หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจอย่างเฉียบพลัน (acute respiratory infection: ARI) ในเด็ก เป็นโรคระบาดที่กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยและองค์การอนามัยโลกให้ความสนใจกันมาก เพราะมีการระบาดอยู่ทุกปี เป็นเหตุทำให้เด็กเสียชีวิตเป็นจำนวนมากประมาณว่าทั่วโลก จะมีจำนวนถึง 2.2 ล้านคนต่อปี เชื้อที่เป็นสาเหตุนั้นพบว่ามีทั้งบัคเตรีและไวรัส (1) สำหรับไวรัสนั้นเชื้อที่เป็นสาเหตุมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus), ไวรัสพาราอินฟลูเอนซา (parainfluenza virus), ไวรัสเร็สไปราทอรี ซินไซเทียล (respiratory syncytial virus), ไวรัสอะดิโน (adenovirus), ไวรัสเอนเทอโร (enterovirus) และ ไวรัสไรห์โน (rhinovirus) เป็นต้น แต่ที่พบเป็นสาเหตุมากและบ่อยที่สุดคือ ไวรัสเร็สไปราทอรี ซินไซเทียล (2-4)

ไวรัสเร็สไปราทอรี ซินไซเทียล นี้ พบเป็นสาเหตุใหญ่ที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคหลอดลมฝอยอักเสบ (bronchiolitis) และปอดบวม (pneumonia) (4,5,6) โดยเฉพาะในเด็กเล็กช่วงขวบปีแรก มักก่อให้เกิดอาการรุนแรงและอัตราตายสูง ไม่ค่อยพบการติดเชื้อที่ไม่แสดงอาการ (7) ประมาณร้อยละ 50 ของเด็กที่เป็นโรคหลอดลมฝอยอักเสบจากเชื้อ RSV นี้จะเกิดอาการ asthma ได้ในภายหลัง (8) และการติดเชื้อ RSV นี้สามารถกลับเป็นอีก (recur) ได้ (9) โดยที่การติดเชื้อในครั้งแรกไม่อาจป้องกันการติดเชื้อครั้งต่อไปได้

เชื้อนี้ติดต่อทางหายใจและจากการปนเปื้อนในหอผู้ป่วยเด็ก เนื่องจากเชื้อเจริญที่บริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจในส่วน nasopharynx และถูกขับออกมากับสารคัดหลั่งจากจมูกและคอ (nasopharyngeal secretion) ประมาณ 10^4-10^5 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) ซึ่งเชื้อที่ถูกขับออกมานี้คงความสามารถใน

การติดเชื้ออยู่นานถึง 6 ชม. ดังนั้นการติดต่อเกิดได้จากการได้สัมผัสกับสิ่งคัดหลั่งจากบริเวณ nasopharynx ของผู้ป่วย ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อจากเด็กคนหนึ่งไปสู่เด็กอีกคนหนึ่งได้พบว่าร้อยละ 45 ของเด็กที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยสาเหตุอื่นและอยู่ในโรงพยาบาลนานเกิน 7 วัน จะมีการติดเชื้อ RSV นี้ได้ (10)

สำหรับการรักษาโดยมากจะรักษาตามอาการแต่ในรายที่มีการติดเชื้อรุนแรงนั้นในปัจจุบันพบว่ายา ribavirin ให้ผลดีในการรักษาในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ RSV (7,10)

การวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV นั้น เนื่องจากอาการแสดงทางคลินิคของเชื้อนี้ไม่แตกต่างจากการติดเชื้อของไวรัสชนิดอื่น ดังนั้นการวินิจฉัยจึงจำเป็นต้องอาศัยวิธีการทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ

สำหรับในประเทศไทยนั้น RSV จัดเป็นไวรัสที่พบมีการระบาดและก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจอักเสบแบบเฉียบพลันเช่นกัน ดังมีรายงานถึงการตรวจพบแอนติบอดีต่อ RSV ด้วยวิธี microneutralization test ในคนปกติในเขตกรุงเทพฯ ถึงร้อยละ 27.9-36.0 (11) และเมื่อศึกษาถึงไวรัสที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนอักเสบ โดยทำการศึกษาในเด็กอายุ 3 เดือน ถึง 13 ปี จำนวน 200 ราย ซึ่งทำการศึกษาที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า (12) โดยการแยกและวิเคราะห์เชื้อจาก nasopharyngeal secretion นั้น พบว่าจากไวรัสที่แยกทั้งหมด 94 strain จะพบเป็น RSV ถึง 72 strain ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 76 ของไวรัสที่แยกได้ทั้งหมด และคิดเป็นร้อยละ 36 ของจำนวนผู้ป่วย (72 รายใน 200 ราย) จากการศึกษาที่โรงพยาบาลรามาธิบดี ถึงเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลัน ของระบบหายใจในเด็ก (13) จากเด็กที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น pneumonia จำนวน 267 ราย พบมีไวรัสเป็นสาเหตุถึงร้อยละ 41 ซึ่งในจำนวน 267 รายนี้พบเป็น RSV มากที่สุดคือพบถึงร้อยละ 22.5 และพบเชื้อนี้ระบาดในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงเดือน พฤศจิกายน การศึกษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ในปี พ.ศ. 2530 (13) ตรวจพบการติดเชื้อ RSV ในเด็กด้วยวิธี indirect immunofluorescence ได้ร้อยละ 24.14 (35 รายใน 145 ราย) โดยการศึกษาในเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 2 ปี ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยปัญหาของปอดอักเสบ และพบมีการระบาดเกิดขึ้นในช่วงฤดูฝน (เดือน กรกฎาคม - กันยายน)

