Srinagaind Hosp Med J 1992; 7(3) 106-114

การตรวจนับจำนวน CD4, CD8 lymphocytes และ CD4/CD8 ratio ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์โดยวิธี Direct immunofluorescence

สุวิน ว่องวัจนะ, วท.ม.
อรัญญา คงถาวร. วท.บ.
สุรศักดิ์ วงศ์รัตนชีวิน, ปร.ด.
กัญญลักษณ์ ชัยคำภา, วท.ม.
ภิรุญ มุตสิกพันธุ์, พ.บ.*

*ภาควิชาจุลชีววิทยา และ *ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002*

Enumeration of CD4, CD8 lymphocyte and CD4/CD8 ratio in HIV infected patients by direct immunofluorescence

Suwin Wongwajana, M.Sc.
Aranya Kongthaworn, B.Sc.
Surasakdi Wongratanacheewin, Ph.D.
Kunyaluk Chaicumpar, M.Sc.
Piroon Mootsikapun, M.D.*
*Department of Microbiology and *Medicine, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand*

CD4 lymphocyte (T helper cell) plays a major role in the regulation of the immune response. Decrease in number of CD4 lymphocyte, due to being infected and destroyed by human immunodeficiency virus (HIV), is the key index for monitoring the stage of disease progression. The appropriate treatment thus can be given to the patients at the right time corresponding to the need of the patients. By direct immunofluorescence technique using monoclonal antibodies, CD4, CD8 lymphocyte and CD4/CD8 ratio were enumerated and calculated. In 37 normal healthy controls (male 20, female 17), aged 26 ± 5 years, the percentage of CD4 and CD8 lymphocytes were 38 ± 8 (range : 23-60) and 28 ± 7 (17-42), the absolute number of CD4 and CD8 lymphocytes were 956 ± 277 cell/mm^3 (545 - 1504 cell/mm^3) and 701 ± 252 (348-1416) respectively. The CD4/CD8 ratio was 1.42 ± 0.34 (0.72-2.48)

We have studied 61 HIV-infected cases by categorizing them into asymptomatic HIV infection, AIDS related complex (ARC), and the full-blown AIDS. The results were tabulated in table 2. The best prognostic index was the absolute number of CD4 lymphocyte which could discriminate between normal control and HIV-infected patients. This index could also differentiate among the various stages of HIV-infected patients; asymptomatic HIV infection (623 ± 347; range: 92-1350), AIDS related complex (ARC) (347 ± 365; 35-1509) and the full blown AIDS (137 ± 130; 9-472).

Key words : *CD4 lymphocyte, CD4/CD8 ratio, AIDS, Immunofluorescence*

บทคัดย่อ

ลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 นับว่าเป็นเซลล์ที่มีบทบาทอย่างสูงในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การลดจำนวนลงของลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 เนื่องจากถูกทำลายจากการที่เป็นเซลล์เป้าหมายในการติดเชื้อของไวรัสเอดส์ จึงเป็นดัชนีที่สำคัญในการพยากรณ์โรคว่ามีการดำเนินของโรคไปถึงขั้นใดแล้วเพื่อที่จะได้ให้การรักษาที่ถูกต้องและเหมาะสมสำหรับผู้ป่วยต่อไป การศึกษาในครั้งนี้ใช้วิธี direct immunofluorescence โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจนับจำนวนของลิมโฟซัยต์ ชนิด CD4 และ CD8 และสัดส่วนระหว่างลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 และ CD8 ซึ่งพบว่าในคนปกติจำนวน 37 ราย (ชาย 20, หญิง 17) อายุเฉลี่ย 26 ± 5 ปี มีค่าเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 และ CD8 = 38 ± 8 (ช่วง : 23-60) และ 28±7 (17-42) ตามลำดับ, มีค่าจำนวนสัมบูรณ์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 และ CD8 = 956 ± 277 เซลล์/มม^3 (545-1504) และ 701 ± 252 (348-1416) ตามลำดับ ส่วนสัดส่วนระหว่างลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 และ CD8 มีค่าเท่ากับ 1.42±0.34 (0.72-2.48)

สำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์จำนวน 61 รายนั้น เราได้ทำการศึกษาโดยแบ่งผู้ป่วยออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มไม่มีอาการ กลุ่มที่มีอาการสัมพันธ์กับเอดส์ และกลุ่มที่เป็นเอดส์เต็มขั้น โดยมีค่าต่าง ๆ ที่ตรวจวัดดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าค่าจำนวนสัมบูรณ์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 จะเป็นดัชนีที่ดีที่สุดในการแยกความแตกต่างระหว่างคนปกติกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ และในระหว่างผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ด้วยกันเอง คือระยะที่ไม่มีอาการ (623±347; ช่วง : 92-1350) ระยะที่มีอาการสัมพันธ์กับเอดส์ (347±365; 35-1509) และระยะเอดส์เต็มขั้น (137±130; 9-472)

บทนำ

จากการเพิ่มจำนวนของผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มากขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน ทำให้ความสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการก่อให้เกิดโรค การวินิจฉัย การรักษา รวมทั้งการติดตามสภาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อว่ามีการดำเนินของโรคไปถึงขั้นใดนั้น มีเพิ่มมากขึ้นเป็นเงาตามตัว ทั้งนี้เนื่องจากผลกระทบจากโรคเอดส์นี้มีผลทั้งต่อทางด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจของประเทศ ผู้ป่วย

ที่ติดเชื้อโรคเอดส์ในระยะแรก ๆ อาจจะยังไม่แสดงอาการของโรคแต่อย่างใด ซึ่งก็มีลักษณะเหมือนคนปกติทั่ว ๆ ไป จวบจนกระทั่งเชื้อโรคเอดส์ที่แฝงอยู่ในร่างกายได้รับการกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ผู้ป่วยจึงจะเริ่มแสดงอาการของโรคและรุนแรงมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งเป็นโรคเอดส์เต็มขั้นซึ่งจะเสียชีวิตลงในระยะเวลาอันสั้นอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันการที่จะควบคุมผู้ป่วยไม่ให้มีอาการ ชลอการเกิดอาการหรือควบคุมอาการที่มีอยู่แล้วไม่ให้รุนแรงมากขึ้น จะอาศัยการให้ยา AZT (Azidothymidine, Zidovudine) หรือ dideoxynucleoside analogues ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม antiretroviral agents ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ reverse transcriptase ของเชื้อโรคเอดส์[1] ซึ่งยาเหล่านี้มีราคาค่อนข้างแพงและผู้ป่วยจะต้องได้รับยานี้ตลอดไป การพิจารณาว่าเมื่อไรจึงควรที่จะเริ่มให้ยาแก่ผู้ป่วยก็คือการติดตามดูสภาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อว่ามีการดำเนินของโรคไปถึงขั้นใดแล้ว ซึ่งแนวทางหนึ่งได้แก่การตรวจนับจำนวนของเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 (CD4 lymphocyte หรือ T helper/inducer lymphocyte) ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายในการทำลายของเชื้อโรคเอดส์[2-4]

CD4 lymphocyte เป็นเซลล์ที่มีบทบาทอย่างสูงในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อโรคติดเชื้อต่าง ๆ[5] ดังนั้นการลดจำนวนลงของ CD4 lymphocyte เนื่องจากการถูกทำลายลงด้วยเชื้อโรคเอดส์ จึงเป็นดัชนีที่สำคัญอันหนึ่งที่จะบ่งบอกว่าผู้ป่วยมีการดำเนินของโรคไปถึงขั้นใดแล้ว ในขณะเดียวกันเมื่อมีการติดเชื้อโรคเอดส์นอกจากจะมีการทำลาย CD4 lymphocyte แล้ว ในทางตรงกันข้ามก็จะมีการกระตุ้น CD8 lymphocyte (T suppressor/cytotoxic lymphocyte) ได้เช่นกัน[6] ดังนั้นการตรวจนับจำนวนของ CD4, CD8 lymphocyte และการวัดสัดส่วนระหว่าง CD4 และ CD8 lymphocyte (CD4/CD8 ratio) จึงสามารถใช้เป็นดัชนีร่วมกันในการพิจารณาถึงสภาวะภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคเอดส์ได้[7] ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพิจารณาว่าเมื่อไรจึงควรที่จะเริ่มให้ยาแก่ผู้ป่วยหรือใช้ในการติดตามผลการรักษาและควบคุมโรคไม่ให้รุนแรงขึ้น

การตรวจนับจำนวน CD4 และ CD8 lymphocyte นอกจากจะมีประโยชน์กับผู้ป่วยโรคเอดส์ในแง่ต่าง ๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ยังมีประโยชน์ในด้านการตรวจวัดสภาวะภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell-mediated immunity, CMI) ของผู้ป่วยโรคอื่น ๆ ได้อีกด้วย การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสัดส่วนระหว่าง CD4 และ CD8 lymphocyte จากค่าปกติ สามารถใช้ช่วยประกอบในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ได้หลายโรค ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1[8]

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการศึกษาถึงจำนวนของ CD4 และ CD8 lymphocyte และ CD4/CD8 ratio ในคนปกติและคนไข้โรคเอดส์ของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ที่ส่งเลือดมาตรวจที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้วิธี direct immunofluorescence

ตารางที่ 1 แสดงค่าสัดส่วนระหว่าง CD4 และ CD8 lymphocyte ในเลือดของผู้ป่วยโรคต่าง ๆ[8]

Decreased in	Increased in
– SLE with renal disease	– Rheumatoid arthritis
– Acute cytomegalovirus infection	– Type I insulin dependent diabetes mellitus
– Burns	– SLE without renal disease
– GVH disease	– Primary biliary cirrhosis
– Sunburn or ultraviolet solarium exposure	– Atopic dermatitis
– Myelodysplasia syndrome	– Sezary syndrome
– Acute lymphocytic leukemia in remission	– Psoriasis
– Recovery from bone marrow transplant	– Chronic autoimmune hepatitis
– AIDS	
– Herpes infection	
– Infectious mononucleosis	
– Measles	
– Vigorous exercise	

ตารางที่ 2 แสดงค่า parameters ต่าง ๆ ที่ตรวจวัดในคนปกติและผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์กลุ่มต่าง ๆ

Parameters / Subjects	Age (year)	Total WBC (cell/mm³)	Lympho-cyte (%)	Total lympho-cyte (cell/mm³)	CD4 cell (%)	CD8 cell (%)	Abs CD4 (cell/mm³)	Abs CD8 (cell/mm³)	CD4/CD8 ratio
Normal (N=37)	26±5 (18–37)	7780±1877 (4250–12100)	34±8 (20–52)	2588±744 (1239–4284)	38±8 (23–60)	28±7 (17–42)	956±277 (545–1504)	701±252 (348–1416)	1.42±0.34 (0.72–2.48)
Asymptomatic HIV infection (N=21)	26±5 (17–37)	9031±3334 (3950–18400)	33±14 (13–70)	2872±1283 (897–6090)	21±7 (6–34)	39±13 (23–80)	623±347 (92–1350)	1083±487 (245–1962)	0.60±0.24 (0.21–1.08)
ARC (N=19)	30±5 (25–41)	7166±2692 (2750–14500)	23±10 (7–46	1640±988 (495–4117)	18±10 (5–39)	41±11 (23–60)	347±365 (35–1509)	703±481 (151–1698)	0.45±0.28 (0.10–1.03)
AIDS (N=21)	35±13 (25–64)	7860±5083 (2100–20900)	12±7 (2–32)	939±779 (213–3960)	14±7 (4–26)	42±13 (21–86)	137±130 (9–472)	396±370 (104–1474)	0.37±0.28 (0.09–1.24)

หมายเหตุ: – *ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน* ($\bar{X} \pm SD$) *ของค่า parameters ต่าง ๆ*
– *ค่าที่แสดงในวงเล็บเป็นค่าของช่วง (range) ต่ำสุด–สูงสุด ของค่า parameters ต่าง ๆ*

ตารางที่ 3 แสดงค่า p-value ของการทดสอบทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) for one-way classification และ multiple comparisons ซึ่งเปรียบเทียบระหว่างค่าของ parameters ต่าง ๆ ที่ตรวจวัดในคนปกติและผู้ป่วยโรคเอดส์กลุ่มต่าง ๆ

Parameters / Compared	Total WBC (cell/mm^3)	Lympho-cyte (%)	Total lympho-cyte (cell/mm^3)	CD4 cell (%)	CD8 cell (%)	Abs CD4 (cell/mm^3)	Abs CD8 (cell/mm^3)	CD4/CD8 ratio
Normal Asymptom	p=0.34*	p>0.05*	p>0.05*	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Normal : ARC		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0.05*	p<0.05
Normal : AIDS		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Asymptom : ARC		p<0.05	p<0.05	p>0.05*	p>0.05*	p<0.05	p<0.05	p>0.05*
Asymptom : AIDS		p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0.05*	p<0.05	p<0.05	p<0.05
ARC : AIDS		p<0.05	p<0.05	p>0.05*	p>0.05*	p<0.05	p<0.05	p>0.05*

*หมายเหตุ : ** – *แสดงถึงกลุ่มที่เปรียบเทียบมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับ* $\alpha = 0.05$ $(p>0.05)$

วัสดุและวิธีการ

เลือด

เลือดที่เจาะใหม่ ๆ จากผู้ป่วยจำนวน 5–7 มล. จะใส่ในหลอดแก้วที่มีเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็ง (15–20 ยูนิต/เลือด 1 มล.) เพื่อใช้สำหรับแยกเม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยต์ และอีกจำนวน 1–2 มล. จะใส่ในหลอดแก้วที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งเพื่อใช้สำหรับนับจำนวนของเม็ดเลือดขาวและนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว (white blood cell count and differential count)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ใช้ตัวอย่างเลือดทั้งหมด 98 ราย (ชาย 72, หญิง 26) ซึ่งส่งมาตรวจระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2534 – เดือนมกราคม 2536 โดยเป็นเลือดจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์จำนวน 61 ราย ซึ่งแบ่งเป็นระยะของโรคในระยะต่าง ๆ (CDC: group II-IV) ดังนี้คือ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์แต่ไม่มีอาการ (asymptomatic HIV infection) จำนวน 21 ราย (ชาย 14, หญิง 7), ผู้ป่วยที่มีอาการสัมพันธ์กับเอดส์ (ARC) จำนวน 19 ราย (ชาย 17, หญิง 2) และผู้ป่วยโรคเอดส์เต็มขั้น (full blown AIDS) จำนวน 21 ราย (ชาย 21) และเลือดของคนปกติจำนวน 37 ราย (ชาย 20, หญิง 17)

การนับจำนวนของเม็ดเลือดขาวและการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว

การนับจำนวนของเม็ดเลือดขาวและการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาว ใช้วิธีที่ปฏิบัติกันอยู่ทั่ว ๆ ไปตามห้องปฏิบัติการชันสูตรโรค[9] โดยการนับเม็ดเลือดขาวจะเจือจางเลือดที่มี EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งด้วยน้ำยาเจือจางสำหรับนับเม็ดเลือดขาว (Turk's solution) และทำการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวใน counting chamber ซึ่งจะได้ค่าของเม็ดเลือดขาวมีหน่วยเป็น

เซลล์/มม^3 ส่วนการนับแยกชนิดของเม็ดเลือดขาวทำโดยการเตรียมสเมียร์ของเลือดบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปย้อมด้วยสี Wright และนับเม็ดเลือดขาว โดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่าจำนวน 100 เซลล์ แล้วรายงานเป็นเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด

Direct immunofluorescence

ใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตน้ำยาเล็กน้อย[10] ซึ่งมีวิธีทำโดยย่อดังนี้ คือเจือจางเลือดที่มีเฮปารินเป็นสารกันเลือดแข็งด้วย phosphate buffer saline (PBS) ในปริมาณที่เท่ากันจากนั้นนำเลือดที่เจือจางแล้วไป overlay บนผิวของน้ำยา lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 1800 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ. นาน 30 นาที (Beckman J-6B centrifuge, rotor JS-5.2) ดูดแยกชั้นของ mononuclear cell มาปั่นล้างจำนวน 3 ครั้งด้วยน้ำยา RPMI-1640 ที่มี 5% fetal calf serum (FCS) (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Germany) ที่ความเร็ว 1800 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4° ซ. ครั้งละ 5 นาที ปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 2×10^7 เซลล์/มล. จากนั้นใช้เซลล์จำนวน 50 ไมโครลิตร ผสมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่าง ๆ ที่ติดฉลากไว้ด้วยสารเรืองแสง (fluorescein isothiocyanate, FITC) ได้แก่ anti-CD4 (anti-human Leu-3a), anti-CD8 (anti-human Leu-2a) และ control mouse immunoglobulin (Becton Dickinson, San Jose, USA) อย่างละจำนวน 20 ไมโครลิตร นำส่วนผสมทั้ง 3 หลอด แช่ไว้ในน้ำแข็งและเก็บไว้ในที่มืด เขย่าทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำมาปั่นล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย RPMI-1640, 5% FCS แล้วผสมเซลล์ที่ล้างแล้วด้วย mounting medium (30% glycerol in PBS) จำนวน 1–2 หยด นำส่วนผสมมาหยดลงบนกระจกสไลด์ ปิดทับด้วย cover slip และ seal รอบ ๆ ด้วยน้ำยาทาเล็บ นำไปนับจำนวนเซลล์ลิมโฟซัยต์ที่เรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง โดยทำการนับจำนวนลิมโฟซัยต์ทั้งหมดอย่างน้อย 200 เซลล์ จำนวนเปอร์เซ็นต์ของ CD4 และ CD8 lymphocyte ที่นับได้ จะนำไปหักลบด้วยจำนวนเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยต์ที่เรืองแสงในสไลด์ที่ย้อมด้วย control mouse immunoglobulin-FITC ซึ่งจะได้ผลลัพธ์เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของ CD4 และ CD8 lymphocyte ที่ถูกต้อง

การคำนวณค่าต่าง ๆ และสถิติที่ใช้ในการทดสอบ

1. ค่า total lymphocyte = (% lymphocyte โดย differential count) X (total white blood cell count) มีหน่วยเป็น เซลล์/มม^3

2. ค่า absolute CD4 lymphocyte = (% CD4 lymphocyte) X (total lymphocyte) มีหน่วยเป็น เซลล์/มม^3

3. ค่า absolute CD8 lymphocyte = (% CD8 lymphocyte) X (total lymphocyte) มีหน่วยเป็น เซลล์/มม^3

4. ค่าสัดส่วนระหว่าง CD4 และ CD8 lymphocyte = (% CD4 lymphocyte)/(% CD8 lymphocyte) หรือ (absolute CD4 lymphocyte) /(absolute CD8 lymphocyte)

5. ใช้ analysis of variance (ANOVA) for one-way classification และ multiple comparisons สำหรับทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าของ parameters ต่าง ๆ ที่ตรวจวัดในกลุ่มของผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ และกลุ่มคนปกติ โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการทดลอง

จากการศึกษาในคนปกติและผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ในระยะต่าง ๆ ได้ค่า parameters ต่าง ๆ ที่ตรวจวัด แสดงไว้ในตารางที่ 2 โดยแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X} \pm SD$) และค่าช่วง (range) ต่ำสุด-สูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติได้ผลดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงค่า p-value ของการทดสอบทางสถิติโดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และ multiple comparisons ซึ่งจะเปรียบเทียบระหว่างค่าของ parameters ต่าง ๆ ที่ทดสอบในกลุ่มคนปกติ และผู้ป่วยโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ซึ่งพบว่า

1. ค่าของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total WBC) ในคนปกติและผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ในระยะต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2. จำนวนเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยต์ (% Lymphocyte) ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ แต่ละระยะ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเทียบกับในคนปกติพบว่าเฉพาะกลุ่ม ARC และกลุ่ม AIDS เท่านั้นที่มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

3. จำนวนของลิมโฟซัยต์ทั้งหมด (Total lymphocyte) ได้ผลเหมือนกับจำนวนเปอร์เซ็นต์ลิมโฟซัยต์ (% Lymphocyte)

4. จำนวนเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 (% CD4 lymphocyte) พบว่าในคนปกติจะได้ค่าที่สูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ทุก ๆ ระยะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ พบว่ากลุ่ม Asymptomatic สูงกว่ากลุ่ม AIDS อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

5. จำนวนเปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD8 (% CD8 lymphocyte) พบว่าในคนปกติจะได้ค่าที่ต่ำกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ทุก ๆ ระยะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

6. จำนวนสัมบูรณ์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD4 (Absolute number of CD4 lymphocyte) พบว่าในคนปกติจะได้ค่าที่สูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ทุก ๆ ระยะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ แต่ละระยะก็มีความแตกต่างกัน ($p<0.05$)

7. จำนวนสัมบูรณ์ของลิมโฟซัยต์ชนิด CD8 (Absolute number of CD8 lymphocyte) พบว่าในคนปกติจะได้ค่าที่สูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์กลุ่ม AIDS ($p<0.05$) และได้ค่าที่ต่ำกว่าในกลุ่ม Asymptomatic ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ARC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

8. ค่าสัดส่วนระหว่าง CD4 และ CD8 lymphocyte (CD4/CD8 ratio) พบว่าในคนปกติจะได้ค่าที่สูงกว่าในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ ทุก ๆ ระยะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ระยะต่าง ๆ แต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่ม Asymptomatic สูงกว่ากลุ่ม AIDS อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

วิจารณ์

การตรวจนับจำนวน CD4, CD8 lymphocyte และ CD4/CD8 ratio มีประโยชน์ในการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ ว่ามีการดำเนินของโรคไปถึงขั้นใด รวมทั้งใช้ในการติดตามผลการรักษา การศึกษาในครั้งนี้โดยใช้วิธี direct immunofluorescence ได้ค่าต่าง ๆ ที่ตรวจวัดในคนปกติ คือ จำนวนลิมโฟซัยต์ทั้งหมด = 2588 ± 744 เซลล์/มม^3 (ช่วง: 1239-4284 เซลล์/มม^3), % CD4 lymphocyte = 38 ± 8 (23-60), %CD8 lymphocyte = 28 ± 7 (17-42), Abs. CD4 lymphocyte = 956 ± 277 (545-1504), Abs. CD8 lymphocyte = 701 ± 252 (348-1416) และ CD4/CD8 ratio = 1.42 ± 0.34 (0.72-2.48) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่รายงานโดย Wasi et al[11] ซึ่งตรวจวัดโดยใช้เครื่อง flow cytometer หรือ fluorescence activated cell sorter (FACS) พบว่าได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงของค่าต่าง ๆ ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ตั้งแต่ไม่มีอาการจนถึงเป็นเอดส์เต็มขั้น จะเห็นว่าจำนวนหรือเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ลิมโฟซัยต์จะเริ่มลดลงอย่างเด่นชัดเมื่อเข้าสู่ระยะ ARC จนถึง AIDS จำนวนหรือเปอร์เซ็นต์ของ CD4 lymphocyte เมื่อเริ่มติดเชื้อโรคเอดส์จะลดต่ำลงกว่าปกติ และลดลงมากขึ้นเมื่อผู้ป่วยมีอาการมากขึ้นซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับรายงานอื่น ๆ[2,6,7,11] ส่วนเปอร์เซ็นต์ของ CD8 lymphocyte เมื่อเริ่มติดเชื้อจะมีค่าสูงกว่าปกติ และเมื่อดูที่จำนวนสัมบูรณ์ของ CD8 lymphocyte จะพบว่าสูงขึ้นเมื่อติดเชื้อและลดลงจนเท่า ๆ กับปกติเมื่อเข้าสู่ระยะ ARC และยิ่งต่ำลงกว่าปกติเมื่อเข้าสู่ระยะ AIDS ซึ่งการที่จำนวนสัมบูรณ์ของ CD8 lymphocyte เริ่มลดลงในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของ CD8 lymphocyte ไม่ได้ลดลงเลยนั้น ก็เป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของจำนวนลิมโฟซัยต์ทั้งหมด จึงทำให้ค่าจำนวนสัมบูรณ์ลดลงตาม[6]

Giorgi และ Detels[6] พบว่าการลดลงของจำนวน CD4 lymphocyte จะเริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มตรวจพบ anti-HIV antibody โดยวิธี ELISA ได้ และจะลดลงไปประมาณ 60% ของจำนวนปกติภายในระยะเวลา 1-1 ปีครึ่ง แล้วจะคงอยู่ในระดับนี้ได้เป็นระยะเวลาหลาย ๆ ปี และภายใน 2 ปีก่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเอดส์จะมีการลดลงของ CD4 lymphocyte อย่างรวดเร็ว ส่วนจำนวนของ T lymphocyte ทั้งหมด (CD3 lymphocyte) พบว่าจะมีจำนวนค่อนข้างคงที่ตลอดระยะของโรค ซึ่งก็เนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนของ CD8 lymphocyte เมื่อมีการติดเชื้อโรคเอดส์

การที่จะใช้ค่าใดเป็นดัชนี ในการที่จะบอกถึงระยะความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุดนั้น จากการศึกษานี้พบว่า ค่าจำนวนสัมบูรณ์หรือเปอร์เซ็นต์ของ CD4 lymphocyte จะบอกถึงพัฒนาการของโรคได้ดีที่สุด นั่นคือจำนวนของ CD4 lymphocyte จะลดลงมากขึ้นเมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้น ซึ่งก็ได้ผลที่สอดคล้องกับหลาย ๆ รายงาน[2,7,12,13]. Yarchoan et al[13] ยังพบอีกว่าผู้ป่วยโรคเอดส์ที่มีระดับของ CD4 lymphocyte น้อยกว่า 50 เซลล์/มม^3 จะเสียชีวิตลงทุกราย โดยมีระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่ได้อีกเฉลี่ย 12.1 เดือน (ช่วง: 7.2-19.4 เดือน) ส่วนค่า CD4/CD8 ratio ในการศึกษาครั้งนี้ก็พบว่าสามารถใช้ช่วยแยกได้ดีระหว่างคนปกติกับผู้ป่วย แต่ไม่สามารถแยกได้ดีระหว่างระยะต่าง ๆ ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อโรคเอดส์ แต่อย่างไรก็ตาม การพิจารณาดูค่าที่ตรวจวัดหลาย ๆ ค่าประกอบกัน ก็ช่วยบอกถึงการดำเนินของโรคได้เช่นกัน โดย Taylor et al[7] พบว่าค่า %CD4

lymphocyte, CD4 number และ CD4/CD8 ratio ให้ผลในการพยากรณ์โรคได้ดีพอ ๆ กัน แต่ค่า %CD4 lymphocyte จะบอกได้ดีกว่าเล็กน้อย เนื่องจากการตรวจวัดในแต่ละครั้งจะได้ค่าที่มีความแม่นยำกว่าเพราะมีตัวแปรที่จะมีผลต่อการวัดและคำนวณน้อยกว่า

การศึกษาในครั้งนี้แม้จะได้ผลการศึกษาเป็นที่น่าพอใจ คือได้ค่าปกติที่ตรวจวัดโดยวิธีนี้ ซึ่งจะเป็นค่าที่ใช้สำหรับอ้างอิงในการตรวจทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นแล้วก็ตาม แต่ในการทำแต่ละครั้งไม่สามารถทำได้ในจำนวนที่มาก ๆ ใช้ขั้นตอนในการทำที่ค่อนข้างนาน ต้องใช้เลือดที่เจาะใหม่ ๆ เพื่อไม่ให้เซลล์ตาย และต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงซึ่งดูด้วยตาอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ค่อนข้างมาก ในปัจจุบันโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยของรัฐและโรงพยาบาลศูนย์ในสังกัดกระทรวงสาธารณสุขเกือบทุกแห่งจะใช้วิธีการตรวจนับด้วยเครื่อง flow cytometer หรือ FACS ซึ่งค่าที่ตรวจวัดได้จะมีความแม่นยำสูงสามารถใช้อ้างอิงได้ทั้งในและต่างประเทศ นอกจากนั้นยังตรวจได้ครั้งละจำนวนมาก ๆ ในเวลาอันรวดเร็วกว่า[14-15] ข้อด้อยของเครื่องมือนี้ก็คือยังมีราคาที่ค่อนข้างแพง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณแก้วใจ คำสุข หน่วยระบาดวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาให้คำปรึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Groopman JE, Molina JM. Nucleoside therapy for HIV infection-some answers, many questions. N Engl J Med 1992; 327:639-641.
2. Phillips AN, Lee CA, Elford J, et al. Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS. Lancet 1991; 337:389-392.
3. Volberding P, Lagakos S, Koch M, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. N Engl J Med 1990; 332: 941-949.
4. Fischl M, Richman D, Hansen N, et al. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic human immunodeficiency virus type I (HIV) infection. A double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med 1990; 112: 727-737.
5. Raulet DH, Eisen HN. Cellular basis for immune responses. In : Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, ed. Microbiology, 4th ed. Singapore: Harper & Row Publishers, 1990: 319-362.
6. Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men : NIAID multicenter AIDS cohort study. Clin Immunol Immunopat 1989; 52: 10-18.
7. Taylor JMG, Fahey JL, Detels R, Giorgi JV. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection : Which to choose and how to use. J AIDS 1989; 2: 114-124.
8. Stites DP. Clinical laboratory methods for detection of cellular immunity. In : Stites DP, Terr AI, ed. Basic and clinical immunology, 7th ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1991: 263-283.
9. Seiverd CE. Hematology for medical technologists, 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1972.
10. Becton Dickinson procedure: Direct immunofluorescence staining of cell surfaces. Becton Dickinson source book section 24. Becton Dickinson immunocytochemistry systems. California, USA.
11. Wasi C, Thepthai C, Sarasombat S, et al. Total lymphocyte and T-cell subpopulations in HIV-infected persons. Asian Pac J Allergy Immunol 1991; 9: 65.
12. Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type I. N Engl J Med 1990; 322:166-172.
13. Yarchoan R, Venzon DJ, Pluda JM, et al. CD4 count and the risk for death in patients infected with HIV receiving antiretroviral therapy. Ann Intern Med 1991; 115: 184-189.
14. Landy A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. AIDS 1990; 4:479-497.
15. โกวิทย์ พัฒนาปัญญาสัตย์. โฟลโซโทเมทรี. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2533; 18 : 81-87.