3. วิธีการวิจัย

3.1 การเลือกผู้ป่วย (inclusion criteria)

3.1.1 การเลือกผู้ป่วยเข้าศึกษาการติดเชื้อ RSV ผู้ป่วยเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์แบบผู้ป่วยในระหว่างเดือนมีนาคม 2535 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2536 ที่มีอายุแรกเกิดถึง 5 ปี ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีประวัติไข้สูงเฉียบพลันภายใน 3 วัน และ/หรือ ตรวจพบว่าอุณหภูมิร่างกายมากกว่า 37.8°C (วัดทางปาก) หรือมากกว่าหรือเท่ากับ 38.3°C (วัดทางทวารหนัก)

2. มีอาการและอาการแสดงของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่างแบบเฉียบพลัน

3.1.2 การเลือกผู้ป่วยเข้าศึกษาการติดเชื้อไข้หวัดใหญ่ A และ B ผู้ป่วยเด็กที่อายุน้อยกว่า 15 ปี ที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ทั้งแบบผู้ป่วยนอกและแบบผู้ป่วยใน ระหว่างเดือน มิถุนายน-กันยายน พ.ศ. 2538 โดยมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีประวัติไข้สูงเฉียบพลันภายใน 3 วัน และ/หรือ ตรวจพบว่าอุณหภูมิร่างกายสูงกว่า 37.8°C (วัดทางปาก) หรือสูงกว่าหรือเท่ากับ 38.3°C (วัดทางทวารหนัก)

2. มีอาการและอาการแสดงทางคลินิกของการติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนบนแบบเฉียบพลัน

3.1.3 ผู้ป่วยที่จะไม่รับเข้าในโครงการ (exclusion criteria)

1. อายุมากกว่าที่กำหนดในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2
2. มีประวัติไข้นานเกิน 3 วัน
3. มีน้ำมูกเขียวหรือไอมีเสมหะเขียว
4. ตรวจพบว่าเป็น exudative pharyngotonsillitis หรือเป็น purulent otitis media
5. ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคติดเชื้ออื่นๆ แน่ชัดแล้ว
6. ผู้ป่วยหรือผู้ปกครองไม่ยินยอมเข้าร่วมการศึกษา

วิธีการเลือกผู้ป่วยใช้การสุ่มตัวอย่างตาม criteria ข้างต้นนี้ไม่เกิน 10 คนต่อสัปดาห์

หลังจากซักประวัติและตรวจร่างกายดังรายละเอียดในภาคผนวก 2 จะทำการศึกษาต่อดังนี้

1. ใช้เครื่องดูดเสมหะแรงปานกลาง (200 มม.น้ำ) ต่อกับสายดูดเก็บเสมหะและเยื่อบุผนังเซลล์จากบริเวณ nasopharynx เก็บใน kit สำหรับ nasopharyngeal suction แล้วดูด transport media เข้าไปผสมกับสิ่งที่ดูดได้ แช่เย็นส่งไปยังห้องปฏิบัติการ

2. ในรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นการติดเชื้อที่ระบบทางเดินหายใจส่วนล่างจะส่งตรวจถ่ายภาพเอ็กซเรย์รังสีปอดทุกราย เพื่อแยกว่าเป็นเพียงหลอดลมเล็กอักเสบหรือปอดอักเสบ เนื่องจากมีอาการทางคลินิกคล้ายคลึงกันมาก

3. การพิจารณาทำการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการอื่นๆ ในรายที่แพทย์สงสัยว่าเชื้อที่ก่อโรคอาจเกิดจากแบคทีเรีย และการรักษาให้ขึ้นกับดุลยพินิจของแพทย์ผู้ดูแล

3.2 การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อไข้หวัดใหญ่และ RSV

การตรวจทางห้องปฏิบัติการแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ
2. การตรวจหาเชื้อไวรัส

3.2.1. การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจจะมี 2 ชนิด ด้วยกันคือ

- nasopharyngeal secretion เก็บจากผู้ป่วยในกลุ่มซึ่งใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสทั้ง RSV และไข้หวัดใหญ่ A และ B
- Throat swab เก็บจากผู้ป่วยกลุ่มซึ่งใช้ตรวจหาเฉพาะไข้หวัดใหญ่ A และ B

การเตรียม nasopharyngeal secretion

เตรียมได้ดังนี้คือ เมื่อได้ nasopharyngeal secretion มาแล้วใช้ pasture pipette ที่ปราศจากเชื้อดูดขึ้นเป่าลงหลายๆ ครั้ง เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากก้อนเสมหะและทำให้ตัวอย่างตรวจเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดถ่าย nasopharyngeal secretion นี้ใส่หลอดก้นแหลม นำไปปั่นที่ 2,500 rpm ที่ 4 °C นาน 15 นาที แยกส่วนน้ำใสใช้ในการแยกเชื้อไวรัส ส่วนที่เป็นตะกอนนำมาปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วย PBS pH 7.4 ปั่นครั้งสุดท้ายดูดเอาน้ำใสส่วนบนทิ้งเหลือเฉพาะตะกอน นำมา smear บน slide อย่างน้อย 3 หลุม ตาก slide ให้แห้ง จากนั้น fix ด้วย acetone นาน 10 นาที นำ slide ออกมาตากให้แห้งแล้วเก็บที่ -70 ° C เพื่อใช้ย้อม immunofluorescence สำหรับตรวจหา RSV antigen, influenza A หรือ influenza B ต่อไป

การเตรียม throat swab

นำ throat swab ที่ได้มาใส่ glass bead 2-3 เม็ดลงในหลอด นำไป mix ด้วย vortex mixer เพื่อให้เซลล์หลุดจาก swab ทิ้งไม้ swab จากนั้นนำมาปั่นที่ 2,500 rpm ที่ 4°C นาน 15 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำส่วนบนไว้สำหรับเพาะแยกเชื้อ influenza virus ส่วนตะกอนทำเช่นเดียวกับ nasopharyngeal secretion เพื่อย้อม immunofluorescence สำหรับตรวจหา influenza virus antigen ต่อไป

สิ่งส่งตรวจ

Nasopharyngeal secretion

Throat swab

ปั่นที่ 2,500 rpm 4° ซ 15 นาที

น้ำใสส่วนบนสำหรับเพาะแยกเชื้อไวรัส ดังนี้

- RSV ด้วยวิธี shell vial
- Influenza virus วิธีดั้งเดิม
- Influenza virus วิธี shell vial

ตะกอนสำหรับตรวจหา viral antigen ด้วยวิธี immunofluorescence

- RSV antigen (IFA)
- Influenza A virus antigen (DFA)
- Influenza B virus antigen (DFA)

แผนภาพ แสดงการเตรียมตัวอย่างตรวจ nasopharyngeal secretion ใช้ ตรวจหาทั้ง RSV และ influenza A, B virus ส่วน throat swab ใช้ตรวจหาเฉพาะ influenza A, B virus

3.2.2. การตรวจหาเชื้อไวรัส

I. การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ A และ B แบ่งการศึกษาเป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและ seed virus

2. การพัฒนาการตรวจด้วยวิธี Shell vial

3. การตรวจตัวอย่างจากผู้ป่วยโดยเปรียบเทียบวิธีตรวจ 3 วิธี ดังนี้

3.1 การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม

3.2 การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี Shell vial

3.3 การตรวจหา viral antigen จากตัวอย่างตรวจโดยวิธี immunofluorescence

II. การตรวจหาเชื้อ RSV เปรียบเทียบการตรวจ 2 วิธี

1. เพาะแยกเชื้อโดยวิธี Shell vial

2. ตรวจหา RSV antigen จากตัวอย่างตรวจโดยวิธี immunofluorescence

I. การตรวจหาเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A และ B

1. การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงและ seed virus

1.1 การเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อใช้เตรียม seed virus และใช้เพาะแยกเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ตลอดการศึกษานี้ มีขั้นตอนดังนี้

- เซลล์ MDCK (Madin Darby Canine Kidney) ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เลี้ยงให้เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวเต็มพื้นที่ผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้งไป ล้างด้วย PBS pH 7.4 พลิกขวดไปมาให้ทั่วผิวเซลล์แล้วดูด PBS ทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

- เติมน้ำยา TV ลงไปประมาณ 1-2 มล. ให้ท่วมผิวเซลล์ นำไปอบที่ 37 $^{\circ}$ C นาน 3-5 นาที นำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อเห็นเซลล์หดตัวมีลักษณะกลมจนเกือบหลุดจากผิวแก้ว จึงดูดน้ำยา TV ทิ้งไป

- ตบข้างขวดเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวแก้วแล้วเติม growth media สำหรับ MDCK cell ลงไป นำเซลล์ไปนับเพื่อปรับปริมาณให้ได้ $3.5x10^5$ เซลล์/ล.

- ถ่ายเซลล์นี้ไปในขวดสำหรับเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่ โดยที่ขวดขนาด 8 ออนด์ ใช้ปริมาตร 10 ml, ขวดขนาด 4 ออนด์ ใช้ปริมาตร 5 มล. อบไว้ที่ 37°C เซลล์จะเจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวบนผิวแก้วภายในเวลา 24 ชม. จะได้เซลล์ตามต้องการ

- ควร passage cell ประมาณ 2 ครั้ง/สัปดาห์

1.2 การเตรียม seed virus เพื่อเพิ่มจำนวนเก็บเป็น stock culture ไว้ใช้ตลอดการศึกษานี้ โดยได้เชื้อไวรัส influenza A และไวรัส influenza B จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มีขั้นตอนดังนี้

- เลี้ยงเซลล์ MDCK ให้เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวในขวด 8 ออนด์ ดังกล่าวข้างต้น 2 ชุด ชุดละ 3 ขวด

- เจือจาง influenza A และ influenza B เป็น 1:10 ด้วย influenza growth media

- ดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง ล้างด้วย PBS pH 7.4 1 ครั้ง ดูด PBS ทิ้ง แล้วเติมไวรัสที่เจือจางแล้วลงไปขวดละ 2 มล. โดย influenza A virus 3 ขวด และ influenza B virus 3 ขวด

- นำไปอบที่ 35°C นาน 2 ชม. นำออกมาพลิกขวดไปมาเพื่อให้ไวรัส กระจายทั่วผิวเซลล์ ทุก 30 นาที

- ดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง แล้วเติม influenza growth media ลงไปขวดละ 5 มล. นำไปอบที่ 37°C

- สังเกตุดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ จนเห็นว่าเกือบทุกเซลล์ติดเชื้อหมดนำขวดไปแช่แข็งที่ -70°C แล้วนำออกมาละลายทันทีที่ 37°C (waterbath) ทำเช่นนี้ซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แตกและไวรัสออกมานอกเซลล์

- นำไปปั่นที่ 2,500 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะน้ำใสส่วนบน แบ่งใส่หลอดเล็กๆ เก็บไว้ที่ -70°C เป็น seed stock culture เพื่อใช้ตลอดการทดลอง

2. การพัฒนาการตรวจด้วยวิธี Shell vial

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปั่นแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.1.1 ความแรงของการปั่น เพื่อหาความแรงที่เหมาะสม

- เลี้ยงเซลล์ MDCK ในหลอดพลาสติกก้นแบน ขนาด 14x40 มม. ภายในมีแผ่นแก้วกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 13 มม. เป็นที่เกาะเจริญของเซลล์ โดยเตรียมเซลล์เหมือนข้างต้น แต่ปรับปริมาณของเซลล์ให้ได้ 2.5 x 10^5 เซลล์/ล. ถ่ายใส่หลอด (vial) ละ 1 ml อบที่ 37 °C จะได้เซลล์เจริญชั้นเดียวบนแผ่นแก้วภายในเวลา 18-24 ชม. จำนวน 16 หลอด ต่อ 1 ชุด ของความแรง

- เจือจางไวรัสจาก seed stock culture เป็น 10^1 - 10^7 เท่าด้วย influenza growth media

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วเติมไวรัสลงไป โดยใช้ความเจือจางละ 2 หลอด หลอดละ 0.2 มล. ส่วน 2 หลอดสุดท้ายเติม media แทน เพื่อใช้เป็น cells control

- นำหลอดไปปั่น ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 1 ชม. แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด คือ ความแรง 0 (ไม่ปั่น), 700, 1500, 3000 g ตามลำดับ

- เมื่อครบเวลาดูดเอาน้ำใสส่วนบนทิ้ง แล้วเติม influenza growth media ลงไป 1 มล. นำไปอบที่ 37°C นาน 48 ชม.

- เมื่อครบเวลาเท media ทิ้ง ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง แล้วเติม acetone ลงไป หลอดละ 1 มล. ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อ fix cells นำแผ่นแก้วมาตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วติดลงบน slide โดยใช้กาว 2-cyanoacrylate (กาวตราช้าง) ทิ้งให้ กาวแห้งนำไปย้อมหาแอนติเจนไวรัส ด้วยวิธี IFA หรืออาจเก็บที่ -70°C เพื่อรอย้อม IFA ต่อไป

- เลือกความแรงของการปั่นที่ทำให้ตรวจพบแอนติเจนของไวรัสได้ในความเจือจางที่สูงที่สุดเป็นความแรงที่เหมาะสม

2.1.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการปั่น

- ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.1.1 แต่ใช้ความแรงของการปั่นที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.1 ใช้เวลา 1 ชม. แยกการทดลองเป็น 3 ชุด ต่างอุณหภูมิกันโดยปั่นที่ 4°C, 25°C และ 37°C

- เลือกอุณหภูมิของการปั่นที่ทำให้ตรวจพบแอนติเจนของไวรัสในความเจือจางมากที่สุดเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม

2.1.3 เวลาในการปั่น

- ดำเนินการเช่นเดียวกันโดยใช้ความแรงของการปั่นและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่เลือกได้ข้างต้น แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด โดยใช้เวลาในการปั่นเป็น 30, 60, 90 และ 120 นาที

- เลือกเวลาที่ทำให้การตรวจพบแอนติเจนของไวรัสในความเจือจางมากที่สุดเป็นเวลาของการปั่นที่เหมาะสม

2.2 ศึกษาถึงระยะเวลาในการตรวจพบไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

- ดำเนินการเช่นเดียวกับ 2.1 แต่ใช้ไวรัสที่เจือจางที่ 10^2 เพียงความเจือจางเดียวและปั่นสภาวะที่เหมาะสมที่เลือกจากข้อ 2.1 นำไปอบที่ 37°C นำแผ่นแก้วออกมา fix และย้อมหาแอนติเจนของไวรัสที่ เวลา 6, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ

- เลือกเวลาที่ตรวจพบไวรัสที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจแยกเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ

3. การตรวจตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วย

3.1 การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม (convensional method)

3.1.1 การ inoculate ไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง

- เพาะเลี้ยง MDCK ในหลอดทดลอง ให้เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียวในเวลา 24 ชม. บนผิวแก้วของหลอดทดลอง

- ดูด media เดิมทิ้ง ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง โดยเติม PBS pH 7.4 จำนวน 1 มล. พลิกไปมาให้ทั่วพื้นที่ที่มีเซลล์เจริญแล้วดูด PBS ทิ้ง

- เติมตัวอย่างตรวจ (ส่วนน้ำใสส่วนบน) จำนวน 0.2 มล. ลงในหลอดนำไปอบที่ 35°C นาน 2 ชม. นำออกมาพลิกหลอดไปมาทุก 30 นาที

- ดูดตัวอย่างตรวจทิ้ง แล้วล้างด้วย PBS 1-2 ครั้ง เติม influenza growth media ลงไปหลอดละ 1 มล. อบที่ 35°C นาน 7 วัน โดยนำออกมาตรวจดูไวรัสไข้หวัดใหญ่ทุกวัน

3.1.2 การตรวจดูไวรัส

- การตรวจคัดกรอง (screening) ด้วยวิธี hemagglutination

- ใช้ autopipette ดูดน้ำใสส่วนบนจากหลอดที่เพาะแยกเชื้อไวรัสจำนวน 50 µl ใส่ใน microtiter plate ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ

- เติม 0.5% เม็ดเลือดแดงของไก่ จำนวน 50 µl เคาะข้าง plate เบาๆ ตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชม. อ่านผลโดยดูการเกิด hemagglutination โดยที่เม็ดเลือดแดงของไก่จะเกิดการแผ่ที่ก้นหลุม แสดงว่า อาจมีไวรัสไข้หวัดใหญ่ใน culture media นั้น

- การตรวจยืนยันเชื้อไวรัส influenza A, influenza B ด้วยวิธี IFA

- เมื่อพบว่าในหลอดเพาะเลี้ยงใดให้ผลบวกโดยเกิด hemagglutination กับเม็ดเลือดแดงของไก่แล้วให้เติม glass bead 2-3 เม็ดลงไปในหลอด เขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์หลุดจากผิวแก้ว

- ปั่นล้างเซลล์นี้ด้วย PBS pH 7.4 2 ครั้ง นำตะกอนที่เป็นเซลล์มา smear บน slide 2 หลุม ตากให้แห้งในอากาศแล้ว fix ด้วย acetone นาน 10 นาที ตาก slide ให้แห้ง

- นำมาย้อมด้วย monoclonal antibody สำหรับ influenza A 1 หลุม และ influenza B 1 หลุม ทำการย้อม IFA ดังวิธีที่จะได้กล่าวต่อไป

3.1.3 การแปรผล

ผลบวก : ในรายที่พบว่าให้ผลบวกกับ hemagglutination และเมื่อย้อมด้วย monoclonal Ab ต่อ influenza A ให้ผลบวก ถือว่า positive culture ต่อ influenza A

: ให้ผลบวกกับ hemagglutination และย้อมด้วย monoclonal Ab ต่อ influenza B ให้ผลบวกถือว่า positive culture ต่อ influenza B

ผลลบ : ไม่พบเซลล์ใดเรืองแสงไม่ว่าจะย้อม IFA ด้วย monoclonal antibody ต่อ influenza A หรือ influenza B

3.2 การเพาะเชื้อด้วยวิธี shell vial มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การแยกเชื้อไวรัส

- เตรียมเซลล์ MDCK ในหลอดพลาสติกก้นแบน ดังได้กล่าวแล้วข้างต้นให้เซลล์เจริญเป็นเซลล์ชั้นเดียว

- เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง เท PBS ทิ้ง

- เติมน้ำใสส่วนบนของตัวอย่างตรวจที่เตรียมได้ จำนวน 0.2 มล.

- นำไปปั่นโดยใช้สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมที่หาได้จากการทดลองขั้นต้น

- fix เซลล์ที่เจริญบนแผ่นแก้วด้วย acetone แล้วนำมาย้อม IFA เพื่อตรวจหา influenza virus infected cell ด้วย monoclonal antibody

3.2.2 การแปรผล

ผลบวก : พบเซลล์ที่ติดเชื้อ influenza A เรืองแสงเมื่อย้อมด้วย monoclonal antibody ต่อ influenza A virus ถือว่า positive culture ต่อ influenza A

: พบเซลล์ที่ติดเชื้อ influenza B เรืองแสงเมื่อย้อมด้วย monoclonal antibody ต่อ influenza B ถือว่า positive culture ต่อ influenza B

ผลลบ : ไม่พบเซลล์ใดเรืองแสงไม่ว่าจะย้อม IFA ด้วย monoclonal antibody ต่อ influenza A หรือ influenza B

3.3 การตรวจหา viral antigen ด้วยวิธี immunofluorescence (IFA) มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างตรวจ ดังกล่าวแล้วข้างต้น

3.3.2 การย้อม IFA ด้วย monoclonal antibody ซึ่งติดฉลากด้วย FITC

- นำ slide ที่ เตรียมไว้แล้ว ออกจาก -70°C นำมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

- หยด monoclonal antibody ต่อ influenza A ลงบน slide หลุมที่ 1 และ monoclonal antibody ต่อ influenza B ลงบน slide หลุมที่ 2

- อบไว้ที่ 37°C นาน 15 นาที ในกล่องความชื้น

- ล้างด้วย PBS โดยจุ่มแช่ไว้นาน 5 นาที

- ตาก slide ให้แห้ง mount ด้วย mounting buffer

- ดูด้วยกล้อง fluoresence

3.3.3 การแปรผล

ผลบวก : จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ influenza A หรือ influenza B เรืองแสง ทั้งในส่วนของ cytoplasm และ nucleus

ผลลบ : ไม่มีเซลล์ใดเรืองแสง

II. การตรวจหาเชื้อ Respiratory syncytial virus (RSV)

1. การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี shell vial มีขั้นตอนดังนี้

1.1 การแยกเชื้อไวรัส

- เตรียมเซลล์ HEp-2 ในหลอดพลาสติกก้นแบน โดยปรับเซลล์ให้ได้ $2.5x10^5$ เซลล์/มล.อบไว้ที่ 37°C นาน 18-24 ชม. จะได้เซลล์เรียงตัวเป็นชั้นเดียวบนแผ่นแก้ว

- เทอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วเท PBS ทิ้ง

- เติมน้ำใสส่วนบนของตัวอย่างตรวจลงไป 0.2 มล.

- นำไปปั่นที่ความแรง 1500 g ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) นาน 1 ชม.

- ล้างด้วย PBS 1-2 ครั้ง เท PBS ทิ้ง เติม mainternance media 0.5 มล.

- อบที่ 37°C นาน 18-24 ชม.

- ล้างด้วย PBS 1 ครั้ง แล้วเติม acetone 1 มล. ทิ้งไว้ 10 นาที นำแผ่นแก้วออกมาตากให้แห้ง

- ติดแผ่นแก้วที่มีเซลล์เกาะอยู่นี้บน slide ด้วย กาวตราช้าง

- นำไปย้อม IFA กับ specific antibody ต่อ RSV เพื่อหา RSV infected cell

1.2 การแปรผล

ผลบวก : จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV เรืองแสงในส่วนของ cytoplsam ถือว่า positive culture ต่อ RSV

ผลลบ : จะไม่เห็นเซลล์ใดเรืองแสง

2. การตรวจหา RSV antigen ด้วยวิธี immunofluorescence

2.1 การเตรียมตัวอย่างตรวจ ดังกล่าวแล้วข้างต้น

2.2 การย้อม IFA โดยใช้ polyclonal antibody ต่อ RSV มีขั้นตอนดังนี้

- นำ slide ที่ smear แล้วออกจาก -70° C ตากให้แห้ง
- หยด rabbit anti-RSV ลงบน slide นำไปอบที่ 37°C ในกล่องความชื้น นาน 30 นาที
- ล้างด้วย PBS นาน 15 นาที ตาก slide ให้แห้ง
- หยด swine anti-rabbit immunoglobulin conjugated FITC ลงบน slide นำไปอบที่ 37°C ในกล่องความชื้นนาน 30 นาที
- ล้างด้วย PBS นาน 15 นาที
- แช่ slide ในขวดที่มี Evan's blue solution ทิ้งไว้ 5 นาที
- ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ตาก slide ให้แห้ง
- mount ด้วย mounting buffer นำไปดูด้วยกล้อง fluoresence

2.3 การแปรผล

ผลบวก : จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV เรืองแสงในส่วนของ cytoplasm

ผลลบ : ไม่พบเซลล์ใดเรืองแสง