บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ที่แน่นอนนั้นจะต้องอาศัยวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ ซึ่งผลการตรวจนี้จะได้ผลดีเพียงใด จะขึ้นอยู่กับการเก็บสิ่งส่งตรวจที่ถูกต้องและมีปริมาณมากพอ ในการศึกษาครั้งนี้ ตัวอย่างที่ใช้คือ nasopharyngeal secretion (NPS) เก็บโดยวิธี aspiration ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้ได้ตัวอย่างตรวจที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหา RSV มากกว่าการใช้วิธี swab (97,98) การศึกษาในครั้งนี้ได้เก็บ NPS โดยดูดใส่หลอดที่ปราศจากเชื้อที่มีท่อเล็ก ๆ ยื่นออกมา 2 ข้าง โดยที่ท่อหนึ่งจะต่อเข้ากับเครื่อง suction ส่วนอีกท่อจะต่อกับสายยางเล็ก ๆ ที่จะสอดเข้าไปเก็บ NPS ทางโพรงจมูกของเด็ก ด้วยวิธีนี้จะทำให้ได้ปริมาณของ NPS ที่มากพอและไม่มีการปนเปื้อนจุลชีพจากสิ่งแวดล้อม โดยปิดท่อทั้งสองข้างแล้วแช่น้ำแข็งนำมาส่งห้องปฏิบัติการทันที

การเพาะเลี้ยงไวรัสนั้น จัดเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัส แต่ปัญหาที่สำคัญก็คือมีการปนเปื้อนของบัคเตรีจาก nasophrynx ซึ่งมีบัคเตรีจำนวนมาก ทั้งที่ก่อโรคและไม่ก่อโรค ดังนั้นจึงต้องมีการเติมยาปฏิชีวนะลงไปในน้ำยาสำหรับขนถ่ายเพื่อกำจัดบัคเตรีเหล่านี้เสียก่อน โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ penicillin G, streptomycin และ gentamicin sulfate และในการเพาะเลี้ยงไวรัสนั้น จะเพิ่ม fungizone (Amphotericin B) ลงไปเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อรา

เซลล์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในการศึกษานี้คือ เซลล์ HEp-2 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความไวต่อการติดเชื้อ RSV สูง การปรับจำนวนเซลล์มีความสำคัญต่อการสังเกตดู CPE เพราะถ้าเซลล์มีปริมาณมากเกินไป จะทำให้ CPE ที่เกิดขึ้นมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมนั่นคือจะเห็นเพียงเซลล์กลมขึ้นเท่านั้น (4) ทำให้อาจจะอ่านผลเป็นผลลบปลอมได้ จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมนั้นควรให้มีเซลล์เดิมเจริญเป็นชั้นเดียว 70 - 80 % ของพื้นที่

การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อย ๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงไวรัสนี้ จะเป็นการเร่งให้เกิดมี CPE ให้เห็นเร็วขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของ glutamine จะมีผลทำให้เกิด CPE ได้ดีขึ้น (99) ซึ่ง glutamine เป็นส่วนผสมที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM อยู่แล้ว แต่อาจถูกใช้ไปหมด หรือเสื่อมสลายไป เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 33°ซ. การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ จึงเหมือนกับเป็นการเติม glutamine ลงไปนั่นเอง

การเกิด CPE ของไวรัสนี้จะสังเกตเห็นได้ประมาณ 5-7 วัน หลังการเพาะเลี้ยง แต่บางรายอาจยาวนานถึง 28 วัน ดังนั้นค่าเฉลี่ยโดยทั่วไปจะประมาณ 10-14 วัน ซึ่ง Arens และคณะ (90) พบว่า เมื่อใช้เซลล์ HEp-2 ในการเพาะแยกเชื้อไวรัส RSV จะสามารถตรวจพบ CPE ได้ในวันที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยง ซึ่งเฉลี่ยจะตรวจพบในเวลาประมาณ 8-10 วัน และจากการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจพบ CPE เร็วที่สุด 3 วันหลังการเพาะเลี้ยงเช่นกัน เฉลี่ยจะพบในเวลาประมาณ 5-6 วัน โดยพบใน passage แรกจำนวน 27 ราย ซึ่งจะพบ CPE ในวันที่ 3-10 หลังการเพาะเลี้ยง และใน passage ที่ 2 จำนวน 4 ราย ซึ่งในจำนวนนี้บางราย การเกิด CPE ไม่ชัดเจนทั้งใน passage ที่ 1 และที่ 2 แต่เมื่อนำมาย้อมด้วย anti-RSV ด้วยวิธี IFA แล้วปรากฏว่าให้ผลบวกชัดเจนแต่พบจำนวนเซลล์ที่ติดเชื้อมีน้อย ซึ่งต่างกับในรายที่ให้ CPE ที่ชัดเจนจะพบมีเซลล์ที่ติดเชื้ออยู่มากมายซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kumer และคณะ (100) ที่พบว่าการพบ RSV จำนวนมากในสิ่งส่งตรวจ จะทำให้จำนวนวันที่ตรวจพบ CPE น้อยกว่าในรายที่มี RSV จำนวนน้อย

จากผลของการเพาะเลี้ยงไวรัสแบบธรรมดานี้ให้ผลบวกน้อยที่สุด ในจำนวนวิธีการที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกัน 4 วิธีนั้น คงเนื่องมาจากในคนไข้บางคนนั้นจะปล่อยไวรัสออกมาน้อย จึงทำให้ต้องอาศัยเวลานานในการเกิด CPE ให้สังเกตเห็นได้ ทำให้เซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงซึ่งเจริญเติบโตขึ้นทุกวันมีอายุมากเกินไป ความไวในการติดเชื้อลดลงตามลำดับและเซลล์ก็เริ่มตาย จึงต้องมีการผ่านไวรัสไปยังเซลล์ชุดใหม่ ซึ่งขั้นตอนนี้จะต้องทำการ freezed-thaw เซลล์ 3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แตกและ ไวรัสออกมานอกเซลล์ ในขั้นตอนนี้ จะทำให้มีไวรัสบางส่วนตายไป หรืออาจทั้งหมด ถ้ามีจำนวนน้อยอยู่แล้ว จากเหตุผลนี้ จึงทำให้การเพาะเลี้ยงไวรัสด้วยวิธีนี้มีความไวในการตรวจพบไวรัสน้อยลง

สำหรับการตรวจด้วยวิธี shell vial technique นี้ ซึ่งจัดเป็นวิธีเพาะเชื้อไวรัสชนิดหนึ่ง ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนใหญ่ ๆ 2 ขั้นตอน นั้นคือในขั้นตอนแรกจะเป็นการใช้การปั่นเพื่อช่วยเพิ่มการ adsorp ของไวรัสกับเซลล์เพาะเลี้ยง และในขั้นตอนที่สองจะเป็นการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสที่จะปรากฏขึ้นภายหลังจากที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์เจริญและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับขั้นตอนทั้งสองของวิธีนี้อย่างละเอียด เพื่อหาสภาวะที่ดีที่สุดในการนำไปใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ในผู้ป่วย

จากผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการปั่นในขั้นตอนการ adsorp ของไวรัสกับเซลล์นั้นพบว่า การปั่นในขั้นตอนนี้จะมีผลทำให้ตรวจพบไวรัสเพิ่มขึ้นถึง 100 เท่า นั่นคือ จากการที่ให้ไวรัส adsorp กับเซลล์โดยไม่ปั่นจะตรวจพบไวรัสได้เมื่อเจือจางไวรัสเป็น 10^{-3} แต่เมื่อมีการปั่นเข้ามาช่วยในขั้นตอนแรกของการ adsorption จะตรวจพบไวรัสได้ที่ความเจือจางเป็น 10^{-5} ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Osborn และคณะ (91) ซึ่งศึกษาใน murine cytomegalovirus (MCV) พบว่าการปั่นจะทำให้พบจำนวน plaque forming unit (PFU) ของ MCV เพิ่มขึ้น 10-100 เท่า เช่นเดียวกันกับ Tenser และคณะ (92,101) ที่ศึกษาใน herpes simplex virus (HSV) พบว่าถ้าใช้แรงปั่นประมาณ 1,100 g จะทำให้ HSV มีความสามารถในการติดเชื้อเพิ่มขึ้น 10 เท่า แต่ถ้าใช้แรงปั่นสูงขึ้นคือใช้ ultracentrifugation จะพบว่าความสามารถในการติดเชื้อจะเพิ่มขึ้นเป็น 100 เท่า การเพิ่มขึ้นของความสามารถในการติดเชื้อนี้ Hudson และคณะ (102) ซึ่งศึกษาใน MCV ได้อธิบายไว้ว่าแรงปั่นจะทำให้ไวรัสเข้าใกล้เซลล์ได้มากขึ้น ทำให้ไวรัสสามารถadsorp กับ receptor บนผิวเซลล์ได้ง่าย จึงทำให้ความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสเพิ่มขึ้น

สำหรับขั้นตอนในการตรวจหาแอนติเจนของ RSV ที่จะปรากฏอยู่ในส่วนของ cytoplasm ของเซลล์นั้น จากการศึกษานี้พบว่าจะสามารถตรวจพบ แอนติเจนของ RSV ได้ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 ชม. เป็นต้นไป โดยใช้วิธี IFA ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Bennett และคณะ(38) ซึ่งพบว่าสามารถตรวจหาแอนติเจนของ RSV ในเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงประมาณ 8-10 ชม. ด้วยวิธี IFAเช่นกัน ถึงแม้

ว่าจะสามารถพบแอนติเจนของ RSV ได้ในเวลา 10 ชม.หลังการเพาะเลี้ยงก็ตาม แต่เวลาที่เลือกใช้สำหรับที่จะนำไปใช้ตรวจหา RSV ในผู้ป่วยนั้นจะเลือกใช้ที่เวลา 18-24 ชม. เนื่องจาก Gleaves และคณะ (93) พบว่าไวรัสที่แยกได้จากผู้ป่วยนั้นจะใช้เวลาในการปรากฏมีแอนติเจนภายในเซลล์ให้ตรวจพบด้วยวิธี IFA นานกว่าไวรัสที่ผ่านการเลี้ยงในเซลล์มาก่อนแล้วประมาณ 2 ชม. ดังนั้นการเลือกที่ 18-24 ชม.จึงเป็นเวลาที่จะให้ความมั่นใจมากที่สุดในการจะตรวจพบแอนติเจนของไวรัส และเนื่องจากตัวอย่างตรวจจากคนไข้จะมาถึงห้องปฏิบัติการประมาณ 10.00-11.00 น.ซึ่งจะทำการเพาะเลี้ยงเสร็จในช่วงเที่ยง-บ่ายจึงทำให้เวลา 10 ชม.หลังการเพาะเลี้ยงจึงเป็นเวลาที่ไม่เหมาะสมในการทำงาน ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในเซลล์ คือเวลา 18-24 ชม.หลังการเพาะเลี้ยง

เมื่อนำเอาวิธีการนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ในผู้ป่วยเด็กจำนวน 133 ราย พบว่าให้ผลบวก 45 ราย (33.3%) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีธรรมดาให้ผลบวกเพียง 32 ราย (24.1%) เท่านั้น ซึ่งจะทำให้มีผลบวกเพิ่มขึ้นถึง 13 ราย (9.7%) และลดระยะเวลาของการตรวจหาไวรัสจากเดิมใช้เวลา 1-2 สัปดาห์มาเหลือเพียง 18-24 ชม.หลังการเพาะเลี้ยง ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับหลายรายงาน ซึ่งนำเอาวิธี shell vial technique นี้ไปใช้ ดังเช่น

Gleaves และคณะ (103) ในปี 1984 ได้นำไปใช้ตรวจหา cytomegalovirus (CMV) ในปัสสาวะของผู้ป่วย พบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนของไวรัสในเซลล์ด้วยวิธี IFA หลังการเพาะเลี้ยงนาน 36 ชม. ซึ่งเดิมจะใช้เวลาในการเกิด CPE ประมาณ 9 วัน และพบการปั่นจะทำให้มีความไวในการตรวจพบไวรัสเพิ่มขึ้นจากเดิม 37.5% มาเป็น 100% และต่อมาในปี 1985 (93) ก็ได้นำเอาวิธีนี้ไปตรวจหา CMV จากเลือด, ปัสสาวะ และเนื้อเยื่อจากปอด โดยใช้เวลาหลังการเพาะเลี้ยงเพียง 16 ชม. ในการตรวจหาแอนติเจน พบว่าจากสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 770 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับวิธี shell vial technique เป็นจำนวน 124 ตัวอย่าง ซึ่งคิดเป็น 16% แต่จะให้ผลบวกกับการเพาะเลี้ยงธรรมดาเพียง 88 ตัวอย่าง (11%) เท่านั้น ซึ่งแสดงว่าวิธีนี้มีความไวมากกว่าการเพาะเลี้ยงธรรมดา คือทำให้ผลบวกเพิ่มขึ้นถึง 36 ตัวอย่างซึ่งคิดเป็น 5 %

ของตัวอย่างทั้งหมด และเมื่อนำผู้ป่วยจำนวน 18 ราย ที่ให้ผลบวกกับวิธี shell vial technique มาติดตามตรวจดูแอนติบอดีปรากฏว่า พบมีการเปลี่ยนแปลงของแอนติบอดี (seroconversion) ทุกราย ซึ่งเป็นเครื่องชี้ที่ดีว่าผลบวกจากวิธี shell vial technique นี้แสดงถึงการติดเชื้อจริง ๆ ของผู้ป่วย

Martin และคณะในปี 1986 (104) ตรวจหา CMV ใน bronchoalveolar lavage โดยเปรียบเทียบวิธี shell vial technique นี้กับการเพาะเลี้ยงธรรมดา พบว่าจากคนไข้ที่ให้ผลบวกจำนวน 19 ราย มาจากการตรวจด้วย วิธี shell vial technique 18 ราย (84%) และการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีธรรมดาเพียง 11 ราย (57.9%) เท่านั้น ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Paya และคณะ (105) ซึ่งตรวจหา CMV จากคนไข้จำนวน 182 ตัวอย่างให้ผลบวกกับ shell vial technique จำนวน 154 ตัวอย่าง (84.6%) และการเพาะเลี้ยงธรรมดาเพียง 126 ตัวอย่าง (69.2%) เท่านั้น

สำหรับการศึกษาใน herpes simplex virus (HSV) นั้น Gleaves และคณะ (106) ในปี 1985 โดยแยกเชื้อจากคนไข้ที่สงสัยว่าติดเชื้อ HSV จำนวน 84 ราย พบว่าโดยวิธี shell vial technique สามารถพบแอนติเจนของไวรัส หลังเพาะเลี้ยงนานเพียง 6 ชม. แต่เพื่อให้แน่ใจถึงความไวมากที่สุด จึงเลือกใช้เวลา 16 ชม. หลังการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าให้ผลบวก 23 ราย (23.46%) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงธรรมดาให้ผลบวก 22 ราย (22.44%) และใช้เวลาในการตรวจพบ CPE ของไวรัสเฉลี่ยนาน 6 วัน

Salmon และคณะ (107) ได้ทำการตรวจหา HSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้จำนวน 431 ตัวอย่าง โดยทำการเพาะเลี้ยงไวรัสเปรียบเทียบกับการทำ shell vial technique โดยการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสนี้ได้ใช้วิธี immunoperoxidase มาใช้แทนวิธี IFA ซึ่งมีความสะดวกในการอ่านผลมากกว่า พบว่า จากจำนวนผลบวก 107 รายนี้เป็นผลบวกจากวิธี shell vial technique 103 ราย (96%) และจากการเพาะเลี้ยงธรรมดา 91 ราย (85%) และลดเวลาจากเดิมใช้เวลาประมาณ 5 วันในการตรวจพบไวรัส มาเหลือเพียง 18-24 ชม.(ข้ามคืน) เท่านั้น

Espy และคณะ (95) ได้ทำการตรวจหา influenza virus ใน throat swabs ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงในเซลล์และวิธี shell vial technique พบว่าวิธี shell vial มีความไวเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงธรรมดา 60% (27/45) แต่มีความจำเพาะสูงถึง 100% และสามารถลดเวลาจากเดิม ต้องใช้ประมาณ 4 วัน มาใช้เวลาเพียง 24 ชม.หลังการเพาะเลี้ยงเท่านั้น

จากการศึกษาดังที่กล่าวมาแล้วนี้จะเห็นได้ว่าวิธี shell vial technique นี้เป็นวิธีแยกและวิเคราะห์เชื้อที่มีความไวมากกว่าการเพาะเลี้ยงธรรมดา และมีความเฉพาะสูงเทียบเท่ากันได้ เป็นวิธีที่มีความสะดวก ทั้งทางด้านวิธีการและการอ่านผล ซึ่งไม่ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญเท่าการตรวจหา CPE ในเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยลดเวลาที่ใช้ในการตรวจพบไวรัสจากเดิมซึ่งใช้เวลาเป็นสัปดาห์ มาใช้เวลาเพียงประมาณ 16-24 ชม. เท่านั้น

สำหรับวิธี indirect immunofluorescence (IFA) นั้น เป็นวิธีที่มีขั้นตอนและวิธีการต่าง ๆ ไม่ค่อยยุ่งยากและซับซ้อนนักแต่ต้องการความละเอียดและประณีตในการทำซึ่งจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆด้วยกันนั่นคือ การเตรียมตัวอย่างตรวจและการย้อม IFA ซึ่งในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างตรวจนั้น ทำได้โดยการปั่นล้าง แล้วนำส่วนที่เป็นเซลล์ป้ายลงบนแผ่น slide ทำให้แห้ง fix แล้วจึงนำมาย้อม IFA หรือเก็บไว้ที่ -20°ซ. จนกว่าจะใช้ ขั้นตอนการเตรียมเซลล์นี้นับเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ซึ่งมีผลต่อความไวของวิธีเป็นอย่างมาก นั่นคือจะต้องมีความระมัดระวังมากเพื่อล้างเอามูก (mucus) ออกให้หมด มิเช่นนั้นจะรบกวนการย้อมและการอ่านผล และต้องระวังไม่ให้เกิดการสูญเสียเซลล์ไปได้ การนำเซลล์มาป้าย (smear) ลงบน slide นี้จะต้องตรวจดูให้ได้จำนวนเซลล์ที่พอเหมาะไม่มากจนเบียดกันแน่น หรือน้อยจนเกินไป ซึ่ง Fulton และ Middleton (108) พบว่า 31.5% ของ NPS จะมีจำนวนเซลล์น้อยเกินไปไม่เพียงพอสำหรับการตรวจด้วย IFA ดังนั้นการ smear slide ควรทำภายใต้กล้องจุลทัศน์ ถ้าเห็นมีเซลล์จำนวนน้อยเกินไป ควรรีบขอให้มีการเก็บ NPS มาใหม่ทันที สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ผู้ป่วยทุกราย จะมีจำนวนเซลล์ที่เพียงพอสำหรับการตรวจ

การย้อมและการอ่านผลจำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์ ความชำนาญและความละเอียดในการตรวจหาเซลล์ที่ติดเชื้อ ซึ่งต้องตรวจดูให้ทั่วการพบเซลล์ที่ติดเชื้อที่มีความเด่นชัด (typical) แม้เพียงเซลล์เดียวก็จะถือว่าคนไข้รายนี้ให้ผลบวก การย้อม normal rabbit immunoglubulin ควบคู่ไปกับการย้อมด้วย rabbit anti-RSV นั้นจะช่วยทำให้การตัดสินใจต่อการเรืองแสงที่ไม่จำเพาะเป็นไปได้ถูกต้อง ช่วยทำให้การอ่านผลง่ายขึ้น นั่นคือจะไม่มีปัญหาการเกิดผลบวกปลอมจากการอ่านผลได้ จึงทำให้การศึกษาครั้งนี้มีความจำเพาะสูง

สำหรับความไวของการตรวจด้วยวิธี IFA นี้แต่ละรายงานจะแตกต่างกันออกไปขึ้นกับวิธีการและแอนติบอดีที่นำมาใช้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีความไว 80% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hughes และคณะ (89) ซึ่งศึกษาโดยใช้ monoclonal antibody ซึ่งมีความไว 81% และสูงกว่ารายงานของ Chonmaitree และคณะ (86) ซึ่งใช้ polyclonal antibody พบมีความไวเพียง 41.2% แต่มีความไวต่ำกว่าการศึกษาของ Lauer และคณะ (78) ซึ่งมีความไวสูงถึง 95% ความไวที่ได้นี้คิดเทียบกับการแยกเชื้อไวรัส

สำหรับการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ด้วยวิธี biotin-avidin-ELISA ในขั้นตอนของการพัฒนาวิธีการตรวจ การเลือกอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา จะเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะทำให้ผลบวกและผลลบแยกจากกันได้อย่างเด่นชัดทั้งการดูด้วยตาเปล่าและอ่านด้วยเครื่อง โดยมีค่าปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ (nonspecific reaction) ที่เกิดจากหลุมที่เคลือบด้วย NRI มีค่าต่ำ เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาต้องไม่นานจนเกินไป เพื่อที่จะให้วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมและมีความรวดเร็ว (rapid method) ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ในผู้ป่วย จากการเลือกใช้สภาวะดังกล่าวนี้เมื่อนำมาทดสอบค่าความเที่ยงตรงและความเชื่อถือได้ของวิธี พบว่ามีค่าที่เม่นยำเชื่อถือได้

การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ NRI เคลือบหลุมควบคู่ไปกับ rabbit anti-RSV แล้วให้ทำปฏิกิริยาคู่กันไป เพื่อเป็นการตรวจหาปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะที่อาจเกิดจากการจับกันแบบไม่จำเพาะของสิ่งรบกวนที่อยู่ใน NPS ของผู้ป่วย กับ rabbit immunoglobulin ที่ใช้เคลือบหลุมซึ่งจะทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ดังนั้นการตัดสินว่าตัวอย่างรายใดให้ผล

บวกจึงถือเอาค่าผลต่างของ OD ที่ได้จากหลุมที่เคลือบด้วย rabbit anti-RSV กับหลุมที่เคลือบด้วย NRI เป็นหลักคือ ถ้ามีค่าเท่ากับ 0.200 ขึ้นไปจะถือว่าเป็นผลบวก ซึ่งจากการนำเอาไปใช้ตรวจและตัดสินการติดเชื้อ RSV ในผู้ป่วย ปรากฏว่าในรายที่ให้ผลบวกจะให้ค่าผลต่างของ OD มากกว่า 0.200 ขึ้นไปทุกราย มีค่าเฉลี่ยเป็น 0.760+0.446 ส่วนในรายที่ให้ผลลบนั้นผลต่างของ OD จะมีค่าน้อยมาก ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเพียง 0.020 + 0.033 และไม่มีรายใดที่ให้ค่าเกิน 0.100 เลย ดังนั้นค่าเกณฑ์ตัดสิน (cut point) ที่ตั้งไว้จึงเป็นค่าที่แบ่งกลุ่มบวกและกลุ่มลบได้ชัดเจนดีมาก

การใช้น้ำใสส่วนบน (supernatant) ที่ได้จากการปั่น NPS เป็นตัวอย่างในการตรวจหา RSV ด้วยวิธี biotin-avidin ELISA นี้ นับเป็นตัวแทนที่ดี สำหรับการตรวจด้วยวิธีนี้ เนื่องจากได้ทดลองนำเอาตัวอย่างแบบต่าง ๆ ของ NPS เช่น NPS ที่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว แต่ยังไม่ปั่นแยก, น้ำใสส่วนบนเมื่อปั่นแยกแล้ว และส่วนที่เป็นเซลล์ซึ่งผ่านการล้าง มาใช้ในการตรวจหา RSV พบว่า 2 ตัวอย่างแรก ให้ค่าผลต่างของ OD ใกล้เคียงกัน แต่ในตัวอย่างแรกจะมีค่า OD ในหลุมที่เคลือบด้วย NRI สูงกว่า ซึ่งแสดงว่ามีการจับแบบไม่จำเพาะเกิดขึ้น ส่วนในตัวอย่างที่ 3 ซึ่งเป็นเซลล์นั้นพบว่าให้ค่าผลต่างของ OD น้อยมากจนในบางรายอ่านได้เป็นผลลบ ซึ่งการทดลองนี้ได้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Hendry และคณะ (109) ซึ่งได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ whole nasal secretion และ wash nasopharyngeal cell ในการตรวจหา RSV ด้วยวิธี ELISA พบว่าการใช้ whold nasal secretion ให้ผลดีกว่า

ตัวอย่างตรวจที่ใช้สำหรับตรวจด้วยวิธีนี้ สามารถที่จะเก็บแช่แข็งไว้ทำในเวลาที่สะดวกของผู้ปฏิบัติงานได้ ดังมีรายงานของ Flanders และคณะ (110) McIntosh ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทดลองเก็บตัวอย่างแช่แข็งไว้ที่ -20°ซ. พบว่าสามารถจะตรวจพบ RSV antigen ได้ แม้จะเก็บตัวอย่างไว้นานถึง 3 เดือนแล้วก็ตาม

เมื่อนำเอาวิธี biotin-avidin-ELISA นี้ไปใช้ในการตรวจหา RSV จากผู้ป่วยจำนวน 133 ราย พบว่าให้ผลบวกจำนวน 40 ราย (30%) และให้ผลลบ 93 ราย เมื่อเทียบกับวิธี shell vial technique แล้วจะมีความไว 88.89% ความจำเพาะ

100% positive predictive value เป็น 100% และค่า negative predictive value เป็น 94.6%

Hornsleth และคณะ (111) ได้รายงานไว้ว่าในคนไข้เด็กที่อายุน้อยกว่า 9 เดือนนั้น จะมีการปล่อย RSV antigen ออกมาน้อย ซึ่งมักจะทำให้เกิดผลลบปลอม เมื่อทำการตรวจหาด้วยวิธี ELISA จากการศึกษานี้มีคนไข้จำนวน 5 ราย ที่ให้ผลลบด้วยวิธี biolin-avidin ELISA ในขณะที่ shell vial technique ให้ผลบวก มีอายุ 2 เดือน, 3 เดือน 2 ราย, 4 เดือน และ 9 เดือน ซึ่งเป็นไปได้ว่าผลลบที่เกิดขึ้นนี้เกิดเนื่องจากการมีแอนติเจนปล่อยออกมาน้อยเกินไป จึงทำให้เกิดเป็นผลลบปลอมได้

เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจด้วยวิธี IFA พบว่าให้ผลไปด้วยกันสูงถึง 92% (123/133 ราย) มีขัดแย้งกัน 10 ราย ซึ่งมีทั้งที่ IFA ให้ผลบวกแต่ biotin-avidin-ELISA ให้ผลลบ (3 ราย) และที่ biotin-avidin-ELISA ให้ผลบวก แต่ IFA ให้ผลลบ (7 ราย) แต่ทั้ง 10 รายนี้ให้ผลบวกกับ shell vial technique ทุกรายซึ่งผลของการขัดแย้งกันนี้คงเนื่องมาจากวิธี IFA จะสามารถตรวจหา cell-associated antigen ได้ดีกว่า ส่วนวิธี biotin-avidin-ELISA จะสามารถตรวจหา cell-free antigen ได้ดีกว่า (110) ดังนั้นถ้ามีการแตกสลายของเซลล์ที่ติดเชื้อในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่าง ก็สามารถตรวจพบ RSV-antigen ได้ด้วยวิธี biotin-avidin-ELISA จึงทำให้วิธีนี้มีความไวมากกว่าวิธี IFA ในการตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ RSV ในผู้ป่วย

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ในผู้ป่วยด้วยวิธีทั้ง 4 วิธี นั่นคือ IFA,biotin-avidin-ELISA, shell vial technique และการเพาะเลี้ยงไวรัสแล้ว ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 26 ซึ่งจะเห็นว่าทุกวิธีมีความจำเพาะเท่าเทียมกัน คือ 100% เนื่องจากแต่ละวิธีที่นำมาใช้ทดสอบนี้ได้มีการควบคุมคุณภาพสำหรับการทดลองเป็นอย่างดี ทำให้สามารถกำจัดปัญหาผลบวกปลอมที่เกิดจากการอ่านผลผิดพลาดไปได้ และแอนติบอดีเฉพาะที่ใช้ (rabbit anti-RSV) เป็นชนิดและ lot เดียวกัน ดังนั้นคุณภาพของน้ำยาที่ใช้ตรวจในแต่ละวิธีจึงไม่แตกต่างกัน ความไวที่แตกต่างกันจากการตรวจนี้จึง

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 เปรียบเทียบการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ด้วยวิธี shell vial technique , biotin-avidin-ELISA , indirect immunofluorescence และ cell culture

วิธี	shell vial technique	biotin-avidin ELISA	IFA	cell culture
ความไว (%)	100	88.9	80.0	71.0
ความจำเพาะ (%)	100	100	100	100
เวลา	1วัน	5 ชม.	3 ชม.	1-3 สัปดาห์
วิธีการ	ยุ่งยาก	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก
การอ่านผล	ง่าย	ง่าย	ง่าย	ยุ่งยาก

หมายเหตุ : - ความไวและความจำเพาะคิดเทียบกับวิธี shell vial technique

เกิดขึ้นเนื่องจากหลักการและวิธีการที่แตกต่างกันของวิธีเหล่านี้ ซึ่งวิธีที่มีความไวมากเรียงตามลำดับ คือ shell vial technique (100%), biotin-avidin-ELISA (88.9%),IFA (80%) และ cell culture (71%)

สำหรับเวลาที่ใช้สำหรับการตรวจนั้น วิธี cell culture จะใช้เวลานานที่สุดคือใช้เวลาประมาณ 1-3 สัปดาห์ ในขณะที่วิธี shell vial technique ใช้เวลาเพียง 2 วัน ซึ่งนับรวมวันที่ต้องจัดเตรียมเซลล์ 1 วัน แต่ถ้านับเฉพาะเวลาที่ใช้ในการตรวจจริง ๆ จะใช้เวลาเพียง 1 วันเท่านั้น

วิธี IFA เป็นวิธีที่ใช้เวลาในการตรวจน้อยคือ ประมาณ 3 ชม. แต่ขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างนั้นค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลานานกว่าการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจด้วยวิธี biotin-avidin-ELISA ซึ่งอาจใช้เวลาประมาณ 1-2 ชม. รวมแล้ววิธี IFA จะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 4-5 ชม. สำหรับวิธี ELISA นี้จะใช้เวลาทั้งหมดตั้งแต่เริ่มทำจนถึงการรายงานผลประมาณ 5 ชม.เศษ

ค่าใช้จ่ายต่อการตรวจ 1 รายนั้น สำหรับในรายงานนี้จะคิดแต่เฉพาะรายการที่เป็นวัสดุและน้ำยาเท่านั้นไม่ได้คิดรวมถึงค่าเครื่องมือต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งพบว่าวิธีที่มีค่าใช้จ่ายมากที่สุดคือวิธีการเพาะเลี้ยงไวรัสทั้ง 2 วิธี ส่วนวิธี IFA และ biotin-avidin-ELISA จะมีค่าใช้จ่ายใกล้เคียงกัน แต่ถ้าคิดเฉพาะค่าน้ำยาแล้ววิธี biotin-avidin-ELISA จะมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเนื่องจากน้ำยาที่ใช้ในวิธีนี้จะใช้ความเข้มข้นที่น้อยมาก (1:2,000-1:7,000) ในขณะที่วิธี IFA จะใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า (1:10-1:30)

สำหรับความสะดวกสบายของวิธีทำแล้วพบว่า วิธี biotin-avidin-ELISA มีความสะดวกสบายที่สุด เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก อีกทั้งวิธีทำและการอ่านผลสะดวกและมีข้อผิดพลาดน้อยกว่าวิธี IFA วิธีที่มีความยุ่งยากซับซ้อน คือวิธีการเพาะเลี้ยงไวรัส ทั้ง 2 วิธี เนื่องจากต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นประจำให้พร้อม ที่จะใช้เพาะเลี้ยงไวรัสและจะต้องทำทันทีเมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการไม่สามารถเก็บเช่นเชื้อ

ไว้ได้ เนื่องจากเป็นไวรัสที่ไม่คงทน แต่เมื่อเปรียบเทียบกันเองใน 2 วิธีแล้ว พบว่าวิธี shell vial technique เป็นวิธีที่มีความสะดวกสบายกว่า เนื่องจากใช้เวลาน้อยไม่ต้องคอยดู CPE ทุกวัน และไม่ต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์บ่อย ๆ การอ่านผลก็อ่านง่าย โดยจะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อเรืองแสงสีเขียวเหลือง ท่ามกลางเซลล์ปกติที่เห็นติดสีเคงของ Evan's blue ได้ชัดเจน

จะเห็นได้ว่า วิธีการแต่ละวิธีที่ใช้นี้ต่างก็มีข้อดี และข้อเสียแตกต่างกันออกไป สำหรับการศึกษาในครั้งนี้วิธีที่เหมาะสมที่จะใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ที่จะใช้ในการตรวจเป็นประจำนั้นมีความเห็นว่า ควรใช้วิธี biotin-avidin-ELISA เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง มีความสะดวกสบายกว่าวิธีอื่น สำหรับวิธี shell vial technique นั้นควรใช้เป็นวิธีตรวจยืนยันการติดเชื้อ RSV