ภาคผนวก 1

ตาราง ก สรุปข้อดีข้อเสียของวิธีต่างๆ ในการหาเชื้อ RSV

| วิธีที่ใช้ทดสอบ | ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|---|---|
| 1. Serology | 1. สามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ได้แม้ผู้ป่วยมาโรงพยาบาลช้า<br>2. เหมาะสำหรับการศึกษาในแง่ของระบาดวิทยา | การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเด็กเกิดช้าจากรายงานของ kadiz และคณะ[54] ซึ่งตรวจหา IgM ด้วยวิธีIndirect fluorescent antibody พบว่าถ้าเจาะเลือดในวันที่ 0-4 หลังมีอาการจะมีความไวเพียง ร้อยละ 34 เท่านั้น |
| 2. Isolation<br>2.1 tube culture (HEp-2 cell) | 1. เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง<br>2. เชื้อที่แยกได้สามารถเก็บไว้ศึกษาต่อไปได้ | 1. มีความไวไม่สูงนักเนื่องจากเชื้อตายง่าย<br>2. ใช้เวลานาน (1-2 สัปดาห์) และต้องอาศัยความชำนาญในการตรวจดู CPE |
| 2.2 shell vial technique | 1. เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี tube culture<br>2. ใช้เวลาในการตรวจหาไวรัสน้อยคือใช้เวลาเพียง 18 ชม. หลังการ inoculate เชื้อ | |
| 3. การย้อมสิ่งส่งตรวจจาก nasopharynx ด้วย fluorescent antibody (FA) | 1. เป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อย (Rapid method) ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV<br>2. พบว่ามีความไวสูงกว่าการแยกเชื้อด้วยวิธี tube culture[56] | 1. การอ่านผลต้องอาศัยผู้ชำนาญ<br>2. การเก็บตัวอย่างต้องได้จำนวนเซลล์ nasopharynx มากพอ |

ตาราง ข สรุปเชื้อไข้หวัดใหญ่ Type A ระหว่างปี พ.ศ. 2522-2529 ประเทศไทย

| พ.ศ. | เชื้อไข้หวัดใหญ่ที่ระบาด (Isolated Type) | |
|---|---|---|
| | A/H1 N1 | A/H3 N2 |
| 2522 | | 1. A/Bangkok/1/79 |
| | | 2. A/Bangkok/2/79 |
| 2523 | | 1. A/Bangkok/2/79 |
| | | 2. คล้าย A/Bangkok/1/79 |
| | | และ A/Texas/1/77 |
| 2524 | 1. A/USSR/90/77 | 1. คล้าย A/Bangkok/1/79 |
| | 2. คล้าย A/USSR/90/77 | และ A/Texas/1/77 |
| | และ A/Brazil/11/79 | 2. A/Bangkok/1/79 |
| 2525 | 1. A/USSR/90/77 | 1. A/Bangkok/1/79 |
| | 2. คล้าย A/USSR/90/77 | 2. A/Bangkok/1/79 |
| | และ A/Brazil/11/79 | และ A/Texas/1/77 |
| 2526 | 1. A/Hong Kong/2/82 | |
| | 2. A/Chile/1/83 | |
| 2527 | | 1. A/Philippines/2/82 |
| | | 2. A/Bangkok/2/82 |
| 2528 | | 1. A/Philippines/2/82 |
| | | 2. A/Bangkok/2/82 |
| | | 3. A/Oregon/4/80 |
| | | 4. A/Caen/1/84 |
| 2529 | 1. A/Taiwan/1/86 | |
| | 2. A/Singapore/6/86 | |

ตาราง ค สรุปข้อดีข้อเสียของวิธีต่างๆ ในการหาเชื้อไข้หวัดใหญ่

| วิธีที่ใช้ทดสอบ | ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|---|---|
| 1. Serology (การตรวจหา antibody) | 1. การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อทำได้ถึงแม้ว่าผู้ป่วยจะมาโรงพยาบาลช้า<br>2. เหมาะสมสำหรับศึกษาในแง่ระบาดวิทยา | 1. การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเด็กเกิดช้า จึงทำให้เกิดผลลบลวงได้เนื่องจากในทางปฏิบัติส่วนใหญ่จะได้ serum เพียงครั้งเดียว<br>2. ทราบข้อมูลช้าอาจไม่ทันต่อการป้องกันและรักษา |
| 2. Isolation<br>2.1 โดยการฉีดเข้าไข่ไก่ฟัก | 1. เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง<br>2. สามารถตรวจหา type และ subtype ได้<br>3. สามารถเก็บเชื้อที่แยกได้ไว้ศึกษาต่อไป | 1. การฉีดตัวอย่างเข้าในไข่ไก่ฟักต้องอาศัยความชำนาญ<br>2. ต้องใช้ไข่ไก่ฟัก<br>3. การ identify เชื้ออาศัย 2 ขั้นตอนคือ ใช้ Hemadsorption เพื่อดูว่าเป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่หรือไม่และทำ neutralization test เพื่อดู type และ subtype |
| 2.2 การเพาะเลี้ยงในเซลล์ MDCK โดยวิธีดั้งเดิม | 1. เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง<br>2. ใช้ cell culture ซึ่งทำได้สะดวกเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดเวลาในห้องปฏิบัติการ<br>3. เชื้อที่แยกได้สามารถนำไปตรวจหา type และ subtype ได้<br>4. สามารถเก็บเชื้อที่แยกได้นี้ไว้ศึกษาต่อไปได้ | 1. ใช้เวลาในการตรวจหาไวรัสนาน (3-4 วัน)<br>2. การ identify เชื้ออาศัย 2 ขั้นตอนเช่นเดียวกับไข่ไก่ฟัก |
| 2.3 การเพาะเลี้ยงในเซลล์ MDCK โดยวิธี shell vial technique | 1. ใช้เวลาในการตรวจหาไวรัสสั้น (18-24 ชม. หลังการ inoculate เชื้อ)<br>2. สามารถบอกว่าเป็น Influenza A ได้ โดยการย้อมดูด้วย Fluorescent antibody | 1. มีความไวน้อยกว่าวิธีที่ 2.2 ถ้าย้อมดูด้วย monoclonal antibody แต่ถ้าใช้ polyclonal antibody อาจทำให้ sensitivity เพิ่มมากขึ้น |

ตาราง ค (ต่อ) สรุปข้อดีข้อเสียของวิธีต่างๆ ในการหาเชื้อไข้หวัดใหญ่

| วิธีที่ใช้ทดสอบ | ข้อดี | ข้อเสีย |
|---|---|---|
| 3. การย้อมสิ่งส่งตรวจจาก nasopharynx ด้วย fluorescent antibody (FA) | เป็นวิธีที่ใช้เวลาน้อย (rapid method) ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ | 1. มีความไวน้อยกว่าการเพาะแยกเชื้อ<br>2. การอ่านผลต้องอาศัยผู้ชำนาญ<br>3. การเก็บตัวอย่างต้องให้ได้เซลล์เยื่อบุผนังบริเวณ nasopharynx มากพอ |

## ภาคผนวก 2

ข้อมูลที่จะสอบถามจากผู้ปกครองหรือตัวผู้ป่วย, การตรวจร่างกายและการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

ชื่อ.....นามสกุล.....HN.....

อายุ.....ปี.....เดือน

ภูมิลำเนา ตำบล.....อำเภอ.....จังหวัด.....

วัน/เดือน/ปีที่มาโรงพยาบาล วันที่.....เดือน.....พ.ศ...

1. อาการที่นำผู้ป่วยมาโรงพยาบาล

| | | | |
|---|---|---|---|
| ( ) ไข้ | ( ) ปวดศีรษะ | ( ) เบื่ออาหาร | ( ) หายใจเร็ว |
| ( ) หนาวสั่น | ( ) ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ | ( ) ไอแห้งๆ | ( ) หายใจอกบุ๋ม |
| ( ) ไอมีเสมหะขาว | ( ) จาม | ( ) น้ำมูกใส | ( ) หายใจเสียงดัง |
| ( ) คัดจมูก | ( ) เจ็บคอ | ( ) เสียงแหบ | ( ) ไอมีเสียงเสมหะในคอ |
| ( ) เขียว | ( ) หยุดหายใจ | | |

2. การรักษาก่อนมาโรงพยาบาล

ยาลดไข้ ( ) ได้ ครั้งสุดท้าย.....ชั่วโมง ก่อนมาโรงพยาบาล

( ) ไม่ได้

ยาแก้อักเสบ ( ) ได้ เป็นเวลา.....วัน ก่อนมาโรงพยาบาล

( ) ไม่ได้

3. มีบุคคลภายในบ้านที่มีอาการติดเชื้อทางเดินหายใจ ( ) มี ( ) ไม่มี

4. การตรวจร่างกาย

อุณหภูมิ.....° ซ วัดทาง ( ) ปาก ( ) ทวารหนัก

| | | | |
|---|---|---|---|
| Nasal discharge | ( ) watery | ( ) mucous | ( ) no |
| Nasal injection/edema | ( ) yes | ( ) no | |
| Injected pharynx | ( ) yes | ( ) no | |
| Mucous postnasal discharge | ( ) yes | ( ) no | |
| Cervical adenitis | ( ) yes | ( ) no | |
| Serous otitis media | ( ) yes | ( ) no | |
| | ( ) cannot be examed | | |
| Stridor | ( ) yes | ( ) no | |
| Hoarsness | ( ) yes | ( ) no | |
| Barking cough | ( ) yes | ( ) no | |
| Dyspnea | ( ) flaring of ala nasi | | |
| | ( ) retraction | ( ) no | |
| Crepitation | ( ) yes | ( ) no | |

Wheezing ( ) yes ( ) no

Rhonchi ( ) yes ( ) no

ผลการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ

5.1 CBC ( ) ทำ ( ) ไม่ทำ

ถ้าทำผล WBC ( ) <5,000 ( ) 5,000-10,000

( ) 10,000-15,000 ( ) >15,000

PMN ( ) >80% ( ) <80%

Band ( ) ไม่มี ( ) <5% ( ) 5-10% ( ) >10%

Lymph ( ) >80% ( ) <80%

5.2 Hemoculture ( ) ทำ ( ) ไม่ทำ

ถ้าทำผล ( ) ขึ้นเชื้อ..... ( ) ไม่ขึ้นเชื้อ

5.3 Endotracheal suction culture ( ) ทำ ( ) ไม่ทำ

ถ้าทำผล ( ) ขึ้นเชื้อ..... ( ) ไม่ขึ้นเชื้อ

5.4 ผลการตรวจ Chest X-ray ( ) ทำ ( ) ไม่ทำ

ถ้าทำผล ( ) มี Perihilar infiltration

( ) มี Hyperaeration

( ) มี Patchy infiltration at.....

( ) ปกติ ( ) อื่นๆ.....

6. ผลการตรวจทางไวรัส

6.1 ไข้หวัดใหญ่

| วิธีการ | ผลการแยกเชื้อ | | ชนิดของไวรัสจากการ | ผลการ Identify |
|---|---|---|---|---|
| | ผลบวก | ผลลบ | ย้อมด้วย Polyclonal Ab | ที่สถาบันวิจัยไวรัส |
| Isolation<br>1. conventional<br>2. shell vial | | | | |
| | ผลการตรวจด้วย polyclonal | | | |
| ย้อมหา Ag จาก | ตรวจพบ | | ตรวจไม่พบ | Inadequate cell |
| สิ่งส่งตรวจโดยตรง | | | | |

6.2 RSV

| วิธีการ | ผลการตรวจด้วย polyclonal | | |
|---|---|---|---|
| | ตรวจพบ | ตรวจไม่พบ | Inadequate cell |
| Isolation<br>(shell vial)<br>ย้อมหา Ag จาก<br>สิ่งส่งตรวจโดยตรง | | | |

## ภาคผนวก 3

1. วัสดุ น้ำยา และสารเคมีที่ใช้

1. เซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1.1 HEp-2 cell line เป็นเซลล์มะเร็งหลอดลม (carcinoma of larynx) มีแหล่งที่มาจากคนสำหรับเพาะแยกเชื้อ RSV

1.2 MDCK cell line (Madin Darby Canine Kidney) เป็นเซลล์จากไตของสำหรับเพาะแยกเชื้อ Influenza virus

2. Seed virus ได้จากกรมวิทยาศาสตร์ มี 3 ชนิด คือ

2.1 Respiratory Syncytial virus (RSV : long strain)

2.2 Influenza A virus (H3N2)

2.3 Influenza B virus (Yamagaters)

3. น้ำยาที่ใช้เลี้ยงเซลล์เพาะแยกเชื้อไวรัส

Minimum Essential Media (MEM) (GIBCO, Grand Island Ny, U.S.A.)

Fetal Caft serum (FCS) (Flow, North Ryde, Australia)

HEPES : N-2-hydroxyethlpiperazine-N-2-ethansulfonic (Sigma, Mo, USA)

Trypsin 1:250 (Difco, USA)

L-Glutamine (Gibco, USA)

BSA fraction V (Sigma, USA)

EDTA : Disodium ethylenediamine tetraacetate dihydrate

Powder (Sigma, USA)

D-biotin & VilaminH (Sigma USA)

Trypsin Acetylate : Acetythypsin from Bovine Pancrase type

V-S (Sigma, USA)

TC Vitamin (Sigma, USA)

Fobic acid : Pleroylglutamic acid (WAKO pure chemical industric Ltd. Japan)

Eagle's MEM (Nissui Pharmaceutical Co LTD., Japan)

Amphotericin B (Squibb & Son, Inc, USA)

Penicillin (Dumex, Bangkok, Thailand)

Streptomycin (Thai Meiji, Bangkok, Thailand)

4. น้ำยาสำหรับ Indirect Immunofluorescence (IFA)

Anti-Respiratory Syncytial Virus, rabbit IgG fraction

(B 344) (Dako, Glostrup, Denmark)

Fluorescein conjugated swine immunoglobulin to rabbit immunoglobulin (F 205)

(Dako, Glostrup, Denmark)

IMAGENTM Influenza virus A and B kit (K 6105) (Dako Denmark)

5. สารเคมี

Acetone, AR grade (BDH, England)

Disodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4$) (E.Merck, Darmstadt,W. Germany)

Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (BDH, England)

Potassium chloride (KCl) (E.Merck, Darmstadt, W. Germany)

Sodium chloride (NaCl) (E.Merck, Darmstadt, W.Germany

di-Potassium hydrogen phosphate ($K_2HPO_2$) (E.Merch, Darmstadt, W.Germany)

Tween 80 (Sigma, Mo, USA)

II. การเตรียมน้ำยาต่างๆ

1. น้ำยาสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 Fetal caft serum : FCS

inactivate ที่ 56°C นาน 30 นาที แบ่งใส่ tube ละ 10 ml เก็บที่ -20°C

1.2 HEPES buffer 1 M

| | |
|---|---|
| HEPES | 4.7124 g |
| Deionized distilled water | 20 ml |

กรองผ่าน filter 0.22 um เก็บที่ 4°C

1.3 7.5% $NaHCO_3$

| | |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 7.5 g |
| Deionized distilled water | 100 ml |

autoclave เก็บที่ 4°C

1.4 0.04% trypsin in EDTA (in PBS (-) )

| | |
|---|---|
| 1% trypsin | 4 ml |
| 1 : 5,000 EDTA in PBS (-) | 96 ml |

เก็บที่ 4°C

1.5 1% trypsin

trypsin 1 gm

PBS(-) 100 ml

mix ให้เข้ากัน กรองผ่าน filter 0.22 μm

แบ่งเก็บที่ -20°C

1.6 1 : 5,000 EDTA in PBS(-)

EDTA 0.2 gm

PBS(-) 1,000 ml

mix ให้เข้ากัน autoclave เก็บที่ 4°C

1.7 PBS(-) 10x free form $Ca^{++}$ และ $Mg^{++}$

NaCl 80 gm

$Na_2HP_4 \cdot 2H_2O$ 14.4 gm

$KH_2PO_4$ 2.0 gm

KCl 2.0 gm

Deionized distilled water 1000 ml

autoclave 121°C 20 min เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ก่อนใช้เจือจางเป็น 10 เท่า ด้วย deionized distilled water

และปรับ pH เป็น 7.4 autoclave ที่ 121°C 20 นาที

และเก็บที่ 4°C

1.8 Penicillin G 20,000 μ/ml (stock solution)

Sodium penicillin G (powder) 1,000,000 U

Deionized distilled water (sterile) 50 ml

แบ่งใส่หลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C

1.9 Streptomycin, 20,000 μ/ml (stock solution)

Streptomycin (powder) 1 gm

Deionized distilled water(sterile) 50 ml

แบ่งใส่หลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C

1.10 Fungizone, 200 μg/ml

Amphotericin B 50 mg/vial

Deionized distilled water (sterile) 250 ml

แบ่งใส่หลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C

1.11 Folic acid

| | |
|---|---|
| Folic acid | 0.03 gm |
| Deionized distilled water | 50 ml |

กรองผ่าน filter 0.22 um แบ่งเป็นหลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C

1.12 d-Biotin

| | |
|---|---|
| d-biotin crystalline | 0.05 gm |

กรองผ่าน filter 0.22 um แบ่งเป็นหลอดเล็กๆ เก็บที่ -20°C

1.13 17.5% Bovine albumin

| | |
|---|---|
| Heat-inactivated FCS | 2.0 ml |
| Penicillin, 20,000 μ/ml | 5.0 ml |
| Streptomycin 20,000 μg/ml | 5.0 ml |
| Amphotericin B 200 μg/ml | 1.0 ml |
| PBS pH 7.4 จนครบ | 100 ml |

แบ่งใส่หลอดก้นแหลมหลอดละ 2.5 ml เก็บที่ 4°C

1.17 Transport media for Influenza virus (throat swab)

| | |
|---|---|
| Penicillin, 20,000 μ/ml | 5.0 ml |
| Streptomycin 20,000 μg/ml | 5.0 ml |
| Amphotericin B 200 μg/ml | 1.0 ml |
| 3% Beef extract จนครบ | 80 ml |

แบ่งใส่หลอดก้นแหลมหลอดละ 2.5 ml เก็บที่ 4°C

1.18 Growth media for HEP-2 cell

| | |
|---|---|
| MEM (Nissui) 10x | 10 ml |
| Heat-inactivated FCS | 10 ml |
| 3% L-glutamine | 1.5 ml |
| Penicillin , 20,000 μ/ml | 1.0 ml |
| Streptomycin 20,000 μg/ml | 1.0 ml |
| Amphotericin B 200 μg/ml | 1.0 ml |
| 1 M HEPES | 0.5 ml |
| 7.5% $NaHCO_3$ | 1.0 ml |

Deionized distilled water; sterile to 100 ml

pH 7.2-7.4 เก็บที่ 4°C

1.19 Growth media for RSV

| | |
|---|---|
| MEM (Nissui) 10x | 10 ml |
| Heat-inactivated-FCS | 2 ml |
| 3% L-glutamine | 1.5 ml |
| Penicillin 20,000 μ/ml | 1.0 ml |
| Streptomycin 20,000 μg/ml | 1.0 ml |
| Amphotericin B 200 μg/ml | 1.0 ml |
| 1 M NEPES | 0.5 ml |
| 7.5% NaHCO3 | 1.0 ml |
| Deionized distilled water; sterile to | 100 ml |

pH 7.2-7.4 เก็บที่ 4°C

1.20 Growth media for MDCK

| | |
|---|---|
| MEM 10x (Gibco) | 10 ml |
| Heat-inactivated FCS | 10 ml |
| Penicillin 20,000 μ/ml | 1.0 ml |
| Streptomycin 20,000 μg/ml | 1.0 ml |
| Amphotericin B 200 μg/ml | 1.0 ml |
| 1 M HEPES | 0.5 ml |
| 7.5% $NaHCO_3$ | 1.0 ml |

pH 7.2-7.4 เก็บที่ 4°C

1.21 Growth media for Influenza Virus

| | |
|---|---|
| MEM 10x (Gibco) | 10 ml |
| TC Vitamine | 0.1 ml |
| Fobic a | 0.1 ml |
| D-biotin | 0.1 ml |
| AC-Trypsin | 0.5 ml |
| 17.5% Bovine albumin | 1.2 ml |
| HEPES | 0.5 ml |
| 7.5% $NaHCO_3$ | 0.5 ml |
| Deionized distilled water sterile to | 100 ml |

เก็บที่ 4°C

1.22 Mounting buffer

| | |
|---|---|
| gluceral | 90 ml |
| PBS pH 7.4 | 10 ml |

ปรับ pH ประมาณ 8.0

เก็บที่ 4°C

1.23 2% tween 80 (conjugate buffer)

| | |
|---|---|
| tween 80 | 0.2 ml |
| PBS pH 7.4 | 10 ml |

เก็บที่ 4°C