จากที่กล่าวมาแล้วนี้ จะเห็นได้ว่า RSV เป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจในเด็ก โดยเฉพาะในช่วงขวบปีแรก ซึ่งเป็น

ปัญหาทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย ซึ่งการวินิจฉัยยังคงต้องอาศัยวิธีการทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะสูง และได้มีการเปรียบเทียบวิธีการที่ใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV เพื่อหาวิธีที่ดีและเหมาะสม เพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจะมีประโยชน์ในการดูแลรักษาคนไข้ที่ติดเชื้อ RSV

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดลองนำเอาวิธี biotin-avidin ELISA มาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนของ RSV เพื่อตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV
2. เพื่อทดลองนำเอาวิธี shell vial technique มาประยุกต์ใช้ในการแยกและตรวจวิเคราะห์การติดเชื้อ RSV
3. เพื่อเปรียบเทียบการตรวจหา RSV ใน nasopharyngeal secretion จากผู้ป่วยด้วยวิธี indirect immunofluorescence, biotin-avidin ELISA, shell vial technique และการทำ cell culture

การสำรวจเอกสาร

ประวัติ

Respiratory Syncytial Virus (RSV) พบครั้งแรกโดย Morris และคณะ (15) ในปี 1956 โดยแยกเชื้อนี้ได้จากทางเดินหายใจของลิงชิมแปนซีที่ป่วยเป็นหวัด เมื่อนำเชื้อที่แยกได้นี้ฉีดกลับเข้าไปในลิงชิมแปนซีตัวใหม่ ก็สามารถทำให้ลิงนี้เกิดอาการเช่นเดิมได้อีก จึงได้ชื่อว่า chimpanzee coryza agent (CCA) ต่อมาในปี 1957 Chanock และคณะ (16) แยกเชื้อนี้ได้จากเด็กทารก 2 คนที่มีอาการของโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง (lower respiratory disease) และได้เปลี่ยนมาใช้ชื่อ respiratory syncytial virus (RSV) ตามลักษณะเฉพาะ ที่ไวรัสนี้ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดการรวมตัวเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (syncytium formation) มีหลายนิวเคลียส (17) จากนั้นได้มีการศึกษาถึงระบาดวิทยาของเชื้อนี้มากขึ้น โดยเริ่มเมื่อต้นปี 1960 พบว่า RSV เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดลมฝอยอักเสบ (bron-

chiolitis) และโรคปอดบวม (pneumonia) มักพบในเด็กมากกว่าในกลุ่มอายุอื่น โดยเฉพาะในช่วงขวบปีแรกของอายุ (18,19) แต่ก็พบมีรายงานการเกิดโรคในผู้ใหญ่ด้วยเช่นกัน (20)

ในปี 1968 Doggett และคณะ (21) พบแอนติบอดีต่อ RSV ในสัตว์พวกวัว ควาย และในปี 1970 สามารถแยกเชื้อนี้ได้จากวัว (22) ซึ่งแสดงว่าเชื้อนี้สามารถก่อโรคในสัตว์พวกวัวควายได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการติดเชื้อ RSV นี้ในห่านแกะ และแมว (23-25)

การจัดจำพวก

RSV จัดอยู่ใน genus Pneumovirus ซึ่งอยู่ใน family Paramyxoviridae (7) เป็นไวรัสที่มีเปลือกหุ้ม (envelope) ผิวด้านนอกมี spike ยื่นออกมา แต่ไม่มีคุณสมบัติของ neuraminidase และ hemagglutinin ซึ่งแตกต่างไปจากไวรัสอื่นใน genus Paramyxovirus RSV มี genome เป็น RNA สายเดี่ยว ปัจจุบันมีเพียง serotype เดียว แต่เมื่อศึกษาด้วย monoclonal antibody ต่อ F glycoprotein และ G glycoprotein ด้วยวิธี IFA หรือ ELISA พบมีแอนติเจนที่แตกต่างกัน (antigenic variants) ทำให้แบ่ง RSV ออกเป็น 3 subgroup คือ subgroup-A, subgroup-B และ intermediated strains (26-28)

คุณสมบัติและโครงสร้างของไวรัส

virion มีลักษณะไม่แน่นอน (pleomorphic forms) ส่วนใหญ่มีลักษณะกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80-150 nm เปลือกนอกมี projection ขนาดกว้าง 10 nm ยาว 12 nm ความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) จะถูกทำลายด้วย ether, chloroform, 0.25% trypsin, 0.1% sodium deoxycholate (29) และความร้อนโดยความสามารถในการติดเชื้อนี้จะลดลงร้อยละ 90 เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 55°ซ. นาน 5 นาที, 37°ซ. นาน 24 ชม. และที่ 4°ซ. นาน 4 วัน สามารถเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่า -50°ซ. ได้นานหลายเดือน (30)

ไวรัสจะถูกทำลาย (inactivate) อย่างรวดเร็วที่ pH 3 แต่จะคงอยู่ได้นานเมื่อค่า pH มากกว่า 4 ขึ้นไป เกลือ inorganic โดยเฉพาะพวก divalent

เช่น magnesium และ calcium และสารจำพวกน้ำตาล เช่น glucose และ sucrose จะช่วยป้องกันการถูก inactivate ได้ (31,32)

จากการศึกษาด้วยวิธีต่าง ๆ พอสรุปได้ว่า genome ของ RSV ซึ่งมีขนาดประมาณ 5 X 10^6 d (33,34) จะสามารถ transcribe ได้เป็น m-RNA ที่แตกต่างกัน 10 สาย แต่ละสายของ m-RNA นี้จะถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน 1 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยที่

NS_1 และ NS_2 เป็น nonstructural protein มี MW 15.6 kda และ 14.7 kda ตามลำดับ ไม่พบใน virions

NS3 เป็น nonstructural protein มี MW 7.3 kda พบใน virions

Nucleocapsid protein (N) เป็น structural protein พบอยู่ในส่วนของ nucleocapsid มี MW 43.5 kda มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ transcription และ translation

Phosphoprotein (P) เป็น structural protein เช่นกันมี MW 27.1 kda มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ transcription และการ translation ของไวรัส

Matrix protein (M) เป็นโปรตีนที่พบในส่วนของเปลือกหุ้มไวรัส มี MW 28.7 kda

M_2 protein ซึ่งพบที่เปลือกหุ้มไวรัสเช่นกัน มีความเป็นด่างมาก และมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic)

Larger envelope glycoprotein (G-protein) เป็นโปรตีนที่ถูก glycosylated มากที่สุด โดยที่เดิมมี MW เพียง 32.6 kda แต่เมื่อ glycosylated แล้วจะมี MW เพิ่มขึ้นเป็น 84-90 kda G-protein จะเกาะกับเปลือกหุ้มไวรัสโดยใช้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic region) ซึ่งอยู่ใกล้ ๆ กับ NH_2 terminus ซึ่งจะเป็นส่วนที่ไวรัสใช้เกาะติดกับเซลล์ขณะมีการติดเชื้อพบว่าแอนติบอดีต่อ G-glycoprotein นี้จะสามารถยับยั้งการเกาะติด (attachment) ของ RSV กับเซลล์ได้ (35)

F glycoprotein มี MW 68.7 kda มีหน้าที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์ (fusion function) โดยพบว่าถ้าเติม monoclonal antibody ต่อส่วน F glycoprotein นี้ลงไปจะสามารถยับยั้งการรวมตัวกันของเซลล์ได้ (36) F glycopro-

ตารางที่ 1 แสดงยีนและโปรตีนต่างๆ ที่ได้จากยีนของ respiratory syncytial virus (7)

3'- 5' order of RS virus genes	mRNA, no. of nucleotides excluding poly(A)[a]	Protein production				
		MW (kilodaltons)				
		No. of amino acid[a]	Unprocessed	After glycosylation	Location	Function
NS1	528	139	15.6	-	Not in virion	Not known
NS2	499	124	14.7	-	Not in virion	Not known
N	1197	391	43.5	-	Nucleocapsid	Structural protein of nucleocapsid
P	907	241	27.1	-	Nucleocapsid	Component of polymerase complex?
M	952	256	28.7	-	Inner aspect of viral envelope	Inner lining of viral envelope
NS3	405	64	7.5	-	Virion?	Not known
G	918	298	32.6	84-90[b]	Surface of viral envelope	Attachment to host cell receptors?
F	1899	574	63.5	68-70[b]	Surface of viral envelope	Fusion of viral envelope with host cell envelope, syncytium formation
M2	957	194	22.2	-	Viral envelope	Not known
L	6500[b]	?	200[b]	-	Nucleocapsid	Polymerase of nucleocapsid?

[a] Deduced from nucleotide sequence of cDNA cloned from viral mRNA.

[b] Estimated by gel electrophoresis.

tein จะพบมี major neutralization epitope ของ RSV อยู่ (37) F glycoprotein นี้ประกอบไปด้วย 2 subunit คือ F_1 และ F_2 ซึ่งต่อกันด้วย disulfide bond

F glycoprotein และ G glycoprotein นี้จะเกี่ยวข้องกับการมีแอนติเจนที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้แบ่ง RSV เป็น subgroup ต่าง ๆ

การเพิ่มจำนวนของไวรัส

ลักษณะของการเจริญเพิ่มจำนวนที่เฉพาะของ RSV นี้ได้มีการศึกษาโดยอาศัยเซลล์ที่ได้จากคนและจากลิง พบว่าประมาณร้อยละ 60-90 ของไวรัส จะเกาะติด (adsorp) กับเซลล์ภายใน 30 นาที เมื่ออบที่อุณหภูมิ 37°ซ. แต่ถ้าจะให้ไวรัส adsorp กับเซลล์มากกว่าร้อยละ 95 ต้องใช้เวลาในการ adsorp นาน 10-12 ชม. (38,39) การเกาะกับเซลล์ของไวรัสจะใช้ส่วนของ G glycoprotein สำหรับ receptor ที่อยู่บนเซลล์นั้นยังไม่ทราบว่าเป็นอะไร แต่คาดว่าจะเป็น sialic acid (39,40) ไวรัสที่เกาะติดอยู่บนผิวเซลล์นี้จะเข้าสู่ภายในเซลล์ (penetration) ภายในเวลา 45 นาที โดยอาศัยขบวนการ membrane fusion (39) ช่วง lalent period จะกินเวลาประมาณ 12-16 ชม. progeny ใหม่ของไวรัสจะพบมากที่สุดหลังการติดเชื้อนาน 36-48 ชม. ซึ่งไวรัสส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 90) จะอยู่ภายในเซลล์ (41)

การเพิ่มจำนวนของไวรัสนี้จะเกิดในส่วนของ cytoplasm เนื่องจากมีgenome เป็น RNA เส้นเดี่ยวสายลบ ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับการ transcription ให้ได้เป็น complementary viral m-RNA ดังนั้นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนจึงไม่ต้องขึ้นกับ nuclear DNA synthesis (34,42) RSV จะไม่หยุดขบวนการ metabolism ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) (43)

แอนติเจนของไวรัสสามารถตรวจพบด้วยวิธี immunofluorescence ในเวลาประมาณ 8-10 ชม.หลังการติดเชื้อ (38,43) เมื่อย้อมด้วย acidine orange จะพบ eosinophilic inclusion bodies อยู่ใกล้ ๆ กับนิวเคลียส และเมื่อย้อมด้วย monoclonal antibodies ต่อส่วนของ nucleocapsid หรือ phosphoprotein จะสามารถจับได้กับ inclusion bodies นี้ ซึ่งแสดงว่ามีส่วนของ nucleocapsid

ของไวรัสอยู่ (44,45) ไวรัสจะใช้ cytoplasmic membrane ของเซลล์เป็นเปลือกหุ้ม เมื่อไวรัส budding ออกจากเซลล์จะมีขนาด 80-150 nm

RSV สามารถเข้าสู่เซลล์และเจริญเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์หลายชนิดด้วยกัน เช่น เซลล์ HEp-2 (46) และ เซลล์ Hela (47) ซึ่งเป็น heteroploid cell line สามารถเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ตลอดไปโดยต้องทำการ passage cell บ่อย ๆ ซึ่งการ passage cell บ่อย ๆ นี้ อาจทำให้ความไวของการติดเชื้อของเซลล์ลดลงได้ ซึ่งไม่อาจคาดเดาได้ว่าจะเกิดขึ้นเมื่อใด ดังนั้นจึงควรมีการเก็บเซลล์นี้บางส่วนแช่แข็งไว้ ในขณะที่เซลล์ยังมีความไวต่อการติดเชื้ออยู่ และนำออกมาละลายและเพาะเลี้ยงใหม่ ทำเช่นนี้ทุก 1-2 เดือน ก็จะทำให้เซลล์ยังคงมีความไวต่อการติดเชื้อได้ดีตลอดไป นอกจากนี้แล้ว RSV ยังสามารถเจริญได้ในเซลล์อื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น เซลล์ Vero, LLCMK-2, BSC-1 และ CV-1 แต่เป็นที่สังเกตว่า RSV จะเพิ่มจำนวนได้ดีในเซลล์ชนิดที่เป็น heteroploid cell line (7) มากกว่า

<u>ระบาดวิทยาของเชื้อ</u>

RSV เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วภูมิภาคของโลก ดังมีรายงานพบเชื้อนี้ที่อังกฤษ (48) สหรัฐอเมริกา (49) และประเทศแถบเอเชีย (3,12,50) ดังสามารถตรวจพบแอนติบอดี ต่อเชื้อนี้ในคนปกติได้มากกว่าร้อยละ 40 (51) และที่กรุงเทพฯ ได้มีการสำรวจหาแอนติบอดีในคนปกติอายุตั้งแต่ 3 เดือนถึงเกิน 50 ปี ก็พบว่ามีแอนติบอดีอยู่ร้อยละ 27.9-36.0 (11)

เชื้อนี้มักพบระบาดเป็นช่วงฤดูกาล ซึ่งจะแตกต่างไปตามภูมิภาคโลก แต่ส่วนใหญ่มักจะระบาดในช่วงฤดูที่มีความชื้นสูง เช่นที่ สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และสกอตแลนด์ พบระบาดในช่วงปลายฤดูใบไม้ร่วง ต่อเข้าฤดูหนาวจนถึงต้นฤดูใบไม้ผลิ (4,49,52,53) ส่วนในประเทศเขตร้อน เช่น สิงคโปร์ ฮ่องกง และไทย มักพบระบาดในช่วงฤดูฝน (12,13,54)

การติดเชื้อจะพบในเด็กมากกว่าในผู้ใหญ่ และในเด็กเพศชายมากกว่าในเด็กเพศหญิงเล็กน้อย โดยมีอัตราส่วนของการติดเชื้อเป็น 1.3-1.5:1 (13,55) สำหรับเชื้อชาตินั้นไม่มีผลต่อความถี่และความรุนแรงของการติดเชื้อ RSV แต่อย่างใด

การติดต่อ เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ทาง จมูก ,nasopharynx และ ตา แต่ไม่สามารถมีการติดเชื้อได้เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายทางปาก (10) เชื้อเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเจริญเพิ่มจำนวนบริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจส่วน nasopharynx และถูกขับออกมากับสารคัดหลั่งจากจมูกและคอ (nasopharyngeal secretion) ในวันที่ 3-8 หลังจากการได้รับเชื้อ จากรายงานของ Hall และคณะ (56) ซึ่งศึกษาในเด็กที่ติดเชื้อ RSV ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล พบว่าไวรัสจะถูกขับออกมากับ secretion ประมาณ 10^4-10^5 $TCID_{50}$ ต่อ secretion 1 มล. (57) จะตรวจพบเชื้ออยู่ประมาณ 6 วัน เชื้อจะค่อย ๆ ลดลงและหมดไปในสัปดาห์ต่อมา แต่ในเด็กบางรายอาจพบเชื้ออยู่ได้นานถึง 21 วัน เชื้อที่ถูกขับออกมานี้ยังคงมีความสามารถในการติดเชื้ออยู่ได้นานถึง 6 ชม.(58) ซึ่งเชื้อจำนวนเพียง 160-640 $TCID_{50}$ จะสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในอาสาสมัครถึงร้อยละ 83 (59) โดยที่เชื้อที่นำมาใช้ทดลองนี้ผ่านการเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงมาแล้ว 2 ครั้ง ซึ่งความรุนแรงของการติดเชื้อย่อมน้อยกว่าไวรัสที่ไม่ได้ผ่านการเลี้ยงในเซลล์มาก่อน ดังนั้นจึงมักพบว่า RSV นี้เป็นปัญหาที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ได้บ่อยที่สุด (60)

พยาธิสภาพและพยาธิกำเนิด

ไวรัสเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะเข้าไปเจริญเพิ่มจำนวนบริเวณเยื่อบุทางเดินหายใจในส่วนของ nasopharynx ระยะฟักตัวประมาณ 4-5 วัน ไวรัสจะเคลื่อนตัวจากทางเดินหายใจส่วนบนไปสู่ทางเดินหายใจส่วนล่างด้วยกลไกใดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าคงเป็นการเคลื่อนตัวผ่านจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง เลยโดยไม่มีภาวะออกนอกเซลล์ หรืออาจเกิดเนื่องจากการสูดเอา secretion ซึ่งมีเชื้อเข้าไปในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง อาการของโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง จะปรากฏในวันที่ 1-3 หลังจากมีน้ำมูกไหล อาการนี้เกิดจากไวรัสเข้าสู่หลอดลมและหลอดลมฝอย ยังไม่ทราบจำนวนที่แน่นอนของไวรัสในทางเดินหายใจส่วนล่างของผู้ป่วย แต่จากการตรวจศพผู้ป่วย (autopsy)จะพบแอนติเจนของไวรัสจำนวนมากในเด็กที่เสียชีวิตด้วยอาการ pneumonia แต่จะพบน้อย ในเด็กที่เป็น brochiolitis (61) ไวรัสจะไม่รุกล้ำเกินชั้น superficial ของเยื่อบุทางเดินหายใจ และจะพบเชื้อนี้ในระบบทางเดินหายใจเท่านั้น มีรายงานการพบ RSV นี้ในหูชั้นกลางได้ แต่ก็พบเป็นส่วนน้อยไม่พบเชื้อนี้ในกระแสเลือด

การ shedding ของไวรัสจะสิ้นสุดลงพร้อม ๆ กับการตรวจพบ secretory antibody คนไข้ที่มีความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) จะพบเชื้อนี้ได้ที่อวัยวะอื่น เช่น ตับ ไต และกล้ามเนื้อหัวใจ (62)

สำหรับ pathogenesis ของการติดเชื้อ RSV นี้ สันนิษฐานกันว่าเป็นกลไกของระบบภูมิต้านทานของร่างกาย immunopathogenic mechanism (9) ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาของ RSV-antibody complex มีรายงานการพบ complement components บนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV ของผู้ป่วยที่กำลังมีการติดเชื้อ RSV อยู่(63) และจากการศึกษาในหลอดทดลองยังพบว่า RSV-antibody complex นี้ สามารถกระตุ้น oxidative และ arachidonic acid metabolism ของ neutrophils (64) หรืออาจเกิดเนื่องจาก cell-mediated immune mechanism ซึ่งเกี่ยวข้องกับ lymphocyte-mediated delayed hypersensitivity (65)

<u>ความต้านทานต่อการติดเชื้อ RSV</u>

ระบบภูมิคุ้มกันมีความสำคัญมากในการยุติการติดเชื้อไวรัสนี้ พบว่าในเด็กที่มีระบบภูมิคุ้มกันปกติ จะมีการ shedding ไวรัส ในเวลา 1-3 สัปดาห์เท่านั้น แต่ในเด็กที่ภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์บกพร่องจะไม่สามารถกำจัดไวรัสออกไปได้ จึงพบมีการ shedding ไวรัสนานหลายเดือน

สำหรับการตอบสนองทางการสร้างแอนติบอดี พบว่ามีทั้ง serum antibody และ secretory antibody แต่มีรายงานพบว่า secretory antibody ของเด็กไม่สามารถจะยับยั้งการติดเชื้อของ RSV ได้ในหลอดทดลอง (75) ซึ่งความบกพร่องนี้คงเนื่องมาจากระบบภูมิต้านทานของเด็กยังไม่เจริญเต็มที่ ซึ่งต่างจากการทดลองในอาสาสมัครที่เป็นผู้ใหญ่ (66) ซึ่งสามารถตรวจพบ nasal neutralizing IgA ได้ แต่อย่างไรก็ตาม อาสาสมัครเหล่านี้ยังคงสามารถติดเชื้อ RSV ซ้ำได้ ถ้าได้รับเชื้อจำนวนมาก

การติดเชื้อ RSV นี้ ตรวจไม่พบ interferon ใน nasal secretion ซึ่ง

ต่างจากการติดเชื้อไวรัส influenza และ parainfluenza ที่จะพบ interferon ในระดับสูง

กลไกของระบบภูมิต้านทานต่อการป้องกันการติดเชื้อ และการติดเชื้อซ้ำนี้ยังไม่ชัดเจนนัก คล้ายกับว่ามีความคุ้มกันแต่เพียงบางส่วนเท่านั้น เช่น พบมีการติดเชื้อในเด็กเล็กได้ แม้จะตรวจพบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาจากแม่ก็ตาม และการติดเชื้อซ้ำจะสามารถพบได้ในทุกกลุ่มอายุ ในบางครั้งในเด็กทารก อาจพบมีการติดเชื้อซ้ำได้ภายใน 2-3 สัปดาห์ หลังการติดเชื้อครั้งแรก (67) นั่นเอง

การรักษา การควบคุม และการป้องกัน

การรักษาส่วนใหญ่จะรักษาตามอาการ ซึ่งการติดเชื้อ RSV นี้สามารถหายได้เองในเด็กที่มีระบบภูมิต้านทานปกติ และอาการไม่รุนแรง สำหรับในรายที่มีอาการรุนแรงนั้นในปัจจุบันมี antiviral compound ที่มีรายงานว่าใช้ได้ผลดีในการรักษาการติดเชื้อ RSV คือ ribavirin (1-B-D-ribofuranosyl-1,2,4 triazole-3-carboxamide) พบว่าจะช่วยลดระยะเวลาของการเกิด bronchiolitis และการ shedding ไวรัส (68,69) การให้ immunoglobulin ที่มี RSV-neutralizing antibody titer ที่สูง ๆ ทางเส้นเลือดดำ พบว่าจะช่วยลดการ shedding ไวรัส (76)

สำหรับการควบคุมและป้องกันนั้นในปัจจุบันการเตรียมวัคซีนยังอยู่ในช่วงศึกษาทดลอง (70-72) แต่พบว่าเด็กที่ดื่มนมแม่จะสามารถป้องกันการติดเชื้อ RSV หรือมีผลลดความรุนแรงของโรคลงได้ (73-75)

การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

สำหรับการตรวจทางห้องปฏิบัติการนี้แบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ

1. การตรวจวินิจฉัยจากสิ่งส่งตรวจโดยตรง มีหลายวิธีดังนี้

1.1 การตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน (electron microscopy:EM)(77) โดยตรวจหาอนุภาคไวรัสจาก nasopharyngeal secretion

โดยตรง วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว แต่มักประสบปัญหาเนื่องจากจำนวนไวรัสน้อยเกินไป ทำให้อ่านผลผิดพลาดได้ อีกทั้งต้องอาศัยประสบการณ์ และความชำนาญสูง และใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทำให้วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมแพร่หลาย

1.2 การตรวจด้วยวิธี immunofluorescence (IFA) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจหา RSV เป็นประจำในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีที่รวดเร็ว ใช้เวลาในการตรวจไม่นาน วิธีที่นิยมใช้มีทั้งชนิด direct และ indirect technique แอนติบอดีที่ใช้ก็มีทั้งที่เป็น polyclonal และ monoclonal antibody (78-81) ซึ่งทำให้ความไวและความจำเพาะของวิธีจะแตกต่างกันไปขึ้นกับวิธีและแอนติบอดีที่เลือกใช้ ซึ่งพบอยู่ระหว่าง 61-95% และ 86-95% ตามลำดับ ข้อจำกัดของวิธีนี้คือ การเก็บส่งตัวอย่างต้องการจำนวนเซลล์ที่มากพอ และการอ่านผลต้องอาศัยกล้อง fluorescence และความชำนาญของผู้อ่าน

1.3 การตรวจด้วยวิธี immunoperoxidase (IP) เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะเทียบเคียงกับวิธี IFA แต่มีข้อดีกว่าคือการอ่านผลจะใช้กล้องจุลทัศน์ธรรมดา และ slide ที่ทำเสร็จแล้วสามารถเก็บได้นาน Garder และคณะ (82) ได้รายงานว่าใน nasopharyneal secretion จะมีเซลล์ที่อักเสบ (inflammatory cell) ซึ่งจะมี endogeneous peroxidase อยู่ ซึ่งอาจทำให้อ่านได้ผลบวกปลอมได้ และการกำจัด endogeneous peroxidase นี้ จะมีผลทำลายแอนติเจนของ RSV ไปด้วย แต่ในรายงานของ Cevinini และคณะ (83) ได้ทำการตรวจหา RSV ด้วยวิธี IP นี้เช่นกัน แต่ไม่มีผลรบกวนจาก endogeneous peroxidase แต่อย่างใด ผลที่ได้ไม่ตรงกันนี้ คงเนื่องมาจาก การใช้น้ำยาที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง peroxidase conjugate และ substrate

1.4 การตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี ELISA การตรวจวิธีนี้นับว่ามีความสะดวกทั้งวิธีการทำและวิธีการอ่านผล ซึ่งไม่จำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญเท่ากับ 3 วิธีแรก ความไวและความจำเพาะจะขึ้นกับหลักการและน้ำยาที่เลือกใช้ ซึ่งจะอยู่ในช่วง 81-95% และ 90-100% ตามลำดับ (84-86) ความไวของวิธีนี้จะ

เพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการนำเอาระบบ biotin-avidin เข้ามาใช้ โดยที่ Guesdon และคณะ (87) ได้เริ่มนำเข้ามาใช้เป็นครั้งแรก โดยอาศัยคุณสมบัติของ avidin ซึ่งเป็น glycoprotein MW 68,000 dalton จะมีส่วนที่จับแบบจำเพาะกับ biotin อยู่ 4 ส่วนด้วยกัน (4 binding site) การจับจะเป็นแบบ noncovalent bond ซึ่งมีความสามารถในการจับกันสูงมาก (dissociation constant 10^{-5} M) จึงทำให้มีความไวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเมื่อเทียบกับวิธี double antibody sandwich ELISA แล้วจะมีความไวสูงกว่าประมาณ 4-5 เท่า (88)

2. การแยกและวิเคราะห์เชื้อโดยการเพาะเลี้ยงในเซลล์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ถือเป็นมาตรฐานสำหรับการวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV เซลล์ที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงคือ เซลล์ HEp-2 ซึ่งพบว่ามีความไวกว่าเซลล์ชนิดอื่น (89) แต่มีรายงานการใช้เซลล์หลายชนิดร่วมกัน เช่น HEp-2, MRC-5, WI-38 และ RhMK จะทำให้มีความไวเพิ่มขึ้น (90) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะใช้เวลานาน เนื่องจากการเกิด CPE จะใช้เวลาประมาณ 1-2 สัปดาห์ จึงมีผู้พัฒนาวิธีการใหม่เพื่อเพิ่มความไวในการตรวจ และลดเวลาให้น้อยลง

โดยเริ่มจากการพบว่าแรงปั่นจะช่วยให้ไวรัส adsorp กับเซลล์เพิ่มขึ้น 10-100 เท่า เมื่อเทียบกับการ adsorp ธรรมดา (91,92) ซึ่งอธิบายได้ว่าแรงปั่นจะช่วยทำให้ไวรัสเข้าใกล้เซลล์ได้มากขึ้น การ adsorp กับ receptor บนผิวเซลล์เกิดขึ้นได้ง่าย จึงทำให้มี infectivity เพิ่มขึ้น ดังนั้นการปั่นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการเพิ่มความไวของการเพาะแยกเชื้อไวรัส และจากการพบว่าไวรัสสามารถที่จะแสดงแอนติเจนที่เฉพาะให้ปรากฏบนผิวเซลล์ที่ติดเชื้อ และสามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี IFA ซึ่งการพบแอนติเจนนี้จะเกิดก่อนที่จะปรากฏ CPE ให้เห็น ทำให้ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจพบไวรัสลงได้มาก ซึ่งเมื่อนำเอาหลักการทั้งสองนี้มารวมกัน จะทำให้การแยกและวิเคราะห์เชื้อไวรัสมีความไวเพิ่มขึ้น แต่ใช้เวลาน้อยลง เรียกวิธีนี้ว่าวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique) เนื่องจากวิธีนี้ทำการเพาะเลี้ยงไวรัสในหลอดพลาสติกก้นแบน (vial) ภายในมีแผ่นแก้วบาง ๆ ใช้เป็นที่เกาะเจริญของเซลล์ที่ใช้เพาะเลี้ยงไวรัส เพื่อสะดวกในการนำไปปั่น และแผ่นแก้วนี้สามารถนำไปย้อม IFA เพื่อตรวจหาแอนติเจนของไวรัสได้เลย ทำให้มีความสะดวกยิ่งขึ้น ได้มีรายงานการนำเอาวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจหาไวรัส

หลายชนิด เช่น herpes simplex virus (93), cytomegalovirus (94) โดยเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเดิม พบว่ามีความไวสูงกว่า และลดเวลาจากเดิมใช้เวลาในการตรวจพบ CPE 6-9 วัน มาเหลือเพียง 16-36 ชม. หลังการเพาะเลี้ยง และเมื่อนำมาตรวจหา influenza virus (95) ก็ได้ผลในทำนองเดียวกัน แต่ยังไม่พบรายงานการนำไปใช้ในการตรวจหา RSV เลย

3. การตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่ม สามารถตรวจได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น complement fixation test (CF), neutralization test (NT), IFA และ ELISA (4) แต่มักจะพบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของเด็กจะเกิดขึ้นช้า ดังนั้น การตรวจพบแอนติบอดีหรือการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของระดับแอนติบอดี จึงต้องอาศัยเวลานาน ดังเช่นรายงานของ Kadi และคณะ (96) ซึ่งทำการตรวจหา IgM ของเด็กที่ติดเชื้อ RSV ด้วยวิธี IFA พบว่าถ้าเจาะเลือดในวันที่ 0-4 หลังมีอาการแล้วการตรวจพบ IgM จะมีความไวเพียง 34% เมื่อเทียบการเพาะแยกเชื้อไวรัส ดังนั้น การตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาทางด้านระบาดวิทยามากกว่าการใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV