

รายงานการวิจัยเรื่อง

อุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กไทย

(Incidence of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children)

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ประจำปี 2550-2551

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

เอกสิทธิ์ โกวิทย์ดำรงค์

ภาวพันธ์ ภัทร โกศล

รุจิภักดิ์ สํารายณ์สำรวจกิจ

นวลจันทร์ ปราบพาล

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา แพทย์ประจำบ้านและแพทย์ประจำบ้านต่อยอดสาขากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และงานวิจัยนี้คงไม่สามารถสำเร็จลงได้ ถ้าไม่ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2550-2551 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณความสำเร็จทุกประการที่ได้จากการวิจัยนี้ให้กับผู้ร่วมงาน ผู้ปกครองและผู้ป่วยเด็กทุกคนที่เข้าร่วมในการศึกษาครั้งนี้

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย อุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กไทย

ชื่อผู้วิจัย เอกสิทธิ์ โกวิทย์ดำรงค์, ภาวพันธ์ ภัทร โกศล, รุจิภัตต์ สำราญสำรวจกิจ,

นวลจันทร์ ปราบพาล

ปีที่ทำการวิจัยเสร็จ พ.ศ. 2552

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและการเสียชีวิตที่สำคัญในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปีในประเทศที่กำลังพัฒนา สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส การศึกษานี้ได้ทำการตรวจ nasopharyngeal aspirates ของผู้ป่วยเด็กอายุ 0-5 ปีที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างจำนวน 268 รายที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึงกันยายน พ.ศ. 2552 ด้วยวิธี multiplex realtime reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่าร้อยละ 67.2 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โดย respiratory syncytial virus (RSV) เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด พบร้อยละ 39.9 รองลงไปได้แก่ adenovirus (ADV) พบร้อยละ 23.1, influenza virus type A (IFV-A) พบร้อยละ 7.1, parainfluenza virus type 1 (PIV-1) พบร้อยละ 3.7, parainfluenza virus type 3 (PIV-3) พบร้อยละ 3.7, parainfluenza virus type 2 (PIV-2) พบร้อยละ 0.8 และ influenza virus type B (IFV-B) พบร้อยละ 0.4 การตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน การตรวจหา IFV-A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100.0 และ 96.9, การเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 36.4 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 54.6 และ 99.2 ตามลำดับ การตรวจหา ADV ด้วย multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 95.4 และ 90.7, การเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 27.9 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 27.9 และ 99.1 ตามลำดับ การตรวจหา PIV-1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 87.5 และ 98.9, การเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 87.5 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 75.0 และ 98.9 ตามลำดับ การตรวจหา PIV-3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 90.9 และ 100.0, การเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 72.7 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 54.6 และ 98.8 ตามลำดับ การตรวจหา RSV ด้วยวิธี realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 98.1 และ 97.0, การเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 85.6 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 92.3 และ 99.4 ตามลำดับ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project Title Incidence of acute viral infections of the respiratory tract in Thai children

Investigators Ekasit Kowitdamrong, Parvapan Bhattarakosol, Rujipat Samransamruajkit,
Nuanchan Prapphal

Year 2009

Abstracts

Acute lower respiratory tract infection is a principal cause of morbidity and mortality in children under five years old in developing countries. Most infections are caused by viruses. In this study, a total of 268 nasopharyngeal aspirates of children aged 0-5 years who admitted to King Chulalongkorn Memorial Hospital with acute lower respiratory tract infection during July 2007 and September 2009 were tested by multiplex realtime reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The incidence of viral infection was 67.2 percent. Respiratory syncytial virus (RSV) was the most common pathogen, 39.9 percent found. Followed by adenovirus (ADV) 23.1 percent, influenza virus type A (IFV-A) 7.1 percent, parainfluenza virus type 1 (PIV-1) 3.7 percent, parainfluenza virus type 3 (PIV-3) 3.7 percent, parainfluenza virus type 2 (PIV-2) 0.8 percent and influenza virus type B (IFV-B) 0.4 percent. Multiplex realtime RT-PCR for detection of respiratory viruses had high sensitivity and specificity when compared with conventional methods. The sensitivity and specificity of multiplex realtime RT-PCR for detection of IFV-A were 100.0 and 96.9 percent, for viral culture were 36.4 and 100.0 percent, for antigen detection were 54.6 and 99.2 percent, respectively. The sensitivity and specificity of multiplex realtime RT-PCR for detection of ADV were 95.4 and 90.7 percent, for viral culture were 27.9 and 100.0 percent, for antigen detection were 27.9 and 99.1 percent, respectively. The sensitivity and specificity of multiplex realtime RT-PCR for detection of PIV-1 were 87.5 and 98.9 percent, for viral culture were 87.5 and 100.0 percent, for antigen detection were 75.0 and 98.9 percent, respectively. The sensitivity and specificity of multiplex realtime RT-PCR for detection of PIV-3 were 90.9 and 100.0 percent, for viral culture were 72.7 and 100.0 percent, for antigen detection were 54.6 and 98.8 percent, respectively. The sensitivity and specificity of realtime RT-PCR for detection of RSV were 98.1 and 97.0 percent, for viral culture were 85.6 and 100.0 percent, for antigen detection were 92.3 and 99.4 percent, respectively.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	8
ผลการวิจัย	19
อภิปรายผลการวิจัย	32
สรุปและเสนอแนะ	40
บรรณานุกรม	42
ภาคผนวก	45
ประวัตินักวิจัยและคณะ	52

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	19
ตารางที่ 2 ผลการตรวจพบเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ	21
ตารางที่ 3 คุณสมบัติของการตรวจหาไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธีต่างๆ	31

สารบัญญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การเพาะแยกเชื้อ respiratory syncytial virus ด้วยวิธี shell vial culture	9
รูปที่ 2 การตรวจหาแอนติเจนของ influenza virus type A ด้วยวิธี DFA	10
รูปที่ 3 การตรวจหาแอนติเจนของ respiratory syncytial virus ด้วยวิธี DFA	11
รูปที่ 4 การตรวจหา influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR	13
รูปที่ 5 การตรวจหา influenza virus type B ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR	14
รูปที่ 6 การตรวจหา adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR	14
รูปที่ 7 การตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR	16
รูปที่ 8 การตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR	16
รูปที่ 9 การตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR	17
รูปที่ 10 การตรวจหา respiratory syncytial virus ด้วยวิธี in-house realtime RT-PCR	18
รูปที่ 11 กลุ่มตัวอย่างจำแนกตามการวินิจฉัยโรค	20
รูปที่ 12 สัดส่วนของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี	22
รูปที่ 13 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสในแต่ละช่วงอายุ	22
รูปที่ 14 ไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในแต่ละช่วงอายุ	23
รูปที่ 15 สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปอดบวมในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี	23
รูปที่ 16 สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค Croup ในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี	24
รูปที่ 17 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในแต่ละเดือน	25
รูปที่ 18 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Respiratory syncytial virus ในแต่ละเดือน	26
รูปที่ 19 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Adenovirus ในแต่ละเดือน	26
รูปที่ 20 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Influenza virus type A ในแต่ละเดือน	26
รูปที่ 21 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Parainfluenza virus type 1 ในแต่ละเดือน	27
รูปที่ 22 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Parainfluenza virus type 3 ในแต่ละเดือน	27

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ADV	=	Adenovirus
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
Cp	=	Crossing point
CPE	=	Cytopathic effect
DFA	=	Direct fluorescent antibody assay
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EIA	=	Enzyme immunoassay
FA	=	Fluorescent antibody assay
HEp-2	=	Human Epidermoid Laryngeal Carcinoma cell
hMPV	=	Human metapneumovirus
IFV-A	=	Influenza virus type A
IFV-B	=	Influenza virus type B
LLC-MK2	=	Rhesus Monkey Kidney Epithelial cell
MDCK	=	Madin Darby Canine Kidney cell
MEM	=	Minimum Essential Medium
MPG	=	Magnetic Glass Particles
n	=	Number
NA	=	Not available
NPV	=	Negative predictive value
NTC	=	No template control
PBS	=	Phosphate Buffer Solution
PCR	=	Polymerase chain reaction
PIV-1	=	Parainfluenza virus type 1
PIV-2	=	Parainfluenza virus type 2
PIV-3	=	Parainfluenza virus type 3
PPV	=	Positive predictive value
RNA	=	Ribonucleic acid
RSV	=	Respiratory syncytial virus
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในประชาชนทุกกลุ่มอายุ โดยเฉพาะในเด็กเล็ก, ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส อัตราการป่วยด้วยโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจพบสูงที่สุดในเด็กเล็ก เด็กที่อายุน้อยกว่า 5 ปี มีการเจ็บป่วยด้วยโรคติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจประมาณ 5 ครั้งต่อคนต่อปี ในขณะที่ผู้ใหญ่มีอัตราการป่วยประมาณ 2 ครั้งต่อคนต่อปี และผู้ป่วยจำนวน 1 ใน 4 มีอาการป่วยจนต้องไปพบแพทย์เพื่อรับการรักษา (1) โรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญในเด็ก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา มีการประมาณว่าในแต่ละปี ทั่วโลกมีเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ประมาณ 4.5 ล้านคนที่ต้องเสียชีวิตเนื่องจากการติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ โดยพบว่าสาเหตุของการเสียชีวิตร้อยละ 20-30 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส (2)

เชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่พบบ่อย ได้แก่ rhinoviruses, coronaviruses, influenza viruses, respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza viruses และ adenoviruses (3) เชื้อไวรัสเหล่านี้ทำให้เกิดโรคติดเชื้อทั้งในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง เช่น โรคไข้หวัด, โรคไข้หวัดใหญ่, โรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ, โรคหลอดลมอักเสบ, โรคหลอดลมฝอยอักเสบและโรคปอดบวม เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีการค้นพบไวรัสชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินหายใจเพิ่มขึ้น ได้แก่ การค้นพบ human metapneumovirus (hMPV) ในปี ค.ศ. 2001 ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหลอดลมฝอยอักเสบและโรคปอดบวมในเด็กเล็ก (4) การอุบัติขึ้นของ coronavirus ชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรค severe acute respiratory syndrome (SARS) ระหว่างปี ค.ศ. 2002-2003 (5) และการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนก (avian influenza) ที่เกิดจากไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 (avian influenza virus type A (H5N1)) ในสัตว์ปีกและมนุษย์ในหลายประเทศทั่วโลก ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003 (6) สิ่งต่างๆเหล่านี้แสดงให้เห็นแนวโน้มว่าการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจน่าจะยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญอย่างต่อเนื่องไปจนถึงอนาคต

Influenza viruses เป็นสมาชิกในตระกูล *Orthomyxoviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นเดี่ยวสายลบ อยู่เป็นท่อนๆ รวม 8 ท่อน (ยกเว้น influenza virus type C มี RNA 7 ท่อน) แคปซิดมีการเรียงตัวแบบขดเป็นเกลียว (helical symmetry) มีเอนเวลลอปห่อหุ้ม อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 80-120 นาโนเมตร influenza viruses แบ่งเป็น 3 serotypes ได้แก่ type A, B และ C influenza viruses ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ โดย type A และ B เป็น types ที่พบได้บ่อย

นอกจากนี้ type A ยังพบมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์บ่อยมาก เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการระบาดใหญ่ของโรคไข้หวัดใหญ่ในประชากรที่ยังไม่เคยมีภูมิคุ้มกันต่อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่เปลี่ยนแปลงไป ในปี ค.ศ. 2003 ได้เกิดการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกจาก avian influenza virus type A (H5N1) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ที่มีความรุนแรงสูงและทำให้มีอัตราป่วยตายถึงร้อยละ 60-70 และนับเป็นครั้งแรกที่พบว่าไวรัสไข้หวัดนกสามารถแพร่จากสัตว์ปีกที่ป่วยมาสู่มนุษย์โดยตรงได้โดยไม่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์ผ่านสัตว์ตัวกลางชนิดอื่นก่อน (6) มีรายงานผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคไข้หวัดนกเป็นจำนวนมากในหลายประเทศ ในประเทศไทย พบผู้ป่วยโรคไข้หวัดนกระหว่างปี ค.ศ. 2004-2006 รวม 25 ราย และมีผู้ป่วยเสียชีวิตรวม 17 ราย

Parainfluenza viruses เป็นสมาชิกในตระกูล *Paramyxoviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นเดี่ยวสายลบ แคปซิดมีการเรียงตัวแบบขดเป็นเกลียว (helical symmetry) มีเอนเวลลอปห่อหุ้ม อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 150-200 นาโนเมตร parainfluenza viruses แบ่งได้เป็น 4 types ได้แก่ type 1, 2, 3 และ 4 การติดเชื้อครั้งแรกมักพบในเด็ก โดย types 1, 2 และ 3 พบทำให้เกิดโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจที่รุนแรงในเด็ก โดย types 1 และ 2 มักทำให้เกิดโรคคอตีบเสียงและหลอดลมอักเสบ (laryngotracheobronchitis หรือ croup) ส่วน type 3 มักทำให้เกิดโรคหลอดลมฝอยอักเสบและโรคปอดบวม การติดเชื้อ parainfluenza virus ชนิดเดิมซ้ำพบได้บ่อย แต่มักทำให้เกิดอาการป่วยแบบไม่รุนแรง อาการคล้ายเป็นโรคไข้หวัดเท่านั้น

Respiratory syncytial virus (RSV) เป็นสมาชิกในตระกูล *Paramyxoviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด RNA เส้นเดี่ยวสายลบ แคปซิดมีการเรียงตัวแบบขดเป็นเกลียว (helical symmetry) มีเอนเวลลอปห่อหุ้ม อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120-200 นาโนเมตร RSV เป็นสาเหตุอันดับหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กทารก โดยทำให้เกิดโรคหลอดลมฝอยอักเสบและโรคปอดบวมซึ่งอาการอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ RSV แบ่งได้เป็น 2 subgroups คือ subgroup A และ B โดยทั่วไป subgroup A พบได้บ่อยกว่าและอาจทำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงกว่า subgroup B

Adenoviruses เป็นสมาชิกในตระกูล *Adenoviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด DNA เส้นคู่ แคปซิดมีการเรียงตัวแบบทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral symmetry) ไม่มีเอนเวลลอปห่อหุ้ม อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 70-90 นาโนเมตร adenoviruses ที่พบมีการติดเชื้อในมนุษย์ ปัจจุบันพบอย่างน้อย 51 serotypes แต่ละ types พบทำให้เกิดโรคที่มีอาการทางคลินิกที่แตกต่างกันไป ตั้งแต่โรคไข้หวัด, โรคคออักเสบ, โรคทอนซิลอักเสบ จนถึงโรคปอดบวม อย่างไรก็ตาม เชื้อไวรัสนี้ serotype ก็สามารรถทำให้เกิดโรคที่มีอาการทางคลินิกแบบเดียวกันได้เช่นกัน serotypes ที่พบบ่อย ได้แก่ serotypes 1-7 และ 21

การให้การวินิจฉัยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจมักไม่ยาก แต่การวินิจฉัยเชื้อที่เป็นสาเหตุมักเป็นปัญหาสำคัญที่แพทย์ผู้ให้การรักษาดูต้องเผชิญ เนื่องจากผู้ป่วยที่มา

ด้วยอาการที่คล้ายคลึงกันนั้นสามารถเกิดจากการติดเชื้อไวรัสได้หลายชนิด การตรวจทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาเพื่อหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะในกรณีผู้ป่วยมีการติดเชื้อที่รุนแรง ซึ่งจำเป็นต้องมีการตัดสินใจให้การรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะหรือยาต้านไวรัสโดยเร่งด่วน

การตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจมีหลายวิธี วิธีการตรวจที่เป็นวิธีมาตรฐาน คือ การเพาะแยกเชื้อไวรัส ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิด อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ต้องทำในห้องปฏิบัติการพิเศษ ใช้เวลาหลายวันกว่าจะทราบผลการตรวจ และเมื่อเก็บตัวอย่างส่งตรวจมาแล้วจำเป็นต้องรีบนำมาเพาะในเซลล์เพาะเลี้ยงทันที มิฉะนั้นความไวของการตรวจด้วยวิธีนี้จะลดลง การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส สามารถเลือกทำได้หลายวิธี เช่น fluorescent antibody assay (FA) และ enzyme immunoassay (EIA) เป็นต้น วิธีนี้มีข้อดีที่สามารถทราบผลการตรวจภายในไม่กี่ชั่วโมง แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากในห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทั่วไปสามารถทำการตรวจได้เฉพาะไวรัสบางชนิดเท่านั้น และความไวของวิธีนี้จะต่ำกว่าวิธีเพาะแยกเชื้อไวรัสในกรณีที่มีปริมาณไวรัสในตัวอย่างส่งตรวจน้อย โดยเฉพาะในผู้ใหญ่ซึ่งมักมีปริมาณไวรัสในตัวอย่างส่งตรวจน้อยกว่าในเด็ก การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยามีประโยชน์น้อยสำหรับการวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากส่วนใหญ่ต้องอาศัยการตรวจพบปริมาณแอนติบอดีจำเพาะต่อไวรัสที่เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างน้ำเหลืองในช่วงที่มีอาการป่วยเฉียบพลัน และช่วงที่หายจากโรคแล้ว ซึ่งกว่าจะทราบผลการตรวจก็ไม่ช่วยในการตัดสินใจเลือกวิธีการรักษาให้แก่ผู้ป่วยแล้ว ในปัจจุบัน การตรวจทางอณูชีววิทยา โดยอาศัยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และ reverse transcription PCR (RT-PCR) เริ่มมีผู้นิยมใช้กันมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจที่มีความไวสูง สามารถตรวจหาไวรัสในตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสเพียงเล็กน้อยได้ ทราบผลการตรวจเร็ว นอกจากนี้ มีการพัฒนาการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR และ multiplex RT-PCR ซึ่งทำให้สามารถตรวจหาไวรัสหลายชนิดในการตรวจเพียงครั้งเดียวได้

ในประเทศไทย ปัจจุบันยังมีข้อมูลทางระบาดวิทยาของการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจเหล่านี้น้อยมาก การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กไทย โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสดังกล่าวจากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสซึ่งเป็นวิธีการตรวจมาตรฐาน การศึกษานี้จะทำให้ได้ข้อมูลอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กไทยที่มีความถูกต้องมากขึ้นกว่าเดิม

การทบทวนวรรณกรรม/ สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

ไวรัสเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจที่พบได้บ่อยที่สุด จากข้อมูลการศึกษาในต่างประเทศ ในปี ค.ศ. 1999 Gröndahl B และคณะ จากประเทศเยอรมัน รายงานการศึกษาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กที่ต้องรับไว้รักษาในโรงพยาบาล จำนวน 1,118 ราย พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 30 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โดยพบ RSV ได้ร้อยละ 45 ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบทั้งหมด, influenza virus type A พบได้ร้อยละ 24, influenza type B พบได้ร้อยละ 3, adenoviruses พบได้ร้อยละ 15, enteroviruses พบได้ร้อยละ 13, parainfluenza virus type 1 พบได้ร้อยละ 4 และ parainfluenza virus type 3 พบได้ร้อยละ 5 (7)

ในปี ค.ศ. 2001 Garcia-Garcia ML และคณะ จากประเทศสเปน รายงานการศึกษาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กอายุน้อยกว่า 2 ปีที่ต้องรับไว้รักษาในโรงพยาบาล จำนวน 617 ราย (ผู้ป่วยร้อยละ 64 ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคหลอดลมฝอยอักเสบ, ร้อยละ 25 เป็นโรคหลอดลมอักเสบ, ร้อยละ 4 เป็นโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ และร้อยละ 7 เป็นโรคปอดบวม) พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 56 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส และ RSV เป็นไวรัสที่พบได้บ่อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 84 ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบทั้งหมด ไวรัสชนิดอื่นที่พบได้แก่ parainfluenza viruses พบร้อยละ 7, adenoviruses พบร้อยละ 4 และ influenza viruses พบได้ร้อยละ 4 (8)

ในปี ค.ศ. 2003 Boivin G และคณะ จากประเทศแคนาดา รายงานการศึกษาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กอายุน้อยกว่า 3 ปีที่ต้องรับไว้รักษาในโรงพยาบาล จำนวน 208 ราย พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 67 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โดยพบ RSV ร้อยละ 51 และพบ influenza virus type A ร้อยละ 22 ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบทั้งหมด (9)

ในประเทศไทย ข้อมูลทางระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย ข้อมูลที่เคยมีผู้ศึกษาไว้ได้แก่ ในปี ค.ศ. 1984 Tantivanich S และคณะ รายงานสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนบนในผู้ป่วยเด็กจำนวน 200 ราย ที่โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า จ.กรุงเทพฯ พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 36 มีสาเหตุจากการติดเชื้อ RSV และร้อยละ 5.5 มีสาเหตุจากการติดเชื้อ adenoviruses (10)

ในปี ค.ศ. 1990 Suwanjutha S และคณะ รายงานอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ในผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี ที่โรงพยาบาลรามธิบดีจำนวน 596 คน พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 45 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส โดย RSV เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด คิดเป็น ร้อยละ 45 ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบทั้งหมด และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดลมอักเสบเฉียบพลัน, โรคหลอดลมฝอยอักเสบเฉียบพลันและโรคปอดบวม (11)

ในปี ค.ศ. 1990 Sunakorn P และคณะ รายงานอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี จำนวน 226 ราย ที่โรงพยาบาลเด็ก (ผู้ป่วย

ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคปอดบวม จำนวน 147 ราย, โรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ จำนวน 19 ราย และโรคหลอดลมฝอยอักเสบ จำนวน 60 ราย) พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 19 เกิดจากการติดเชื้อไวรัสและร้อยละ 10 เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดย RSV เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 18 (12)

ในปี ค.ศ. 1994 Puthavathana P และคณะ รายงานอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 6 เดือนที่ป่วยด้วยโรคปอดบวม จำนวน 76 ราย ที่โรงพยาบาลรามาศิบัติและโรงพยาบาลศิริราช จ. กรุงเทพฯ พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 28 เกิดจากการติดเชื้อ RSV, ร้อยละ 11 เกิดจากการติดเชื้อ adenoviruses และร้อยละ 5 เกิดจากการติดเชื้อ parainfluenza virus type 3 การศึกษานี้ ทำการตรวจหาไวรัสที่เป็นสาเหตุด้วยวิธี indirect immunofluorescence, การเพาะแยกเชื้อไวรัส และการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส (13)

ในปี ค.ศ. 2001 Ekalaksananan T และคณะ รายงานสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กจำนวน 74 ราย (ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคปอดบวมจำนวน 56 ราย, โรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ จำนวน 12 ราย และโรคหลอดลมฝอยอักเสบจำนวน 6 ราย) ที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ จ.ขอนแก่น พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 35 มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส และร้อยละ 30 มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรีย โดย RSV เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 24 การศึกษานี้ทำการตรวจหาแอนติเจนของ RSV ด้วยวิธี EIA และพบว่า RSV มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปอดบวมและโรคหลอดลมฝอยอักเสบ (14)

ในปี ค.ศ. 2002 Siritantikorn S และคณะ รายงานสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กอายุน้อยกว่า 5 ปี จำนวน 472 ราย ในอำเภอตากสี จ. นครสวรรค์ พบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 36 มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อไวรัส โดย RSV เป็นไวรัสที่พบได้บ่อยที่สุด และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคปอดบวมและโรคหลอดลมอักเสบ จากการตรวจ subgroup ของ RSV ด้วยการย้อม indirect immunofluorescence โดยใช้ subgroup specific monoclonal antibodies พบว่าในปีแรกของการศึกษา พบ RSV subgroup B มากกว่า ส่วนในปีที่สองของการศึกษา กลับพบ RSV subgroup A มากกว่า (15)

แม้ว่าข้อมูลข้างต้นนี้แสดงระบาดวิทยาของเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจแต่มีข้อมูลของเชื้อไวรัสเพียงบางชนิดเท่านั้น และเป็นที่ทราบกันดีว่า ระบาดวิทยามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาติดตามเป็นระยะ กอปรกับในสถานการณ์ขณะนี้ที่มีการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนก ทำให้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจมีความสำคัญมาก เพราะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่แพทย์ต้องใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคและการตัดสินใจให้การรักษาแก่ผู้ป่วย รวมทั้งยังมีความสำคัญกับการวางแผนการป้องกันและควบคุมโรค การศึกษานี้จะทำให้ทราบข้อมูลอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่พบบ่อยทั้ง 7 ชนิด โดยข้อมูลอุบัติการณ์ที่ได้น่าจะมีความถูกต้องมากกว่า

การศึกษาก่อนหน้านี้ เนื่องจากการตรวจหาไวรัสได้เลือกใช้วิธี multiplex realtime RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าวิธีการตรวจมาตรฐานแบบเดิม นอกจากนี้ การศึกษานี้จะทำให้ทราบคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น โดยเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจมาตรฐานด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กไทย ที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส 7 ชนิด ได้แก่ influenza viruses type A และ B, adenoviruses, parainfluenza viruses type 1-3 และ respiratory syncytial virus

ขอบเขตการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงพรรณนาแบบไปข้างหน้า โดยเก็บตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยอาการของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างมาทำการตรวจหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

1. เตรียมอุปกรณ์ น้ำยา สารเคมีและเซลล์เพาะเลี้ยงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา
2. รวบรวมผู้ป่วยเด็กอายุไม่เกิน 5 ปีที่มีอาการป่วยด้วยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง จำนวน 250 ราย ภายในระยะเวลาประมาณ 2 ปี โดยขอความยินยอมจากผู้ปกครองของผู้ป่วยก่อนทุกราย
3. เก็บตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยเพื่อส่งตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา
4. ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ด้วยวิธี shell vial culture
5. ทำการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ด้วยวิธี direct fluorescent antibody assay (DFA)
6. ตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR
7. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเชิงพรรณนา ทำการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็ก โดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR
8. สรุปผลการวิจัยและเขียนรายงาน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ influenza viruses type A และ B, adenoviruses, parainfluenza viruses type 1-3 และ respiratory syncytial virus ในเด็กปกติอายุไม่เกิน 5 ปีที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง
2. พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจทั้ง 7 ชนิดด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR จนสามารถเปิดให้บริการแก่ผู้ป่วยได้
3. ทราบคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR
4. ผลการศึกษานี้จะสามารถเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในสาขาที่เกี่ยวข้องในระดับชาติและนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็น prospective descriptive study

กลุ่มประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วยเด็กแรกเกิดถึงอายุ 5 ปีที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยอาการของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ตั้งแต่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2552 โดยมีการให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงการวิจัยนี้และได้รับความยินยอมโดยสมัครใจจากผู้ปกครองของผู้ป่วยทุกราย โครงการวิจัยนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยเข้าในการศึกษา มีดังนี้

- (1) เป็นผู้ป่วยเด็กแรกเกิดถึงอายุ 5 ปีที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ด้วยอาการของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ
- (2) เป็นผู้ป่วยเด็กที่กำลังมีอาการและ/ หรืออาการแสดงของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ โดยเพิ่งป่วยมาไม่เกิน 7 วัน นับตั้งแต่วันที่เริ่มมีอาการและไม่เกิน 72 ชั่วโมงหลังจากเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาลครั้งนี้

และมีเกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออกจากการศึกษา ดังนี้

- (1) ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิต้านทานของร่างกาย
- (2) ผู้ป่วยที่มีโรคประจำตัวที่รุนแรง เช่น โรคเลือด, โรคปอดเรื้อรัง

ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ

เก็บตัวอย่าง nasopharyngeal aspirate ปริมาณอย่างน้อย 1 มิลลิลิตรจากผู้ป่วยและนำไปใส่ใน viral transport media (ประกอบด้วย 2% heat-inactivated Fetal Bovine Serum, sterile Phosphate Buffer Solution pH 7.4, Penicillin G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 2 มิลลิลิตรทันที ระหว่างนำส่งห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา เมื่อตัวอย่างสิ่งส่งตรวจถูกนำส่งถึงห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา จะดำเนินการเพาะแยกเชื้อไวรัสและตรวจหาแอนติเจนของไวรัสจากตัวอย่างนั้นทันที และตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตรจะถูกแบ่งแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

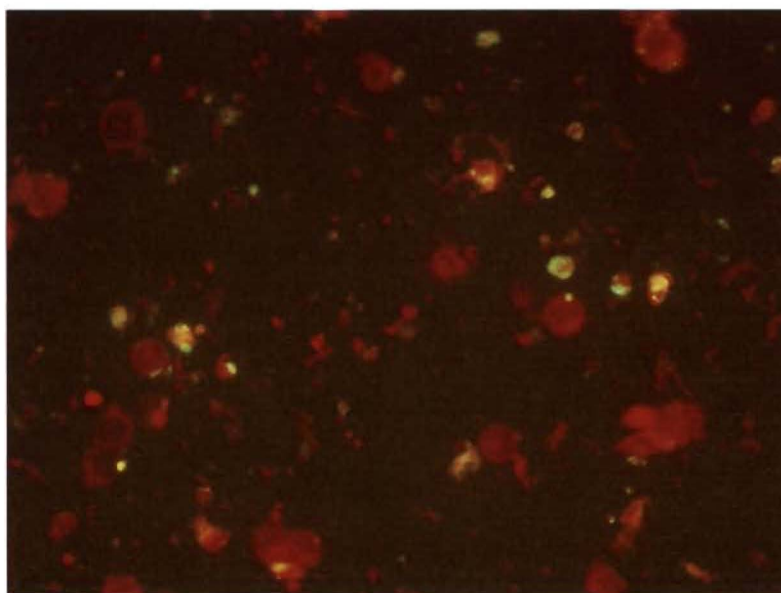
ระหว่างวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2552 สามารถเก็บตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยเด็กที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้รวม 268 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัสที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวก

เชื้อไวรัสที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวกภายนอก ได้แก่ influenza virus type A ชนิด H3N2 (Hong Kong strain) สำหรับ influenza virus type B, parainfluenza virus type 1, 2 และ 3 และ adenovirus ได้มาจากการเพาะแยกเชื้อจากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย

การเพาะแยกเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี shell vial culture

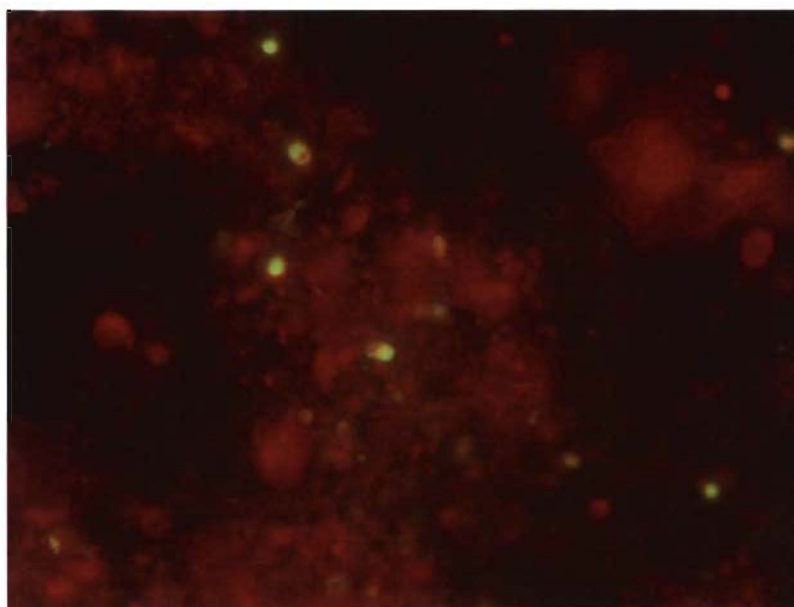
Influenza virus type A และ B ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์ MDCK (Madin Darby Canine Kidney cell) สำหรับ parainfluenza virus type 1, 2 และ 3 ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์ LLC-MK2 (Rhesus Monkey Kidney Epithelial cell) และสำหรับ adenoviruses และ respiratory syncytial virus ทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสโดยใช้เซลล์ HEp-2 (Human Epidermoid Laryngeal Carcinoma cell) เริ่มจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้นโดยใช้ 10% MEM (Minimum Essential Medium) ใน vial ซึ่งเป็นขวดพลาสติกสะอาดปราศจากเชื้อ ที่ก้นของ vial จะมี cover slip แบบกลมใสอยู่ เซลล์จะเจริญบนผิวของ cover slip เป็นเซลล์ชั้นเดียว (monolayer cell) อายุ 1 วัน หลังจากนั้นจะใส่ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยปริมาณ 0.2 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 2,600 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 เซลเซียส นาน 60 นาที เพื่อให้ไวรัสในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจเกาะติดเซลล์ หลังจากนั้น นำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงถึง 7 วัน ทำการสังเกตดูว่ามี cytopathic effect (CPE) เกิดขึ้นหรือไม่ทุกวัน ถ้าพบว่ามี CPE เกิดขึ้นจะนำมายืนยันพิสูจน์ว่ามีการติดเชื้อไวรัสชนิดใดโดยวิธี direct fluorescent antibody assay (DFA) ต่อไป (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การเพาะแยกเชื้อ respiratory syncytial virus ด้วยวิธี shell vial culture แล้วนำมายืนยันยืนยันด้วย direct fluorescent antibody จะเห็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อไวรัสเรืองแสงสีเขียวแอปเปิ้ล

การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี DFA

ทำการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี DFA โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Respiratory DFA viral screening and identification kit (บริษัท Millipore, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ขั้นตอน โดยย่อ เริ่มจากนำตัวอย่างสิ่งส่งตรวจมาปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ปั่นล้างส่วนตะกอนด้วย Phosphate Buffer Solution (PBS) 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที นำส่วนตะกอนมาป้ายลงบนสไลด์ ผึ่งให้แห้ง แล้วแช่ใน acetone ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผึ่งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปย้อมด้วยน้ำยา monoclonal antibody ต่อไวรัสทั้ง 7 ชนิด (influenza virus type A และ B, adenoviruses, parainfluenza virus type 1-3 และ respiratory syncytial virus) เซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสจะถูก monoclonal antibody ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงจับ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์จะเห็นเซลล์ที่ติดเชื้อเรืองแสงสีเขียว ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อจะติดสีแดงของ Evans blue (รูปที่ 2 และ 3)

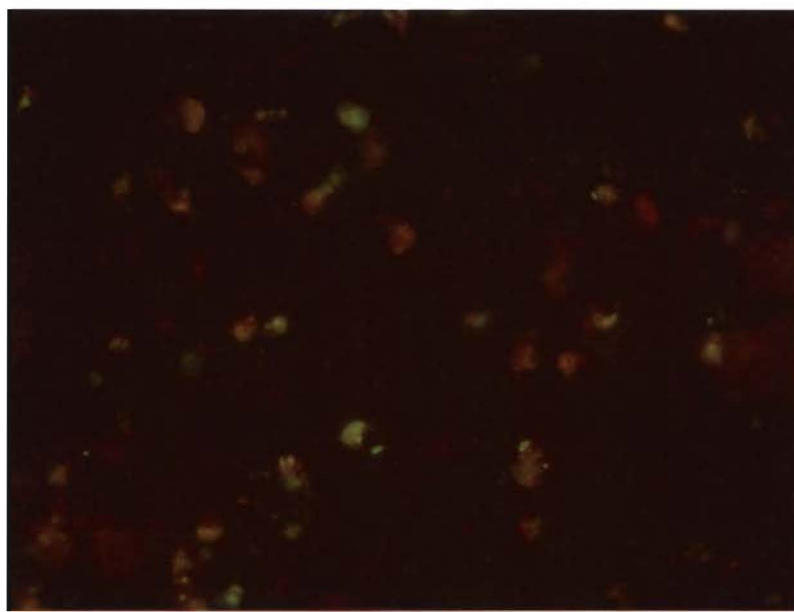


รูปที่ 2 การตรวจหาแอนติเจนของ influenza virus type A ด้วยวิธี direct fluorescent antibody assay จะเห็นเซลล์เยื่อผิวของทางเดินหายใจที่มีการติดเชื้อไวรัสเรืองแสงสีเขียวแอมป์เปล

การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง

การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อนำมาใช้เป็นตัวควบคุมบวกภายนอก เริ่มจากการนำเซลล์เพาะเลี้ยงที่มี CPE เกิดขึ้นนั้น มาปั่นแยกเฉพาะเซลล์ นำตะกอนเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวมาทำการสกัดสารพันธุกรรมโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp Viral RNA Mini Kit (บริษัท Qiagen, ประเทศเยอรมัน) ยกเว้น adenovirus ซึ่งจะทำการสกัดโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

QIAamp DNA Mini Kit (บริษัท Qiagen, ประเทศเยอรมัน) หลักการโดยย่อ คือ ใช้ปริมาณตัวอย่างตั้งต้น 140 ไมโครลิตร (200 ไมโครลิตรสำหรับ adenovirus) ทำการย่อยสลายโปรตีนด้วย Proteinase K และทำการแยกสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยผ่าน high pure filter ปริมาตรสุดท้ายที่จะได้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร



รูปที่ 3 การตรวจหาแอนติเจนของ respiratory syncytial virus ด้วยวิธี direct fluorescent antibody assay จะเห็นเซลล์เยื่อผิวของทางเดินหายใจที่มีการติดเชื้อไวรัสเรืองแสงสีเขียวแอมเปิ้ล

การสกัดสารพันธุกรรมของไวรัสจากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย

ทำการสกัดสารพันธุกรรมชนิดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยโดยใช้ชุดน้ำยาสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) ทำบนเครื่องสกัดสารพันธุกรรมแบบอัตโนมัติ MagNa Pure LC Instrument (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) วิธีการสกัดสารพันธุกรรมโดยย่อ คือ ใช้ปริมาณตัวอย่างตั้งต้น 200 ไมโครลิตร ทำการย่อยสลายโปรตีนด้วย Proteinase K และทำการแยกสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์โดยใช้ Magnetic Glass Particles (MPGs) ดูดซับสารพันธุกรรมเอาไว้ จากนั้นจึงทำการแยกสารพันธุกรรมที่ถูกดูดซับไว้โดย MPGs ออกมา ปริมาตรสุดท้ายที่ได้เท่ากับ 50 ไมโครลิตร

การสังเคราะห์ complementary DNA จากสารพันธุกรรมของไวรัสที่สกัดได้

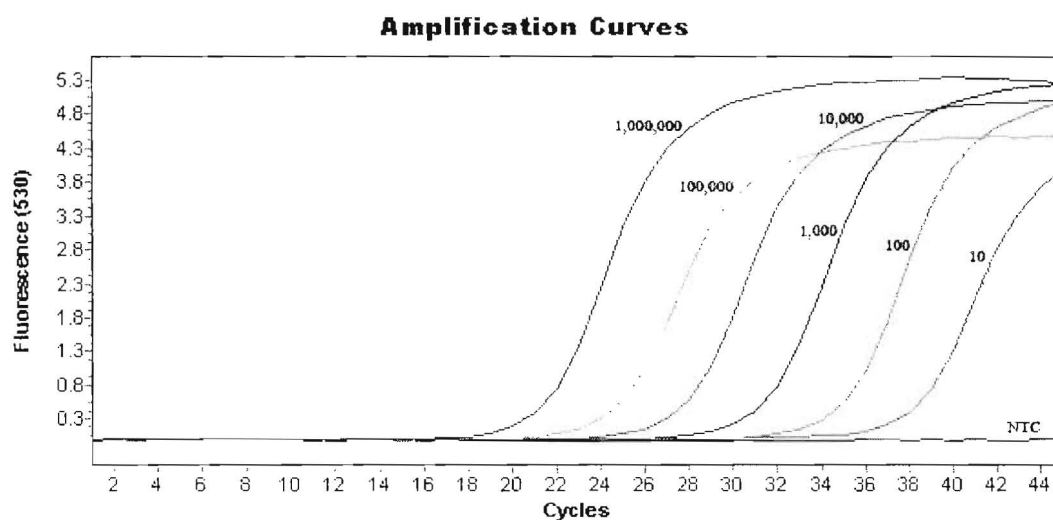
ทำการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากสารพันธุกรรมที่สกัดได้โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) โดยใช้ตัวอย่างสารพันธุกรรมที่สกัดได้ 10 ไมโครลิตรผสม Random hexamer primer 60 ไมโครโมลาร์ นำส่วนผสมดังกล่าวไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นเติม Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) 4 ไมโครลิตร, Protector RNase Inhibitor 20 ยูนิต, Deoxynucleotide Mix แต่ละชนิด 1 มิลลิโมลาร์ และ Transcriptor Reverse Transcriptase 10 ยูนิต ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 นาที และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 30 นาที สุดท้ายทำการยับยั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 5 นาที ถ้ายังไม่ทำการทดสอบต่อทันที ให้นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปทำการทดสอบต่อไป

การตรวจหาสารพันธุกรรมของ influenza virus type A, B และ adenoviruses

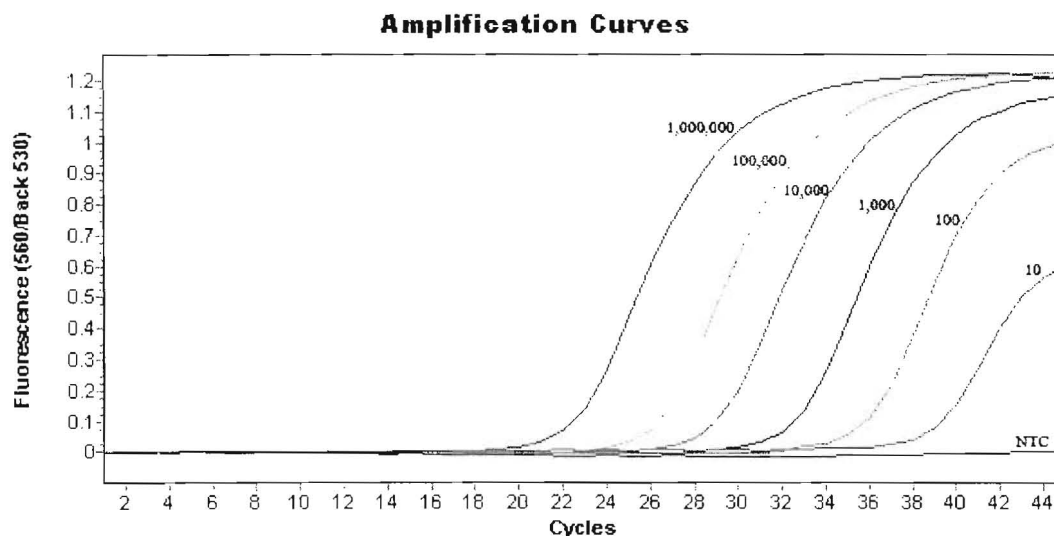
ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ influenza virus type A, B และ adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น วิธีทำโดยย่อ คือ ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ cDNA 5 ไมโครลิตร, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน matrix gene ของ influenza virus type A (16) คือ InfA M+255: 5' AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG 3' 0.2 ไมโครโมลาร์, InfA M-1243: 5' TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG 3' 0.2 ไมโครโมลาร์ และ InfA M+64 TaqMan probe: 5' 6FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA--BBQ 0.1 ไมโครโมลาร์, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน hemagglutinin gene ของ influenza virus type B [ดัดแปลงจาก (17)] คือ BHA-188: 5' AGACCAGAGGGAAACTATGCC 3' 0.4 ไมโครโมลาร์, BHA-347A: 5' CTGTCGTGCATTATAGGAAAGCA 3' 0.4 ไมโครโมลาร์ และ InfB BHA-273b TaqMan probe: 5' YAK-ACCCTC GGCAAAAGTTTCAATACTCCAT--BBQ 0.2 ไมโครโมลาร์, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน hexon gene ของ adenoviruses [ดัดแปลงจาก (18)] คือ AdQF: 5' CCSCAR TGGKWCATATGCACATC 3' 0.4 ไมโครโมลาร์, AdQIS: 5' CCACGGTGGGGTTTCTAA ACTT 3' 0.4 ไมโครโมลาร์ และ AP_610 TaqMan probe 5' LC Red610-TGCACCAGACCC GGGCTCAGGTACTCCGA--BBQ 0.2 ไมโครโมลาร์, primers ที่จำเพาะต่อ β -Globin gene ของมนุษย์ซึ่งใช้เป็น internal control primers คือ PC04: 5' CAACTTCATCCAGGTTCCACC 3' 0.2 ไมโครโมลาร์ และ GH20: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' 0.2 ไมโครโมลาร์, Master Mix (5×) จากชุดน้ำยาสำเร็จรูป LightCycler TaqMan Master (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) และเติมน้ำ (PCR grade) จนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร multiplex realtime RT-PCR ทำบนเครื่อง

LightCycler 2.0 Instrument (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 45 รอบและ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที 1 รอบ จากการทดลอง พบว่าความไวของการตรวจหา influenza virus type A, influenza virus type B และ adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้เท่ากับ 10, 10 และ 10 copies ตามลำดับ (รูปที่ 4, 5 และ 6)

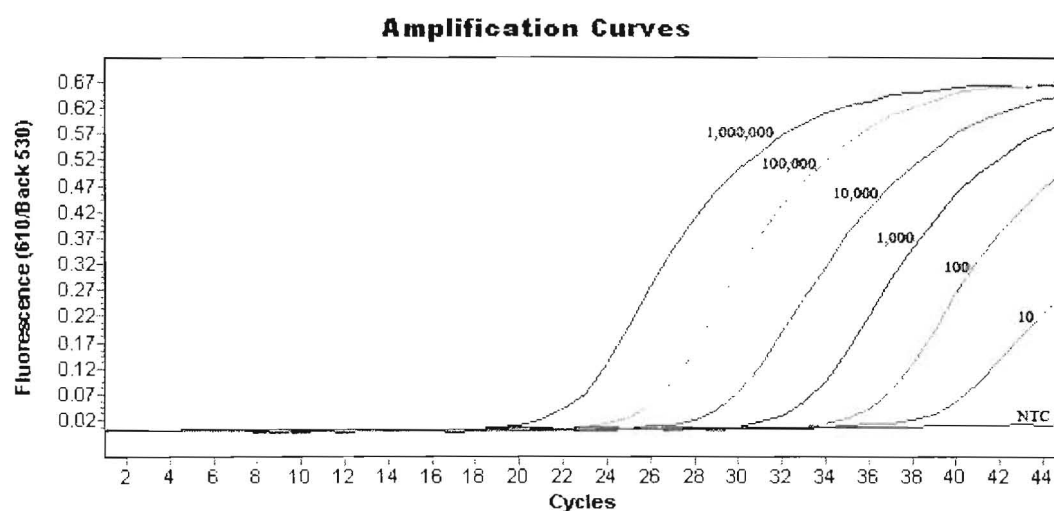
สำหรับผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่ไม่สอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน จะทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจนั้นซ้ำด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR (สำหรับการตรวจหา IFV-A และ IFV-B) หรือ monoplex realtime PCR (สำหรับการตรวจหา ADV) โดยใช้ชุดตรวจน้ำยาสำเร็จรูปดังต่อไปนี้ LightMix for the detection of Influenza A Virus M2 (บริษัท Tib Molbiol, ประเทศเยอรมัน) และ Influenza Virus A Real Time RT-PCR kit (บริษัท Shanghai ZJ Bio-Tech, ประเทศจีน), LightMix kit Influenza B Virus (บริษัท Tib Molbiol, ประเทศเยอรมัน) และ Influenza Virus B Real Time RT-PCR kit (บริษัท Shanghai ZJ Bio-Tech, ประเทศจีน) และ LightMix Kit human Adenovirus (บริษัท Tib Molbiol, ประเทศเยอรมัน) ทั้งนี้ การตรวจวิเคราะห์ซ้ำทั้งหมดได้ปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตทุกขั้นตอน



รูปที่ 4 การตรวจหา influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ influenza virus type A ที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)



รูปที่ 5 การตรวจหา influenza virus type B ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 560/Back 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ influenza virus type B ที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)

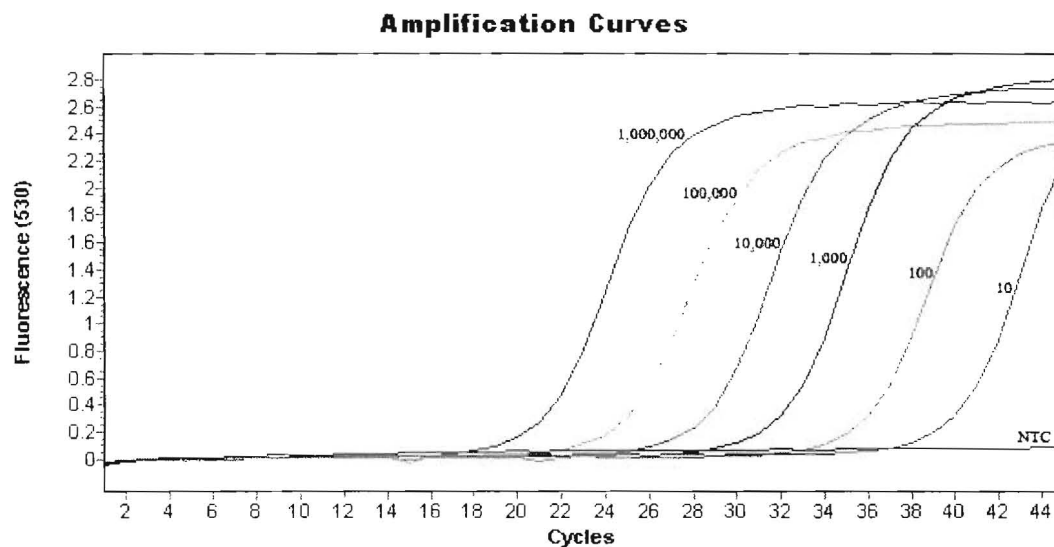


รูปที่ 6 การตรวจหา adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 610/Back 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ adenovirus ที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)

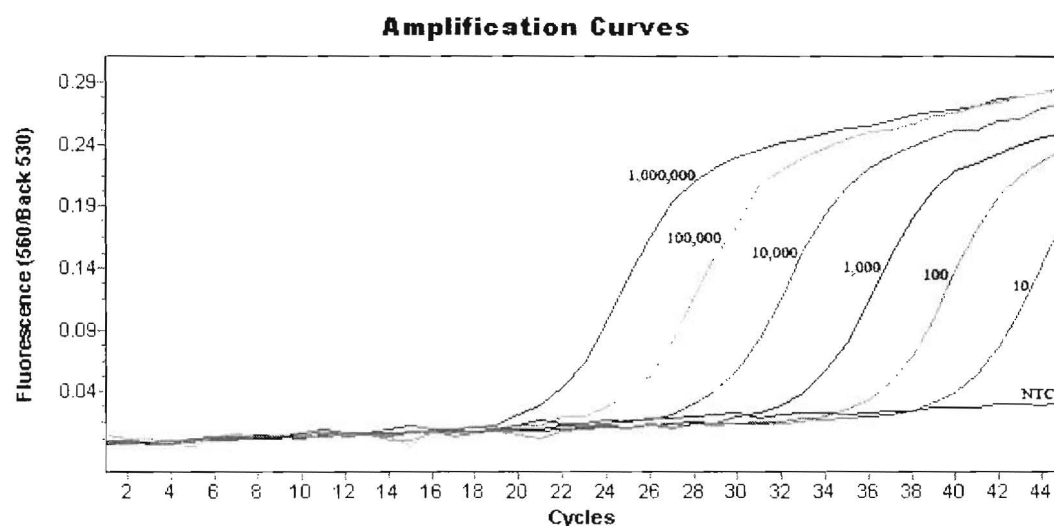
การตรวจหาสารพันธุกรรมของ parainfluenza virus type 1, 2 และ 3

ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ parainfluenza virus type 1, 2 และ 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่ได้พัฒนาขึ้น วิธีทำโดยย่อ คือ ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ cDNA 5 ไมโครลิตร, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน hemagglutinin-neuraminidase gene ของ parainfluenza virus type 1 (19) คือ PIV-1_F: 5' GTTGTCAATGTCTTAATTCGTATCAATAATT 3' 0.4 ไมโครโมลาร์, PIV-1_R: 5' GTAGCCTMCCTTCGGCACCTAA 3' 0.4 ไมโครโมลาร์และ PIV-1 TaqMan probe: 5' 6FAM-TAGGCCAAAGATTGTTGTCGAGACTATTC CAA--BBQ 0.1 ไมโครโมลาร์, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน hemagglutinin-neuraminidase gene ของ parainfluenza virus type 2 (19) คือ PIV-2_F: 5' GCATTTCCAATCTTCAGGAC TATGA 3' 0.2 ไมโครโมลาร์, PIV-2_R: 5' ACC-TCCTGGTATAGCAGTGACTGAAC 3' 0.2 ไมโครโมลาร์และ PIV-2 TaqMan probe: 5' YAK-CCATTTACCTAAGTGATGGAATCAA TCGCAA--BBQ 0.1 ไมโครโมลาร์, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน hemagglutinin-neuraminidase gene ของ parainfluenza virus type 3 (19) คือ PIV-3_F: 5' AGTCATGTTCT CTAGCACTCCTAAATACA 3' 0.4 ไมโครโมลาร์, PIV-3_R: 5' ATTGAGCCATCATAAT TGACAATATCAA 3' 0.4 ไมโครโมลาร์ และ PIV-3 TaqMan probe: 5' LC Red610-AACTCC CAAAGTTGATGAAAGATCAGATTATGCA--BBQ 0.2 ไมโครโมลาร์, primers ที่จำเพาะต่อ β -Globin gene ของมนุษย์ซึ่งใช้เป็น internal control primers คือ PC04: 5' CAACTTCATC CAGGTTCCACC 3' 0.2 ไมโครโมลาร์และ GH20: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' 0.2 ไมโครโมลาร์, Master Mix (5X) จากชุดน้ำยาสำเร็จรูป LightCycler TaqMan Master (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) และเติมน้ำ (PCR grade) จนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร Multiplex Real Time RT-PCR ทำบนเครื่อง LightCycler 2.0 Instrument (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 45 รอบและ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที 1 รอบ จากการทดลอง พบว่าความไวของการตรวจหา parainfluenza virus type 1, type 2 และ type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้เท่ากับ 10, 10 และ 10 copies ตามลำดับ (รูปที่ 7, 8 และ 9)

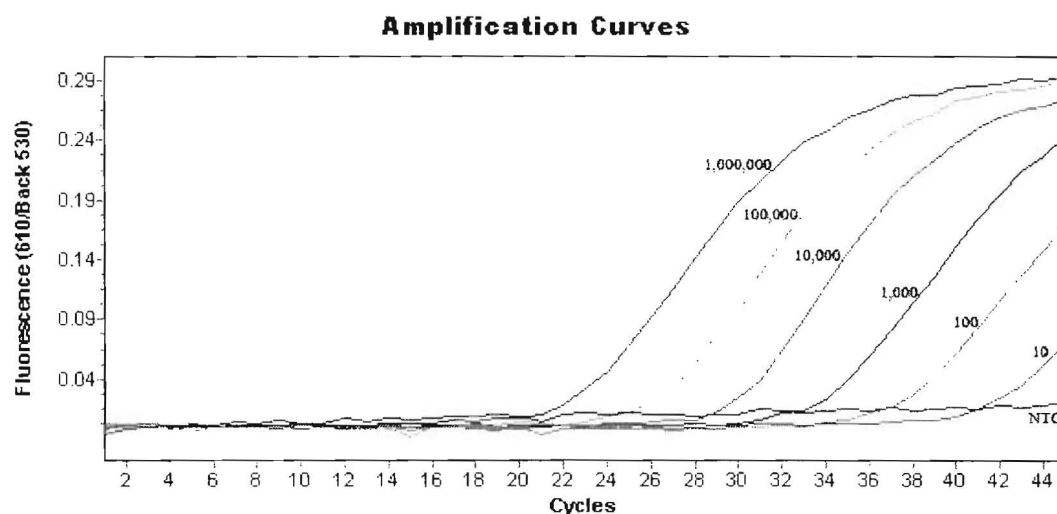
สำหรับผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่ไม่สอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน จะทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจนั้นซ้ำด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR โดยใช้ชุดตรวจน้ำยาสำเร็จรูป LightMix for Parainfluenza virus 1, 2, 3 (บริษัท Tib Molbiol, ประเทศเยอรมัน) ทั้งนี้ การตรวจวิเคราะห์ซ้ำได้ปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตทุกขั้นตอน



รูปที่ 7 การตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ parainfluenza virus type 1 ที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)



รูปที่ 8 การตรวจหา parainfluenza virus type 2 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 560/Back 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ parainfluenza virus type 2 ที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)

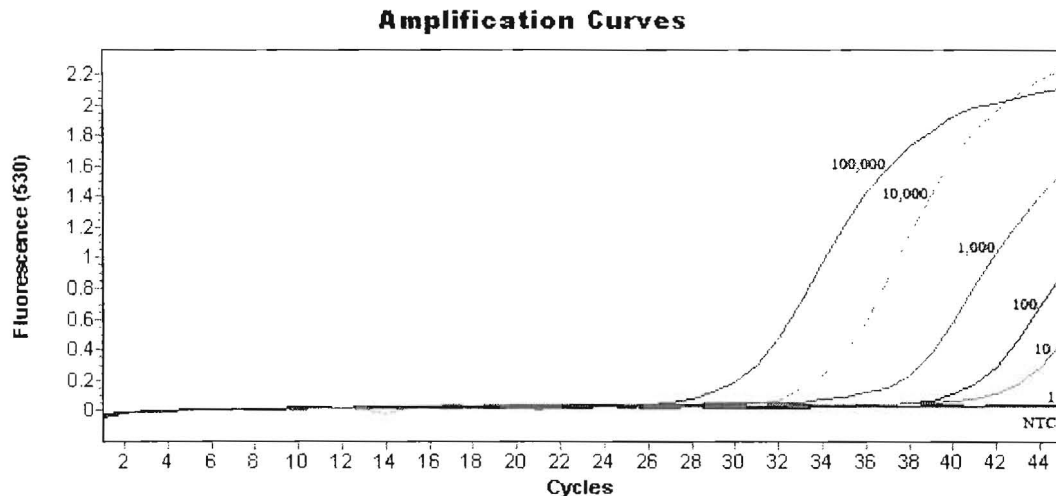


รูปที่ 9 การตรวจหา parainfluenza virus type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 610/Back 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ parainfluenza virus type 3 ที่มีปริมาณตั้งแต่ 10-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)

การตรวจหาสารพันธุกรรมของ Respiratory syncytial virus

ทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ RSV ด้วยวิธี realtime RT-PCR วิธีทำโดยย่อ คือ ทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยใช้ cDNA 5 ไมโครลิตร, primers และ probe ที่จำเพาะต่อส่วน nucleoprotein gene ของ RSV (20) คือ NPA1084: 5' GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTT 3' 0.2 ไมโครโมลาร์, NPA1328: 5' TCTTTATAGTGTCTTCTCTTCCTAA 3' 0.2 ไมโครโมลาร์ และ RSV TaqMan probe: 5' 6FAM-CTGTCATCCAGCAAATACACCATCCAACG--BBQ 0.1 ไมโครโมลาร์, Master Mix (5X) จากชุดน้ำยาสำเร็จรูป LightCycler TaqMan Master (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) และเติมน้ำ (PCR grade) จนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร realtime RT-PCR ทำบนเครื่อง LightCycler 2.0 Instrument (บริษัท Roche, ประเทศเยอรมัน) ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ, 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 45 รอบและ 40 องศาเซลเซียส 30 วินาที 1 รอบ จากการทดลองพบว่าความไวของการตรวจหา RSV ด้วยวิธี realtime RT-PCR นี้เท่ากับ 10 copies (รูปที่ 10)

สำหรับผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของ RSV ด้วยวิธี realtime RT-PCR ที่ไม่สอดคล้องกับการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน จะทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ RSV ในตัวอย่างส่งตรวจนั้นซ้ำโดยใช้ชุดตรวจ Respiratory Syncytial Virus (RSV) Real Time RT-PCR kit (บริษัท Shanghai ZJ Bio-Tech, ประเทศจีน) ทั้งนี้ การตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวได้ปฏิบัติตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตทุกขั้นตอน



รูปที่ 10 การตรวจหา respiratory syncytial virus ด้วยวิธี realtime RT-PCR ทำการอ่านผลที่ channel 530 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะเห็น fluorescence signal เพิ่มขึ้นเป็น sigmoid curve จากการทดลองตรวจ standard DNA ของ respiratory syncytial virus ที่มีปริมาณตั้งแต่ 1-1,000,000 copies พบว่าสามารถตรวจพบไวรัสได้น้อยถึง 10 copies (NTC = no template control)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำเสนอข้อมูลแบบพรรณนา (descriptive study) ผลการตรวจพบเชื้อไวรัสชนิดต่างๆจากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยโดยวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส, การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสและการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แสดงผลเป็นจำนวนนับและร้อยละ สำหรับคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจในผู้ป่วยเด็กโดยการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แสดงผลเป็นค่า sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value และ accuracy

เนื่องจากเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า การตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี realtime RT-PCR นั้นมีความไวมากกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ดังนั้นในกรณีที่การตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ให้ผลบวก แต่การตรวจด้วยวิธีมาตรฐานให้ผลลบ ตัวอย่างนั้นจะถูกทำการตรวจยืนยันซ้ำด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR (หรือ monoplex realtime PCR สำหรับการตรวจหา adenoviruses) ถ้าผลการตรวจยืนยันเป็นบวก จะถือว่าผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นั้นเป็นผลบวกจริง แต่ถ้าผลการตรวจยืนยันเป็นลบ ก็ถือว่าผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นั้นเป็นผลบวกลวง และในกรณีที่การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ให้ผลลบ แต่การตรวจด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสให้ผลบวก จะถือว่าผลลบจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นั้นเป็นผลลบลวง

ผลการวิจัย

ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มประชากรตัวอย่าง

มีผู้ป่วยเด็กไทยอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 5 ปี ที่ป่วยด้วยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ระหว่างวันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2552 เข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้เป็นจำนวนทั้งสิ้น 268 คน แบ่งเป็นเพศชายจำนวน 163 คน คิดเป็นร้อยละ 60.82 และเพศหญิงจำนวน 105 คน คิดเป็นร้อยละ 39.18 ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการวิจัยมีอายุระหว่าง 2 สัปดาห์ถึง 5 ปี อายุเฉลี่ย 1 ปี 4 เดือน \pm 1 ปี 1 เดือน (ตารางที่ 1) และผู้ป่วยส่วนใหญ่ (คิดเป็นร้อยละ 82.09) มีอายุระหว่าง 2 สัปดาห์ถึง 2 ปี จากจำนวนผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมด 268 ราย มีผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคปอดบวมมากที่สุด จำนวน 237 ราย คิดเป็นร้อยละ 88.43 ของผู้ป่วยทั้งหมด, รองลงไป ได้แก่ โรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ จำนวน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 4.85, โรคหลอดลมฝอยอักเสบ จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.36 และโรคหลอดลมอักเสบ จำนวน 9 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.36 ตามลำดับ (รูปที่ 1)

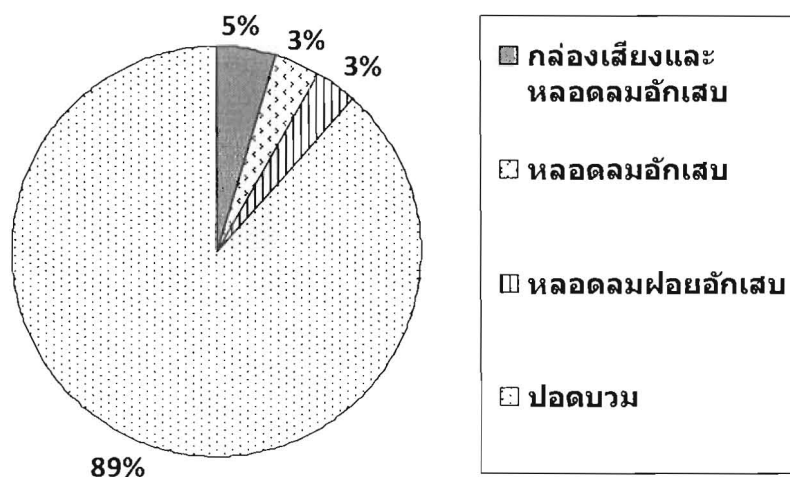
ตารางที่ 1 ข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

คุณลักษณะ	จำนวน
จำนวนผู้ป่วย	268 คน
จำนวนตัวอย่าง	268 ตัวอย่าง
จำนวนเพศชาย: เพศหญิง	163: 105
ช่วงอายุ	2 สัปดาห์ - 5 ปี
อายุเฉลี่ย (\pm SD)	1 ปี 4 เดือน (\pm 1 ปี 1 เดือน)

ผลการเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี shell vial culture

ผลการเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี shell vial culture จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมดจำนวน 268 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดในตัวอย่างจำนวน 116 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.28 โดย respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่ตรวจพบมากที่สุด จำนวน 89 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33.21 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.48, parainfluenza virus type 3 จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.99, parainfluenza virus type 1 จำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.61, influenza virus type A จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.49 และ parainfluenza virus type 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.37

ตามลำดับ โดยที่ตรวจไม่พบ influenza virus type B เลย นอกจากนี้ สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสสองชนิดพร้อมกันได้ จำนวน 5 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.87 (ตารางที่ 2)



รูปที่ 11 กลุ่มตัวอย่างจำแนกตามการวินิจฉัยโรค

ผลการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี DFA

ผลการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี DFA จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมดจำนวน 268 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดในตัวอย่างจำนวน 130 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 48.51 โดย respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่ตรวจพบมากที่สุด จำนวน 97 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 36.19 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 14 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 5.22, parainfluenza virus type 1 จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.36, parainfluenza virus type 3 จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.36, influenza virus type A จำนวน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 2.99, parainfluenza virus type 2 จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.49 และ influenza virus type B จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.75 ตามลำดับ นอกจากนี้ สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดพร้อมกันได้ จำนวน 9 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.36 (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

ผลการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR จากตัวอย่างส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทั้งหมดจำนวน 268 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดในตัวอย่างจำนวน 180 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 67.16 โดย respiratory

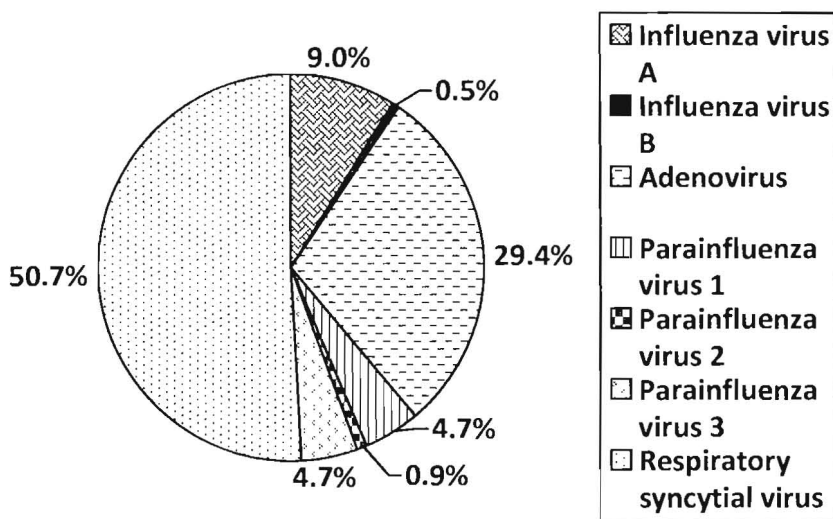
syncytial virus เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด จำนวน 107 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.93 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 62 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.13, influenza virus type A จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 7.09, parainfluenza virus type 1 จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.73, parainfluenza virus type 3 จำนวน 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.73, parainfluenza virus type 2 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.75 และ influenza virus type B จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.37 ตามลำดับ (ดังรูปที่ 3-8) นอกจากนี้ สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสสองชนิดพร้อมกันได้ จำนวน 31 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.57 (ตารางที่ 2) สัดส่วนของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปีแสดงดังรูปที่ 12

ตารางที่ 2 ผลการตรวจพบเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี viral culture, direct fluorescent antibody assay และ multiplex realtime RT-PCR

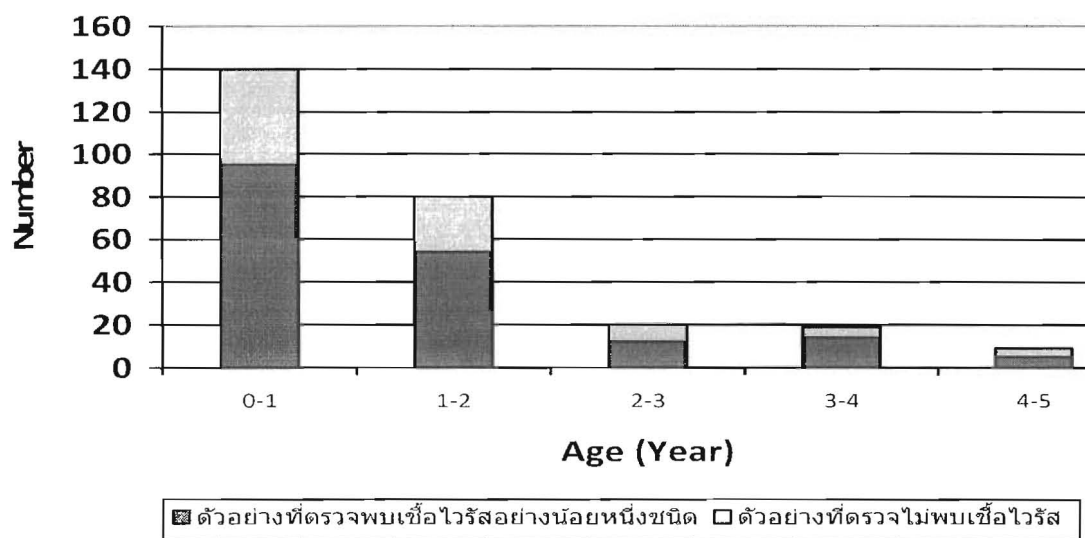
	Viral culture (n)	Direct fluorescent antibody assay (n)	Multiplex realtime RT-PCR (n)
Total specimens	268	268	268
Positive specimens	116	130	180
Influenza virus type A	4	8	19
Influenza virus type B	0	2	1
Adenovirus	12	14	62
Parainfluenza virus type 1	7	9	10
Parainfluenza virus type 2	1	4	2
Parainfluenza virus type 3	8	9	10
Respiratory syncytial virus	89	97	107
Mixed infection	5	9	31

เมื่อพิจารณาผู้ป่วยในแต่ละช่วงอายุ พบว่าผู้ป่วยเด็กอายุ 0-1 ปี สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิด ร้อยละ 67.86, ผู้ป่วยเด็กอายุ 1-2 ปี ตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดร้อยละ 67.50, ผู้ป่วยเด็กอายุ 2-3 ปี ตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดร้อยละ 60.00, ผู้ป่วยเด็กอายุ 3-4 ปี ตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดร้อยละ 73.68 และผู้ป่วยเด็กอายุ 4-5 ปี ตรวจพบเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดร้อยละ 55.56 (รูปที่ 13) พบว่า respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบบ่อยที่สุดในเด็กที่มีอายุ 0-4 ปี พบเฉลี่ยร้อยละ 30-50 adenoviruses เป็นไวรัสที่พบได้บ่อยเป็น

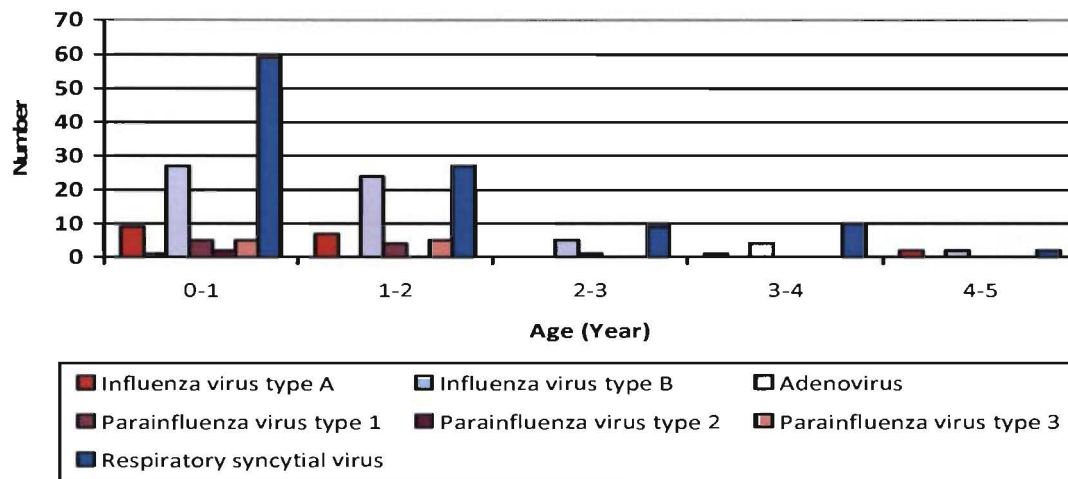
อันดับสอง พบเฉลี่ยร้อยละ 20-30 เท่าๆกันในทุกช่วงอายุ influenza virus type A เป็นไวรัสที่พบได้บ่อยเป็นอันดับสาม พบเฉลี่ยร้อยละ 6-9 โดยผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ IFV-A ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 84.21) เป็นเด็กที่มีอายุ 0-2 ปี parainfluenza virus type 1 พบเฉลี่ยร้อยละ 3-5 โดยผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ PIV-1 ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90) เป็นเด็กที่มีอายุ 0-2 ปี parainfluenza virus type 3 พบเฉลี่ยร้อยละ 3-6 โดยผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ PIV-3 ทั้งหมดเป็นเด็กที่มีอายุ 0-2 ปี (รูปที่ 14)



รูปที่ 12 สัดส่วนของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี

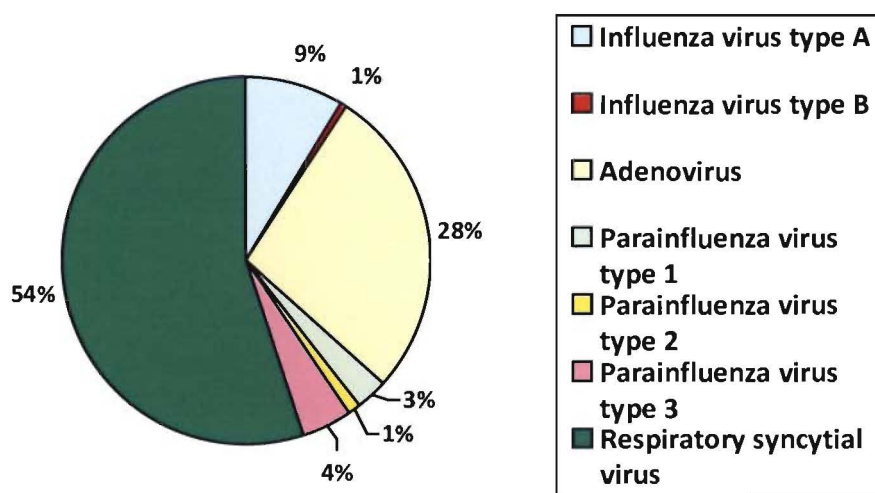


รูปที่ 13 จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสในแต่ละช่วงอายุ



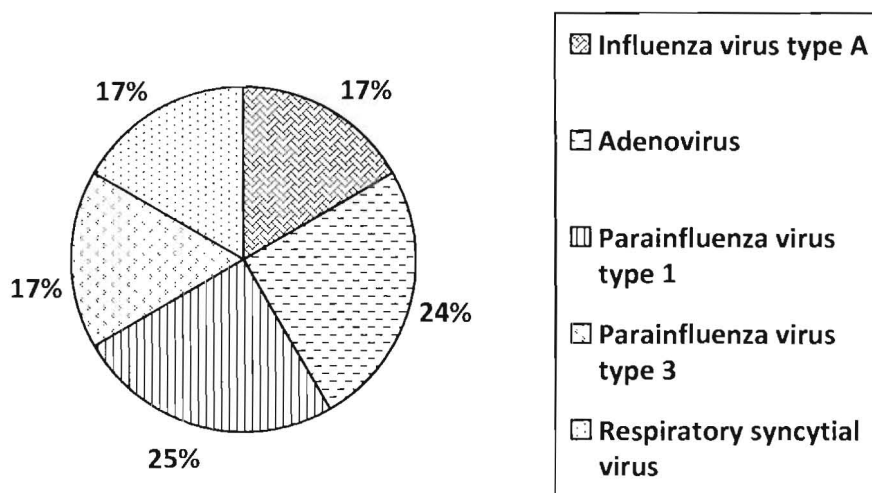
รูปที่ 14 ไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในแต่ละช่วงอายุ

เมื่อพิจารณาผู้ป่วยจำแนกตามการวินิจฉัยโรค พบว่า ในกลุ่มผู้ป่วยโรคปอดบวม (ทั้งหมด 237 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อ respiratory syncytial virus มากที่สุด จำนวน 102 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.04 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 21.52, influenza virus type A จำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.75, parainfluenza virus type 3 จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.38, parainfluenza virus type 1 จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 2.11, parainfluenza virus type 2 จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.84 และ influenza virus type B จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.42 ตามลำดับ สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปอดบวมในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปีแสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคปอดบวมในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ (ทั้งหมด 13 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อ parainfluenza virus type 1 จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.08, adenoviruses จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.08, influenza virus type A จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.38, parainfluenza virus type 3 จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.38 และ respiratory syncytial virus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.38 สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปีแสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 สัดส่วนของเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบในเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี

ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดลมฝอยอักเสบ (ทั้งหมด 9 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อ adenoviruses จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.33 และ respiratory syncytial virus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.22

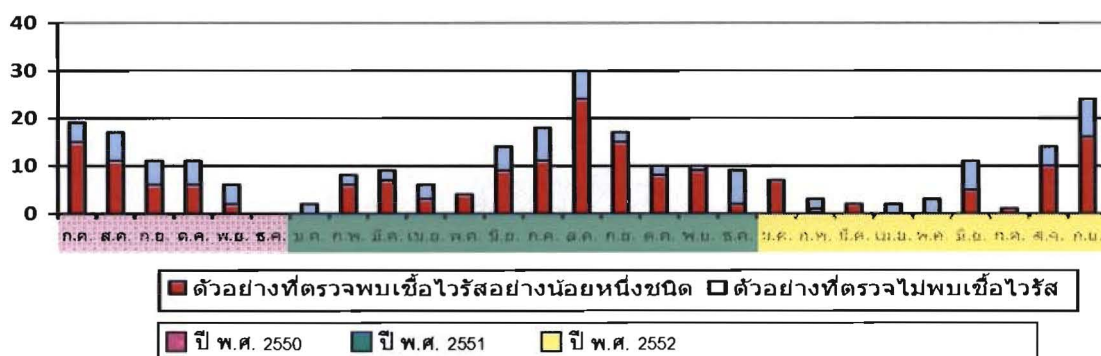
ในกลุ่มผู้ป่วยโรคหลอดลมอักเสบ (ทั้งหมด 9 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อ adenoviruses จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.56, parainfluenza virus type 1 จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.22, influenza virus type A จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.11 และ respiratory syncytial virus จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.11

เมื่อแยกพิจารณาผู้ป่วยเด็กในแต่ละเพศ ในกลุ่มผู้ป่วยเพศชาย (ทั้งหมด 163 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิดจำนวน 112 ราย คิดเป็นร้อยละ 68.71 โดย respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด จำนวน 62 ราย คิดเป็นร้อยละ 38.04 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 47 ราย คิดเป็นร้อยละ 28.83, influenza virus type A จำนวน 13 ราย คิดเป็นร้อยละ 7.98, parainfluenza virus type 1 จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.68, parainfluenza virus

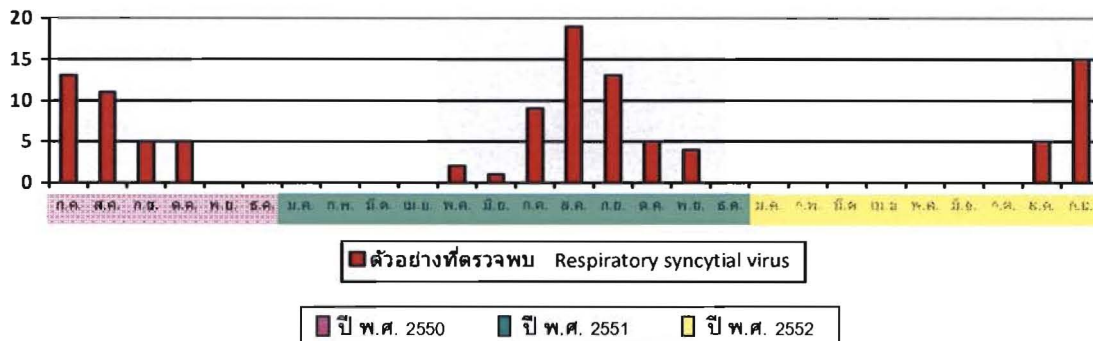
type 3 จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.68, parainfluenza virus type 2 จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.61 ตามลำดับ โดยไม่พบการติดเชื้อ influenza virus type B ในผู้ป่วยเด็กเพศชายเลย

ในกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิง (ทั้งหมด 105 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อไวรัสอย่างน้อยหนึ่งชนิด จำนวน 68 ราย คิดเป็นร้อยละ 64.76 โดย respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบมากที่สุด จำนวน 45 ราย คิดเป็นร้อยละ 42.86 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 15 ราย คิดเป็นร้อยละ 14.29, influenza virus type A จำนวน 6 ราย คิดเป็นร้อยละ 5.71, parainfluenza virus type 1 จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.81, parainfluenza virus type 3 จำนวน 4 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.81, influenza virus type B จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.95 และ parainfluenza virus type 2 จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 0.95 ตามลำดับ

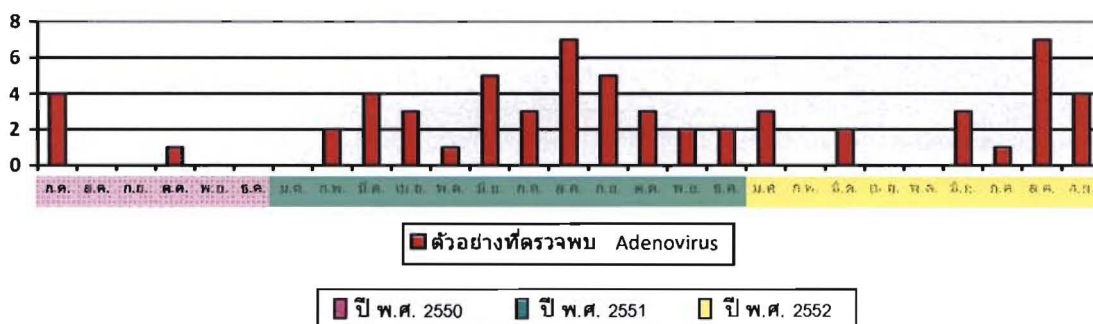
เมื่อพิจารณาจำนวนผู้ป่วยในแต่ละช่วงของปี พบว่าอัตราการป่วยด้วยโรคติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี จะเพิ่มสูงขึ้นปีละ 2 ช่วง ช่วงแรกคือช่วงฤดูฝนซึ่งมีช่วงที่มีอุบัติการณ์สูงสุด และช่วงที่สองคือช่วงฤดูหนาวซึ่งเป็นช่วงที่มีอุบัติการณ์สูง รองลงมา (รูปที่ 17) สำหรับการติดเชื้อ respiratory syncytial virus พบมีการระบาดเฉพาะในช่วงฤดูฝนของทั้ง 2 ปีที่ทำการศึกษา โดยมีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน (รูปที่ 18) สำหรับการติดเชื้อ adenovirus พบได้เกือบตลอดทั้งปี แต่มีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงฤดูฝน และสูงรองลงมาในช่วงฤดูหนาว (รูปที่ 19) การติดเชื้อ influenza virus type A พบระบาดปีละ 2 ครั้ง คือ มีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงฤดูฝนและสูงรองลงมาในช่วงฤดูหนาวของทั้งสองปีที่ทำการศึกษา (รูปที่ 20) การติดเชื้อ parainfluenza virus type 1 พบมีการระบาดในเดือนกุมภาพันธ์เฉพาะในปีแรกที่ทำการศึกษา (รูปที่ 21) การติดเชื้อ parainfluenza virus type 3 พบได้ประปรายในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาวของทั้งสองปีที่ทำการศึกษา (รูปที่ 22)



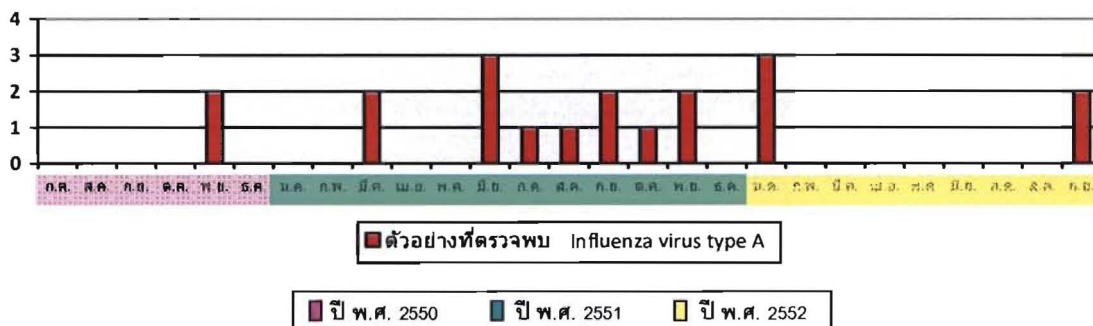
รูปที่ 17 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในแต่ละเดือน



รูปที่ 18 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Respiratory syncytial virus ในแต่ละเดือน



รูปที่ 19 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Adenovirus ในแต่ละเดือน



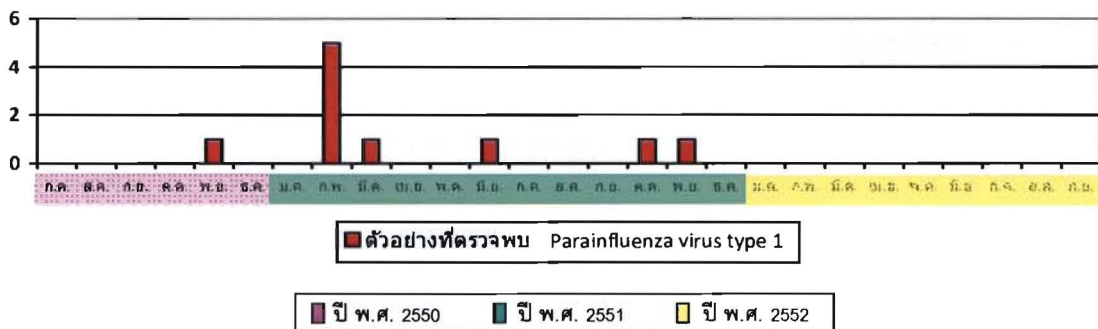
รูปที่ 20 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Influenza virus type A ในแต่ละเดือน

ผลการศึกษาคณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

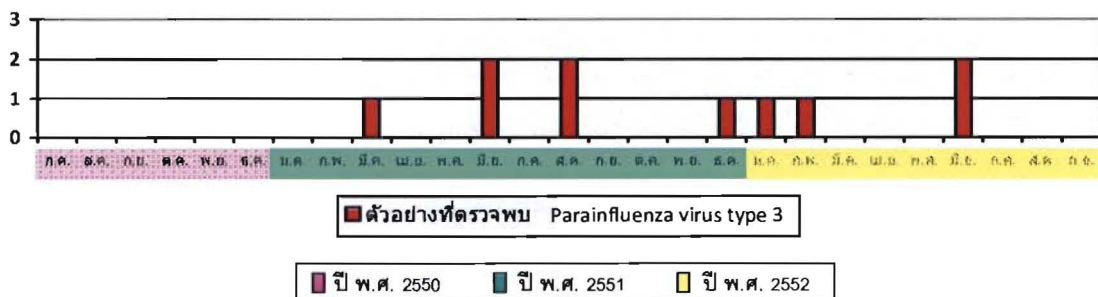
จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ได้ผลบวกตรงกันรวม 7 ตัวอย่างและได้ผลลบตรงกันรวม 249 ตัวอย่าง และมี 12 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่

สอดคล้องกันนำมาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ที่ตรวจ matrix gene เหมือนกันแต่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน multiplex realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ให้ผลบวกจำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนอีก 8 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ จึงแปลผลได้ว่า multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นตรวจได้ผลบวกจริงรวม 11 ตัวอย่าง ส่วนอีก 8 ตัวอย่างถือว่าเป็นผลบวกลวง นอกจากนี้ พบว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้ไม่มีผลลบลวงเลย

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้น พบว่า การตรวจหา influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 100.00 มีค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 96.89 มี positive predictive value (PPV) เท่ากับร้อยละ 57.89 มี negative predictive value (NPV) เท่ากับร้อยละ 100.00 และมีค่าความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 97.01 (ตารางที่ 3)



รูปที่ 21 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Parainfluenza virus type 1 ในแต่ละเดือน



รูปที่ 22 ตัวอย่างที่ตรวจพบ Parainfluenza virus type 3 ในแต่ละเดือน

ผลการศึกษาคณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ influenza virus type B ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา influenza virus type B ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ได้ผลลบตรงกันรวม 265 ตัวอย่าง และมี 1 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ที่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน multiplex realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ก็ให้ผลบวกเช่นกัน จึงแปลผลได้ว่า multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นตรวจได้ผลบวกจริงรวม 1 ตัวอย่าง โดยไม่มีผลบวกหลงเลย นอกจากนี้ มี 2 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส แต่ได้ผลลบจากการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR พบว่าได้ผลเป็นลบ แสดงว่าการตรวจหาแอนติเจนนั้นให้ผลบวกหลง จึงแปลผลได้ว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้ให้ผลบวกจริงรวม 267 ตัวอย่างโดยไม่มีผลบวกหลงเลย

เนื่องจากมีตัวอย่างที่ตรวจพบ influenza virus type B เพียง 1 ตัวอย่าง จึงไม่อาจทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ multiplex realtime RT-PCR ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ influenza virus type B ได้

ผลการศึกษาคณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ได้ผลบวกตรงกันรวม 11 ตัวอย่างและได้ผลลบตรงกันรวม 204 ตัวอย่าง และมี 51 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime PCR ที่ตรวจ hexon gene เหมือนกันแต่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน multiplex realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime PCR ให้ผลบวกจำนวน 30 ตัวอย่าง ส่วนอีก 21 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ จึงแปลผลได้ว่า multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นตรวจได้ผลบวกจริงรวม 41 ตัวอย่าง ส่วนอีก 21 ตัวอย่างถือว่าเป็นผลบวกหลง นอกจากนี้ พบว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้ให้ผลบวกหลง 2 ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้น พบว่า การตรวจหา adenoviruses ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 95.35 มีค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 90.67 มี positive predictive value (PPV) เท่ากับร้อยละ 66.13 มี negative predictive value (NPV) เท่ากับร้อยละ 99.03 และมีค่าความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 91.42 (ตารางที่ 3)

ผลการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ได้ผลบวกตรงกันรวม 6 ตัวอย่างและได้ผลลบตรงกันรวม 257 ตัวอย่าง และมี 4 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ที่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน multiplex realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ให้ผลบวกจำนวน 1 ตัวอย่าง ส่วนอีก 3 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ จึงแปลผลได้ว่า multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นตรวจได้ผลบวกจริงรวม 7 ตัวอย่าง ส่วนอีก 3 ตัวอย่างถือว่าเป็นผลบวกหลง นอกจากนี้ พบว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้ให้ผลลบหลง 1 ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้น พบว่า การตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 87.50 มีค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 98.85 มี positive predictive value (PPV) เท่ากับร้อยละ 70.00 มี negative predictive value (NPV) เท่ากับร้อยละ 99.61 และมีค่าความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 98.51 (ตารางที่ 3)

ผลการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ parainfluenza virus type 2 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา parainfluenza virus type 2 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ได้ผลลบตรงกันรวม 265 ตัวอย่าง และมี 2 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ที่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน multiplex realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ให้

ผลบวกจำนวน 1 ตัวอย่างและให้ผลลบจำนวน 1 ตัวอย่าง จึงแปลผลได้ว่า multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นตรวจได้ผลบวกจริงรวม 1 ตัวอย่าง และให้ผลลบกลวง 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้พบว่า การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ให้ผลลบลงจำนวน 1 ตัวอย่าง

เนื่องจากมีตัวอย่างที่ตรวจพบ parainfluenza virus type 2 เพียง 2 ตัวอย่าง จึงไม่อาจทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ multiplex realtime RT-PCR ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ parainfluenza virus type 2 ได้

ผลการศึกษาคูสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ parainfluenza virus type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา parainfluenza virus type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นและวิธีมาตรฐาน ได้ผลบวกตรงกันรวม 7 ตัวอย่างและได้ผลลบตรงกันรวม 257 ตัวอย่าง และมี 3 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ที่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน multiplex realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ให้ผลบวกทั้ง 3 ตัวอย่าง จึงแปลผลได้ว่า multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นตรวจได้ผลบวกจริงรวม 10 ตัวอย่าง โดยไม่มีผลลบกลวงเลย นอกจากนี้พบว่า การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้ให้ผลลบลง 1 ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้น พบว่า การตรวจหา parainfluenza virus type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 90.91 มีค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 100.00 มี positive predictive value (PPV) เท่ากับร้อยละ 100.00 มี negative predictive value (NPV) เท่ากับร้อยละ 99.61 และมีค่าความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 99.63 (ตารางที่ 3)

ผลการศึกษาคูสมบัติเฉพาะของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ respiratory syncytial virus ด้วยวิธี realtime RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 268 ตัวอย่างเพื่อตรวจหา respiratory syncytial virus ด้วยวิธี in-house realtime RT-PCR และวิธีมาตรฐาน ได้ผลบวกตรงกันรวม 98 ตัวอย่างและได้ผลลบตรงกันรวม 159 ตัวอย่าง และมี 9 ตัวอย่างที่ได้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี in-house realtime RT-PCR แต่ได้ผลลบจากการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อนำตัวอย่างที่ได้ผลตรวจไม่สอดคล้องกันนี้มาทำการตรวจยืนยันด้วย commercial realtime RT-PCR ที่ใช้ primers และ probes ที่แตกต่างกับที่ใช้ใน in-house realtime RT-PCR ผลปรากฏว่าการตรวจยืนยันด้วย commercial realtime RT-PCR ให้

ผลบวกจำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนอีก 5 ตัวอย่างให้ผลเป็นลบ จึงแปลผลได้ว่า in-house realtime RT-PCR ตรวจได้ผลบวกจริงรวม 102 ตัวอย่าง ส่วนอีก 5 ตัวอย่างถือว่าเป็นผลบวกดวง นอกจากนี้พบว่า in-house realtime RT-PCR ตรวจได้ผลลบดวงจำนวน 2 ตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้น พบว่า การตรวจหา respiratory syncytial virus ด้วยวิธี in-house realtime RT-PCR นี้ มีค่าความไว (sensitivity) เท่ากับร้อยละ 98.08 มีค่าความจำเพาะ (specificity) เท่ากับร้อยละ 96.95 มี positive predictive value (PPV) เท่ากับร้อยละ 95.33 มี negative predictive value (NPV) เท่ากับร้อยละ 98.76 และมีค่าความแม่นยำ (accuracy) เท่ากับร้อยละ 97.39 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของการตรวจหาไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธีต่างๆ

ไวรัส	วิธีทดสอบ	ความไว (%)	ความจำเพาะ (%)	PPV (%)	NPV (%)	ความแม่นยำ (%)
Influenza virus type A	Viral culture	36.36	100.00	100.00	97.35	97.39
	DFA	54.55	99.22	75.00	98.08	97.39
	Multiplex realtime RT-PCR	100.00	96.89	57.89	100.00	97.01
Influenza virus type B	Viral culture	NA	NA	NA	NA	NA
	DFA	NA	NA	NA	NA	NA
	Multiplex realtime RT-PCR	NA	NA	NA	NA	NA
Adenoviruses	Viral culture	27.91	100.00	100.00	87.89	88.43
	DFA	27.91	99.11	85.71	87.80	87.69
	Multiplex realtime RT-PCR	95.35	90.67	66.13	99.03	91.42
Parainfluenza virus type 1	Viral culture	87.50	100.00	100.00	99.62	99.63
	DFA	75.00	98.85	66.67	99.23	98.13
	Multiplex realtime RT-PCR	87.50	98.85	70.00	99.61	98.51
Parainfluenza virus type 2	Viral culture	NA	NA	NA	NA	NA
	DFA	NA	NA	NA	NA	NA
	Multiplex realtime RT-PCR	NA	NA	NA	NA	NA
Parainfluenza virus type 3	Viral culture	72.73	100.00	100.00	98.85	98.88
	DFA	54.55	98.83	66.67	98.07	97.01
	Multiplex realtime RT-PCR	90.91	100.00	100.00	99.61	99.63
Respiratory syncytial virus	Viral culture	85.58	100.00	100.00	91.62	94.40
	DFA	92.31	99.39	98.97	95.32	96.64
	Multiplex realtime RT-PCR	98.08	96.95	95.33	98.76	97.39

หมายเหตุ: DFA = direct fluorescent antibody assay, RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction, PPV = positive predictive value, NPV = negative predictive value, NA = not available

อภิปรายผลการวิจัย

โรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเป็นสาเหตุของการป่วยและการเสียชีวิตที่สำคัญเป็นอันดับหนึ่งในประชาชนทุกกลุ่มอายุ โดยเฉพาะเด็กเล็กในประเทศที่กำลังพัฒนา ผู้ป่วยเด็กที่เสียชีวิตจากโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างร้อยละ 25 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสที่พบเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างที่พบได้บ่อย ได้แก่ respiratory syncytial virus, influenza virus type A และ B, adenovirus, parainfluenza virus type 1, 2 และ 3 โครงการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่พบบ่อยทั้ง 7 ชนิดข้างต้นในผู้ป่วยเด็กไทย อายุไม่เกิน 5 ปี จำนวน 268 รายที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึงกันยายน พ.ศ. 2552 ด้วยอาการของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง โดยทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสจาก nasopharyngeal aspirates ของผู้ป่วยด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในโครงการส่วนใหญ่ (ร้อยละ 88.43, n = 237) เป็นผู้ป่วยโรคปอดบวม รองลงไปเป็นผู้ป่วยโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ (ร้อยละ 4.85, n = 13), โรคหลอดลมฝอยอักเสบ (ร้อยละ 3.36, n = 9) และโรคหลอดลมอักเสบ (ร้อยละ 3.36, n = 9) ตามลำดับ

จากการศึกษานี้พบว่า ไวรัสที่พบบ่อยที่สุด คือ respiratory syncytial virus พบร้อยละ 39.9 (107 ตัวอย่าง) ไวรัสที่พบบ่อยเป็นอันดับสองและสาม ได้แก่ adenoviruses พบร้อยละ 23.1 (62 ตัวอย่าง) และ influenza virus type A พบร้อยละ 7.1 (จำนวน 19 ตัวอย่าง) ตามลำดับ สำหรับไวรัสชนิดอื่นที่พบรองลงไป ได้แก่ parainfluenza virus type 1 พบร้อยละ 3.7 (จำนวน 10 ตัวอย่าง), parainfluenza virus type 3 พบร้อยละ 3.7 (จำนวน 10 ตัวอย่าง), parainfluenza virus type 2 พบร้อยละ 0.8 (จำนวน 2 ตัวอย่าง) และ influenza virus type B พบร้อยละ 0.4 (จำนวน 1 ตัวอย่าง) ผลการศึกษาที่ได้พบว่ามีผลสอดคล้องกับหลายการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยในปี ค.ศ. 2004 Boivin G และคณะ (9) รายงานผลการตรวจหาเชื้อไวรัส 3 ชนิด (influenza virus type A, B และ respiratory syncytial virus) จาก nasopharyngeal aspirate ของผู้ป่วยเด็กอายุ 0-3 ปีที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลด้วยโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจ จำนวน 208 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR โดยใช้ SYBR Green พบ respiratory syncytial virus ร้อยละ 51.0 และพบ influenza virus type A ร้อยละ 21.6 แต่ไม่พบ influenza virus type B เลย ในปี ค.ศ. 2006 Kuypers J และคณะ (21) รายงานผลการตรวจหาเชื้อไวรัส 7 ชนิด (influenza virus type A, parainfluenza virus type 1, 2 และ 3, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus และ adenovirus) จากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยเด็กอายุ 1 วัน-19 ปี จำนวน 1,138 ตัวอย่าง ด้วยวิธี monoplex realtime RT-PCR โดยใช้ TaqMan probes พบว่า respiratory

syncytial virus เป็นไวรัสที่พบบ่อยที่สุด พบร้อยละ 22.4, adenovirus พบบ่อยเป็นอันดับสอง ร้อยละ 12.5, influenza virus type A พบบ่อยเป็นอันดับสาม ร้อยละ 11.8 รองลงไป ได้แก่ human metapneumovirus ร้อยละ 6.6, parainfluenza virus type 3 ร้อยละ 4.8, parainfluenza virus type 1 ร้อยละ 3.4 และ parainfluenza virus type 2 ร้อยละ 0.8 ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2007 van de Pol AC และคณะ (22) ทำการตรวจหาเชื้อไวรัส 7 ชนิด (influenza virus type A และ B, parainfluenza virus type 1, 2 และ 3, respiratory syncytial virus และ adenovirus) จากตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยเด็ก จำนวน 181 ตัวอย่าง ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR โดยใช้ TaqMan probes พบว่า respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบบ่อยที่สุด พบร้อยละ 25.4, influenza viruses พบร้อยละ 9.9, adenovirus พบร้อยละ 9.4 และ parainfluenza viruses พบร้อยละ 4.4 ตามลำดับ สิ่งที่แตกต่างกันจากการศึกษาก่อนหน้านี้ คือ การศึกษานี้ตรวจพบอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ adenovirus ในปริมาณที่สูงกว่ารายงานอื่นๆ ก่อนหน้านี้ ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่า primers และ probe ที่ใช้สำหรับการตรวจหา adenovirus ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ในการศึกษานี้ได้ ออกแบบมาเพื่อให้สามารถตรวจหา human adenoviruses ได้ครบทั้ง 51 serotypes แตกต่างจากการศึกษาอื่นก่อนหน้านี้อาจยังไม่สามารถตรวจหา adenovirus ได้ครบถ้วนทุก serotypes นอกจากนี้ adenovirus นั้นมีความแตกต่างกับไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ในการศึกษาที่ตรงที่มักพบว่า adenovirus นั้นสามารถตรวจพบอยู่ได้เป็นเวลานานภายหลังจากที่มี primary infection (21) และยังสามารถตรวจพบในคนที่ไม่มีอาการป่วยของระบบทางเดินหายใจได้อีกด้วย (23) ประกอบกับ multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนั้นมีความไวสูงมาก สามารถตรวจพบ adenovirus ที่มีปริมาณเพียง 10 copies ได้ ดังนั้น adenovirus ที่ตรวจพบได้นี้จึงอาจเป็นเพียง coincidence ที่บังเอิญตรวจพบ โดยอาจไม่ใช่สาเหตุที่แท้จริงของอาการป่วยในครั้งนี้ของผู้ป่วย อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR สามารถบอกผลเป็นค่าปริมาณไวรัส (viral load) ที่ตรวจพบได้ว่ามีปริมาณมากน้อยเพียงใด ในกรณีที่ viral load มีค่าสูงมากอาจช่วยในการแปลผลการตรวจได้ว่าน่าจะเป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดอาการป่วยในครั้งนี้จริง สำหรับค่า cut off ของ viral load ที่จะนำมาใช้พิจารณาประกอบการแปลผลคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษานี้ การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR สามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสสองชนิดพร้อมกันจำนวน 31 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 11.6 ในขณะที่การเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสสามารถตรวจพบการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดพร้อมกันได้น้อยกว่า คือ ร้อยละ 1.9 และร้อยละ 3.4 ตามลำดับ ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ โดยในปี ค.ศ. 2004 Boivin G และคณะ (9) รายงานการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR โดยใช้ SYBR Green พบ respiratory syncytial virus ร่วมกับ influenza virus type A ร้อยละ 5.8 ในปี ค.ศ. 2007 van de Pol AC และคณะ (22) รายงานการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-

PCR พบการติดเชื้อไวรัสตั้งแต่สองชนิดพร้อมกันร้อยละ 5.0 ในปี ค.ศ. 2006 Kuypers J และคณะ (21) รายงานการตรวจด้วยวิธี monoplex realtime RT-PCR พบการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดพร้อมกันร้อยละ 7.3 เปรียบเทียบกับการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสซึ่งตรวจพบการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดพร้อมกันเพียงร้อยละ 0.5 ในปี ค.ศ. 2006 Freymuth F และคณะ (24) รายงานการตรวจด้วยวิธี multiplex RT-PCR พบการติดเชื้อไวรัสสองชนิดพร้อมกันร้อยละ 19.8 เปรียบเทียบกับการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสร่วมกับการเพาะแยกเชื้อไวรัสซึ่งตรวจพบการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิดพร้อมกันเพียงร้อยละ 1.9

จากการศึกษานี้ พบว่าผู้ป่วยเด็กโรคปอดบวม (จำนวน 237 ราย) เกิดจากการติดเชื้อ respiratory syncytial virus มากที่สุด จำนวน 102 ราย คิดเป็นร้อยละ 43.0 รองลงไป ได้แก่ adenoviruses จำนวน 51 ราย คิดเป็นร้อยละ 21.5, influenza virus type A จำนวน 16 ราย คิดเป็นร้อยละ 6.8 และ parainfluenza virus type 3 จำนวน 8 ราย คิดเป็นร้อยละ 3.4 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ซึ่งตรวจผู้ป่วยเด็กโรคปอดบวมจำนวน 309 ราย พบว่าเกิดจากการติดเชื้อ respiratory syncytial virus มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 19.1 รองลงไป ได้แก่ influenza virus type A และ adenoviruses ที่พบร้อยละ 5.5 และ 4.9 ตามลำดับ

จากการศึกษานี้ พบว่าผู้ป่วยโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ (จำนวน 13 ราย) เกิดจากการติดเชื้อ parainfluenza virus type 1 จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.1, adenoviruses จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 23.1, influenza virus type A จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.4, parainfluenza virus type 3 จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.4 และ respiratory syncytial virus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 15.4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ซึ่งพบว่าผู้ป่วยเด็กโรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบเกิดจากการติดเชื้อ parainfluenza virus type 3, parainfluenza virus type 1, influenza virus type A, enterovirus, adenovirus, respiratory syncytial virus และ influenza virus type B

จากการศึกษานี้ พบว่าผู้ป่วยโรคหลอดลมฝอยอักเสบ (จำนวน 9 ราย) เกิดจากการติดเชื้อ adenoviruses จำนวน 3 ราย คิดเป็นร้อยละ 33.3 และ respiratory syncytial virus จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ซึ่งพบว่าผู้ป่วยเด็กโรคหลอดลมฝอยอักเสบส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อ respiratory syncytial virus คิดเป็นร้อยละ 26.9 และ adenovirus คิดเป็นร้อยละ 9.6

จากการศึกษานี้ พบว่าผู้ป่วยโรคหลอดลมอักเสบ (จำนวน 9 ราย) ตรวจพบมีการติดเชื้อ adenoviruses จำนวน 5 ราย คิดเป็นร้อยละ 55.6, parainfluenza virus type 1 จำนวน 2 ราย คิดเป็นร้อยละ 22.2, influenza virus type A จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.1 และ respiratory syncytial virus จำนวน 1 ราย คิดเป็นร้อยละ 11.1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B

และคณะ (7) ซึ่งพบว่าผู้ป่วยเด็กโรคหลอดลมอักเสบเกิดจากการติดเชื้อ respiratory syncytial virus, influenza virus type A และ adenovirus คิดเป็นร้อยละ 13.7, 4.2 และ 3.2 ตามลำดับ

ข้อมูลจากการศึกษานี้ดังที่อภิปรายมาข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า influenza virus type A เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคปอดบวม, โรคคroup และหลอดลมอักเสบ respiratory syncytial virus เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคปอดบวม, โรคหลอดลมฝอยอักเสบ adenovirus เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคหลอดลมอักเสบ, โรคหลอดลมฝอยอักเสบ นอกจากนี้ ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคคroup และหลอดลมอักเสบ, โรคปอดบวมด้วย parainfluenza virus type 1 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคคroup และหลอดลมอักเสบ, โรคหลอดลมอักเสบ parainfluenza virus type 3 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคคroup และหลอดลมอักเสบ, โรคปอดบวม ผลการศึกษาที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ซึ่งพบว่า influenza virus type A ทำให้เกิดโรคปอดบวม, โรคคroup และหลอดลมอักเสบ respiratory syncytial virus ทำให้เกิดโรคปอดบวม, โรคหลอดลมฝอยอักเสบ, โรคหลอดลมอักเสบ adenovirus ทำให้เกิดโรคหลอดลมฝอยอักเสบ parainfluenza virus type 1 และ 3 ทำให้เกิดโรคคroup และหลอดลมอักเสบ

ไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจส่วนใหญ่มีการระบาดตามฤดูกาล จากการศึกษาพบว่า การติดเชื้อ respiratory syncytial virus มีการระบาดในช่วงฤดูฝนของทุกปี โดยมีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน ซึ่งผลที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ของ Rattanadilok Na Bhuket และคณะ (25) ที่พบว่า การติดเชื้อ RSV พบมากในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม และสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาในเขตร้อนที่ Stensballe LG และคณะ (26) รายงานว่าการติดเชื้อ RSV ในทวีปอเมริกาใต้พบมากระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน แต่พบว่ามีความแตกต่างกับข้อมูลการศึกษาในเขตอบอุ่นที่ Grondahl B และคณะ (7) รายงานว่าการติดเชื้อ RSV ในประเทศเยอรมันพบมากในช่วงฤดูหนาว ระหว่างเดือนธันวาคมถึงพฤษภาคม และ Stensballe LG และคณะ (26) รายงานว่าการติดเชื้อ RSV ในทวีปอเมริกาเหนือพบมากระหว่างเดือนตุลาคมถึงเมษายน และจากการศึกษานี้ พบว่าการติดเชื้อ influenza virus type A มีการระบาดปีละ 2 ครั้ง คือ มีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงฤดูฝน และสูงรองลงมาในช่วงฤดูหนาวของทุกปี ซึ่งผลที่ได้นี้มีความสอดคล้องกับข้อมูลการศึกษาในประเทศไทยก่อนหน้านี้ของ Simmerman JM และคณะ (27) ที่พบว่าโรคไข้หวัดใหญ่นั้นมีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงกันยายน และมีอุบัติการณ์สูงรองลงมาในช่วงฤดูหนาว ระหว่างเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ และสอดคล้องกับข้อมูลการระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในซีกโลกใต้ ที่พบว่า มีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกันยายน (28) แต่จะมีความแตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ที่รายงานว่า การติดเชื้อ influenza virus ในประเทศเยอรมันพบมากในช่วงฤดูหนาว ระหว่างเดือนธันวาคมถึงพฤษภาคมและแตกต่างกับข้อมูล

การระบาดของโรคไข้หวัดใหญ่ในเขตอบอุ่นของซีกโลกเหนือ ที่พบว่ามีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเมษายน (28) จากการศึกษานี้ พบว่าการติดเชื้อ adenovirus พบได้เกือบตลอดทั้งปี แต่อุบัติการณ์จะสูงที่สุดในช่วงฤดูฝน และสูงรองลงมาในช่วงฤดูหนาว สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ที่พบว่าการติดเชื้อ adenovirus พบได้ตลอดปีโดยมีอุบัติการณ์สูงขึ้นเล็กน้อยในช่วงฤดูหนาว จากการศึกษานี้ พบว่าการติดเชื้อ parainfluenza virus type 1 มีการระบาดในเดือนกุมภาพันธ์ของปีแรกที่ทำการศึกษานั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Grondahl B และคณะ (7) ซึ่งพบว่าการติดเชื้อ parainfluenza virus type 1 มีการระบาดเป็นช่วงเช่นกัน โดยเชื่อว่าการระบาดทุก 2-3 ปี จากการศึกษานี้ พบว่าการติดเชื้อ parainfluenza virus type 3 เกิดขึ้นประปรายในช่วงฤดูฝนและฤดูหนาวของทุกปี ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Grondahl B และคณะ (7) ที่รายงานว่าพบการติดเชื้อ parainfluenza virus type 3 ได้ตลอดทั้งปี

จากการศึกษาพบว่าอัตราการติดเชื้อ influenza virus type A และ B, parainfluenza virus type 1, 2 และ 3 และ respiratory syncytial virus ในเพศชายและเพศหญิงนั้น ไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้น adenovirus ซึ่งพบว่ามีอัตราการติดเชื้อในเพศชายมากกว่าเพศหญิง คือ ร้อยละ 28.8 และร้อยละ 14.3 ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการของโรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในผู้ป่วยเด็กอายุ 0-5 ปี อยู่ระหว่างร้อยละ 55.6-73.7 โดยพบว่า respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบบ่อยที่สุดในเด็กอายุ 0-4 ปี adenoviruses พบได้เท่าๆกันในทุกช่วงอายุ สำหรับ influenza virus type A, parainfluenza virus type 1 และ parainfluenza virus type 3 พบในเด็กอายุ 0-2 ปีเป็นส่วนใหญ่

การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวเหนือกว่าวิธีการตรวจด้วยวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส การเพาะแยกเชื้อไวรัสนั้นการเก็บรักษาตัวอย่างส่งตรวจระหว่างที่นำส่งห้องปฏิบัติการนั้นมีความสำคัญอย่างมาก หากเก็บไม่ถูกวิธีก็จะทำให้ความไวของการทดสอบต่ำลงอย่างมาก ต่างจากการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่สามารถตรวจเชื้อไวรัสที่ inactive แล้วได้ การเก็บรักษาตัวอย่างส่งตรวจระหว่างที่นำส่งห้องปฏิบัติการจึงมีความเข้มงวดน้อยกว่า การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจพบไวรัสที่มีปริมาณน้อยถึง 10 copies ได้ (ดูในส่วนของวิธีดำเนินการวิจัย) ในขณะที่การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี immunofluorescent assay โดยมากสามารถตรวจไวรัสที่มีปริมาณตั้งแต่ 1,000,000 copies ต่อมิลลิลิตรขึ้นไปเท่านั้น (21)

จากการศึกษาพบว่า การตรวจหา influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวเท่ากับร้อยละ 100.0 ซึ่งสูงกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสที่มีความไวร้อยละ 36.4 และร้อยละ 54.6 ตามลำดับ ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษา

ก่อนหน้า¹ของ Boivin G และคณะ (9) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา IFV-A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวร้อยละ 100.0 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสซึ่งมีความไวร้อยละ 43.6 และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า¹ของ Kuypers J และคณะ (21) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา IFV-A ด้วยวิธี monoplex realtime RT-PCR มีความไวเพิ่มขึ้นร้อยละ 13.4 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส

จากการศึกษานี้ พบว่าการตรวจหา adenovirus ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวเท่ากับร้อยละ 95.4 ซึ่งสูงกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสที่มีความไวร้อยละ 27.9 และร้อยละ 27.9 ตามลำดับ ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า¹ของ Kuypers J และคณะ (21) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา ADV ด้วยวิธี monoplex realtime PCR มีความไวเพิ่มขึ้นร้อยละ 77.7 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส

จากการศึกษานี้ พบว่าการตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวเท่ากับร้อยละ 87.5 ซึ่งไวเท่ากับ การเพาะแยกเชื้อไวรัส แต่ไวมากกว่าการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสที่มีความไวร้อยละ 75 ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า¹ของ Kuypers J และคณะ (21) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา PIV-1 ด้วยวิธี monoplex realtime RT-PCR มีความไวเพิ่มขึ้นร้อยละ 64.1 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส

จากการศึกษานี้ พบว่าการตรวจหา parainfluenza virus type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวเท่ากับร้อยละ 90.9 ซึ่งสูงกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสที่มีความไวร้อยละ 72.7 และ 54.6 ตามลำดับ ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า¹ของ Kuypers J และคณะ (21) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา PIV-3 ด้วยวิธี monoplex realtime RT-PCR มีความไวเพิ่มขึ้นร้อยละ 30.1 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส

จากการศึกษานี้ พบว่าการตรวจหา respiratory syncytial virus ด้วยวิธี realtime RT-PCR มีความไวเท่ากับร้อยละ 98.1 ซึ่งสูงกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสและการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสที่มีความไวร้อยละ 85.6 และ 92.3 ตามลำดับ ผลที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า¹ของ Boivin G และคณะ (9) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา RSV ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวร้อยละ 94.5 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสซึ่งมีความไวร้อยละ 81.6 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Kuypers J และคณะ (21) ซึ่งพบว่าความไวของการตรวจหา RSV ด้วยวิธี monoplex realtime RT-PCR มีความไวเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.1 เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจหาแอนติเจนของไวรัส

จากการศึกษานี้พบว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลบวกโดยรวม 38 ตัวอย่าง (influenza virus type A จำนวน 8 ตัวอย่าง, adenovirus จำนวน 21

ตัวอย่าง, parainfluenza virus type 1 จำนวน 3 ตัวอย่าง, parainfluenza virus type 2 จำนวน 1 ตัวอย่างและ respiratory syncytial virus จำนวน 5 ตัวอย่าง) ตัวอย่างเหล่านี้เกือบทั้งหมด (36 จาก 38 ตัวอย่าง) เป็นตัวอย่างที่มีปริมาณไวรัสในตัวอย่างน้อย (high crossing point ($C_p > 35$) จากการตรวจด้วย multiplex realtime RT-PCR) ดังนั้น เมื่อต้องมีการนำตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียสมาผ่านการ freeze-thaw ใหม่เพื่อทำการตรวจยืนยันผลด้วย commercial monoplex realtime RT-PCR ต่อไวรัสแต่ละชนิด จึงอาจส่งผลให้ RNA และ DNA ของไวรัสที่มีน้อยอยู่แล้วเกิดการแตกหักจนส่งผลให้การตรวจซ้ำได้ผลเป็นลบได้ นอกจากนี้ ความไวของ monoplex realtime RT-PCR ที่นำมาใช้เพื่อตรวจยืนยันผล อาจมีความไวน้อยกว่าวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นก็ได้ เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาเปรียบเทียบกันมาก่อน

จากการศึกษานี้พบว่าการตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้ผลลบโดยรวม 7 ตัวอย่าง (adenovirus 2 ตัวอย่าง, parainfluenza virus type 1, 2 และ 3 อย่างละ 1 ตัวอย่าง, respiratory syncytial virus 2 ตัวอย่าง) คิดเป็นร้อยละ 2.6 ของตัวอย่างสิ่งส่งตรวจทั้งหมด สาเหตุอาจเป็นเพราะมี inhibitors ต่อ PCR ในตัวอย่างสิ่งคัดลอกจากระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย ซึ่งกรณีเช่นนี้พบได้ร้อยละ 1.9-2.5 (29) หรืออาจเกิดจากไวรัสมีการกลายพันธุ์ของยีนที่เป็นเป้าหมายในการตรวจก็ได้

เมื่อพิจารณาในแง่ความรวดเร็วของการได้รับผลการตรวจ การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้ใช้เวลาในการตรวจเพียง 3 ชั่วโมง ซึ่งไวกว่าวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธี shell vial culture ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2-3 วัน และไวกว่าการตรวจด้วยวิธี conventional RT-PCR เนื่องจากไม่ต้องมี post-PCR analysis และแม้ว่าจะใช้เวลาในการตรวจมากกว่าวิธีการตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี direct fluorescent antibody assay ซึ่งใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2 ชั่วโมงอยู่บ้าง แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธี DFA จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผลมากกว่า ในกรณีที่มีตัวอย่างปริมาณมาก การอ่านผลโดยเจ้าหน้าที่อาจทำได้ลำบาก ต้องใช้เวลามากและทำให้ล่าช้าได้ เมื่อเปรียบเทียบการทราบผลการตรวจที่ช้ากว่ากันเพียงเล็กน้อยกับความไวของการทดสอบที่เหนือกว่า รวมถึงการอ่านและแปลผลที่ง่ายกว่า ดังนั้น การนำ multiplex realtime RT-PCR มาใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจจึงน่าจะทำให้เกิดประโยชน์มากกว่า ช่วยให้แพทย์สามารถเลือกให้การรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องเหมาะสม โดยเฉพาะการให้ยาต้านไวรัสใช้หวัดใหญ่ซึ่งจำเป็นต้องให้ภายใน 48 ชั่วโมงแรกที่มีอาการป่วยจึงจะได้ผลการรักษาที่ดีที่สุด, สามารถลดการใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็น ซึ่งจะช่วยลดโอกาสเกิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่กำลังเป็นปัญหาที่สำคัญอยู่ในปัจจุบัน และช่วยให้แพทย์สามารถคัดแยกและกักกันผู้ป่วยอย่างเหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในโรงพยาบาลและในชุมชน เช่น ที่โรงเรียน, สถานรับเลี้ยงเด็ก

การเลือกนำเทคนิค realtime RT-PCR มาใช้นั้นช่วยลดโอกาสเกิด contamination ของ PCR product ในห้องปฏิบัติการและช่วยลดโอกาสเกิดผลบวกปลอม ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้หากทำการตรวจด้วยวิธี conventional RT-PCR เนื่องจากต้องทำการเปิดหลอดทดลองเพื่อนำ PCR product มาทำการวิเคราะห์ต่อยด้วย gel electrophoresis นอกจากนี้ ยังมีความปลอดภัยมากกว่า เนื่องจากผู้ปฏิบัติงานไม่จำเป็นต้องมีการสัมผัสกับ ethidium bromide ที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง

การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส 7 ชนิดได้พร้อมกันโดยใช้ตัวอย่างสิ่งส่งตรวจในปริมาณน้อยเพียง 200 ไมโครลิตร สามารถเป็นเครื่องมือสำหรับแพทย์ในการวินิจฉัยแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุก่อโรคและช่วยลดค่าตรวจลง (เมื่อเทียบกับการต้องแยกตรวจ monoplex realtime RT-PCR ต่อไวรัสทั้ง 7 ชนิด) เดิม multiplex RT-PCR นั้นจะมีข้อด้อยตรงที่ความไวของการทดสอบจะต่ำกว่า monoplex RT-PCR โดยความไวจะลดลงตามจำนวนคู่ primers ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากอาจมีการทำปฏิกิริยาต่อกันของ primers ที่จำเพาะต่อไวรัสชนิดต่างๆและมีการแย่งใช้ส่วนประกอบต่างๆในปฏิกิริยา แต่ผู้วิจัยได้มีการปรับสภาวะของ multiplex realtime RT-PCR นี้ให้เหมาะสมและมีความไวของการทดสอบเทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับ monoplex RT-PCR การตรวจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ยังสามารถทราบปริมาณของไวรัสในสิ่งส่งตรวจด้วย ซึ่งจะมีประโยชน์ในกรณีที่ต้องการศึกษาว่าการติดเชื้อไวรัสที่ตรวจพบนั้นมีความสัมพันธ์กับอาการป่วยหรือไม่

การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ influenza virus type B และ parainfluenza virus type 2 มีปริมาณน้อยเพียง 1 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ จึงยังไม่สามารถทำการประเมินคุณสมบัติเฉพาะของการตรวจหาเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นได้

อุปสรรคของการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่พบบ่อยทั้ง 7 ชนิดที่ได้จากการศึกษานี้ น่าจะมีความใกล้เคียงกับข้อมูลที่เป็นจริงมากกว่าการศึกษาอื่นในประเทศไทยก่อนหน้านี้นี้ เนื่องจากผู้วิจัยได้เลือกใช้การตรวจวิธี multiplex realtime RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าการตรวจด้วยวิธีมาตรฐานซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้นำมาใช้ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลอุปสรรคที่ได้นี้น่าจะยังคงต่ำกว่าความเป็นจริงอยู่ดี เนื่องจากน่าจะยังมีผู้ป่วยอีกเป็นจำนวนมากที่มีการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจ แต่มีอาการป่วยไม่มากจึงไม่ได้มาพบแพทย์

จากการศึกษานี้ พบว่าร้อยละ 67.2 ของโรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็กอายุ 0-5 ปีเกิดจากการติดเชื้อ respiratory syncytial virus, adenoviruses, influenza virus type A และ B, parainfluenza virus type 1-3 อย่างไรก็ตาม มีผู้ป่วยอีกหนึ่งในสามที่ยังไม่ทราบเชื้อที่เป็นสาเหตุ ซึ่งที่จริงแล้วอาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่นๆก็ได้ เช่น human metapneumovirus, rhinoviruses, coronaviruses และ enteroviruses ในอนาคตจึงสมควรพัฒนาการตรวจ multiplex realtime RT-PCR ให้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสเหล่านี้ได้ด้วย

สรุปและเสนอแนะ

โรคติดเชื้อเฉียบพลันในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างเป็นสาเหตุของการป่วยและตายที่สำคัญของเด็กอายุ 0-5 ปีในประเทศที่กำลังพัฒนา สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส จากการตรวจ nasopharyngeal aspirates ของผู้ป่วยด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR ที่พัฒนาขึ้นพบว่า ร้อยละ 67.2 เกิดจากการติดเชื้อไวรัส respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบบ่อยที่สุด ร้อยละ 39.9 รองลงไปได้แก่ adenovirus ร้อยละ 23.1, influenza virus type A ร้อยละ 7.1, parainfluenza virus type 1 ร้อยละ 3.7, parainfluenza virus type 3 ร้อยละ 3.7, parainfluenza virus type 2 ร้อยละ 0.8 และ influenza virus type B ร้อยละ 0.4 respiratory syncytial virus เป็นไวรัสที่พบบ่อยที่สุดในเด็กอายุ 0-4 ปี เป็นสาเหตุของโรคปอดบวม, โรคหลอดลมฝอยอักเสบ มีการระบาดในช่วงฤดูฝนของทุกปี มีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน การติดเชื้อ influenza virus type A ส่วนใหญ่เกิดในเด็กอายุ 0-2 ปี เป็นสาเหตุของโรคปอดบวม, โรคกล่องเสียงและหลอดลมอักเสบ มีการระบาดปีละ 2 ครั้ง มีอุบัติการณ์สูงสุดในช่วงฤดูฝน และสูงรองลงมาในช่วงฤดูหนาว

การตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยวิธีมาตรฐาน การตรวจหา influenza virus type A ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 100.0 และ 96.9 เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 36.4 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 54.6 และ 99.2 ตามลำดับ การตรวจหา adenovirus ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 95.4 และ 90.7 เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 27.9 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 27.9 และ 99.1 ตามลำดับ การตรวจหา parainfluenza virus type 1 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 87.5 และ 98.9 เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 87.5 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 75.0 และ 98.9 ตามลำดับ การตรวจหา parainfluenza virus type 3 ด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 90.9 และ 100.0 เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 72.7 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 54.6 และ 98.8 ตามลำดับ การตรวจหา respiratory syncytial virus ด้วยวิธี realtime RT-PCR มีความไวและความจำเพาะ ร้อยละ 98.1 และ 97.0 เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะแยกเชื้อไวรัส ร้อยละ 85.6 และ 100.0 และการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส ร้อยละ 92.3 และ 99.4 ตามลำดับ

เนื่องจากยังมีตัวอย่างอีกร้อยละ 32.8 ที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค จึงน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการพัฒนา multiplex realtime RT-PCR ให้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสก่อ

โรคในระบบทางเดินหายใจชนิดอื่นๆ ได้เพิ่มขึ้น เช่น human metapneumovirus, rhinoviruses, coronaviruses และ enteroviruses ซึ่งจะช่วยให้ข้อมูลทางระบาดวิทยาของการติดเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจในประเทศไทยมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ การตรวจหาเชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจด้วยวิธี multiplex realtime RT-PCR นี้จะเป็นบริการทางห้องปฏิบัติการที่มีประโยชน์ต่อแพทย์และผู้ป่วยต่อไปอย่างมาก

บรรณานุกรม

1. Monto AS, Sullivan KM. Acute respiratory illness in the community: frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect* 1993;110:145-60.
2. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. *Rev Infect Dis* 1991;13:S454-62.
3. Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, Takala A, Kilpi T, Hovi T. Epidemiology of documented viral respiratory infection and acute otitis media in a cohort of children followed from two to twenty-four months of age. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:574-81.
4. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719-24.
5. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;30:1394-9.
6. Chotpitayasunondh T, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Chunsuthiwat S, Sawanpanyalert P, Kijphati R, et al. Human disease from influenza A (H5N1), Thailand, 2004. *Emerg Infect Dis* 2005;11(2):201-9.
7. Gröndahl B, Puppe W, Hoppe A, Kühne I, Weigl JAI, Schmitt HJ. Rapid identification of nine microorganism causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):1-7.
8. Garcia-Garcia ML, Ordobas GM, Calvo RC, Gonzalez AM, Aguilar RJ, Arregui SA, et al. Viral infection of the lower respiratory tract in hospitalized infants: etiology, clinical features and risk factors. *An Esp Pediatr* 2001;55(2):101-7.
9. Boivin G, Côté S, Déry P, Serres GD, Bergeron MG. Multiplex real-time PCR assay for detection of influenza and human respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 2004;42:45-51.
10. Tantivanich S, Chityothin O, Tharavanij S. Infection rates of respiratory syncytial virus in pediatric patients attending Phra Mongkutklao Hospital, Bangkok. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1984;15(1):63-7.

11. Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Watthanakasetr S, Sirinavin S, Ruangkanchanasetr S, Hotrakitya S, et al. A study of nonbacterial agents of acute lower respiratory tract in Thai children. *Rev Infect Dis* 1990;12 suppl 8:S923-8.
12. Sunakorn P, Chunchit L, Niltawat S, Wangweerawong M, Jacobs RF. Epidemiology of acute respiratory infections in young children from Thailand. *Pediatr Infect Dis J* 1990;9(12):873-7.
13. Puthavathana P, Habanananda S, Wasi C, Kositanont U, Chantarojanasiri T, Suwanjutha S, et al. Incidence of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and viral infections in pneumonia cases under six months of age, Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994;25(4):657-63.
14. Ekalaksananan T, Pientong C, Kongyingyoes B, Pairojkul S, Teeratakulpisarn J, Heng S. Etiology of acute lower respiratory tract infection in children at Srinagarind Hospital, Khon Kaen, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32(3):513-9.
15. Siritantikorn S, Puthanavathana P, Suwanjutha S, Chantarojanasiri T, Sunakorn P, Ratanadilok Na Phuket T, et al. Acute viral lower respiratory infections in children in a rural community in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2002;85 Suppl 4:S1167-75.
16. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 2002;40(9):3256-60.
17. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H, Pauli G. Application of a Fluorogenic PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Samples. *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1552-58.
18. Heim A, Ebnet C, Harste G, Pring-Akerblom P. Rapid and Quantitative Detection of Human Adenovirus DNA by Real-Time PCR. *J Med Virol* 2003;70(2):228-39.
19. Watzinger F, Suda F, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):5189-98.
20. Freymuth F, Eugene G, Vabret A, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, et al. Detection of Respiratory Syncytial Virus by Reverse Transcription-PCR and Hybridization with a DNA Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 1995;33(12):3352-5.

21. Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, et al. Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2382-8.
22. Van de Pol AC, van Loon AM, Wolfs TF, Jansen NJ, Nijhuis M, Breteler EK, et al. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 2007;45(7):2260-2.
23. Leung AY, Chan M, Cheng VC, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of adenovirus in the lower respiratory tract of patients without clinical adenovirus-related respiratory disease. *Clin Infect Dis* 2005;40:1541-4.
24. Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006;78(11):1498-504.
25. Rattanadilok Na Bhuket T, Sunakorn P, Suwanjutha S, Nawanoparatkul S, Teeyapaiboonsilpa P. Wheezing-associated lower respiratory infections in under 5-year-old children: study in Takhli District Hospital. *J Med Assoc Thai* 2002;85(Suppl4):S1247-51.
26. Stensballe LG, Devasundaram JK, Simoes EA. Respiratory syncytial virus epidemics: the ups and downs of a seasonal virus. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22(suppl):S21-32.
27. Simmerman JM, Thawatsupha P, Kingnate D, Fukuda K, Chaising A, Dowell SF. Influenza in Thailand: a case study for middle income countries. *Vaccine* 2004;23(2):182-7.
28. Dowell SF, Ho MS. Seasonality of infectious diseases and severe acute respiratory syndrome – what we don't know can hurt us. *Lancet Infect Dis* 2004;4:704-8.
29. Stauffer F, Haber H, Reiger A, Mutschlechner R, Hasenberger P, Tevere VJ, et al. Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:614-7.

ภาคผนวก



คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย อุบัติการณ์ของโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กไทย

ผู้สนับสนุนการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

แพทย์ผู้ทำวิจัย

ชื่อ อาจารย์ นายแพทย์ เอกสิทธิ์ โกวิทย์ดำรงค์

ที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4132 ต่อ 615

แพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัย

1. ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภักดิ์ สำราญสำรวงิจ

ที่ทำงาน ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4496 ต่อ 123

2. ชื่อ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นวลจันทร์ ปราบพาส

ที่ทำงาน ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เบอร์โทรศัพท์ 0-2256-4496 ต่อ 128

เรียน ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่แสดงข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจของท่านในการอนุญาตให้บุตรหลานของท่านเข้าร่วมการศึกษาวิจัย อย่างไรก็ตาม ก่อนที่ท่านตกลงให้บุตรหลานของท่านเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ ขอให้ท่านอ่านเอกสารฉบับนี้อย่างละเอียด เพื่อให้ท่านได้ทราบถึงเหตุผลและรายละเอียดของการศึกษาวิจัย หากท่านมีข้อสงสัยใดๆ เพิ่มเติม กรุณาซักถามจากทีมงานของแพทย์ผู้ทำวิจัย หรือแพทย์ผู้ร่วมในโครงการวิจัยซึ่งจะเป็นผู้สามารถให้ความกระจ่างแก่ท่านได้

ท่านสามารถขอคำแนะนำในการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้จากครอบครัว เพื่อน หรือแพทย์ประจำตัวของท่านได้ ถ้าท่านตัดสินใจแล้วว่าจะให้บุตรหลานของท่านเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขอให้ท่านเซ็นชื่อยินยอมในเอกสารฉบับนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการติดเชื้อไวรัสเฉียบพลัน 7 ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคของระบบทางเดินหายใจในเด็กที่พบได้บ่อย ได้แก่ adenoviruses, influenza viruses type A และ



B, parainfluenza viruses type 1-3 และ respiratory syncytial virus โดยมีจำนวนผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ทั้งสิ้น 400 คน

คำชี้แจงเกี่ยวกับโรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็ก

โรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญที่สุด ทำให้เกิดการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในประชาชนทุกกลุ่มอายุ โดยเฉพาะในเด็กเล็ก, ผู้สูงอายุ และผู้ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสก่อโรคในระบบทางเดินหายใจที่พบบ่อย ได้แก่ rhinoviruses, coronaviruses, influenza viruses, respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza viruses และ adenoviruses โดยทำให้เกิดโรคติดเชื้อทั้งในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง เช่น ไข้หวัด, ไข้หวัดใหญ่, กล้องเสียงอักเสบ, หลอดลมอักเสบ, หลอดลมฝอยอักเสบ, และปอดบวม เป็นต้น

การให้การวินิจฉัยโรคติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจโดยอาศัยอาการและอาการแสดงมักไม่ยาก แต่การระบุเชื้อที่เป็นสาเหตุมักทำได้ลำบาก เนื่องจากผู้ป่วยที่มาด้วยอาการที่คล้ายคลึงกันนั้นสามารถเกิดจากการติดเชื้อไวรัสได้หลายชนิด การส่งตรวจพิเศษทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคจึงมีความสำคัญ โดยเฉพาะในกรณีที่มีผู้ป่วยมีการติดเชื้อที่รุนแรง ซึ่งจำเป็นต้องมีการตัดสินใจให้การรักษาโดยการให้ยาปฏิชีวนะหรือยาด้านไวรัสโดยเร่งด่วน นอกจากนี้ หากสามารถยืนยันได้ว่าผู้ป่วยมีอาการป่วยจากการติดเชื้อไวรัสดังกล่าวจริง ย่อมช่วยลดโอกาสที่ผู้ป่วยจะได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะโดยไม่จำเป็นได้

การตรวจพิเศษทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสของระบบทางเดินหายใจ ในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี โดยเก็บตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วยมาทำการเพาะแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง, ตรวจหาแอนติเจนของไวรัสและตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยอาศัยวิธีทางอณูชีววิทยา

วิธีการที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย

เมื่อท่านตกลงใจให้ผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ขั้นตอนแรกเจ้าหน้าที่จะแจกแบบฟอร์มให้ท่านกรอกประวัติและอาการเจ็บป่วยของผู้ป่วย หลังจากนั้นให้ท่านนำผู้ป่วยเข้าพบแพทย์เพื่อรับการตรวจร่างกายโดยละเอียด จากนั้นแพทย์จะทำการเก็บตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจของผู้ป่วย โดยใช้สายยางอ่อนที่ปราศจากเชื้อใส่เข้าทางรูจมูกของผู้ป่วยและดูดสิ่งคัดหลั่งจากลำคอ เพื่อส่งตรวจพิเศษทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาเพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคเพิ่มเติมต่อไป



คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

ความเสี่ยงที่อาจได้รับจากการเก็บตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งจากทางเดินหายใจ

ผู้ป่วยมีโอกาสที่จะเกิดอาการเจ็บ หรือเลือดออกเล็กน้อยจากจมูกและลำคอ ขณะทำการเก็บตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งในระบบทางเดินหายใจได้ อย่างไรก็ตาม อาการดังกล่าวจะเกิดขึ้นเพียงชั่วคราวเท่านั้นและไม่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่ร้ายแรงใดๆ

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการเข้าร่วมในโครงการวิจัย

บุคลากรของท่านจะได้รับการตรวจรักษาจากแพทย์อย่างละเอียด และส่งตัวอย่างสิ่งคัดหลั่งของระบบทางเดินหายใจเพื่อตรวจหาการติดเชื้อไวรัสทั้ง 7 ชนิดข้างต้น ซึ่งจะช่วยให้แพทย์สามารถให้การวินิจฉัยโรคได้อย่างถูกต้อง และตัดสินใจให้การรักษาบุคลากรของท่านได้อย่างถูกต้องเหมาะสมที่สุด ซึ่งท่านไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมสำหรับการส่งตรวจพิเศษทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

คำชี้แจงเกี่ยวกับการแจ้งผลการตรวจพิเศษทางห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา

แพทย์ผู้วิจัยหรือแพทย์ที่ให้การดูแลรักษาบุคลากรของท่านจะแจ้งผลการตรวจให้ท่านทราบทันทีที่ทราบผลการตรวจแล้ว

การเข้าร่วมและการสิ้นสุดการเข้าร่วมโครงการวิจัย

การเข้าร่วมในโครงการวิจัยครั้งนี้เป็นไปโดยความสมัครใจ หากท่านไม่สมัครใจให้ผู้ป่วยเข้าร่วมการศึกษาแล้ว ท่านสามารถถอนตัวได้ตลอดเวลา การขอถอนตัวจากโครงการวิจัยจะไม่มีผลต่อการดูแลรักษาโรคของผู้ป่วยแต่อย่างใด

การปกป้องรักษาข้อมูลของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ข้อมูลที่จะนำไปสู่การเปิดเผยตัวของผู้ป่วย จะได้รับการปกปิดและจะไม่เปิดเผยแก่สาธารณชน ในกรณีที่ผลการวิจัยได้รับการตีพิมพ์ ชื่อและที่อยู่ของผู้ป่วยจะต้องได้รับการปกปิดอยู่เสมอ โดยจะใช้เฉพาะรหัสประจำโครงการวิจัยของผู้ป่วยเท่านั้น



คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลสำหรับผู้ป่วยหรือผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

สิทธิของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย

ในฐานะที่ท่านเป็นผู้แทนโดยชอบธรรมของผู้เข้าร่วมในโครงการวิจัย ท่านมีสิทธิ์ดังต่อไปนี้

1. ท่านจะได้รับทราบถึงลักษณะและวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้
2. ท่านจะได้รับการอธิบายเกี่ยวกับวิธีการของการวิจัยทางการแพทย์ รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้
3. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงความเสี่ยงและความไม่สบายที่อาจได้รับจากการวิจัย
4. ท่านจะได้รับการอธิบายถึงประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย
5. ท่านจะมีโอกาสได้ซักถามเกี่ยวกับงานวิจัยหรือขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
6. ท่านจะได้รับทราบว่าการยินยอมเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ท่านสามารถขอถอนตัวจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยไม่ได้รับผลเสียใด ๆ ทั้งสิ้น
7. ท่านจะได้รับสำเนาเอกสารยินยอมที่มีทั้งลายเซ็นและวันที่
8. ท่านจะได้โอกาสในการตัดสินใจว่าจะเข้าร่วมในโครงการวิจัยหรือไม่ก็ได้ โดยปราศจากการใช้อิทธิพลบังคับ ช่มชู้ หรือการหลอกลวง

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้

.....



คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
สำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม
(Informed Consent Form)

การวิจัยเรื่อง อับัติการณ์ของ โรคติดเชื้อไวรัสเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจในเด็กไทย

วันที่ให้คำยินยอม วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้า นาย/นาง/นางสาว.....(ชื่อ-นามสกุล ผู้แทน

โดยชอบธรรม) ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นของผู้เข้าร่วมวิจัย ได้อ่านรายละเอียดจากเอกสารข้อมูลสำหรับ

ผู้เข้าร่วมวิจัยที่แนบมาแล้ว และข้าพเจ้ายินยอมให้ ด.ช./ค.ญ.

(ชื่อ-นามสกุล ของผู้เข้าร่วมวิจัย) เข้าร่วมโครงการวิจัยโดยสมัครใจ

ข้าพเจ้าได้รับสำเนาใบแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้ลงนาม และ วันที่ พร้อมด้วย เอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมวิจัย ทั้งนี้ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมวิจัย ได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่ อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมโครงการมีเวลา และโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยทั้งหมดจนมีความเข้าใจอย่างดีแล้ว โดยผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่าง ๆ ที่ ข้าพเจ้าและอาสาสมัครสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้าเข้าใจถึงสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยเมื่อใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องแจ้งเหตุผล และการบอก เลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้ จะไม่มีผลต่อการรักษาโรคหรือสิทธิอื่นๆ ที่ผู้เข้าร่วมวิจัยจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวของผู้เข้าร่วมวิจัยเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะเมื่อ ได้รับการยินยอมจากข้าพเจ้าเท่านั้น บุคคลอื่น ในนามของบริษัทผู้สนับสนุนการวิจัย คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน และสำนักงานคณะกรรมการพิจารณาอาหารและยา อาจจะได้รับอนุญาตให้เข้ามาตรวจสอบและ ประมวลข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งนี้จะต้องกระทำไปเพื่อวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ ข้อมูลเท่านั้น โดยการตกลงที่จะเข้าร่วมการศึกษานี้ ข้าพเจ้าได้ให้คำยินยอมที่จะให้มีการตรวจสอบข้อมูลประวัติทาง การแพทย์ของผู้เข้าร่วมวิจัยได้

ผู้วิจัยรับรองว่าจะไม่มีการเก็บข้อมูลใด ๆ ของผู้เข้าร่วมวิจัยเพิ่มเติม หลังจากที่ข้าพเจ้าขอยกเลิกการเข้าร่วม โครงการวิจัยและต้องการให้ทำลายตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมดที่สามารถสืบค้นถึงตัวผู้เข้าร่วมวิจัย

ข้าพเจ้าเข้าใจว่า ข้าพเจ้าและผู้เข้าร่วมวิจัยมีสิทธิ์ที่จะตรวจสอบหรือแก้ไขข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมวิจัย และสามารถยกเลิกการให้สิทธิในการใช้ข้อมูลส่วนตัวของผู้เข้าร่วมวิจัยได้ โดยต้องแจ้งให้ผู้วิจัยรับทราบ



คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หนังสือแสดงความยินยอมการเข้าร่วมในโครงการวิจัย
สำหรับผู้แทนโดยชอบธรรม
(Informed Consent Form)

ข้าพเจ้าได้ตระหนักว่าข้อมูลในการวิจัยรวมถึงข้อมูลทางการแพทย์ที่ไม่มีการเปิดเผยชื่อ จะผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การตรวจสอบ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิทยาศาสตร์และทางการแพทย์เท่านั้น

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมให้ผู้เข้าร่วมวิจัยเข้าร่วมในโครงการวิจัยด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้แทน โดยชอบธรรม
(.....) ชื่อผู้แทน โดยชอบธรรมตัวบรรจง
.....ความสัมพันธ์ของผู้แทน โดยชอบธรรมกับผู้เข้าร่วมวิจัย
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ข้าพเจ้าได้อธิบายถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตราย หรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด ให้ผู้แทนโดยชอบธรรมของผู้เข้าร่วมวิจัยตามนามข้างต้น ได้ทราบและมีความเข้าใจดีแล้ว พร้อมลงนามลงในเอกสารแสดงความยินยอมด้วยความเต็มใจ

.....ลงนามผู้ทำวิจัย
(.....) ชื่อผู้ทำวิจัย ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

.....ลงนามพยาน
(.....) ชื่อพยาน ตัวบรรจง
วันที่เดือน.....พ.ศ.....

ประวัตินักวิจัยและคณะ

หัวหน้าโครงการวิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ เอกสิทธิ์ โกวิทค์ดำรงค์

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานสังกัด หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษา

- | | |
|-----------|---|
| พ.ศ. 2542 | ปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| พ.ศ. 2546 | ประกาศนียบัตรบัณฑิตทางวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก
สาขากุมารเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| พ.ศ. 2547 | ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กุมารเวชศาสตร์)
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| พ.ศ. 2548 | วุฒิปัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม
สาขากุมารเวชศาสตร์ แพทยสภา |
| พ.ศ. 2552 | อนุมัติบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม
สาขาพยาธิวิทยาคลินิก แพทยสภา |

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 1

รองศาสตราจารย์ ดร. กาวพันธ์ ภัทร โกศล

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ / หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

หน่วยงานสังกัด หน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษา

- | | |
|-----------|---|
| พ.ศ. 2524 | ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) เกียรตินิยมอันดับสอง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| พ.ศ. 2527 | ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล |
| พ.ศ. 2533 | ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล |

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 2

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ รุจิภักดิ์ สำราญสำรวงกิจ

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

หน่วยงานสังกัด หน่วยโรคระบบหายใจและเวชบำบัดวิกฤต ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2534 ปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. 2538 Diplomate American Board of Pediatrics
- พ.ศ. 2542 Certificate in Pediatric Critical Care, Loma Linda University, USA
- พ.ศ. 2543 Diplomate American Subboard of Pediatric Pulmonology

ผู้ร่วมโครงการวิจัยคนที่ 3

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นวลจันทร์ ปราบพาล

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ระดับ 9

หน่วยงานสังกัด หน่วยโรคระบบหายใจและเวชบำบัดวิกฤต ภาควิชากุมารเวชศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2518 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. 2520 ปริญญาแพทยศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- พ.ศ. 2525 วุฒิปัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม
สาขากุมารเวชศาสตร์ แพทยสภา
- พ.ศ. 2530 Certificate in Pediatric Pulmonary Medicine, George Washington
University, USA
- พ.ศ. 2532 อนุมัติบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม
สาขากุมารเวชศาสตร์ โรคระบบหายใจ แพทยสภา
- พ.ศ. 2541 อนุมัติบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพเวชกรรม
สาขาเวชบำบัดวิกฤต แพทยสภา