสาวะมีความไว 97.7% และมีความจำเพาะ 100% แต่จำนวนตัวอย่างที่รายงานมีจำนวนน้อยจากรายงานของ Chargelegue และคณะ⁽⁶⁶⁾ ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ซีดี 4 กับแอนติบอดีของเอชไอวี-1 ในเลือด โดยศึกษาเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ แอนติบอดีต่อส่วน p17 และ p24 ในเลือดโดยวิธี RIA กับ จำนวนเซลล์ซีดี 4 ในเลือดของผู้ติดเชื้อเอชไอวี พบว่ากลุ่มที่ไม่แสดงอาการ จะมีจำนวน แอนติบอดี ต่อ p17 และ p24 ของเชื้อเอชไอวีในเลือด สูงกว่ากลุ่มที่แสดงอาการโรคเอดส์ และมีจำนวนเซลล์ซีดี 4 มากกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. ส่วนกลุ่มที่แสดงอาการโรคเอดส์ มีจำนวนเซลล์ซีดี 4 น้อยกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้เป็นการศึกษาที่ใช้จำนวนตัวอย่างเพียง 15 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาแอนติบอดี ต่อ p17 และ p24 ของเชื้อเอชไอวี ไม่ได้ศึกษาแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีทุกส่วน และการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาในเลือด ไม่ได้ศึกษาในปัสสาวะเพื่อหาความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ซีดี 4

การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ในปัสสาวะชนิดไอจีเอ

เป็นที่น่าสังเกตว่ารายงานส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นในการตรวจภูมิคุ้มกันต้านทานชนิดไอจีจี ทั้ง ๆ ที่โดยทั่วไปแล้ว มากกว่า 90% ⁽⁶⁷⁾ ของการติดเชื้อเอชไอวี เกิดจากเพศสัมพันธ์และภูมิคุ้มกันต้านทานจากสิ่งคัดหลั่งส่วนใหญ่ มากกว่า 60% จะเป็น IgA ดังนั้นภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะน่าจะมีส่วนที่เป็นไอจีเอ รายงานที่มีจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษา แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ชนิดไอจีเออย่างเป็นระบบในปัสสาวะ Akerlund และคณะ ⁽⁶⁸⁾ ใช้วิธี ีไลซ่า วัดปริมาณ sIgA คนปกติในปัสสาวะเปรียบเทียบกับ โนนม และในน้ำลาย พบว่า ถ้าใช้เทคนิคที่จำเพาะต่อการหา ปริมาณ sIgA พบว่า secretory component และ Free secretory component จะไม่มารบกวนการตรวจวัด ยิ่งไปกว่านั้น การเปลี่ยนแปลง ของ pH และ osmolarity ไม่มีผลต่อค่าที่ได้ จากรายงาน O. Shen และคณะ ⁽⁶⁹⁾ ใช้ captured radioimmuno assay ในการหา HIV-1- IgA antibodies ผู้ป่วยเอชไอวี พบ 89% ใน plasma, 26% ใน semen, 28% ใน vaginal secretion, และ 17.6% ใน saliva แต่ในปัสสาวะยังไม่มีรายงาน

ความสำคัญของ CD4 cell count

CD4 หรือ helper T cells เป็นเซลล์เป้าหมายหลักของเชื้อเอชไอวี เมื่อเชื้อเอชไอวีเข้าร่างกาย โดยการจับกันระหว่าง gp120 ของเปลือกนอกเชื้อเอชไอวี กับ CD4 cell receptor จากนั้นเชื้อเอชไอวี จะเข้าไปใน CD4 cell จะเข้าไปเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวน มีการแตกทำลายของ CD4 cell ซึ่งเป็นศูนย์กลางของการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันชนิดพึ่งเซลล์ (CMI) เมื่อจำนวน CD4 cell ลดจำนวนลง ทำให้ผู้ป่วยเกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาส ต่าง ๆ การตรวจหาจำนวน CD4 cell ซึ่งเป็นการตรวจสอบสถานะทางภูมิคุ้มกันโดยตรงมีประโยชน์ในการบอกระยะของโรคเอชไอวีอย่างคร่าวๆ ปัจจุบันนี้ ทางห้องปฏิบัติการนิยมตรวจหาเปอร์เซ็นต์ CD4 cell จำนวน absolute CD4 cell และ CD4/CD8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการศึกษาผู้ป่วยโรคเอดส์พบว่า การลดของจำนวน CD4 cell เป็นตัวบ่งชี้ถึงความรุนแรงในผู้ป่วย^(70,71) สามารถแบ่งการลดลงของเซลล์ CD4 ได้เป็น 4 ระยะ⁽⁷²⁾ คือ ระยะที่ 1 เป็นระยะที่ร่างกายรับเชื้อ HIV แล้วเกิด seroconversion ภายใน 6 ถึง 18 เดือน จำนวนเซลล์ CD4 จะลดจากระดับปกติประมาณ 1,000 เซลล์/ลบ.มม. ลงมาเป็น 600 เซลล์/ลบ.มม. ระยะที่ 2 เป็นระยะที่ระดับของจำนวน เซลล์ CD4 อยู่ในระดับค่อนข้างคงที่ ระยะนี้อาจกินเวลานานหลาย ๆ ปี ระดับของเซลล์ CD4 อยู่ระหว่าง 200-600 เซลล์/ลบ.มม. ระยะที่ 3 ผู้ติดเชื้อเริ่มมีอาการสัมพันธ์กับโรคเอดส์ หรือระยะ ARC (AIDS Related Complex) ซึ่งจำนวน CD4 ลิ้มฟิซัยท์ จะลดลงอย่างรวดเร็ว ระยะ 4 เป็นระยะสุดท้ายหรือเป็นโรคเอดส์เต็มขั้น ซึ่งคนไข้จะมีจำนวนเซลล์ CD4 ลดลง จนถึงแก่กรรม และมีอัตราส่วนของเซลล์ CD4 /CD8 น้อยกว่า 0.2 ส่วนอัตราร้อยละของเซลล์ CD4 นั้น น้อยกว่า 10 ในระยะนี้คนไข้มักจะเสียชีวิตจากโรคแทรกซ้อนต่าง ๆ

ในภาวะติดเชื้อเอชไอวี จำนวนเซลล์ CD8 จะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ 2-3 เดือนแรกของการติดเชื้อ โดยมีจำนวนเซลล์ CD8 ประมาณ 1,000 เซลล์/ลบ.มม. ในระยะที่ผู้ป่วยเป็นโรคเอดส์เต็มขั้น จำนวน lymphocyte ในร่างกายลดลงมาก ซึ่งมีผลให้จำนวนเซลล์ CD8 ลดลงเช่นกัน และจำนวนเซลล์ CD8 เป็น lymphocyte ส่วนใหญ่ในร่างกาย ทั้งนี้เพราะจำนวนเซลล์ CD4 ลดลงมากในระยะโรคเอดส์เต็มขั้น

ดังนั้นการใช้ค่าของ CD4 จะเป็นประโยชน์ต่อการพยากรณ์การดำเนินโรค และติดตามผลการรักษา จากการศึกษ Taylor JMG และคณะ⁽⁷³⁾ ได้ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของผู้ติดเชื้อเอชไอวี พบว่าในรายที่มี ระดับเซลล์ CD4 สูงกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. จะมีอัตราการรอดชีวิต (AIDS free survival rate) สูงกว่าในกลุ่มที่มีระดับเซลล์ CD4 ต่ำ กลุ่มที่มีระดับเซลล์ CD4 น้อยกว่า 163 เซลล์/ลบ.มม. จะมีอัตราการรอดชีวิต 1 ปี ร้อยละ 40 กลุ่มที่มีระดับเซลล์ CD4 มากกว่า 366 เซลล์/ลบ.มม. อัตรารอดชีวิตมากกว่า 3 ปี ร้อยละ 80 และยังพบว่า ระดับเซลล์ CD4 มีความสัมพันธ์กับภาวะโรคฉวยโอกาส เช่น ที่ระดับ เซลล์ CD4 น้อยกว่า 60 เซลล์/ลบ.มม. จะมีการติดเชื้อ *M. avium* และ cytomegalovirus และระดับเซลล์ CD4 มากกว่า 100 เซลล์/ลบ.มม. จะพบโรค *Pneumocystis carinii* pneumomia นอกจากนี้ สถาบันสุขภาพแห่งชาติ ของสหรัฐอเมริกา⁽⁷⁴⁾ ยังใช้ค่าของจำนวนเซลล์ CD4 เป็นเกณฑ์

การตัดสินใจ เริ่มให้ยาและติดตามผลการรักษา ของชาวคอเคเซียน (caucasian) โดยแนะนำว่า ถ้าจำนวนเซลล์ CD4 ต่ำกว่า 500 เซลล์ต่อลบ.มม. ควรจะให้ยา Zidovudine (AZT) แก่คนไข้ แต่ถ้าจำนวน absolute ของเซลล์ CD4 สูงกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. ก็ยังไม่มีควมจำเป็นที่จะต้องให้ยา หรือถ้าต่ำกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. ควรให้ยาป้องกัน *Pneumocystis carinii* ส่วนในคนไทยยังไม่มีบรรทัดฐานกำหนดแน่นอน จากการศึกษานในคนไทยพบว่า ถ้า CD4 ลิมโฟไซต์ต่ำกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. ผู้ นั้นจะมีโอกาสเป็นเอดส์เต็มขั้นภายใน 2 ปี มากกว่าคนที่ CD4 ลิมโฟไซต์สูงกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. ถึง 9 เท่า⁽³⁰⁾

ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2536 CDC ของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดวิธีการแบ่งระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อเอดส์ขึ้นใหม่ โดยอาศัยอาการทางคลินิก (clinical categories) ร่วมกับระดับของ CD4 cell (CD4 T-lymphocyte categories)⁽⁷⁵⁾ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 1993 Revised CDC classification system for HIV infection and expanded AIDS surveillance case definition for adolescents and adults

CD4 T-cell categories	Clinical categories		
	(A)	(B)	(C)
	Asymptomatic, acute (primary) HIV or PGL	Symptomatic, not (A) or (C) conditions	AIDS-indicator conditions
>500 /ul	A1	B1	C1
200-499 /ul	A2	B2	C2
<200 /ul	A3	B3	C3

หมายเหตุ : (1) A3, B3 และ C1-C3 รวมเรียกเป็น AIDS ตาม expanded AIDS surveillance case definition ใหม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) CD4 > 500 เซลล์ /ลบ.มม. เทียบเท่ากับ CD4 > 29%, CD4 200-499 เซลล์/ลบ.มม. เทียบเท่ากับ CD4 14-28% , CD4 < 200 เซลล์ /ลบ.มม. เทียบเท่ากับ CD4 < 14%

นั่นคือ ระยะเวลาที่ 1 จำนวนเซลล์ CD4+เซลล์ มากกว่า หรือเท่ากับ 500 เซลล์/ลบ.มม. หรือมากกว่า หรือเท่ากับ 29%

ระยะเวลาที่ 2 จำนวนเซลล์ CD4+ เซลล์ อยู่ระหว่าง 200- 500 เซลล์/ลบ.มม. หรือระหว่าง 14 - 28 %

ระยะเวลาที่ 3 จำนวนเซลล์ CD4+เซลล์ น้อยกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. หรือต่ำกว่าเท่ากับ 14%

อาการรวมคลินิก(clinical category) แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ A, B, C

Clinical category A เป็นระยะที่ผู้ติดเชื้อไม่มีอาการหรือมีต่อมน้ำเหลืองโตหลายตำแหน่ง หรือแสดงอาการป่วยเฉียบพลัน

Clinical category B เป็นระยะที่ผู้ติดเชื้อ แสดงอาการ ที่ไม่ใช่ A และ C เช่น มีไข้หรือ อุจจาระร่วง ติดเชื้อรา Candidiasis ที่ oropharyngeal และ vulvovaginal มากกว่า 1 เดือน เซลล์ที่ ปากมดลูก dysplasia หรือเป็นมะเร็งเฉพาะชั้นผิว

Clinical category C ติดเชื้อจุลินทรีย์พวยโอกาสที่ระบบต่าง ๆ เช่น Candidiasis ที่หลอด อาหารและหลอดลม ติดเชื้อ Cryptococcus ที่ปอดและลำไส้ อาการทางสมอง ติดเชื้อ *Mycobacterium avium*, *M. tuberculosis* หรือพบ Pneumonia มากกว่า 2 ครั้งใน 1 ปี

หลักการของโฟลไซโตเมทรี (Principles of flow cytometry) ⁽⁷⁶⁻⁸³⁾

โฟลไซโตเมทรี คือ วิธีการวัดเซลล์โดยใช้คุณสมบัติของเซลล์ ได้แก่ รูปร่าง ลักษณะ ขนาด รวมทั้งคุณสมบัติอื่น ๆ ได้แก่ markers DNA เป็นต้น วัดเซลล์ขณะที่เซลล์กำลังไหลตามกระแสของของเหลว ซึ่งจะถูกวัดเมื่อเซลล์ผ่านไปถึงจุดวัดของเครื่องมือที่ใช้วัดที่เรียกว่า เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ ซึ่งเป็นเครื่องที่เกิดจากการผสมผสานของการใช้ อิเล็กทรอนิกส์ จลศาสตร์ของเหลว ink-jet เทคโนโลยี หลักการวัดแสง ไมโครคอลลิคัลแอนติบอดี เทคโนโลยีการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ และเทคโนโลยีของ คอมพิวเตอร์ ดังนั้นเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จึงสามารถตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ต่างชนิดกันซึ่งอยู่รวมกันได้ โดยเป็นการวิเคราะห์แต่ละเซลล์ วัดปริมาณของสารเรืองแสงที่เปล่งบนผิวเซลล์หรือภายในเซลล์ในขณะที่ไหลผ่านเครื่องทางพวย (nozzle) เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ในอัตราความเร็ว 500-100 เซลล์/วินาที เมื่อผ่านลำแสงเลเซอร์จะทำให้แสงเลเซอร์ที่กระทบเซลล์จะเกิดการหักเหของแสงเป็น 2 ทิศทาง และภายในตัวเครื่องจะมี detector มารับการหักเหของแสง คือ detector ที่วัดค่าการหักเหของแสง เป็นมุมแคบทางด้านหน้า เรียกว่า forward scatter (FSC) ทำให้สามารถบอกขนาดของเซลล์ได้

ในขณะที่ detector อีกตัวหนึ่งจะวัดค่าการหักเหของแสงที่ออกจากเซลล์ ทำให้สามารถวัด ส่วนประกอบภายในเซลล์ได้ เรียกว่า 90° light หรือ side scatter (SSC) จากนั้นเครื่องจะเปลี่ยน สัญญาณคลื่นแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า จะส่งข้อมูลไปยังเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อแสดงผลออกมา

การวัดเซลล์ของโฟลไซโตมิเตอร์

เครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ วัดเซลล์โดยอาศัยขนาด (size) ความเข้มหรือความหนาแน่นภายใน เซลล์ (granularity) และการย้อมด้วยสารเรืองแสง (fluorescence) ขนาดของเซลล์เกิดจากแสง เลเซอร์ที่กระทบเข้ากับเซลล์เกิดเป็นเงาของเซลล์ ขนาดของเงาจะเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับขนาดของ เซลล์ เช่น เซลล์โมโนไซต์มีขนาดโตกว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ จึง มีค่า FSC มากกว่า เรียกแสงที่ทำให้เกิด เงาของเซลล์นี้ว่า forward light scatter (FSC) ส่วนความเข้มชั้นของเซลล์เกิดจากแสงเลเซอร์ที่ กระทบเข้ากับเซลล์แล้วหักเห (Refraction) ออกมาจากภายในเซลล์เรียกแสงที่หักเหออกจากเซลล์นี้ ว่า 90° องศา light หรือ side scatter (SSC) เซลล์ที่มี granularity ภายในเซลล์มากจะมีการหักเหของ แสงมาก เช่น เซลล์แกรนูโลไซต์ที่มี granule ในเซลล์มากจึงมี SSC สูงกว่าเซลล์โมโนไซต์และลิมโฟ ไซต์ และเซลล์ที่ย้อมด้วยสารเรืองแสงอาจจะเป็นสารเรืองแสงอย่างเดี่ยวหรือสารเรืองแสงที่มี แอนติบอดีเชื่อมติดอยู่เมื่อกระทบเข้ากับแสงเลเซอร์ เช่น แสงเลเซอร์จากแหล่งกำเนิดพลังงานของแสง ที่มีขนาดความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร จะเกิดการดูดซับพลังงานจากแสงเกิดการสั่นและเปล่งแสง เรืองสีออกมาด้วยขนาดคลื่นของแสงที่ยาวขึ้น เช่น ถ้าสารเรืองแสงเป็น fluorescein isothiocyanate (FITC) ก็จะได้คลื่นแสงสีเขียวที่เปล่งออกมาที่ 530 นาโนเมตร โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ควรติด ฉลากด้วยสารเรืองแสง โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ใช้ส่วนใหญ่จะเป็นแอนติบอดีชนิดย้อมด้วยสาร ฟลูออโรโครม 2 ชนิด เช่น สาร rhodamine ให้แสงสีแดง และ สาร FITC ให้แสงสีเขียว สามารถใช้ dichroic mirror แยกแสงสีแดงซึ่งมีคลื่นแสงยาวกว่าออกจากแสงสีเขียวซึ่งมีคลื่นสั้นกว่า หลังจากการ เตรียมเซลล์ให้นำมาอ่านด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 100 ราย ที่มารับการรักษาที่คลินิกโรคติดต่อเพศสัมพันธ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีหลักการในการคัดเลือกผู้ป่วย เป็นผู้ที่ได้รับการวินิจฉัยและยืนยันผล จากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ว่าติดเชื้อเอชไอวี

กำหนดขนาดตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา 100 ราย

ที่มาของขนาดตัวอย่าง

จากการศึกษาเบื้องต้น ของ Tiensiwakul และคณะ⁽⁶⁵⁾ ซึ่งใช้วิธีการตรวจเหมือนกันกับการวิจัยครั้งนี้ พบ แอนติบอดี ชนิดไอจีจีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี 80-100 %

จากสูตร⁽⁶⁰⁾

$$n = Z^2pd/d^2 \text{ เมื่อ } n = \text{จำนวนตัวอย่าง}$$

$$\text{สัดส่วนที่ตรวจพบ (p)} = 0.8$$

$$\text{สัดส่วนที่ตรวจไม่พบ (q)} = 1.0 - 0.8$$

$$= 0.2$$

$$Z = 1.96 \quad (\text{ค่า } Z \text{ จากตาราง } Z \text{ เมื่อ } \alpha .05 \text{ มีค่าเท่ากับ } 1.96 \text{ ที่ความเชื่อมั่นที่ } 95\%)$$

$$d = 0.1 \times p \quad (d = \text{ความคลาดเคลื่อนของโอกาสที่จะพบ(Maximum permissible error)})$$

$$= 0.1 \times 0.8$$

$$= 0.08$$

$$\text{ดังนั้น } n = (1.96)^2 \times 0.8 \times 0.2 / (0.08)^2$$

$$= 96 \text{ ราย}$$

ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่นำมาใช้ในการหารูปแบบแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี-1 ชนิดไอจีจีในปีสภาวะและจำนวนตัวอย่างเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนโครงสร้างของแอนติบอดีต่อเอชไอวี-1 ชนิดไอจีจีในปีสภาวะกับจำนวนเซลล์ซีดี 4 ใช้จำนวนตัวอย่าง เท่ากับ 100 ราย ส่วนจำนวนตัวอย่างที่จะหาอุบัติการณ์ โปรตีนโครงสร้างของแอนติบอดีต่อเอชไอวี-1 ชนิดไอจีจีในปีสภาวะ ยังไม่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน จึงไม่ทราบสัดส่วนที่จะตรวจพบไอจีจี การศึกษานี้เป็นการศึกษาครั้งแรกจึงอนุโลมใช้จำนวนตัวอย่างเดียวกันกับการศึกษาโปรตีนโครงสร้างของแอนติบอดี ต่อเอชไอวี-1 ชนิดไอจีจี คือ 100 ตัวอย่าง (จาก ข้อมูลซึ่งมีผู้เคยทำการศึกษา

แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี-1 ชนิดไอจีจีในปัสสาวะใช้ตัวอย่าง 44 ราย⁽⁶⁵⁾ ส่วนจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาในสารคัดหลั่งต่าง ๆ เพื่อหาแอนติบอดีต่อเชื้อ เอชไอวี-1 ชนิดไอจีเอ ใช้จำนวนตัวอย่างเพียง 7-46 ตัวอย่าง)⁽⁶⁹⁾

2. การเก็บสิ่งส่งตรวจ

- 2.1 EDTA blood ทยละ 3-5 มล. เพื่อนำมาตรวจ CBC และนับจำนวนเซลล์ซีดี 4
- 2.2 Clean voided urine ทยละ 10 มล. เพื่อตรวจ แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีทั้งไอจีจีและไอจีเอ แอนติบอดี โดยลักษณะทั่วไปของปัสสาวะไม่มีความผิดปกติจากการตรวจด้วยสายตา เก็บในตู้เย็น 2°-4°C ทำการทดสอบภายใน 24 ชม.
- 2.3 Heparinized blood ทยละ 20 มล. เพื่อเก็บเป็นเซลล์แช่แข็ง ในไนโตรเจนเหลว ส่งรองไว้ในกรณีที่ต้องการตรวจโดยวิธีอื่น ๆ ถ้าจำเป็นที่ต้องการผลยืนยัน

3. ขั้นตอนการทำ โฟลไซโตเมตรี

3.1 ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ภายใน 6 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องนับอัตโนมัติ (CELL-DYN รุ่น 3700, Sequaid Turner Corp, Mountain View, California) เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณหาจำนวนเปอร์เซ็นต์และค่าสัมบูรณ์ของเม็ดเลือดขาวชนิด ซีดี 4

3.2 การเตรียมตัวอย่าง whole blood เพื่อตรวจนับจำนวน ซีดี 4 ภายใน 24 ชั่วโมง โดยดูดเลือดจาก EDTA blood ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเติม monoclonal antibody (mouse anti-CD4-FITC/CD8-PE) ใส่หลอดตามที่ label หลอดละ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน อบที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที ในที่มืดไม่ให้ถูกแสง เมื่อครบเวลาเติม FACS Lysing solution 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที แล้วนำมาปั่นที่ 300 g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสข้างบน (supernatant) ทิ้ง ล้างเซลล์ที่ได้ 2 ครั้ง ด้วย PBS (Phosphate buffer saline, pH 7.2-7.3) โดยการเติม PBS ครั้งละ 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายไม่เกาะเป็นกลุ่ม นำไปปั่นที่ 300 g 5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายหลังจากเทส่วนใสทิ้ง เติม 1% Paraaldehyde จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายไม่เกาะเป็นกลุ่ม เก็บในที่มืดอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer รุ่น FACS calibur (Becton Dickinson) เพื่อ นับจำนวนเซลล์ซีดี 4 ซึ่ง FACS calibur เป็นเครื่อง โฟลไซโตมิเตอร์ แบบอัตโนมัติ สามารถวิเคราะห์สีได้ถึง 4 สี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำยาที่ใช้และสามารถคัดเลือกเซลล์ที่ต้องการมา

ศึกษาได้ โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากโปรแกรม CELLQUEST บนเครื่องคอมพิวเตอร์ ที่ใช้โปรแกรม แมคอินทอช

4. ขั้นตอนการตรวจหา แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ชนิด ไอจีจี และ ไอจีเอ ในปัสสาวะ ด้วยวิธี เวสเทิร์นบลอต (Western Blot) โดยใช้ชุดตรวจเอชไอวีบลอต 2.2 และเครื่อง Auto blot system 36 ของบริษัทGENELAB DIAGNOSIS

4.1 หลักการทางด้านเคมีและชีววิทยาของการทดสอบ ด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอต

ใช้ชุดตรวจเอชไอวีบลอต 2.2 (ของบริษัทGENELAB DIAGNOSIS ประเทศสิงคโปร์) แถบไนโตรเซลลูโลส ประกอบด้วย โปรตีนแยกส่วนที่เป็นแอนติเจนของเชื้อ เอชไอวี-1 (ผ่านการทำ ให้บริสุทธิ์และทำให้หมดฤทธิ์แล้ว) โดยใช้เทคนิคการย้ายโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า ใน SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) ซึ่งจะทำให้ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเชื้อเอชไอวี ที่เป็นโปรตีน แยกเรียงตามลำดับ ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนเหล่านั้น หลังจากนั้นเคลื่อนย้ายแถบ โปรตีนจาก SDS-PAGE ไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ด้วยกระแสไฟฟ้า เพื่อให้สามารถตรวจ เอชไอวี-2 ได้ด้วย จึงเพิ่มส่วนของโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์ส่วนที่เป็น envelope gp 36 พันธิดเพิ่ม เป็นแถบต่อจากแถบสุดท้าย ของ เอชไอวี-1 แต่ละแถบของแผ่นไนโตรเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยา กับ ปัสสาวะ และตัวควบคุม (controls) ที่ผ่านการเจือจางแล้ว แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ เอชไอวี-1 และเอชไอวี- 2 ถ้ามีปรากฏอยู่ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ จะจับกับโปรตีนต่าง ๆ ของเชื้อ เอชไอวี-1 และโปรตีนสังเคราะห์ เอชไอวี-2 ที่อยู่บนแถบตรวจ หลังจากการล้างเอาส่วนประกอบที่ไม่ เกี่ยวข้องออก แอนติบอดีที่จับอย่างจำเพาะกับโปรตีนของเอชไอวี จะปรากฏให้เห็นได้ โดย ปฏิกิริยาระหว่าง alkaline phosphatase ที่จับอยู่กับ goat anti-human IgG และ สารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสี BCIP/NBT เพื่อหลีกเลี่ยงความคลาดเคลื่อนจากการเปลี่ยน lot ของชุดตรวจ จึงใช้น้ำยา ใน lot เดียวกันทั้งหมดตลอดการวิจัยครั้งนี้

4.2 วิธีทดสอบเพื่อตรวจหา ไอจีจี แอนติบอดี

4.2.1 ใช้ปากคีบเรียง แถบทดสอบ (strip) ตามจำนวนตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบ ลงในแต่ ละหลุมของถาดหลุมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยหงายด้านที่มีตัวเลขขึ้น ซึ่งเป็นด้านที่มีส่วนประกอบ ของเชื้อ รวมทั้งแถบทดสอบอีก 3 ชุด สำหรับทำปฏิกิริยากับตัวควบคุมผลบวกเข้มข้น (strong reactive control) ตัวควบคุมผลบวกอ่อน (weakly reactive control) และตัวควบคุมผลลบ (negative control)

- 4.2.2 โดยเครื่องจะเติมสารละลายวอชบัฟเฟอร์เจือจาง 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม
- 4.2.3 ทำปฏิกิริยา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) บน rocking platform จากนั้นดูดน้ำยาทิ้ง
- 4.2.4 เติมสารละลายบลอตติงบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร และปัสสาวะของผู้ป่วยหรือตัวควบคุมผล 1 มิลลิลิตร
- 4.2.5 ปิดฝาภาตหลุม ทำปฏิกิริยา ที่ อุณหภูมิห้อง บน rocking platform นาน 1 ชั่วโมง
- 4.2.6 เปิดฝาย่างระมัดระวังมิให้น้ำยาในแต่ละหลุมปนเปื้อนกัน แล้วดูดน้ำยา ในแต่ละหลุมทิ้ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างหลุม ให้เปลี่ยนปิเปตทิพ ทุกครั้งในการดูดน้ำยาใส่แต่ละหลุม
- 4.2.7 ล้างแต่ละ strip 3 ครั้ง โดยเติมสารละลาย วอชบัฟเฟอร์เจือจาง 2 มล. ลงในหลุมทิ้งไว้ 5 นาที บน rocking platform แล้วดูดออกในการล้างแต่ละครั้ง
- 4.2.8 ดูดสารละลายคอนจูเกต (Monoclonal mouse anti-human IgG conjugate diluted 1:1,000) สำหรับใช้งาน 2 มล. ลงในแต่ละหลุม ปิดฝา แล้วอุ่นที่อุณหภูมิห้อง บน rocking platform นาน 1 ชั่วโมง
- 4.2.9 ดูดน้ำยากอนจูเกตในแต่ละหลุมทิ้ง ล้าง strip (เหมือนในข้อ 4.2.7)
- 4.2.10 เติมสารละลายสีตั้งต้น 2 มล. ลงในแต่ละหลุม ปิดฝา อุ่นที่อุณหภูมิห้อง บน rocking platform
- 4.2.11 ดูดสารเกิดสีตั้งต้นทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น (สำหรับเตรียมสารละลาย) 3 ครั้ง เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- 4.2.12 ใช้ปากคีบค่อย ๆ นำ strip ออกจากภาตหลุม วางบนกระดาษซับ ทิ้งไว้จนแห้ง
- 4.2.12 ติด strip ที่แห้งแล้วบน worksheet (กระดาษขาวที่ไม่ดูดซึม) สังเกตและแบ่งระดับความเข้มของแถบสีโปรตีนที่ปรากฏ

4.3 วิธีทดสอบเพื่อตรวจหา ไอจีเอ แอนติบอดี

- 4.3.1 ใช้ปากคีบเรียง แถบทดสอบ (strip) ตามจำนวนตัวอย่างที่จะใช้ทดสอบ ลงในแต่ละหลุมของภาตหลุมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยหงายด้านที่มีตัวเลขขึ้น ซึ่งเป็นด้านที่มีส่วนประกอบของเชื้อ รวมทั้ง แถบทดสอบสำหรับตัวควบคุมผลบวกเข้มขึ้น ตัวควบคุมผลลบอ่อน และตัวควบคุมผลลบ
- 4.3.2 โดยเครื่องจะเติมสารละลายวอชบัฟเฟอร์เจือจาง 2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม
- 4.3.3 ทำปฏิกิริยา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) บน rocking platform จากนั้นดูดน้ำยาทิ้ง

4.3.4 เติมสารละลายยบสีที่ดั่งบัพเฟอร์ 1 มิลลิลิตร และบัสสาวะของผู้ป่วยหรือตัวควบคุมผล 1 มิลลิลิตร

4.3.5 ปิดฝาภาดหลุม ทำปฏิกิริยา ที่ อุณหภูมิห้อง บน rocking platform นาน 1 ชั่วโมง

4.3.6 เปิดฝาย่างระมัดระวังมิให้น้ำยาในแต่ละหลุมปนเปื้อนกัน แล้วดูค่น้ำยา ในแต่ละหลุมทึ่ง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างหลุม ให้เปลี่ยนปิเปตทิฟ ทุกครั้งในการดูค่น้ำใส่แต่ละหลุม

4.3.7 ล้างแต่ละ strip 3 ครั้ง โดยเติมสารละลาย วอชบัพเฟอร์เจือจาง 2 มล. ลงในหลุมทึ่งไว้ 5 นาที บน rocking platform แล้วดูคอกในการล้างแต่ละครั้ง

4.3.8 ดูดสารละลายคอนจูเกต (Rabbit anti – human IgA alkaline phosphatase conjugate 1:1,000) สำหรับใช้งาน 2 มล. ลงในแต่ละหลุม ปิดฝา แล้วค่นที่อุณหภูมิห้อง บน rocking platform นาน 1 ชั่วโมง

4.3.9 ดูค่น้ำยาคอนจูเกตในแต่ละหลุมทึ่ง ล้าง strip (เหมือนในข้อ 4.3.7)

4.3.10 เติมสารละลายสีดั่งต้น 2 มล. ลงในแต่ละหลุม ปิดฝาค่นที่อุณหภูมิห้อง บน rocking platform

4.3.11 ดูดสารเกิดสีดั่งต้นทึ่ง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อหยุดปฏิกิริยา

4.3.12 ใช้ปากคิบค้อย ๆ นำ strip ออกจากภาดหลุม วางบนกระดาษซับ ทึ่งไว้จนแห้ง

4.3.13 ติด strip ที่แห้งแล้วบน worksheet (กระดาษขาวที่ไม่ดูคซึม) ไม่ใช่เทปกาว ติดทับบริเวณที่เกิดแถบโปรตีนขึ้น สังเกตและแบ่งระดับ แถบโปรตีนที่ปรากฏ

4.4 การอ่านผล

ถ้ามีแอนติบอดีที่จับอย่างจำเพาะกับโปรตีนส่วนใดของเชื้อ เอชไอวี จะปรากฏแถบสีน้ำเงินดำ อ่านความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นบนแผ่น เวสเทอร์นบล็อต โดย อ่านความเข้มข้น ของแถบสีที่เกิดขึ้น⁽⁶⁵⁾ เป็น trace , 1⁺ , 2⁺ , 3⁺ และ 4⁺

บทที่ 4

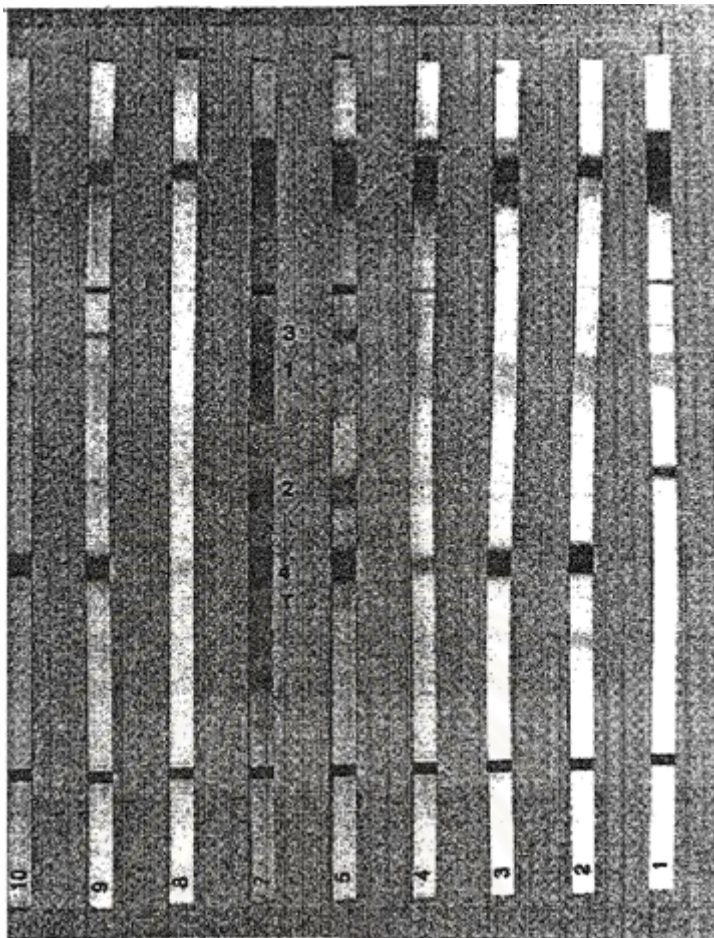
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 จำนวนร้อยละของแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1

จากการตรวจตัวอย่างปัสสาวะของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ที่มารับการรักษาที่คลินิกเพศสัมพันธ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จำนวน 100 ราย โดยวิธี เวสเทิร์นบลอต พบแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนร้อยละของแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1

ชนิดของโปรตีน	จำนวนที่ตรวจพบแอนติบอดี (ร้อยละ)
GAG p17	24
p24	93
p39	30
p55	25
POL p31	60
p51	76
p66	85
ENV gp41	63
gp120	78
gp160	98



ภาพที่ 4.1 แสดงการให้ค่าความเข้มของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี ที่เกิดขึ้นใน การทำเวสต์เทิร์นบลอต: trace, 1+, 2+, 3+, 4+

ตารางที่ 4.1.1 ความเข้มของแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี

แอนติบอดีต่อ โปรตีน	Anti-HIV-IgG grading				
	trace	1+	2+	3+	4+
p24(93 ราย)	6(6.5%)	8(8.6%)	18(19.4%)	20(21.5%)	41(44.1%)
gp120(78 ราย)	8(10.3%)	6(67.7%)	34(43.6%)	20(25.6%)	10(12.8%)
gp160(98 ราย)	0(0%)	5(5.1%)	22(22.4%)	40(40.8%)	31(31.6%)

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าในปัสสาวะ มีแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ไม่ว่าจะเป็นส่วน GAG, POL, และ ENV แอนติบอดีบางชนิดพบน้อย เช่นแอนติบอดีต่อ p17 และต่อ p55 ซึ่งพบร้อยละ 24 และ 25 ตามลำดับ แต่แอนติบอดีบางชนิดก็พบมากในปัสสาวะ โดยพบแอนติบอดี p24 และต่อ gp160 สูงถึงร้อยละ 93 และ 98 ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี ตามลำดับ

นอกจากจำนวนร้อยละที่ให้ผลบวกของแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างชนิดต่างๆ จะแตกต่างกันแล้ว ความเข้มของ band ของแอนติบอดีชนิดต่างๆ ก็แตกต่างกันด้วย (ภาพที่ 4.1)

จากตารางที่ 4.1.1 ซึ่งแสดงถึงความเข้มของ band ของแอนติบอดีที่สำคัญ 3 ชนิด คือ p24, gp120 และ gp160 พบว่าในส่วนของแอนติบอดีต่อ p24 ให้ผลบวกมากที่สุด คือ 4+(44.1%) รองลงมา คือ 3+(21.5%) และ 2+(19%) และน้อยที่สุด คือ trace(6.5%)

ส่วนแอนติบอดีต่อ gp120 ให้ผลบวกมากที่สุดคือ 2+(43.6%) รองลงมาคือ 3+(25.6%) และ 4+(12.8%) แอนติบอดีต่อ gp160 ให้ผลบวกมากที่สุดที่ความเข้ม 3+(40.8%) รองลงมาคือ 4+(31.6%) และ 2+(22.4%) ตามลำดับ

4.2 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อเชื้อเอชไอวีในกลุ่มผู้ป่วยแบ่งตามจำนวน CD4 ในเลือด

เนื่องจาก CDC classification ได้ใช้จำนวนเซลล์ CD4 จำแนกกลุ่มผู้ติดเชื้อเอชไอวี เพื่อแสดงความรุนแรงของโรค ซึ่งผันแปรในสัดส่วนผกผันกับจำนวนเซลล์ CD4 ดังนั้นเราจึงได้ตรวจหาจำนวน เซลล์ CD4 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีทุกราย เพื่อศึกษาเปรียบเทียบและหาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ในปัสสาวะกับจำนวนเซลล์ CD4 แสดงในตาราง 4.2)

จากตารางที่ 4.2 เป็นการเปรียบเทียบแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีเทียบกับจำนวน absolute เซลล์ CD4 เพื่อที่จะหาความสัมพันธ์ ระหว่างจำนวนร้อยละ ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีชนิดไอจีจีกับจำนวน CD4 ที่ลดลง

พบว่าแอนติบอดีในส่วนของ GAG สูงขึ้นทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นแอนติบอดีต่อ p17, p39 และ p55 เมื่อเซลล์ CD4 ลดจำนวน จากมากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ 200-500 เซลล์/ลบ.มม. เมื่อผู้ป่วยมีอาการมากขึ้นโดยใช้หลักการของจำนวนเซลล์ CD4 ลดลงจนต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งผู้ป่วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการติดเชื้อฉวยโอกาส แอนติบอดีที่พบกลับลดลง จนแอนติบอดีต่อ p39 ลดลงจากร้อยละ 48 ในกลุ่มเซลล์ CD4 200-500 เซลล์/ลบ.มม.

จนถึงไม่พบเลย (ร้อยละ 0) ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 ต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. แอนติบอดีในส่วนนี้ที่เป็นข้อยกเว้น คือ แอนติบอดีต่อ p24 จะยังคงที่ ในช่วงร้อยละ 91 ถึง 95

แอนติบอดีในส่วนของ POL ไม่พบรูปแบบที่ชัดเจนในความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ CD4 ที่ลดลง และแอนติบอดีในส่วนของ ENV ไม่พบรูปแบบที่แน่นอน เช่นเดียวกับแอนติบอดีในส่วนของ POL แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า สามารถพบแอนติบอดีต่อ gp160 ถึงร้อยละ 100 เมื่อจำนวนเซลล์ CD4 ลดลงจาก 500 เซลล์/ลบ.มม. ถึงต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 จำนวนร้อยละของแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 แบ่งตามจำนวนเซลล์ CD4 ในเลือด

จำนวน CD4+ เซลล์/ลบ.มม.	แอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี									
	GAG				POL			ENV		
	p17	p24	p39	p55	p31	p51	p66	gp41	gp120	gp160
>500(40 ราย)	8(20%)	38(95%)	11(28%)	10(25%)	25(63%)	30(75%)	33(83%)	21(53%)	26(65%)	38(95%)
200-500(29ราย)	12(41%)	27(93%)	14(48%)	9(31%)	21(72%)	26(90%)	28(97%)	22(76%)	27(93%)	29(100%)
50-199(20 ราย)	3(15%)	18(90%)	5(25%)	4(20%)	8(40%)	12(60%)	14(70%)	13(65%)	18(90%)	20(100%)
<50(11 ราย)	1(9%)	10(91%)	0(0%)	2(18%)	6(55%)	8(73%)	10(91%)	7(64%)	7(64%)	11(100%)

ตารางที่ 4.3 จำนวนร้อยละของแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี-1 กับอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8

อัตราส่วน CD4/CD8	แอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี									
	GAG				POL			ENV		
	p17	p24	p39	p55	p31	p51	p66	gp41	gp120	gp160
>0.5(19 ราย)	3(16%)	19(100%)	3(16%)	4(21%)	12(63%)	13(68%)	16(84%)	8(42%)	12(63%)	17(89%)
0.1-0.5(59ราย)	19(32.2%)	46(80.0%)	15(25.4%)	17(28.8%)	37(62.7%)	49(83.1%)	52(88.1%)	44(74.6%)	50(84.7%)	49(83.1%)
<0.1(22 ราย)	2(9%)	16(73%)	3(14%)	4(18%)	11(50%)	14(64%)	11(50%)	16(73%)	16(73%)	22(100%)

4.3 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี-1 กับอัตราส่วนของเซลล์ CD4/CD8 ในเลือด

อาการผู้ติดเชื้อเอชไอวีรุนแรง ไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ CD4 ที่ลดลงเท่านั้น แต่ที่สำคัญกว่าคือจำนวนเซลล์ CD8 ที่ลดลง ซึ่งแสดงถึงความสำคัญของเซลล์ CD8 ซึ่งถึงบทบาทของ cytotoxic T cell ในการต้านทานต่อเชื้อโรคต่างๆ ดังนั้นถึงแม้จำนวนเซลล์ CD4 จะลดลง แต่ถ้าจำนวนเซลล์ CD8 ไม่ลดหรืออาจเพิ่มขึ้น ก็จะช่วยบรรเทาความรุนแรงของโรค ในทางตรงข้ามถ้าจำนวนเซลล์ CD4 ลดลง แต่อัตรการลดลงของเซลล์ CD8 มากกว่าอัตรการลดลงของเซลล์ CD4 ก็จะเป็นการเพิ่มความรุนแรงของโรคเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงได้ทำการตรวจจำนวนเซลล์ CD8 และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนร้อยละของแอนติบอดีโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีต่ออัตราส่วน CD4/CD8

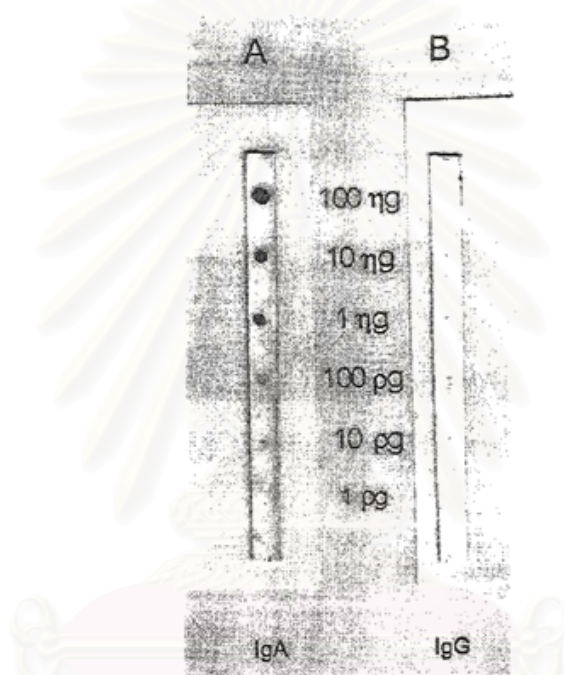
จากตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่ารูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวีที่ตรวจพบเมื่อแบ่งตาม CD4/CD8 ratio คล้ายกับที่พบในตารางที่ 4.2 ซึ่งเป็นรูปแบบของแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างจัดตามจำนวนเซลล์ CD4 โดยในส่วนของแอนติบอดีต่อ GAG จะให้จำนวนร้อยละที่พบสูงขึ้น เมื่อ CD4/CD8 ratio น้อยลง จากมากกว่า 0.5 เป็น 0.3-0.5 แต่หลังจากอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ลดลง จาก 0.1x0.3 ไปเป็น น้อยกว่า 0.1 จำนวนร้อยละที่พบในรูปแบบแอนติบอดีต่อส่วนของ GAG กลับลดลง เช่นเดียวกับแอนติบอดีต่อส่วนของ POL ไม่พบรูปแบบที่ชัดเจน เมื่ออัตราส่วน CD4/CD8 ลดลง ในส่วนแอนติบอดีต่อ ENV เช่นเดียวกับ POL ไม่พบรูปแบบที่แน่นอน แต่แอนติบอดีต่อ gp 160 ยังพบได้เป็นร้อยละ 100 เมื่ออัตราส่วน CD4/CD8 ลดลงจาก 0.3-0.5 จนถึงน้อยกว่า 0.1

4.4 ผลบวกจำนวนร้อยละ ของแอนติบอดีชนิดไอจีเอ ในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1

เนื่องจากแอนติบอดีชนิดไอจีเอ ในปัสสาวะยังไม่มีชุดตรวจสำเร็จรูป และยังไม่ได้ establish เช่นเดียวกับการตรวจแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปัสสาวะ ดังนั้นจึงจำเป็นต้อง establish ความไวของชุดตรวจนี้เราได้ดัดแปลงจาก western blot ที่ใช้ในการตรวจปัสสาวะชนิดไอจีจี โดยการใช้ rabbit antihuman IgA conjugate กับเอนไซม์ alkaline phosphatase ในการนี้เราได้ใช้วิธี immunodot โดยการ apply human IgA ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1 pg. ถึง 100 ng. โดย dot ละ 1 ไมโครลิตร ลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วทำการ block เพื่อลด non-specific staining ตลอดจนขั้นตอนอื่นๆ เช่นเดียวกับการตรวจหา IgG เพียงแต่เปลี่ยน conjugate ตามที่ได้กล่าว

แล้วข้างต้น ผลความไวของการตรวจแอนติบอดีชนิดไอจีเอ แสดงในภาพที่ 4.2 ซึ่งพบว่ามีความไวถึง 10 pg ในขณะที่มีความจำเพาะไอจีเอโดยไม่เกิด cross reaction ต่อแอนติบอดีชนิดไอจีจี

เนื่องจากแอนติบอดีในสิ่งคัดหลั่งส่วนใหญ่จะเป็นไอจีเอ⁽⁶⁷⁾ ดังนั้นแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีซึ่งเป็นสิ่งคัดหลั่งชนิดหนึ่งน่าจะมีส่วนของแอนติบอดีชนิดไอจีเอต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี และยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับแอนติบอดีชนิดไอจีเอในปัสสาวะ ดังนั้นเราจึงได้ทำการศึกษาลักษณะของแอนติบอดีชนิดไอจีเอต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี โดยวิธีเวสเทิร์น บล๊อต และเปรียบเทียบแอนติบอดีชนิดไอจีเอเทียบกับแอนติบอดีชนิดไอจีจี (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.2 แสดงผลความไวของการตรวจแอนติบอดีชนิดไอจีเอ

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ IgA conjugate โดยวิธี Immunodot blot ใช้น้ำยา Goat antihuman IgA ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน เคลือบบน แผ่นทดสอบ nitrocellulose มีความเข้มข้น 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 ng, 10 pg และ 1 pg ของ IgA (แผ่นทดสอบ A) และ IgA (แผ่นทดสอบ B)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 จำนวนร้อยละของแอนติบอดีชนิดไอจีจี และไอจีเอในปัสสาวะ ต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวี-1

Immunoglobulin subclass	จำนวนร้อยละผู้ตรวจพบแอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อเชื้อเอชไอวี									
	GAG				POL			ENV		
	p17	p24	p39	p55	p31	p51	p66	gp41	gp120	gp160
IgG	24	93	30	25	60	76	85	63	78	98
IgA	0	7	0	1	1	2	2	0	1	4

จากตารางที่ 4.4 แอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ชนิด IgA ในปัสสาวะพบได้น้อยมาก ร้อยละ 7 แอนติบอดีชนิด IgA ในปัสสาวะต่อ p24 ซึ่งเป็นส่วนของ GAG เป็นที่น่าสังเกตว่าแอนติบอดี IgA ต่อ gp160 พบได้น้อยมาก เพียงร้อยละ 4

4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแอนติบอดีชนิด ไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 กับจำนวนเซลล์ CD4

นอกจากเราจะได้ศึกษาหาจำนวนร้อยละที่ให้ผลบวก ในปัสสาวะต่อส่วนต่างๆ ของเชื้อเอชไอวี-1 แล้ว ในผู้ป่วยที่ให้ผลบวกแต่ละราย เรายังได้ศึกษาถึงความเข้มข้นของแต่ละ band ซึ่งกล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ titer เป็น semiquantitative ต่อแต่ละ antibody นั้นเอง โดยการให้ grading เป็น trace, 1+, 2+, 3+ และ 4+ และเพื่อที่จะสามารถนำค่า semiquantitative ที่ได้มาลงในโปรแกรม excel เพื่อหาค่า correlation (R) ดังนั้นจึงเปลี่ยนเป็นค่าตัวเลขโดยให้ trace = 0.5, 1+=1, 2+=2, 3+=3, 4+=4 ตามลำดับ

ดังนั้นจึงสามารถที่จะหาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างเปรียบเทียบกับจำนวน CD4 แล้วแสดงค่า correlative ของแต่ละแอนติบอดีต่อเซลล์ CD4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 แสดงความสัมพันธ์ (Correlation: r) ระหว่างความเข้มของผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 กับจำนวน CD4+ เซลล์ในเลือด

ผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ	จำนวน CD4+ เซลล์ในเลือด							
	>500(40ราย)		200-500(ราย)		50-199(ราย)		<50(ราย)	
	ราย	r	ราย	r	ราย	r	ราย	r
GAG p17	8	0.335	12	0.097	3	0.087	1	0.000
p24	38	-0.034	27	0.028	18	0.192	10	0.154
p39	11	-0.276	14	-0.253	5	0.000	0	0.000
p55	10	-0.532	9	-0.113	4	0.834	2	1.000
POL p31	25	0.180	21	0.242	8	0.362	6	0.320
p51	30	0.014	26	0.035	12	0.473	8	0.040
p66	33	-0.022	28	0.048	14	0.514	10	-0.300
ENV gp41	21	-0.326	22	-0.054	13	0.128	7	0.350
gp120	26	0.208	27	-0.291	18	0.246	7	0.830
gp160	38	0.039	29	0.013	20	0.485	11	0.090

ความเข้มของผลบวกของแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างชนิดไอจีจีต่อส่วนต่างๆ ของเชื้อเอชไอวี ที่ปรากฏพบ Western blot strip ได้รับการ grading เป็น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ขึ้นอยู่กับความเข้มของ band นี้ปรากฏเป็น trace, 1+, 2+, 3+ และ 4+ ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแอนติบอดีแต่ละเส้นในกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่มเทียบกับจำนวนเซลล์ CD4 แสดงเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (correlation coefficient: r)

การแปรค่าความสัมพันธ์ r (correlation):	0-0.2-	ไม่มีความสัมพันธ์กันเลย,
	0.2-0.5-	มีความสัมพันธ์น้อย,
	0.5-0.8-	มีความสัมพันธ์ปานกลาง,
	0.8-1.0-	มีความสัมพันธ์มาก

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นได้ว่า ความเข้มของแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปัสสาวะที่มีความสัมพันธ์กับจำนวน CD4+ เซลล์ มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. คือ แอนติบอดีต่อ p39, p55 และเซลล์มีจำนวนมากขึ้น แอนติบอดีแต่ละชนิดมีความเข้มลดลง โดย แอนติบอดีในส่วนของ GAG แอนติบอดีที่มีความสัมพันธ์น้อยต่อจำนวนเซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. คือ แอนติบอดีต่อ p39 ($r=-0.276$), แอนติบอดีต่อ p55($r=-0.532$) ในส่วน POL แอนติบอดีที่มีความสัมพันธ์น้อยต่อจำนวนเซลล์ CD4 ในช่วง 200-500 เซลล์/ลบ.มม. คือ แอนติบอดีต่อ p31($r=0.242$)

ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีจำนวนเซลล์ CD4 น้อยกว่า 200 เซลล์/ลบ.มม. ได้แก่ กลุ่มที่มีจำนวนเซลล์ CD4 ตั้งแต่ 50-199 เซลล์/ลบ.มม. และน้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. (ตารางที่ 4.5) จะพบเป็น positive correlation กล่าวคือ ความเข้มของแอนติบอดีจะสูงมาก เมื่อมีจำนวนเซลล์ CD4 มากเข้าใกล้ 200 เซลล์/ลบ.มม. ความเข้มของภูมิต้านจะยิ่งน้อย โดยแอนติบอดียิ่งน้อย ยิ่งจำนวนเซลล์ CD4 ต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ความเข้มของภูมิต้านจะยิ่งน้อย โดยแอนติบอดีที่มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ CD4 50-199 เซลล์/ลบ.มม. คือ แอนติบอดีต่อ p31($r=0.362$), p51($r=0.473$), gp120($r=0.246$), gp160($r=0.485$) โดยมีความสัมพันธ์น้อย ส่วนความสัมพันธ์ขนาดปานกลางคือ แอนติบอดีต่อ p66($r=0.574$) และมีความสัมพันธ์มาก ต่อแอนติบอดี p55($r=0.834$) ส่วนแอนติบอดีที่มีความสัมพันธ์มากกับจำนวนเซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. คือ แอนติบอดีต่อ p55($r=1.000$) และ gp120($r=0.830$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง เพื่อศึกษาหารูปแบบแอนติบอดี ชนิดไอจีจีและ ไอจีเอ ต่อโปรตีนโครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1 ในปัสสาวะ และหาความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี ชนิดไอจีจีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 ปัสสาวะ กับจำนวนเซลล์ซีดี 4 ในเลือด โดยเก็บ ตัวอย่างจำนวน 100 ราย จากผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่คลินิกเพศสัมพันธ์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ เดือน มิถุนายน 2542 ถึง เดือนธันวาคม 2543 ซึ่งเป็นผู้ที่ได้รับการยืนยันผลจากโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ว่าเป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี

สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

5.1 แอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี

แอนติบอดีต่อส่วน GAG ของเชื้อเอชไอวี จากตารางที่ 4.4 พบว่า จำนวนร้อยละที่พบสูงสุด คือ พบแอนติบอดี ต่อ p24 ซึ่งพบสูงสุดร้อยละ 93 และต่ำสุดคือ ภูมิต้านทานต่อ p17 ซึ่งพบร้อยละ 24 ซึ่ง เปรอ์เซ็นต์ที่พบนี้สูงกว่าที่เคยรายงาน (Tiensiwakul) โดยพบภูมิต้านทานต่อ p24 ร้อยละ 68 และต่อ p17 ร้อยละ 6.8 ซึ่งสาเหตุที่พบภูมิต้านทานดังกล่าวสูงขึ้น เนื่องจาก ศึกษาในตัวอย่างผู้ป่วยมากขึ้น หรือ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของผู้ป่วยที่นำศึกษา ได้แก่ ระยะเวลาการติดเชื้อของผู้ป่วย

แอนติบอดี ต่อโปรตีนโครงสร้างของ POL พบให้ผลบวกตั้งแต่ร้อยละ 60 ถึง 85 ซึ่ง มากกว่าที่เคยรายงานเล็กน้อย

แอนติบอดี ต่อโปรตีนโครงสร้างของ ENV ซึ่งน่าจะเป็นแอนติบอดีที่สำคัญในการวินิจฉัยการ ติดเชื้อเอชไอวี เพราะพบแอนติบอดีต่อส่วนประกอบนี้ทุกส่วนในเปอร์เซ็นต์สูง โดยพบแอนติบอดีต่อ gp41 ร้อยละ 63 แอนติบอดีต่อ gp120 ร้อยละ 78 และแอนติบอดีต่อ gp160 ร้อยละ 98 ปัสสาวะของ ผู้ป่วย 2 รายที่ให้ผลลบสำหรับ gp160 เป็นผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ early seroconversion โดยรายหนึ่งเป็น หญิงอาชีพพิเศษที่ทำการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีเป็นประจำเป็นระยะๆ ตั้งแต่ seronegative จนเป็น seropositive ผลที่ได้ใกล้เคียงกับผลที่รายงานโดย Tiensiwakul⁽⁶⁵⁾ ซึ่งพบแอนติบอดีต่อ gp 41, gp120, gp160 ในสัดส่วนร้อยละ 63.6, 75 และ 97.7 ตามลำดับ แอนติบอดีต่อส่วนประกอบของ ENV

โดยเฉพาะต่อ gp41 โดยปกติมี titer และ avidity อยู่ในระดับสูงตลอดระยะเวลาการดำเนินของโรค จึงน่าจะ เป็น diagnostic marker ที่สำคัญ⁽⁸⁵⁾

การพบแอนติบอดี ต่อ gp160 ถึงร้อยละ 98 มีความสำคัญ ในการใช้แอนติบอดีต่อ gp160 เป็น marker ในการวินิจฉัย การติดเชื้อเอชไอวี ในปัสสาวะ โดยเฉพาะในโครงการของผู้ทำการวิจัยและ คณะที่จะทำการผลิตชุดตรวจ วินิจฉัยการติดเชื้อเอชไอวีจากปัสสาวะ เป็นชนิด simple/rapid test kit โดยวิธี immunochromatographic strip test (IC) โดยการเคลือบ gp160 บนแผ่นทดสอบ เพื่อตรวจหา แอนติบอดี ชนิด gp160 ในปัสสาวะ ซึ่งถ้าสามารถผลิตให้ชุดตรวจนี้ มี sensitivity ได้เท่ากับ ชุดตรวจ Western Blot ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ ก็จะสามารถ ทำให้ชุดตรวจ IC มีความไวถึง 98% และที่สำคัญ คือ รายงานอื่นๆ ที่ตรวจแอนติบอดี ในปัสสาวะ ในปัสสาวะค่อนข้างจะมีความจำเพาะสูง คือ ไม่ปรากฏ false positive เช่นที่อาจพบในการตรวจจากน้ำเหลือง

แต่ปัจจุบัน ในการตรวจ urine test ในประเทศสหรัฐอเมริกา ถ้าพบ positive ยังต้องให้ ตรวจเลือดยืนยันผล

นอกจากจำนวนร้อยละของผลบวกที่แตกต่างกันของแต่ละแอนติบอดี ความเข้มข้นของ แอนติบอดีแต่ละชนิดยังแตกต่างกัน แสดงถึงปริมาณที่แตกต่างกันในปัสสาวะ แสดงในตารางที่ 4.1.1 ความเข้มข้นของแอนติบอดีที่สำคัญคือ ต่อ p24, gp160 ส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 60 อยู่ในช่วง 3+ ถึง 4+ ส่วน gp120 ประมาณร้อยละ 40 จะเป็น 2+ ส่วนที่อยู่ในช่วง 3+ ถึง 4+ มีสัดส่วนร้อยละ 30 จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่า แอนติบอดีที่สำคัญทั้ง 3 ล้วนมีปริมาณมาก ในขณะที่แอนติบอดี ต่อส่วนอื่นๆ จะมีปริมาณน้อย โดยอ่านได้แค่ 1+ ถึง 2+

5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดี ชนิดไอจีจีในปัสสาวะ ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อ เอชไอวีกับจำนวนเซลล์ CD4 ในเลือด

จากตารางที่ 4.2 พบว่าแอนติบอดีของ GAG ในปัสสาวะ ซึ่งได้แก่ แอนติบอดี ต่อ p17, p39 และ p55 สัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ CD4 แอนติบอดี ดังกล่าวขึ้นสูงสุด สำหรับผู้ป่วยในกลุ่มที่มี เซลล์ CD4 ตั้งแต่ 200-500 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งน่าจะเป็นช่วง maturity ของ HIV antibody production ทั้งนี้เพราะในช่วงผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. เป็นระยะต้นๆ ของ การติดเชื้อ แอนติบอดีของบางคนจะยังไม่สร้าง บางคนก็สร้างก็ยังมี titer ไม่สูง ซึ่งจะสังเกตได้จาก การตรวจเลือดของผู้ป่วย ในระยะ early infection บางรายจะยังตรวจไม่พบแอนติบอดี ซึ่งเรียกว่า window period ทำให้ต้องตรวจหา antigen แทน ปัญหาดังกล่าวก็พบเช่นเดียวกันในปัสสาวะ ที่ ผู้ป่วยในช่วงเซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. พบแอนติบอดีต่อ p17, p39 และ p55 ร้อยละ

20 28 และ 25 ตามลำดับ และแอนติบอดีดังกล่าวได้เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 41, 48 และ 31 ตามลำดับ ในช่วงนี้ผู้ป่วยเริ่มมีการติดเชื้อมากขึ้น โดยมีเซลล์ CD4 ลดลง ถึง 200-500 เซลล์/ลบ.มม.

แอนติบอดีดังกล่าวจะลดลง เมื่อผู้ป่วยมีอาการมากขึ้น จนอาจเสี่ยงต่อการติดเชื้อฉวยโอกาส ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีจำนวนเซลล์ CD4 ในช่วง 50-199 เซลล์/ลบ.มม. โดยแอนติบอดีต่อ p17, p39 และ p55 ลดลง เป็นร้อยละ 15, 25 และ 20 ตามลำดับ และยิ่งแอนติบอดียิ่งลดลงมากขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่มี เซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์ที่กระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีถูกทำลายมากขึ้น จนแอนติบอดีต่อ p17, p39, p55 ลดลงเหลือร้อยละ 9, 0 และ 18 ตามลำดับ การที่พบจำนวนร้อยละของแอนติบอดีต่อส่วน GAG ลดลงมาก นอกจากสาเหตุที่ เซลล์ที่กระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีใหม่ลดลง (เซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม.) อาจเป็นเพราะเป็นช่วงนี้ เซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวี มีจำนวนไวรัสมากขึ้นทำให้เซลล์ดังกล่าวแตกสลาย และปล่อยส่วนประกอบของเชื้อไวรัสเข้าไปในกระแสเลือด ซึ่งจะจับกับแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี ที่สร้างมาก่อนเกิดเป็น immune complex ดังนั้นจึงทำให้จำนวน free antibody ต่อ p17, p39 และ p55 ลดลงมากจนถึงตรวจไม่พบในช่วงนี้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า แอนติบอดีต่อ p24 ยังคงมีระดับสูงในตลอดทุกช่วงของจำนวนเซลล์ CD4 ตั้งแต่ร้อยละ 91 ถึง 96 ถึงแม้ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีจำนวนเซลล์ CD4 ต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. จะมีจำนวนร้อยละลดลงเล็กน้อย จาก 96 เป็น 91 จำนวนร้อยละที่ลดลง อาจอธิบายได้ด้วยเหตุผล immune complex เช่นเดียวกับที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น แต่เนื่องจากแอนติบอดีต่อ p24 น่าจะสร้างขึ้นเป็นจำนวนมาก หรือไม่ก็ antibody ค่อนข้างสูงหรือทั้งสองประการ ดังนั้น จึงทำให้ยังตรวจพบแอนติบอดีต่อ p24 ยังคงอยู่ในระดับสูง ซึ่งสามารถพิสูจน์ได้ โดยการ ทำ quantitative measurement อันเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยซึ่งคณะผู้วิจัยกำลังทำอยู่ แต่ไม่ใช่วิธีการของวิทยานิพนธ์นี้ ซึ่งทำการศึกษาแอนติบอดีชนิดต่างๆ ใน follow up cases โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แอนติบอดีต่อ p24 โดยทำการวัดความเข้มของแอนติบอดีต่อ p24 จาก band ที่ปรากฏบน Western Blot strip โดยวัดความเข้มเป็น pixel ด้วย densitometer

ส่วนแอนติบอดีชนิดไอจีจี ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ในส่วนของ POL (แอนติบอดีต่อ p31, p51, p66) และในส่วนของ ENV (แอนติบอดีต่อ gp41, gp120, gp160) จะมีรูปแบบที่ไม่ชัดเจน แต่โดยภาพรวมพบจำนวนร้อยละสูง ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 ในช่วง 200-500 เซลล์/ลบ.มม. และลดลงในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 ต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ยกเว้นแอนติบอดีต่อ gp160 ซึ่งยังคงสูง ทุกกลุ่มของเซลล์ CD4 โดยพบได้สูงตั้งแต่ ร้อยละ 95-100 ซึ่งเป็นข้อสนับสนุนให้ใช้ gp160 เป็น diagnostic marker ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ

5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีชนิดไอจีจีในปัสสาวะ ต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี-1 กับอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ในเลือด

รูปแบบของแอนติบอดีที่พบในปัสสาวะสัมพันธ์กับอัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ในเลือด (ตารางที่ 4.3) ซึ่งพบคล้ายกับที่พบ เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ CD4 โดยจะพบจำนวนร้อยละสูงสุด (peak) เมื่ออัตราส่วน CD4/CD8 อยู่ในช่วง 0.3-0.5 โดยที่อัตราส่วน CD4/CD8 สูงกว่า 0.5 หรือต่ำกว่า 0.3 จะมีจำนวนร้อยละของผู้ป่วยที่ให้ผลบวกลดลง

จากตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่ารูปแบบแอนติบอดีของ CD4/CD8 ratio คล้ายกับที่พบในตารางที่ 4.2 ซึ่งเป็นรูปแบบของแอนติบอดีต่อส่วนต่างๆ จัดตามจำนวนเซลล์ CD4 โดยในส่วนของแอนติบอดีต่อ GAG จะให้จำนวนร้อยละที่พบสูงขึ้น เมื่อ CD4/CD8 ratio น้อยลงจาก มากกว่า 0.5 เป็น 0.3-0.5 แต่หลังจาก อัตราส่วนเซลล์ CD4/CD8 ลดลงจาก 0.1-0.3 ไปเป็น น้อยกว่า 0.1 จำนวนร้อยละที่พบแอนติบอดีต่อ GAG กลับลดลง เช่นเดียวกับแอนติบอดีต่อส่วน POL ไม่พบรูปแบบที่แน่นอน แต่แอนติบอดีต่อ gp160 ยังพบได้เป็นร้อยละ 100 เมื่ออัตราส่วน CD4/CD8 ลดลงจาก 0.3-0.5 จนถึงน้อยกว่า 0.1

5.4 แอนติบอดีชนิดไอจีเอ ในปัสสาวะต่อโปรตีนโครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1

ผลจากการศึกษาพบ เอชไอวี-1 ชนิดไอจีเอ ในปัสสาวะให้ผลบวกสูงสุดร้อยละซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ p24 ผลที่ได้แตกต่างจาก เอชไอวี-1 ไอจีเอ ที่พบในน้ำลาย⁽⁸⁶⁾ ซึ่งจะเป็นแอนติบอดีต่อ gp160 จำนวนร้อยละที่พบก็ต่ำกว่าที่พบในน้ำลายที่พบได้สูงถึงร้อยละ 17.6⁽⁶⁹⁾ ดังนั้นแอนติบอดีชนิดไอจีเอต่อเชื้อเอชไอวีในปัสสาวะ น่าจะมีความสำคัญน้อยกว่าแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปัสสาวะ และจำนวนร้อยละที่ให้ผลบวกน้อยมาก จนไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ ในแง่ของ diagnostic marker ได้ ทั้ทั้งๆ ที่ในระบบของเราสามารถตรวจพบความเข้มข้นของ IgA ในปัสสาวะ ได้ถึง 10 pg. ก็ตาม อาจเป็นไปได้ที่ แอนติบอดีชนิดไอจีเอ สร้างในระยะ early infection แต่ผู้ป่วยในโครงการไม่ได้ อยู่ในระยะ early infection เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็น cross-sectional study ไม่ได้คัดเลือกผู้ป่วยที่อยู่ในระยะ early seroconversion

5.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจี ในปัสสาวะ ต่อโปรตีนโครงสร้าง ของเชื้อเอชไอวี-1 กับจำนวนเซลล์ CD4

คำถามที่น่าสนใจคือ นอกจากเปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่จะให้ผลบวกต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวีซึ่งอาจมีประโยชน์ในแง่ของการนำมาเป็นประโยชน์ในการ diagnostic parameters

ซึ่งจากผลงานของการวิจัยในครั้งนี้คล้ายกับรายงานการวิจัยของ Tiensiwakul ที่ลงพิมพ์มาแล้ว⁽⁶⁵⁾ พบว่าแอนติบอดีต่อส่วน ENV (gp160) สามารถใช้เป็น diagnostic marker ได้ โดยเฉพาะ gp160 น่าจะเป็น candidate ที่ดีของ IC ที่ได้กล่าวมาแล้ว การศึกษาหาแอนติบอดีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี จะสามารถนำมาประยุกต์ ใช้ติดตามผลการรักษาหรือพิจารณาโรคริดได้หรือไม่

จากการรายงานของ Weber และคณะ⁽⁸⁷⁾ ศึกษา น้ำเหลืองของผู้ป่วย 2 ราย พบความเข้มของแอนติบอดีต่อ p24 ลดลงตามระยะเวลาภายหลังติดเชื้อเอชไอวี เช่นเดียวกับ Sum และคณะ⁽⁸⁸⁾ พบแอนติบอดีต่อ p24 ในน้ำลายลดลงตามอาการของโรค ดังนั้นเราจึงได้ทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี โดยทำการวิเคราะห์เป็น semiquantitative โดยใช้คะแนนเป็น 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ตามความเข้มของ band ที่อ่านได้ เป็น trace, 1+, 2+, 3+ และ 4+ ตามลำดับแล้วหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

ความเข้มของผลบวกของแอนติบอดีชนิดไอจีจีต่อโปรตีนโครงสร้างของเชื้อเอชไอวี ที่ปรากฏบน Western Blott strip ได้รับการ grading เป็น 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 ขึ้นอยู่กับความเข้มของ band ที่ปรากฏเป็น trace, 1+, 2+, 3+ และ 4+ ตามลำดับ ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแอนติบอดีในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง เทียบกับจำนวนเซลล์ CD4 แสดงเป็น ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient : r)

ผลจากตารางที่ 4.5 จะเห็นได้ว่า โดยภาพรวมแอนติบอดีชนิดไอจีจี ต่อส่วนของ GAG ซึ่งได้แก่ p17, p24, p39 และ p55 ไม่แสดงความสัมพันธ์กับจำนวน CD4+ เซลล์ ยกเว้นแอนติบอดีต่อ p17 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. มีความสัมพันธ์เล็กน้อย ($r=0.335$) และในกลุ่มแอนติบอดีต่อ p55 ของผู้ป่วยในกลุ่มที่มีเซลล์ CD4 ระหว่าง 50-199 เซลล์/ลบ.มม. ($r=0.834$) และ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ($r=1.000$) มีความสัมพันธ์กันมาก แต่ข้อมูลใน 2 กลุ่มหลังนี้ อาจคลาดเคลื่อน เนื่องจากจำนวน ตัวอย่างใน 2 กลุ่มหลังนี้น้อยมาก แค่ 4 และ 2 ราย ตามลำดับ ผลนี้ได้สอดคล้องกับผลการศึกษา โดย Thomas และ คณะ⁽⁸⁵⁾ ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ของ avidity ของ p17 ต่อระยะเวลา ภายหลัง seroconversion แต่พบ avidity ของ p24 ตกลงก่อนที่จะมีอาการ ARC หรือ AIDS

ความสัมพันธ์ระหว่างผลบวกของแอนติบอดี ต่อ POL ซึ่งได้แก่ p31, p51, p66 พบสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ CD4 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 ระหว่าง 50-199 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งน่าจะเป็นช่วงระยะที่มี maturity ของ แอนติบอดีต่อโปรตีนของ POL สูงสุด โดยในกลุ่มผู้ป่วยที่เริ่มติดเชื้อโดยมีจำนวนเซลล์ CD4 มากกว่า 500 เซลล์/ลบ.มม. ไม่มีความสัมพันธ์และจะเริ่มมีความสัมพันธ์บ้าง ($r=0.242$) ในแอนติบอดีต่อ p31 ของกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 ช่วง 200-500 เซลล์/ลบ.มม. และขึ้นสูงสุดในกลุ่มผู้ป่วย 50-199 เซลล์/ลบ.มม. หลังจากนั้นจึงลดต่ำลงในกลุ่มผู้ป่วยที่มีเซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ($r=0.320$)

สาเหตุที่มีความสัมพันธ์ของแอนติบอดีต่อ POL ในกลุ่มที่มีเซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. น่าจะมีสาเหตุจาก เซลล์ที่สร้างแอนติบอดีนี้้อยมาก แอนติบอดีที่มีอยู่เป็น residue IgG ซึ่งจะจับกับเอนไซม์ที่ release มาจาก HIV-1 infected เซลล์ที่แตกสลายแล้วเกิดเป็น immune complex ทำให้ปริมาณแอนติบอดีต่อส่วนที่เป็น free antibody ลดลงอย่างมากมาย

แอนติบอดีต่อส่วน ENV ได้แก่ gp41, gp120, gp160 แอนติบอดีต่อส่วนนี้ได้มีการศึกษาหา avidity โดยเฉพาะต่อ gp41 Thomas และคณะ ได้พบว่ามีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการดำเนินของโรค เนื่องจากแอนติบอดีต่อ gp41 พบขึ้นสูงอย่างรวดเร็วและอยู่นานโดยไม่ตกลง ซึ่งผลสอดคล้องกับการพบของผู้วิจัย ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างแอนติบอดีต่อ gp41 และจำนวนเซลล์ CD4 ยกเว้น ในกลุ่มสุดท้ายที่มี จำนวนเซลล์ CD4 น้อยกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ซึ่งความเข้มของแอนติบอดีลดลง เมื่อจำนวนเซลล์ CD4 ลดลงต่ำกว่า 50 เซลล์/ลบ.มม. ($r=0.350$) ซึ่งน่าจะมีสาเหตุเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในส่วน POL คือเกิด Immune complex ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ข้อเสนอแนะเป็นตัวอย่างที่กำลังมีการพัฒนาวิธีตรวจหากรดนิวคลีอิกของเชื้ออื่นๆ ที่ก่อโรคทางเพศสัมพันธ์ เหมาะที่จะนำมาตรวจกรองเบื้องต้นแทนการเจาะเลือดในการตรวจหาแอนติบอดีต่อการติดเชื้อ HIV และซิฟิลิส

รายการอ้างอิง

1. Luciw PA. Human immunodeficiency viruses and their replication. In Fields **Virology**, 3rd ed. Knipe BN, Howley PM, et al., eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996: 1881-1952.
2. Metcalf JA, Davey JR and Lane HX. Acquired immunodeficiency syndrome: Serologic and virologic tests. In: DeVita VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA. **AIDS**. Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997: 29-43.
3. ประพันธ์ ภานุภาค. โรคเอดส์, ใน ฤทัย สกุลแรมรุ่ง (บรรณาธิการ) **วิทยาภูมิคุ้มกัน**. พิมพ์ครั้งที่10. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2539: 327-345.
4. จินตนา จิรถาวร. ไวรัสเอชไอวีและโรคเอดส์, ใน ไหม รัตนวราภักษ์ (บรรณาธิการ) **วิทยาภูมิคุ้มกันพื้นฐานและคลินิก** พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2543: 341-353.
5. Center for Disease Control. Pneumocystis pneumonia Los Angelis. **Morbid Mortal Weekly Rep** 19881a; 30: 250-252.
6. Gottlieb MS, Shraff R, Schanker HM, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. **N Engl J Med** 1981; 305. 1431-1438.
7. Center for Disease Control. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men. **Morbid Mortal Weekly Rep** 19881b; 30: 305-308.
8. Center for Disease control Task Force on Kaposi's sarcoma and Opportunistic Infections. Epidemiological aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections **New Engl J Med** 1982; 306: 248-252.
9. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. 1983. Isolation of T Lymphotropic, retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (Aids). **Science**; 220: 868-871.
10. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequency detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science** 1984; 225: 840-842.
11. Levy JA, Hoffman AB, Kramer SM, et al. Isolation of Lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science** 1984; 225: 840-842.

12. Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Human Immunodeficiency Virus. *Wkly Epidem Rec* 1986; 61: 229.
13. Clavel F, Guctard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-346.
14. ชัยยศ คุณานุสนธิ์ ระบาดวิทยาของ HIV/AIDS และผลการทบทต่อประเทศไทย, ใน เกียรติรักษา รุ่งธรรม (บรรณาธิการ). **การประมวลและสังเคราะห์องค์ความรู้ เอดส์: การวินิจฉัยทางคลินิก**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์, พ.ศ. 2541: 1-9.
15. สาธารณสุข, กระทรวง, กองระบาดวิทยา. **สถานการณ์ผู้ป่วยโรคเอดส์ในประเทศไทย** ณ วันที่ 31 มกราคม. พ.ศ. 2543. (In press)
16. Levy JA. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus infection. *Microbiol Rev.* 1993; 57 (1): 183-289.
17. Hirsch MS, Curran J. Human immunodeficiency viruses Biology and medical aspects. In Fields BN, Knipe DM et al. eds. *Virology*. New York: Raven Press Ltd. 1990; 1547-1570.
18. Folks TM, Hart CE. The life cycle of human immunodeficiency virus type 1. In: DeVita VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA. *AIDS. Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997: 29-43.
19. Cohen J. AIDS Research; How can HIV replication be controlled? *Science* 1993; 260: 1254-1261.
20. Simon F, Mauclore P, Roques P, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998; 4: 1032-1037.
21. Levy JA. Changing concepts in HIV infection: Challenges for the 1990s. *AIDS* 1990; 4:1051-1058.
22. Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312: 763-767.
23. Coffin JM. Genetic diversity and evolution retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 176:143-164.
24. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte t4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312:767-768.
25. Favci AS. The human immunodeficiency virus: Infectivity and mechanisms of pathogenesis *Science* 1988; 239: 617-623.
26. Mosmann TR, Cherwinski HM, Bond MW, et al. Two types of mouse helper T cell clone 1.

- Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.
27. Mosmann TR, Coffman RL. Two types of mouse helper T cell clone: implications for immune regulation. *Immunol Today* 1987; 8: 223-227.
 28. Munoz A, Wang M M-C, Bass S, et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) the time after human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) seroconversion in homosexual men. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 530-539.
 29. Bacchetti P, Moss AR, Osmond D, et al. Seropositivity for HIV and the development of AIDS or AIDS-related condition three years follow up of the San Francisco General Hospital Cohort. *BMJ* 1989; 196: 745-750.
 30. Srivichayakul S, Phanuphak P, Hanvanich M, et al. Clinical correlation of the immunologic markers of HIV infection in individuals from Thailand. *AIDS* 1992; 6: 393-397.
 31. เกียรติ รักรุ่งธรรม, อุษา ทิสยากร, ชัยยศ คุณานุสนธิ์, และคณะ **การประมวลและสังเคราะห์องค์ความรู้เอดส์: การวินิจฉัยทางคลินิก**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชวนพิมพ์. 2541.
 32. Centers for Disease Control. Classification system for human T- lymphotropic virus Type III/lymphadenopathy associated virus infections. *Morbidity Mortality Weekly Report* 1986; 35:334-339.
 33. Center for Disease Control. Revision of CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *Morbidity Mortality Weekly Report* 1987; 36: 45-155.
 34. สาธารณสุข กระทรวง, กองระบาดวิทยา. **นิยามผู้ป่วยโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อเอดส์ที่มีอาการที่ใช้ในการเฝ้าระวังโรค**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, 2536.
 35. กองระบาดวิทยา สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. **นิยามผู้ป่วยโรคเอดส์และผู้ติดเชื้อเอดส์ที่มีอาการที่ใช้ในการเฝ้าระวังโรค. รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์**. 2536; ๖24 (25): 1-22.
 36. Kessler , Biauw B, Spear J, et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. *JAMA* 1987; 258: 1196-1199.

37. จันทพงษ์ วะสี และสุดา ลุยศิริโรจนกุล. วิธีตรวจไวรัสเอดส์, ใน รวงผึ้ง สุทเธนทร์ และจันทพงษ์ วะสี (บรรณาธิการ) **การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการไวรัส**. คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล 2535: 93-108.
38. สาธารณสุข, กระทรวง ,กองโรคเอดส์. **การส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเอชไอวี/เอดส์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์เจเอส การพิมพ์. 2542.
39. สาธารณสุข, กระทรวง ,กองโรคเอดส์. **เอดส์: การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์ชุมนุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย., 2542.
40. Goudsmit J, Lange J, Paul D, et al. Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigens in AIDS, AIDS related complex and subclinical human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis** 1987; 155: 588-600.
41. World Health Organization Global Program on AIDS. Recommendation for the selection and use of HIV antibody test. **Wkly Epidem Rec** 1992; 67:145-149.
42. Pagcharoenpol P, Cassler AB and Schramm WJ. Simplified test for antibodies to human immunodeficiency Virus. **J Clin Microbiol** 1996; 34: 973-974.
43. Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors and AIDS program, Center for Infectious Diseases, Public Health Practice Program Office, and Centers for Diseases Control. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections **MMWR** 1989; 38(S): 1-7.
44. ประสงค์ พุกษานานนท์. การตรวจหา พี 24 แอนติเจน ในระยะต่าง ๆ ของการติดเชื้อเอชไอวี. **วารสารโรคเอดส์** 2534; 3(2): 85-91.
45. Portera M, Vitale F, La Licata R, et al. Free and antibody complexed antigen and antibody profile in apparent healthy HIV seropositive individuals and in AIDS patients. **J Med Biol** 1990; 30: 30-35.
46. Nishanian P, Huskins K, Stelin S, et al. A simple method for improved assay demonstrates that HIV p24 antigen is present as immune complexes in most sera from HIV infected individuals. **J Infect Dis** 1990; 162: 21-28.
47. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci Am** 1990; 262: 36-43.
48. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 1985; 230: 1350-1354.
49. Connell JA, Parry JV, Mortimer PP and Duncan J. Novel assay for the detection of

- immunoglobulin G anti-human immunodeficiency virus in untreated saliva and urine. **J Med Virol** 1993; 41: 159-164.
50. Tribble RD, Rodier RG, Saad DM, et al. Comparative field evaluation of HIV rapid diagnostic assays using serum, urine and oral mucosal transudate specimens. **Clinical and Diagnostic Virology**. 1997; 7: 127-132.
 51. Beerrios DC, Avins AL, and Sanstad KH. Screening for human immunodeficiency virus antibody in urine. **Ach Pathol Lab Med** 1995; 119: 139-141.
 52. Cao Y, Friedman-Kien AE, Chuba JV, et al. IgG antibodies to HIV-1 in urine of HIV-1 seropositive individuals. **Lancet** 1981: 831-832.
 53. Cao Y, Friedman-Kien AE, Mirabile M, et al. HIV-1 neutralizing antibodies in urine from seropositive individuals. **AIDS**. 1990; 3:195-199.
 54. Connell JA, Parry JV, Mortimer PP, et al. Preliminary report: Accurate assays for anti-HIV in urine. **Lancet** 1990; 335: 1377-1379.
 55. Desai S, Bates H, and Michalski FJ. Detection of antibody to HIV-1 in urine **Lancet** 1991; 337: 183-184.
 56. Reagan KJ, Lile CC, Book GW, et al. Use of urine for HIV-1 antibody screening. **Lancet** 1990; 335: 358-359.
 57. Skolnik PR, Kosloff BR, Bechtel LJ, et al. Absence of infectious HIV-1 in the urine of seropositive viremic subject. **J Infect Dis** 1989; 160:1056-1060.
 58. Constantine NT, Zhang X, and Li L. Application of a rapid assay for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in urine. **Am J Clin Pathol** 1994; 101: 157-161.
 59. Vallari AS, Hickman RK, Hackett JR, et al. Rapid assay for simultaneous detection and differentiation of immunoglobulin G antibodies to human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Group M, HIV-1 group O, and HIV-2. **J Clin Microbiol** 1998; 36: 3657-3661.
 60. Martimez PM, Tosres AR, and Lejarazu RO et al. Human immunodeficiency virus antibody testing by Enzyme-Linked Fluorescent and Western Blot assays using serum, gingival-crevicular transudate, and urine samples. **J Clin Microbiol** 1999; 37: 1100-1106.
 61. Urnovitz HB, Sturge JC, Gotfried TD, and Murphy WH. Urine antibody Tests: New insights into the dynamics of HIV-1 infection. **Clin Chem** 1999; 45: 1602-1613.
 62. Urine based test to detect HIV antibodies. **American Family physician**. 1998; 58: 1222.
 63. Testing for HIV in urine. **Science** 1990; 249:121.

64. First urine –based HIV-1 supplemental test approved. **Nurse Pract.** 1998; 23: 95.
65. Teinsiwakul P. Urinary HIV-1 antibody patterns by Western Blot assay. **Clin Lab Science** 1998; 22: 336-338.
66. Chargelgue D, Stanley CM, O' Toole CM, et al. The absence or loss of antibodies of high affinity to human immunodeficiency virus (HIV) Is associated with disease progression in HIV-1 infected patients. **J Infect Dis** 1995; 172: 897-898.
67. Kresina TF. And Mathieson B. Human immunodeficiency virus type-1 infection mucosal immunity and pathogenesis and extramural research programs at **National Institutes of Health**. 1999; 179(Suppl 3): S392-396.
68. Akerlund AS, Hanson LA, Ahistedt S, et al. A sensitive method for specific quantitative of secretory IgA. **Scan J Immunol** 1997; 6(12) 1275-1282.
69. O'Shea S, Cordery M, and Barrett WY. HIV excretion patterns and specific antibody responses in body fluids. **J Med Virol** 1990; 31:291-296.
70. Andrien JM, Eme D, Venet A, et al. Serum HIV antigen and anti-P24-antibodies in 200 seropositive patients: correlation with CD4 and CD4 subsets. **Clin Exp Immunol** 1988; 73:1-5.
71. Polk MD, Fox R, Brookmeyer R, et al. Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. **N Engl J Med** 1987; 316: 61-66.
72. Giorgi JV. CD4 counts in relation to markers of immune activation. In: Janossy G, Autran B, Miedema F, eds. **The immunology of HIV Infection**. Basel: Karger, 1992: 1-17.
73. Taylor JMG, Fahay JL, Delels R, et al. CD4 percentage CD4 number and CD4/CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. **J Acquir Immune Defic Syndr** 1989; 2: 114-124.
74. Center for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **Morbidity Mortal Weekly Rep** 1987; 36: 45-155.
75. Center for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults **Morbidity Mortal Weekly Rep** 1992; 41(No.RR-17): 1-19.

76. Shapilo HM. *Practice Flow Cytometry*. New York: Alan R. Liss, 1988.
77. Omerod MG. *Flow Cytometry: A practical Approach*. Oxford University Press, 1990.
78. พรเทพ เทียนสิวกุล. **เอกสารประกอบการสอนเรื่อง Basic flow cytometry and application of flow cytometry in AIDS**. วิชาภูมิคุ้มกันวิทยา ของนิสิตเทคนิคการแพทย์ชั้นปีที่ 3 คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2543. 16 หน้า
79. ชมรมโพลีไซโตเมทรีแห่งประเทศไทย. **การบริหารคุณภาพโพลีไซโตเมทรี: การวิเคราะห์หาประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 2541; จำนวน 124 หน้า.
80. โกวิท พัฒนาปัญญาสัตย์. การหาประชากรย่อยของลิมโฟไซต์ในตัวอย่างเลือดของคนปกติและคนไข้ โดยใช้โพลีไซโตมิเตอร์. **วารสารเทคนิคการแพทย์** 2537; 22(2): 5-17.
81. Weiblen BJ, Debell K, Giorgio A, et al. Monoclonal antibody testing of lymphocytes after overnight storage. **J Immunol Methods** 1984; 70: 179-183.
82. Shuldt CF, Marlett P, Smith A, et al. Stability of human leukocyte differentiation antigens when stored at room temperature. **J Immunol Methods** 1983; 62: 347-352.
83. Ho DD, Newmann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection. **Nature** 1995; 373: 123-126.
84. เต็มศรี ชำนาญกิจ. **สถิติประยุกต์ทางการแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 5 กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. พ.ศ. 2540.
85. Thomas HW, Wilson SQ and Hoole CM. Differentiated maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV. **Clin Exp Immunol** 1996; 103: 185-191.
86. Skott P, Lucht E, Iulander I. Salivary sIgA response in HIV-1 infection. **AIDS** 1992: 73-80.
87. Weber DN, Weiso RA, Robuts C. et al. Human immunodeficiency virus infection in two cohorts of homosexual men: neutralizing sera and association of anti-gag antibody with prognosis. **Lancet** 1987; i: 199-122.
88. Sun D, Aschibald DW and Purth PA. Variation of secretory antibodies in parotid saliva to human immunodeficiency virus type 1 with HIV-1 disease stage. **AIDS Res Hum Retroviruses** 1990; 6: 933-941.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

ส่วนประกอบและขั้นตอนการเตรียมน้ำยา ชุดตรวจเอชไอวีบีล๊อท 2.2

ส่วนประกอบชุดน้ำยาตรวจ เอชไอวี (ชุดตรวจเอชไอวีบีล๊อท 2.2 ของบริษัท GENELAB ประเทศ สิงคโปร์) เป็นชุดตรวจสำหรับ พลาสมา แต่นำมาประยุกต์ใช้กับปัสสาวะ

1. แอบนไนโตรเซลลูโลส

ประกอบด้วยตัวเชื้อเอชไอวี 1 ซึ่งถูกแยกส่วนตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-PAGE อิเล็กโตรฟอร์เรซิส และถูกย้ายจากเจลมาอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยกระแสไฟฟ้า และเพิ่มเติมโปรตีนจำเพาะส่วน envelope ของเชื้อเอชไอวี 2 เพื่อให้ชุดตรวจนี้สามารถตรวจได้ทั้ง เอชไอวี 1 และ 2 เก็บในที่แห้งไม่ถูกแสง

2. ตัวควบคุมผลลบ

ปัสสาวะคนปกติ ที่คัดเลือก สำหรับเป็นตัวควบคุม

3. ตัวควบคุมผลบวกแรง

ปัสสาวะของผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี ที่ให้ผลบวก 3⁺ ถึง 4⁺

4. ตัวควบคุมผลบวกอ่อน

ปัสสาวะของผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี ที่ให้ผลบวก \pm ถึง 1⁺

5. สต็อกบัฟเฟอร์เข้มข้น (10 เท่า)

Tris บัฟเฟอร์ ผสมกับซีรั่มแพะปกติ ใส่น้ำไทเมอโรซาลเป็นสารกันเสีย

6. วอชบัฟเฟอร์เข้มข้น (20 เท่า)

Tris และ Tween 20 ใส่น้ำไทเมอโรซาล เป็นสารกันเสีย

7. คอนจูเกต

Goat anti-Human IgG คอนจูเกตกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส สำหรับ HIV-1 IgG

Rabbit anti-human IgA คอนจูเกตเข้ากับอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส(Dako) สำหรับ HIV-1 IgA

8. สารเกิดสีตั้งต้น

สารละลายของ 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) และ nitroblue tetrazodium (NBT)

9. ผลบลิ้อตติง

ผงนมไร้ไขมัน

10. ภาตหลุมสำหรับทำปฏิกิริยา

ขั้นตอนการเตรียมน้ำยาชุดตรวจเอชไอวี บลิ้อท 22

1. สารละลาย วอชบัฟเฟอร์เจือจาง

เจือจางน้ำยวอชบัฟเฟอร์เข้มข้น (20 เท่า) 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่นสำหรับเตรียมสารละลาย 19 ส่วน โดยปริมาตรผสมให้เข้ากัน

2. สารละลายบลิ้อตติงบัฟเฟอร์

2.1 ควรเตรียมน้ำยา บลิ้อตติงบัฟเฟอร์ใหม่ ๆ ก่อนการใช้งาน

2.2 เจือจางน้ำยาสต็อกบัฟเฟอร์เข้มข้น (10 เท่า) 1 ส่วน ด้วยน้ำกลั่น 9 ส่วน โดยปริมาตรผสมให้เข้ากัน

2.3 เติมผง บลิ้อตติงจำนวน 1 กรัม ลงในทุก ๆ 20 มล. ของบัฟเฟอร์ที่เจือจางแล้วจากข้อ 2.2 ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายคอนจูเกตสำหรับใช้งาน

3.1 เจือจางคอนจูเกตด้วยสารละลายบลิ้อตติงบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้จากข้อ 2 ในอัตราส่วน 1 : 1000 เช่น เจือจาง คอนจูเกต จำนวน 5 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายบลิ้อตติงบัฟเฟอร์จำนวน 5 มิลลิลิตร

3.2 น้ำยาคอนจูเกต สำหรับใช้งาน ปกติเตรียมใหม่ ๆ ก่อนการใช้งาน

4. สารเกิดสีตั้งต้น (พร้อมใช้งาน)

4.1 นำสารเกิดสีตั้งต้นออกมาใช้งานตามจำนวนที่ต้องการโดยตรงจากขวด โดยใช้ปิเปตที่สะอาด ปิดฝาให้แน่นทุกครั้งหลังใช้งาน

ภาคผนวก ข.

วิธีการใช้เครื่องฟลูวไฮโดมิเตอร์

วิธีการใช้เครื่องฟลูวไฮโดมิเตอร์ชนิด FACSCalibur (บริษัทเบคตันดิคคินสัน จำกัด)

การเริ่มต้นใช้เครื่อง

1. ตรวจสอบระดับของเหลวในถัง Sheath reservoir ซึ่งอยู่ด้านซ้าย ควรมีของเหลวประมาณ 3/4 ของถังและถึงน้ำที่ด้านขวาควรวางไม่มีน้ำที่ถังอยู่ และควรเติม 5% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 400 มล. ลงในถังเพื่อฆ่าเชื้อ
2. ตรวจสอบให้แน่ใจว่าฝาของถัง Sheath reservoir และถึงน้ำที่ปิดแน่น และยกปุ่ม Vent Value ขึ้น เพื่อให้เกิดความดัน ที่จะนำพาของเหลว และเซลล์ไปในการตรวจวัด
3. เปิดสวิทช์เครื่องฟลูวไฮโดมิเตอร์ และส่วนประเมินผลโดยเปิดสวิทช์ จากเครื่องพิมพ์ ไล่ไปจนถึงส่วนของตัวคอมพิวเตอร์
4. กดปุ่ม Fluid control panel มาที่ Standby หน้าจอเครื่องจะขึ้นว่า "NOT READY" ที่ระยะเวลาให้หลอดเลเซอร์ WARM UP ประมาณ 5-10 นาที ถ้าเรียบร้อย หน้าจอจะเปลี่ยนเป็น "STAND BY"
5. ทำการไล่อากาศออกจากส่วนต่าง ๆ ของเครื่อง โดยกด prime 2-3 ครั้ง จนไม่มีฟองอากาศ ถูกไล่ออกมา จากส่วนของสายยาง และ Flow cell
6. กดปุ่ม RUN บน Fluid control panel เมื่อจะวัดตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปรับเครื่องก่อนใช้

เปิดโปรแกรม FACS comp แล้วทำตามโปรแกรมโดยการเติมข้อมูลต่าง ๆ ลงไปในวัน
วันที่ Bead Lot จากนั้น จึงเตรียม Beads ที่ใช้ในการตรวจวัดเพื่อปรับเครื่องดังนี้

1. เติม 1 มล. ของ Sheath fluid ลงในหลอดทดลอง 2 หลอด (Falcon 2052) หลอด
หนึ่ง เขียนว่า "Unstained" อีกหลอดหนึ่งเขียนว่า "mixed"
2. นำ Calibrite beads จากตู้เย็นทั้ง 3 ขวด คือ White, Red และ Green มาผสมให้เข้า
กันด้วยเครื่องผสม (vortex Mixer)
3. เติม 2 หยดของขวด Unstained (จุกสีขาว) ลงในหลอดทดลองที่เขียนว่า
"Unstained" แล้วผสมให้เข้ากันดี
4. เติม 1 หยด ของขวด Unstained Red และ Green ลงในหลอดที่เขียนว่า "Mixed"
แล้วผสมให้เข้ากันดี ทำตามโปรแกรมที่ขึ้นบนหน้าจอคอมพิวเตอร์ ถ้าทำการทดสอบไม่ผ่าน ให้ทำ
การ apperate ใหม่ แล้วจึงทำการทดสอบอีกครั้ง ผลที่ได้พิมพ์และเก็บไว้เป็นหลักฐาน

การตรวจวัดตัวอย่าง

1. เปิดโปรแกรม Cell Quest เพื่อทำการปรับสภาพเครื่องกับเซลล์ตัวอย่างจริง โดยใช้
instrument setting เมื่อทำการปรับสภาพเครื่องเรียบร้อยแล้ว สามารถเก็บค่าไว้ใช้งานครั้งต่อไป
2. ทำการวัดตัวอย่าง
 - 2.1 หลังจากย้อมตัวอย่างด้วยน้ำยา CD4-FITC/CD8-PE แล้วนำเข้าเครื่องโฟลว
ไซโตมิเตอร์ โดยเครื่องจะนับเซลล์ทั้งหมด 10,000 เซลล์ จะพบว่าเซลล์ CD4+ จะอยู่ใน quadrant
4 และ CD8+ จะอยู่ใน quadrant ที่ 2
 - 2.2 ถ้าไม่เป็นไปตามที่กำหนดต้องทำการปรับ Voltage FL-1 และ FL-2 โดยการ
ปรับ Detectors/Amps ที่ linear mode โดยตั้ง Voltage ที่ EOO แล้วปรับ Amp Gain ให้ได้
lymphocyte population ไปทางขวามือเกือบสุดให้แยกออกจาก cell debris ปกติประมาณ 1.96
 - 2.3 หลังจากนั้นจึงปรับ Detectors/Amps ที่ log mode โดยการปรับ Voltage
ของ FI-1 และ FL-2 ซึ่งปกติ Voltage ของ FI-1 ได้ประมาณ 501 และของ FL-2 ได้ประมาณ

2.4 ปรับ SSC ที่ linear ที่ Amp Gain 1.00 เพื่อให้ granulocytes กระจาย ขึ้นข้างบนแยกออกจาก lymphocyte ซึ่งปกติได้ Voltage ประมาณ 394

2.5 ปรับ Threshold ให้ได้ FSC-H ประมาณ 152 เพื่อลดจำนวน debris โดยดูจากจอ monitor

2.4 ตั้ง gate รอบ lymphocytes ที่ต้องการวัด

2.5 นำ tube isotype controls ซึ่งย้อมด้วย r-2a FIIC/r₁ - PE ทำการวัด หลังจากนั้นจึงปรับ Detectors/Amps ที่ log mode โดยการเพิ่ม Voltage ของ FL-1 และ FL-2 ให้เซลล์ที่นับอยู่ใน quadrant ที่ 3 ซึ่งปกติ Voltage ของ FL-1 ได้ประมาณ 501 และของ FL-2 ได้ประมาณ 506

2.6 บีบให้เซลล์นี้กระจายใน quadrant 3 ตามข้อ 2.5 ให้กระชับแน่นเข้า โดยการปรับ Compen salron โดยปกติได้ FL1-0.8% FL2 และ FL2-20.6/FL1

3. เก็บผลที่พิมพ์ทั้งในรูปรายงานทางห้องปฏิบัติการ และบันทึกข้อมูลในเครื่องคอมพิวเตอร์

4.การควบคุมคุณภาพโดย

4.1 ตรวจสอบ qualibrit bead เพื่อ control เครื่องโฟลวไซโตมิเตอร์

4.2 fix ตำแหน่งที่ gate รอบ lymphocytes ไว้ ถ้าทำการวัดตัวอย่างรายใด lymphocyte ไม่อยู่ในตำแหน่งที่กำหนดไว้ จะต้องหาสาเหตุการเปลี่ยนแปลง, ปรับ voltage หรือทำใหม่

4.3 ทำ CD Chex ทุกครั้งที่เปลี่ยนน้ำยา Lot. ใหม่ หรือมีการเปลี่ยนแปลง condition เพื่อ check ค่า CD4+, CD8+ control อยู่ในช่วงที่ยอมรับ

หลังจากใช้งาน

1. ให้เครื่องดูดน้ำยา 5% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรค
2. ให้เครื่องดูดน้ำกลั่น 5 นาที เพื่อล้างส่วนต่าง ๆ ภายในเครื่อง
3. กดปุ่ม Fluid control panel จาก "RUN" มาที่ STANBY" รอ 5-10 นาทีเพื่อให้หลอดเลเซอร์เย็น ก่อนปิดเครื่อง
4. กดปุ่ม Vent Value ลงปล่อยความดันเพื่อให้ Shealh fluid เข้าไปในสายยาง
5. เทของเหลวจากถังน้ำทิ้ง แล้วเติม 5% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 400 มล. ลงไป

ประวัติผู้วิจัย

นางสุวันดี บัญชรเทวกุล เกิดวันที่ 29 กรกฎาคม พ.ศ. 2503 ที่อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคนิคการแพทย์) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปี พ.ศ. 2529 รับราชการที่แผนกพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพระนั่งเกล้า จังหวัดนนทบุรี สำเร็จปริญญาเศรษฐศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง ปี พ.ศ. 2532 สำเร็จปริญญานิติศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช ปี พ.ศ. 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์)ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี พ.ศ. 2540 ปัจจุบันรับราชการ ตำแหน่งนักเทคนิคการแพทย์ ที่โรงพยาบาลพระนั่งเกล้า จังหวัดนนทบุรี



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย