

การตรวจแยกเชื้อไวรัสในผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์

แจ่มใส เพียรทอง
ทิพยา เอกลักษณ์นันท์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Virus isolation from patients of Srinagarind Hospital

Chamsai Pientong and Tipaya Ekalaksananan

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University.

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University has recently set up its routine laboratory service for the diagnosis of herpes simplex virus (HSV) and other viruses associated with respiratory diseases. During the initial period from August 1989 to September 1990, specimens from 70 patients admitted at Srinagarind Hospital were requested to be investigated. Among these, 28 were suspected of HSV and 42 were associated with respiratory tract infection. HSV was isolated and identified in 35.7% of the former group. Of the latter with respiratory tract infection, enterovirus, adenovirus, HSV, respiratory syncytial virus and parainfluenza virus type 3 were found to be the cause in 7.1, 7.1, 7.1, 2.4 and 2.4% respectively.

บทคัดย่อ

จากการเปิดบริการตรวจแยกเชื้อ herpes simplex virus (HSV) และไวรัสชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินหายใจ ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่าในช่วงเวลาตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2532 ถึง กันยายน 2533 สามารถตรวจแยกเชื้อ enterovirus, adenovirus, HSV, respiratory syncytial virus และ parainfluenza virus type 3 ได้ร้อยละ 7.1, 7.1, 7.1 2.4 และ 2.4 ตามลำดับ จากผู้ป่วยโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจ 42 ราย และ แยกเชื้อ HSV ได้ร้อยละ 35.7 จากผู้ป่วยที่ถูกสงสัยว่าติดเชื้อ HSV 28 ราย

บทนำ

ข้อมูลที่ได้จากการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ นับเป็นกุญแจสำคัญในการศึกษาทางด้านต่างๆ เช่น ระบาดวิทยา การวินิจฉัยสาเหตุของโรค วิธีการรักษาที่จำเพาะ การติดต่อและพยาธิกำเนิด ตลอดจนแนวทางการป้องกันและควบคุมโรคที่เหมาะสม ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา ได้ถูกพัฒนาไปอย่างรวดเร็วจนสามารถให้บริการตรวจหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคต่างๆได้ การตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดทำได้หลายวิธีแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความพร้อมของห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง และจาก

ความสามารถแจ้งผลการตรวจได้รวดเร็วจะมีประโยชน์มาก ในการรักษาและควบคุมโรค เช่น โรคเอดส์ โรคไขเลือดออก โรคไขหัวคใหญ่ และโรคสมองอักเสบจากเชื้อ HSV เป็นต้น ถึงแม้ว่า ในขณะนี้ยังไม่มียาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อไวรัสดี เพียงพอ แต่การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุได้อย่างรวดเร็ว จะมีประโยชน์ต่อผู้ป่วย และผู้ดูแลผู้ป่วยในการตัดสินใจเกี่ยวกับ การรักษา ในสภาวะต่างๆ การให้ยาปฏิชีวนะที่ถูกต้อง และการหลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ดังนั้นการตรวจ แยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินหายใจ และ HSV ที่เป็นสาเหตุของโรคซึ่ง มีผลต่อการเจ็บป่วย และการตายของประชากร น่าจะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัย การรักษา และการ ฝ้าระวังโรคได้

วิธีการ

ตัวอย่างตรวจ : ตัวอย่างตรวจสำหรับตรวจ แยกเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจ ประกอบด้วย nasopharyngeal secretion, nasopharyngeal wash และ throat swab ส่วนตัวอย่างตรวจสำหรับตรวจ แยกเชื้อ HSV ประกอบด้วย น้ำไขสันหลัง (CSF), swab จากตุ่มหนอง, swab จากเยื่อเมือกที่อักเสบ, swab จากปากมดลูก และ slide ที่ป้ายจากตุ่ม หนอง เมื่อผู้ป่วยเข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาล ตัวอย่างตรวจจากผู้ป่วยจะถูกเก็บใส่ในหลอด แก้วที่บรรจุ transport media (ยกเว้น CSF ซึ่ง ต้องเก็บในขวดปราศจากเชื้อ และ slide ที่ป้าย จากตุ่มหนอง) และแช่ในน้ำแข็ง แล้วนำส่งห้อง ปฏิบัติการทันที slide ที่ป้ายจากตุ่มหนอง จะ นำไปย้อมด้วย FITC conjugated rabbit anti-HSV โดยวิธี immunofluorescence (IF) ตัวอย่างตรวจ อื่น ๆ จะถูกนำไปตรวจแยกเชื้อไวรัสซึ่งถ้าเป็น CSF ก็สามารถนำไปตรวจได้เลย แต่ตัวอย่างตรวจ อื่น ๆ จะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm ที่

อุณหภูมิ 4 C เพื่อแยกตะกอนออก นำเฉพาะ ส่วนน้ำไปตรวจแยกเชื้อ ถ้าในตะกอนมีเซลล์ เยื่อเมือกอยู่มากพอ จะนำไปย้อมด้วยแอนติบอดีต่อ influenza A virus (Flu A), influenza B virus (Flu B), parainfluenza virus type 1 (PF 1), parainfluenza virus type 3 (PF 3), adenovirus, respiratory syncytial virus (RSV) และ HSV โดยวิธี IF

การแยกและพิสูจน์เชื้อไวรัส (1) :

1. การตรวจแยกไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ตรวจแยกเชื้อไวรัส คือ Vero, HEp-2, HeLa, MDCK และ LLC-MK₂ โดยเซลล์ เหล่านี้เจริญอยู่ใน minimal essential medium (MEM) ที่ประกอบด้วย 10% fetal calf serum, streptomycin (200 ug/ml), penicillin (200 units/ml), kanamycin (100 ug/ml) และ fungizone (1 ug/ml) ที่อุณหภูมิ 37° C ใน 5% CO₂ นำ ตัวอย่างตรวจใส่ในเซลล์เพาะเลี้ยง แล้วสังเกต การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื่องจากไวรัส (cytopathic effect, CPE) ภายใน 1-2 สัปดาห์ ถ้ามี CPE เกิดขึ้นจะนำเซลล์เหล่านั้นมาทำการทดสอบ ต่อด้วยแอนติบอดีต่อ HSV, RSV และ adenovirus โดยวิธี IF, แต่หากไม่เกิด CPE ภายใน 1-2 สัปดาห์ จะนำไปทดสอบการดูดซับเม็ดเลือดแดงของหนูตะเภา (hemadsorption test), ถ้าให้ ผลบวกจะนำเซลล์นั้นมาตรวจหาชนิดของไวรัส ต่อไปโดยใช้แอนติบอดีต่อ Flu A, Flu B, PF 1 และ PF 3 โดยวิธี IF

2. การทำ IF test : นำเซลล์ที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนของไวรัส มาปั่นล้างด้วย PBS 3 ครั้ง ป้ายเซลล์ลงบน slide แล้ว fix เซลล์ด้วย acetone ที่อุณหภูมิ -20 C เป็นเวลา 10 นาที และนำ slide มาย้อมด้วยแอนติบอดีต่อไวรัส

ผลการศึกษา

ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2532 ถึง กันยายน 2533 พบว่า มีตัวอย่างตรวจ 97 ตัวอย่างจากผู้ป่วยทั้งหมด 70 ราย ตัวอย่างตรวจ 63 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 42 ราย ซึ่งถูกส่งมาเพื่อตรวจแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินหายใจ ประกอบด้วย nasopharyngeal secretion 15 ตัวอย่าง, nasopharyngeal wash 12 ตัวอย่าง และ throat swab 31 ตัวอย่าง จากตัวอย่างตรวจเหล่านี้ ตรวจพบเชื้อไวรัสได้ร้อยละ 26.1 (11 ราย) ซึ่งประกอบด้วย enterovirus 3 ราย, adenovirus 3 ราย, HSV 3 ราย, PF3 1 ราย และ RSV 1 ราย โดยมีตัวอย่างตรวจที่ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้เนื่องจากการปนเปื้อนจำนวน 7 ตัวอย่าง ตัวอย่างตรวจจำนวน 34 ตัวอย่างจากผู้ป่วย 28 ราย ได้ถูกส่งตรวจเชื้อ HSV โดยเฉพาะ ตัวอย่างตรวจดังกล่าวประกอบด้วย น้ำไขสันหลัง 16 ตัวอย่าง, swab จากคอ 2 ตัวอย่าง, swab จากปากมดลูก 1 ตัวอย่าง และสไลด์ที่ป้ายจากตุ่มหนองโดยตรง 1 ตัวอย่าง พบว่า สามารถตรวจแยกเชื้อ HSV ได้ร้อยละ 35.7 (10 ราย) โดยทั้งหมดนี้แยกได้จาก swab จากตุ่มหนองเท่านั้น และมีตัวอย่างตรวจ 3 ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้

วิจารณ์

ผลจากการตรวจแยกเชื้อไวรัสในระบบทางเดินหายใจในห้องปฏิบัติการนี้ แม้จะได้จากผู้ป่วยจำนวนน้อย แต่ชนิดของไวรัสที่ตรวจพบยังมีความสอดคล้องกับผลที่ได้จากรายงานอื่น ๆ เช่น รายงานการศึกษาเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจเฉียบพลันในเด็กที่มารับการตรวจที่แผนกผู้ป่วยนอกของโรงพยาบาลศิริราช (2) และ โรงพยาบาลเด็ก (3)

อัตราการแยกเชื้อไวรัสของการศึกษานี้ (ร้อยละ 26.1) จะสูงกว่าการศึกษาในผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราช (ร้อยละ 11) อาจเป็นเพราะความแตกต่างของกลุ่มผู้ป่วย และชนิดของตัวอย่างตรวจ ซึ่งการศึกษาในผู้ป่วยของโรงพยาบาลศิริราชใช้ throat swab ของผู้ป่วยนอก อย่างไรก็ตามคืออัตราการแยกเชื้อไวรัสของการศึกษานี้จะไม่ต่างจากการศึกษาในผู้ป่วยของโรงพยาบาลเด็ก (ร้อยละ 26) ซึ่งใช้ nasopharyngeal swab ของผู้ป่วยนอก และ การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างตรวจมากกว่า 1 ชนิดจากผู้ป่วยบางราย การศึกษานี้ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของไวรัสกับกลุ่มอายุได้ เนื่องจากได้รับข้อมูลเกี่ยวกับผู้ป่วยไม่สมบูรณ์ สำหรับตัวอย่างตรวจเพื่อแยกเชื้อ HSV ส่วนใหญ่เป็น swab จากตุ่มหนองและน้ำไขสันหลัง เชื้อที่ตรวจแยกได้ทั้งหมดเป็นตัวอย่างตรวจจากตุ่มหนอง การที่ไม่สามารถตรวจแยกเชื้อได้จากน้ำไขสันหลังเนื่องจากเป็นตัวอย่างตรวจที่แยกเชื้อได้ยาก การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสโดยวิธี ELISA (4) หรือตรวจหา DNA ของไวรัสจากเซลล์ที่อยู่ใน CSF โดยวิธี polymerase chain reaction จะเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะมากกว่า แต่วิธีเหล่านี้ยังมีขีดจำกัดในการใช้งานทางห้องปฏิบัติการ(5) อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการตรวจแยก HSV จากตำแหน่งต่างๆ ที่เกิดพยาธิสภาพได้อย่างถูกต้อง และรวดเร็วจะมีประโยชน์ต่อการวินิจฉัย การรักษา และการพยากรณ์การเกิดโรคที่เป็นอันตรายเนื่องจาก HSV เช่น herpes simplex encephalitis

ผลที่ได้จากการตรวจแยกไวรัสจากทางเดินหายใจ และ HSV นี้คาดว่าน่าจะต่ำกว่าความเป็นจริง เนื่องจากการเก็บและส่งตัวอย่างตรวจยังไม่ถูกต้อง ตัวอย่างตรวจที่ได้รับประมาณร้อยละ 30 เป็นตัวอย่างตรวจที่ไม่ได้ถูกส่งมายังห้อง

ปฏิบัติการไวรัสโดยตรง แต่ถูกส่งไปยังห้องปฏิบัติการกลางของโรงพยาบาลก่อน อีกทั้งวิธีการนำส่งบางครั้งมีการปฏิบัติอย่างไม่ถูกต้อง เช่น ไม่เก็บตัวอย่างตรวจใส่ใน transport media ที่ทางห้องปฏิบัติการเตรียมไว้ให้ หรือไม่แช่ตัวอย่างตรวจในน้ำแข็งขณะนำส่งห้องปฏิบัติการ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลให้ปริมาณไวรัสลดลงได้ โดยเฉพาะ RSV จะตายได้ง่ายมากที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ผู้เก็บตัวอย่างตรวจยังมีความชำนาญไม่เพียงพอทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย (10 ราย) ปัญหาสำคัญอีกประการหนึ่งคือ การส่งตัวอย่างตรวจไม่เป็นไปตามวันที่ทางห้องปฏิบัติการกำหนดไว้ ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อได้ทันที ปัญหาดังกล่าวทั้งหมดนี้จะสามารถแก้ไขได้ ถ้าผู้ส่งตัวอย่างตรวจและผู้ทำการตรวจแยกเชื้อมีการติดต่อกัน และผู้ดูแลรักษาผู้ป่วยก็ต้องให้ความ

สำคัญในการตรวจแยกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรค เพื่อที่จะได้มีข้อมูลสำหรับการตรวจวินิจฉัยการรักษา และเฝ้าระวังโรคได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Sullivan CJ, Jordan MC. Diagnosis of viral pneumonia. *Semin Respir Infect* 1988; 3: 148-161.
2. Ekaklasananan T. Viruses associated with acute respiratory infection in children. Thesis in Faculty of Graduated Studies, Mahidol University, 1987.
3. Olson LC, Lexomboon U, Sithisam P, Noyes HE. The Etiology of respiratory tract infections in a tropical country. *Am J Epidemiol* 1973; 97: 34-43.
4. Lakeman FD, Koga J, Whitley RJ. Detection of antigen to herpes simplex virus in cerebrospinal fluid from patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis* 1987; 155: 1172-1178.
5. Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, Wolinsky SM. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet* 1990; 335: 440-441.