4. ผลการศึกษาการติดเชื้อ RSV

4.1 จำนวนผู้ป่วยระหว่างเดือนมีนาคม 2535 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2536 ที่เลือกเข้าการศึกษามีทั้งสิ้น 139 คน มีสัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิง เท่ากับ 1.4 : 1 ผู้ป่วยที่ตรวจพบมีการติดเชื้อ RSV มี 31 คน คิดเป็นร้อยละ 22.3 ผู้ที่ติดเชื้อ RSV มีสัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1.8 : 1

4.2 ฤดูกาล ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV พบตั้งแต่เดือนสิงหาคม-ธันวาคม โดยพบมากที่สุดในเดือนตุลาคม ผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อ RSV พบได้ตลอดทั้งปีแต่ก็พบบ่อย ในช่วงเดือน สิงหาคม-ธันวาคม ของปีเช่นกัน (แผนภูมิที่ 1) การกระจายของผู้ป่วยตามฤดูกาลของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P=0.15)

4.3 อายุของผู้ป่วย ผู้ป่วยที่พบเชื้อ RSV มีอายุเฉลี่ย 8.2 ± 7 เดือน น้อยกว่าผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบเชื้อซึ่งมีอายุเฉลี่ย 15.6 ± 12.8 เดือน การกระจายของอายุผู้ป่วยแสดงในตารางที่ 1 ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV พบว่าเป็นผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่ากลุ่มอายุอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 6 เดือน กับกลุ่มอายุอื่นๆ พบว่าผู้ป่วยที่อายุน้อยกว่า 6 เดือนมีโอกาสติดเชื้อ RSV มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.01) โดยมี odds ratio = 3.05 (95%CI = 1.24-7.55) และ relative risk = 2.30 (95%CI = 1.26-4.23)

4.4 อาการและอาการแสดงทางคลินิก แสดงในตารางที่ 2 และ 3 ผู้ป่วยติดเชื้อ RSV มีอาการหอบรุนแรงจนมารดาหรือผู้ดูแลสังเกตุได้ว่ามีหน้าอกบุ๋มมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.04) ส่วนอาการและอาการแสดงอื่นๆ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

4.5 ผลทางห้องปฏิบัติการ

4.5.1 การตรวจนับเม็ดเลือดขาว แสดงในตารางที่ 4 ผู้ป่วย RSV ส่วนใหญ่จะมีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงกว่าปกติ แต่ชนิดของเม็ดเลือดขาวอยู่ในเกณฑ์ปกติ ผลการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวของสองกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าร้อยละของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลในกลุ่มที่พบเชื้อ RSV สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.016)

4.5.2 การตรวจภาพถ่ายรังสีทรวงอก แสดงในตารางที่ 5 ผู้ป่วยติดเชื้อ RSV 18 รายคิดเป็นร้อยละ 62.1 มีภาพรังสีทรวงอกเป็นแบบ perihilar infiltration ในจำนวนนี้มี hyperaeration ร่วมด้วย 10 ราย พบ patchy infiltration หรือ lobar infiltration 11 ราย (ร้อยละ 37.9)

4.5.3 ผลการเพาะเชื้อจากเลือดพบเชื้อ *Hemophilus influenzae* ในกลุ่มที่พบเชื้อ RSV 1 ราย

4.5.4 การตรวจทางไวรัส ตรวจพบเชื้อ RSV ในผู้ป่วย 31 คน คิดเป็นร้อยละ 22.3 ผู้ป่วยที่เก็บ nasopharyngeal secretion และสามารถตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ทั้ง 2 วิธีคือวิธี IFA และ shell vial มีจำนวน 134 ราย ผลจากการเปรียบเทียบวิธีการ 2 วิธีในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV แสดงในตารางที่ 6 โดยวิธี IFA ให้ผลบวก 23 ราย ผลลบ 111 ราย และวิธี shell vial ให้ผลบวก 27 ราย ผลลบ 107 ราย วิธีทั้งสองให้ผลตรงกัน 22 ราย ผลลบตรงกัน 106 ราย มีผู้ป่วย 1 รายที่ให้ผลบวกกับวิธี IFA แต่ให้ผลลบกับ shell vial และเมื่อเปรียบเทียบกับ shell vial แล้ว วิธี IFA มีความไวในการตรวจพบเชื้อ RSV 81.5% และมีความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัย RSV 99.1%

5. ผลการศึกษาการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่

5.1. จำนวนผู้ป่วยระหว่างเดือนมิถุนายน 2538 ถึงเดือนกันยายน 2538 ที่เลือกเข้าการศึกษามีทั้งสิ้น 172 คน มีสัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1.4 ต่อ 1 ผู้ป่วยตรวจพบว่าติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มี 30 คน คิดเป็นร้อยละ 17.4 เป็นเชื้อไข้หวัดใหญ่ชนิด A 28 คนและชนิด B 2 คน ผู้ที่ติดเชื้อมีสัดส่วนเพศชายต่อเพศหญิงเท่ากับ 1.3 ต่อ 1

5.2. ฤดูกาล ตรวจพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ในเดือนกรกฎาคม 18 คนและเดือนสิงหาคม 12 คน (ตารางที่ 7)

5.3. อายุ ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่มีอายุเฉลี่ย 61 $\pm$ 30.6 เดือน ผู้ที่ตรวจไม่พบเชื้อไข้หวัดใหญ่มีอายุเฉลี่ย 52.8 $\pm$ 33.4 เดือน

5.4. อาการและอาการแสดงทางคลินิก แสดงในตารางที่ 8 และ 9 ผู้ป่วยที่ติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ให้ประวัติว่าคนในบ้านมีอาการติดเชื้อของทางเดินหายใจคล้ายกับผู้ป่วยและอาการเจ็บคอมากกว่า ในกลุ่ม

ที่ตรวจไม่พบเชื้อไข้หวัดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่า P-value <0.001 และเท่ากับ 0.04 ตามลำดับ สำหรับอาการแสดงทางคลินิกของผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มพบว่าไม่แตกต่างกัน

5.5. การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B

5.5.1 ผลการพัฒนาวิธีการตรวจด้วยวิธี shell vial

1.1 การศึกษาความแรงของการปั่น

ผลการศึกษาความแรงของการปั่นที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา influenza A virus และ influenza B virus ได้แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากตารางจะเห็นได้ว่าเมื่อไม่ปั่น (ความแรง = 0) จะพบไวรัสที่ความเจือจางเป็น 10^{-5} และ 10^{-4} แต่เมื่อเพิ่มความแรงปั่นเป็น 700, 1500, และ 3000 xg จะพบไวรัสที่ความเจือจางสูงขึ้น สำหรับไวรัส influenza A พบว่า ที่ 1500 xg และ 3000xg จะได้ผลใกล้เคียงกัน สำหรับ influenza B virus ที่ความแรง 700 xg, 1500 xg และ 3000 xgได้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกความแรงที่ 1500 xg เป็นความแรงที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ครอบคลุมทั้ง influenza A และ influenza B virus

1.2 การศึกษาระยะเวลาของการปั่น

เมื่อทดลองเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ปั่นระหว่างเวลา 30 นาที 60 นาที 90 นาที และ 120 นาที ตามลำดับ ผลที่ได้ดังแสดงตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4 สำหรับ influenza A และ influenza B จากตารางพบว่าการตรวจพบไวรัสจะไม่แตกต่างกันมากนั้นในเวลาที่ใช้ปั่นต่างๆ กัน ทั้ง influenza A และ influenza B แต่ใน influenza A จะเห็นว่าเมื่อใช้เวลาปั่นนาน 30 นาที แม้ว่าจะพบไวรัสได้ที่ความเจือจางเดียวกับเวลาอื่นๆ แต่จำนวน foci ของไวรัสที่พบจะมีจำนวนต่ำกว่าที่พบที่เวลา 60 นาที 90 นาที และ 120 นาที ดังนั้นเพื่อให้การตรวตพบไวรัสมีความไวที่สุดจึงเลือกเวลาในการปั่นที่ 60 นาที ซึ่งเวลาเท่านี้ผลการตรวจพบไวรัส influenza B ก็ให้ผลดีที่สุดด้วยเช่นกัน

1.3 การศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการปั่น

โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ใช้ในการปั่นที่แตกต่างกันคือ 4°ซ, 25°ซ และ 37°ซ ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 6 จากตาราง จะเห็นว่าไม่ความแตกต่างกันในการตรวจพบ foci ของไวรัสทั้ง 2 ชนิด เมื่อใช้อุณหภูมิที่ต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงความสะดวกของการใช้งานแล้ว การปั่นที่อุณหภูมิ 25°ซ หรือที่อุณหภูมิห้องนั้นจะมีความสะดวกมากกว่า ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการตรวจนี้คือ อุณหภูมที 25°ซ

1.4 ศึกษาระยะเวลาในการตรวจพบแอนติเจนของไวรัสในเซลล์

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วยวิธี shell vial ตามสภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้จากของ 1.1, 1.2 และ 1.3 แล้ว นำเซลล์บนแผ่นแก้วมาย้อม immunofluorescence เพื่อดูการปรากฏแอนติเจนของไวรัสเพื่อที่จะใช้เลือกเป็นเวลาที่เหมาะสมในการ incubate หลังจากที่ไวรัส absorp เข้าเซลล์แล้ว เวลาที่ใช้incubate คือ เวลา 6 ชม. 12 ชม., 24 ชม., 36 ชม., 48 ชม. และ 72 ชม. ตามลำดับ ซึ่งผลของการย้อม immunofluorescence ด้วย monoclonal antibody ต่อไวรัส influenza A และ influenza B แล้วพบว่าที่ 24 ชม. จะพบเซลล์ที่ติดเชื้อเรืองแสงเป็นเซลล์เดี่ยวๆ กระจายอยู่ทั่วไป ที่ 36

และ 48 ชม. จะพบลักษณะเดียวกันแต่การเรืองแสงเข้มและชัดเจนกว่าส่วนที่ 72 ชม. จะเห็นการเรืองแสงของเซลล์เป็นกลุ่มๆ และมีเซลล์บางส่วนหลุดจากแผ่นแก้ว ดังนั้นเวลาของการ incubate ไวรัสที่เหมาะสมในการตรวจพบแอนติเจนของไวรัสทั้งสองคือ เวลาในช่วง 36-48 ชม.

จากผลที่กล่าวมาทั้งหมดนี้พอสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพาะแยกเชื้อ influenza A และ influenza B virus ด้วยวิธี shell vial คือการ adsorp ไวรัสโดยการปั่นที่ 1500 xg ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 1 ชม. และ incubate เพื่อให้ไวรัสเพิ่มจำนวนและตรวจหาแอนติเจนของไวรัส เป็นเวลา 36-48 ชม. โดยนำมาย้อมด้วย monoclonal antibody ต่อ influenza A และ influenza B เพื่อยืนยันผล

5.5.2. ผลการตรวจหา Influenza virus จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

จากการเพาะแยกเชื้อ influenza virus ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในเซลล์โดยวิธีดั้งเดิมพบว่าสามารถตรวจพบ hemaglutination screening positive ใน culture media ได้ในวันที่ 3 หลังการเพาะแยกเชื้อโดยเฉลี่ยแล้วจะพบในราววันที่ 5-6 หลังการเพาะเลี้ยง

จากการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส influenza A และ B ในเด็กจำนวน 306 ราย จากตัวอย่าง 2 กลุ่มคือ ผู้ป่วยเด็กที่เก็บสิ่งส่งตรวจเป็น nasopharyngeal secretion ระหว่างเดือนมีนาคม 2535 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2536 จำนวน 134 ราย และกลุ่มที่ 2 เก็บสิ่งส่งตรวจเป็น Throat swab ระหว่างเดือน มิถุนายน 2538 ถึง กันยายน 2538 จำนวน 172 ราย โดยตรวจด้วยวิธี IFA เพาะแยกเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิมและเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี shell vial ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 โดยที่ตรวจด้วยวิธี IFA ได้ผลบวก 6 ราย ผลลบ 300 ราย ตรวจด้วยวิธีดั้งเดิมได้ผลบวก 34 ราย ผลลบ 272 ราย ส่วนการตรวจด้วยวิธี shell vial ได้ผลบวก 39 ราย ผลลบ 267 ราย ซึ่งในผลบวกเหล่านี้มีเพียง 2 รายที่เป็น influenza B นอกนั้นเป็น influenza A ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบผลบวกที่ได้จากการตรวจด้วยวิธีทั้ง 3 พบว่าวิธี shell vial ให้ผลบวกมากที่สุด ส่วนวิธี IFA ให้ผลบวกน้อยที่สุด และผลบวกวิธี shell vial สามารถถือเป็นผลบวกจริงได้เนื่องจากเป็นวิธีเพาะแยกเชื้อการตรวจยืนยันเชื้อนี้ด้วย monoclonal antibody ที่เฉพาะต่อไวรัส influenza A และ influenza B

เมื่อเปรียบเทียบการแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีดั้งเดิมและวิธี shell vial พบว่า ให้ผลบวกตรงกัน 34 ราย และวิธี shell vial ให้ผลบวกมากกว่าวิธีดั้งเดิม 5 ราย และไม่มีผู้ป่วยรายใดที่ให้ผลลบกับวิธี shell vial แล้วให้ผลบวกด้วยวิธีดั้งเดิม ดังแสดงในตารางที่ 8 จากการทดลองนี้ พบว่าวิธี shell vial เป็นวิธีที่ไม่พบมีผลลบปลอมและเมื่อเปรียบเทียบกับการแยกเชื้อแบบดั้งเดิมแล้ว การแยกเชื้อแบบดั้งเดิมจะมีความไวในการตรวจแยกเชื้อไวรัส 87.2% และความจำเพาะ 100%

เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจระหว่าง IFA กับ shell vial พบว่า IFA ให้ผลบวก 6 รายโดยในผู้ป่วยกลุ่มที่ 1 ให้ผลบวก 2 ราย โดยให้ผลตรงกันกับ shell vial 1 ราย และไม่ตรงกัน 1 รายโดยที่ IFA ได้ผลบวกแต่ shell vial ให้ผลลบส่วนในผู้ป่วยกลุ่มที่ 2 ให้ผลบวกตรงกัน 4 รายเป็น influenza virus A 3 รายและ influenza B 1 ราย ในกลุ่มนี้ไม่มีผู้ป่วยรายใดที่ให้ผลบวกกับ IFA และ ให้ผลลบ

กับ shell vial ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ shell vial แล้ววิธี IFA มีความไวในการตรวจพบเชื้อไวรัส 12.8% มีความจำเพาะเป็น 99.6% ดังแสดงในตารางที่ 18

5.6. ผลการตรวจหาเชื้อ Respiratory Syncytial virus จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย

จากการเปรียบเทียบวิธีการ 2 วิธีในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV นั้นคือ IFA และวิธี shell vial โดยตรวจในผู้ป่วยเด็กกลุ่มแรกที่เก็บ nasopharyngeal secretion ระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ 2535 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ 2536 จำนวน 134 ราย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 โดยวิธี IFA ให้ผลบวก 23 ราย ผลลบ 111 ราย และวิธี shell vial ให้ผลบวก 27 ราย ผลลบ 107 ราย วิธีทั้งสองให้ผลตรงกัน 22 ราย ผลลบตรงกัน 106 ราย มีผู้ป่วย 1 รายที่ให้ผลบวกกับวิธี IFA แต่ให้ผลลบกับ shell vial และเมื่อเปรียบเทียบกับ shell vial แล้ว วิธี IFA มีความไวในการตรวจพบเชื้อ RSV 81.5% และมีความจำเพาะในการตรวจวินิจฉัย RSV 99%