LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION IN CHILDREN AND ITS ANTIBODY RESPONSE

RACHANEEPORN TONCHAROENSUK

Wit[illegible]ts
of
Faculty of graduate studies, Mahidol University

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

TH
R119a
1996

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การติดเชื้อเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ไวรัส และ การสร้างแอนติบอดีตอบสนอง ในเด็ก

ผู้วิจัย รัชนีพร ตนเจริญสุข

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

พิไลพันธ์ พุธวัฒนะ, ปร.ด.

จันทพงษ์ วะสี, พ.บ.

สุปรีดา หัพนานนท์, พ. บ.

อุไรวรรณ โฆษิตานนท์, วท.ม.

รวงผึ้ง สุทเธนทร์, พ.บ., Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 23 มกราคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อเฉียบพลันของระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็ก เป็นโรคที่พบบ่อยในเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ทั่วโลก เชื้อต้นเหตุ ได้แก่ ไวรัส และแบคทีเรีย ส่วนจุลชีพชนิดอื่นๆ เช่น รา และปรสิต พบได้ในบางโอกาส ไวรัสที่พบก่อโรคบ่อยที่สุด คือ ไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล รองลงมาคือ ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไวรัสไข้หวัดใหญ่และไวรัสอะดิโน

วิธีการศึกษาทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยไวรัสก่อโรคระบบทางเดินหายใจ ได้แก่การตรวจหาแอนติเจนของไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อโดยวิธีอิมมูนเรืองแสง การแยกและพิสูจน์เชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง และการตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่ม

การวินิจฉัยเชื้อก่อโรคโดยวิธีตรวจหาแอนติบอดี มักอาศัยหลักการตรวจซีรั่มคู่ เพื่อดูการเพิ่มระดับของแอนติบอดีในซีรั่มที่สอง ซึ่งต้องมีแอนติบอดีไตเตอร์สูงกว่าซีรั่มแรกสี่เท่าขึ้นไป จึงจะให้การวินิจฉัยว่าเป็นโรคได้ วิธีการตรวจแอนติบอดีใช้กันอยู่ในปัจจุบัน คือ วิธีตรึงคอมพลิเมนต์ ส่วนใหญ่จะให้ผลลบ ไม่พบระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นชัดเจน แม้ว่าจะตรวจพบแอนติเจนของเชื้อไวรัส หรือแยกเชื้อไวรัสได้จากผู้ป่วยรายนั้นก็ตาม

Copyright by Mahidol University

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาว่าเด็กเล็กสามารถสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสได้หรือไม่ จึงใช้วิธีอีไลซ่าที่มีความไวสูง และการวินิจฉัยเชื้อต้นเหตุใช้วิธีอ่านค่าแอนติบอดีไตเตอร์ในซีรั่มคู่ เพื่อดูการเพิ่มระดับแอนติบอดี

งานวิจัยนี้ให้การวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสด้วยวิธีดังนี้ คือ 1) วิธีอิมมูนเรืองแสง เพื่อตรวจหาแอนติเจนของเชื้อไวรัสในเซลล์ที่ดูดออกมาจากนาโสฟาริงซ์ ไวรัสที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีนี้ ได้แก่ เชื้อไวรัสอะดิโน ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ไทป์ เอ และ บี ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 1 และ 3 และ ไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล 2) การแยกเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง HEp-2 MDCK และ LLC-MK-2 โดยเชื้อไวรัสอะดิโน และ ไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล เพิ่มจำนวนใน HEp-2 cell line ส่วนเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ และ ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า เพิ่มจำนวนในเซลล์ MDCK และ LLC-MK-2 3) วิธีตรวจหาแอนติบอดีในซีรั่มคู่ โดยวิธีตรึงคอมพลิเมนต์ (CF) เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ ไวรัสอะดิโน ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า และไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล และ ใช้วิธีอีไลซ่า (ELISA) ร่วมด้วยในการวินิจฉัย ไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ส่วนการหาแอนติบอดีต่อเชื้อ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ใช้วิธียับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (HI)

การศึกษาผู้ป่วยเด็กที่เป็นโรคติดเชื้อระบบทางเดินหายใจส่วนล่างชนิดเฉียบพลัน ซึ่งได้รับไว้รักษาตัวในโรงพยาบาล จำนวน 261 ราย ชาย : หญิง = 1.5 : 1 ช่วงอายุที่เป็นโรคมากที่สุด คือ 6 - 11 เดือน (ร้อยละ 37.9) ผู้ป่วยร้อยละ 91.2 (238 ราย) มีอายุน้อยกว่า 2 ปี และโรคที่พบบ่อยที่สุด คือ โรคปอดบวม พบมากถึงร้อยละ 67.4 โรคหลอดลมฝอยอักเสบ พบร้อยละ 15.3 โรคครูป พบร้อยละ 13.8 และ โรคหลอดลมใหญ่อักเสบ พบร้อยละ 3.4 ไวรัสที่พบบ่อยที่สุดในการก่อ โรคปอดบวม โรคหลอดลมฝอยอักเสบ และโรคหลอดลมใหญ่อักเสบ คือ ไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ส่วนไวรัสที่พบบ่อยใน โรคครูป คือ ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 3

ในการศึกษาเกี่ยวกับฤดูกาล พบการติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียลมากที่สุดในฤดูฝน โดยมีอุบัติการสูงสุดในเดือนสิงหาคม หรือกันยายน ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 3 พบอุบัติการสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ และมีนาคม สำหรับไวรัสอื่นๆไม่สามารถบอกฤดูกาลติดเชื้อได้ เนื่องจากมีอัตราการติดเชื้อต่ำ และจากการศึกษา subgroup ของเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล พบว่า subgroup B ระบาดมากในปี พ.ศ. 2533 และ subgroup A ระบาดมากในปี พ.ศ. 2534

จากจำนวนผู้ป่วย 261 ราย ได้รับการวินิจฉัยว่าติดเชื้อไวรัสระบบทางเดินหายใจ ร้อยละ 49 (128 ราย) และพบเชื้อไวรัสทั้งหมด 135 เชื้อ ไวรัสที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ ไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ร้อยละ 34.9 (91 ราย) รองลงมาคือ ไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 3 ร้อยละ 8.8 (23 ราย) ไวรัสอะดิโน ร้อยละ 3.4

Copyright by Mahidol University

(9 ราย) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ไทป์ เอ ร้อยละ 1.9 (5 ราย) ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ไทป์ บี ร้อยละ 1.5 (4 ราย) และไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 1 ร้อยละ 1.1 (3 ราย) และมีผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด ร้อยละ 2.3 (6 ราย)

จากจำนวนผู้ป่วยในโครงการ 261 ราย มีเพียง 125 ราย เท่านั้น ที่แพทย์สามารถส่งตัวอย่างตรวจเพื่อการวินิฉัยโรคได้ครบถ้วน คือ ได้สิ่งดูดจากนาโสฟาริงซ์ในปริมาณเพียงพอ และได้ซีรั่มคู่ เมื่อทำการศึกษาด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการต่างๆ พบว่าวิธีการตรวจหาแอนติบอดีเป็นวิธีการที่ไวที่สุด สามารถวินิจฉัยผู้ติดเชื้อไวรัสได้ ร้อยละ 56.0 (70 ราย) รองลงมาคือ วิธีอิมมูนเรืองแสง วินิจฉัยได้ ร้อยละ 35.2 (44 ราย) และวิธีแยกเชื้อ วินิจฉัยได้น้อยที่สุด คือ ร้อยละ 24.8 (31 ราย) แต่เมื่อพิจารณาแต่ละเชื้อแล้ว พบว่าความไวของวิธีการทดสอบ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อด้วย เช่น วิธีแยกเชื้อ มีความไวต่ำสุดสำหรับไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล วินิจฉัยได้เพียง 17 ราย จากจำนวนผู้ติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ทั้งหมด 63 ราย ในขณะที่มีความไวสูงสุดสำหรับ เชื้อไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า เพราะสามารถแยกเชื้อไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 3 ได้จากผู้ป่วย 7 ราย ในจำนวนผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 3 ทั้งหมด 10 ราย และในทำนองเดียวกัน วิธีตรึงคอมพลิเมนต์ วินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ได้เพียง 11 ใน 63 ราย แต่วินิจฉัยผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสพาราอินฟลูเอนซ่า ไทป์ 3 ได้ 6 ใน 10 ราย

ประเด็นสำคัญที่การศึกษานี้แสดงให้เห็น คือ ถ้าแพทย์สามารถส่งตัวอย่างตรวจได้ครบถ้วน และห้องปฏิบัติการใช้วิธีที่มีความไวเพียงพอ จะพบว่าไวรัสเป็นสาเหตุก่อโรค ถึงร้อยละ 59.2 (74 ใน 125 ราย) แต่ถ้าตัวอย่างตรวจไม่ครบถ้วน ห้องปฏิบัติการตรวจพบเชื้อไวรัสได้เพียง ร้อยละ 49.0 (128 ใน 261 ราย) เท่านั้น

ในจำนวนผู้ป่วย 125 ราย มีผู้ติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียลทั้งสิ้น 63 ราย(ร้อยละ50.4) การตรวจหาแอนติบอดี โดยวิธีอีไลซ่า และ วิธีตรึงคอมพลิเมนต์ร่วมกัน วินิจฉัยโรคได้ 56 ราย (ร้อยละ 44.8) และทั้ง 56 รายนี้วินิจฉัยได้หมดโดยวิธีอีไลซ่า ส่วนวิธีตรึงคอมพลิเมนต์วินิจฉัยได้เพียง 11 รายเท่านั้น

ในจำนวนผู้ป่วย 56 ราย ที่ได้ผลบวกโดยการใช้วิธี อีไลซ่า เพื่อตรวจหา seroconversion ของอิมมูโนโกลบุลิน class ต่างๆ นั้น ผู้ป่วย 31 ราย (ร้อยละ 55.4) สร้างอิมมูโนโกลบุลินเพียง class เดียว 23 ราย (ร้อยละ 41.1) สร้างอิมมูโนโกลบุลิน 2 classes และมีเพียง 2 ราย (ร้อยละ 3.6) ที่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบุลินได้ทั้ง 3 classes พร้อมกัน

Copyright by Mahidol University

อิมมูโนโกลบุลินที่พบมากที่สุด คือ ไอจีจี (ร้อยละ 76.8, 33 ใน 56 ราย) รองลงมา คือ ไอจีเอ (ร้อยละ 44.6, 25 ใน 56 ราย) และ ไอจีเอ็ม (ร้อยละ 26.8, 15 ใน 56 ราย) ตามลำดับ จากการศึกษานี้พบว่าคุณสมบัติในการตรึงคอมพลิเมนต์ของอิมมูโนโกลบุลินในการติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียลพบได้ในไอจีจี แต่ไม่พบในไอจีเอ และไอจีเอ็ม

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เด็กเล็กส่วนใหญ่สามารถ สร้างแอนติบอดีตอบสนอง ต่อการติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล ได้ (มี seroconversion) แม้ว่าความสามารถในการ สร้างแอนติบอดีนั้น จะไม่สมบูรณ์ คือ สร้างอิมมูโนโกลบุลินได้เพียงบาง class เท่านั้น สำหรับผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส เรสปิราทอรี ซินไซเชียล ที่ไม่พบ seroconversion มีจำนวน 7 ราย และพบว่า เป็นผู้ที่มีแอนติบอดี อยู่ตั้งแต่ซีรั่มแรก ถึง 6 ราย ซึ่งอาจเป็นแอนติบอดี ที่ได้จากมารดา หรือ จากการติดเชื้อครั้งก่อน ซึ่งแอนติบอดีที่มีอยู่แต่แรกอาจมีผลกดการสร้างแอนติบอดีตอบสนอง ต่อการติดเชื้อในครั้งนี้ นอกจากนี้ได้มีการศึกษา หาค่า O.D. จากซีรั่มที่ความเจือจางเดียว เพื่อใช้ค่า O.D. นี้เป็นค่า cut-off แยกระหว่าง ผู้ป่วย ติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียล และผู้ป่วยที่ไม่ได้ ติดเชื้อไวรัสนี้ แต่จากการทดสอบทางสถิติ พบว่าไม่สามารถหาค่า O.D. ที่สามารถใช้ในการวินิจฉัยแยกการติดเชื้อไวรัสเรสปิราทอรี ซินไซเชียลได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Respiratory Syncytial Virus Infection in Children and Its Antibody Response

Name Rachaneeporn Toncharoensuk

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Pilaipan Puthavathana, Ph.D.

Chantapong Wasi, M.D.

Suprida Habanananda, M.D.

Uraiwan Kositanont, M.Sc.

Ruengpung Sutthent, M.D., Ph.D.

Date of Graduation 23 January B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Acute lower respiratory tract infection (ALRI) in children is the most common cause of illness in children under 5 years of age throughout the world. Generally, acute respiratory infections in small children are caused by viruses, and bacteria, while fungi and parasites play role only under special circumstances. Previous reports have shown that respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of ALRI, followed by parainfluenza virus, and adenovirus, respectively. Laboratory investigation for diagnosis of respiratory viral infection can be achieved by several methods such as detection of viral antigens in infected cells from nasopharyngeal aspirate by indirect immunofluorescence (IF), isolation of respiratory viruses in cell culture and detection of specific antibodies in sera.

Copyright by Mahidol University

Diagnosis of respiratory viral infection by detection of specific antibody in serum was generally based on a four-fold rise in titer of specific antibody in paired sera. Complement fixation test (CF) mostly showed negative results, although the virus had been isolated or the viral antigen had been detected in those cases. The negative CF test is explained in such a way that small children have immature immunity and fail to produce antibody response. In addition, CF test itself is not sensitive enough to pick up small amount of specific antibody.

Nowadays, reagents for detection specific antibody by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are commercially available. This method is highly sensitive and can specify class of immunoglubulin, e.g., IgG and IgM. According to high sensitivity of ELISA, specific IgM can be detected for several months after the infection. Thus, this may lead to misdiagnosis of the subsequent infections.

If ELISA is used to investigate for a four-fold rise in titer of any class of immunogloblin in paired sera, it would be possible to clarify that infants and small children can develop immune response to viral infection or not. For its importance, RSV was chosen as the model of our study.

Laboratory methods used to diagnose the viral infections in this study including immunofluorescence test (IF) for specific antigens of adenovirus, influenza virus types A and B, parainfluenza virus types 1 and 3, and RSV; virus isolation in cell cultures of HEp-2,. MDCK and LLC-MK2; and serodiagnosis by complement fixation test (CF) for adenovirus, parainfluenza virus types 1 and 3, and RSV, hemagglutination inhibition test (HI) for influenza virus types A and B, and ELISA test for RSV.

Copyright by Mahidol University

Of 261 patients who were admitted to the Pediatric Ward, Siriraj Hospital from June 1990 to December 1991, males were more prevalent with the male to female sex ratio of 1.5:1. Incidence of ALRI was highest in patients of age-group 6-11 months old (37.9%). However, 91.2% (238 cases) were under 2 years of age. The most common clinical diagnosis was pneumonia (67.4%), followed by bronchiolitis (15.3%), croup (13.8%) and bronchitis (3.4%), respectively. RSV played major role in pneumonia, bronchiolitis and bronchitis. Parainfluenza virus type 3 played major role in croup.

Seasonal distribution of RSV was demonstrated in rainy season, and its peaks were seen in August or September.. Parainfluenza virus type 3 had its peak in February. For other viruses, seasonal distribution could not be observed because number of the infected cases was too low. During the epidemic season, RSV subgroup B predominated in 1990, whereas RSV subgroup A predominated in 1991.

Of the 261 study patients, respiratory virus infecions were diagnosed in 49% (128 cases), and 135 respiratory virus agents were found. RSV was the most common virus observed (34.9%, 91 cases), followed by parainfluenza virus type 3 (8.8%, 23 cases), adenovirus (3.4%, 9 cases), influenza A (1.9%, 5 cases), influenza B (1.5%, 4 cases) and parainfluenza virus type 1 (1.1%, 3 cases). Mixed infections were found in 2.3% (6 cases).

Among a total of 261 cases, only 125 cases could be investigated completely i.e., there were adequte cells in nasopharyngeal aspirate and paired sera were obtained. It was demonstrated that serological methods was the most efficient diagnostic method (56.0%, 70 cases), followed by indirect IF (35.2%,

Copyright by Mahidol University

(35.2%, 44 cases) and isolation of virus in cell culture (24.8%, 31 cases). However, sensitivity of each method for each virus was different. The method of virus isolation in cell culture was the least sensitive for RSV, because it could diagnose only 17 of all 63 RSV infected cases. In contrast, the isolation method was the most sensitive test for parainfluenza virus type 3, since it could diagnose 7 of 10 cases of parainfluenza virus type 3 infection. Similarly, CF can diagnose RSV infection only in 11 of 63 cases, while it did so in 6 of 10 parainfluenza virus type 3 infected cases.

Our results indicated that if complete clinical specimens were obtained for laboratory investigation, viral infection will be found in 59.2% (74 of 125 subjects), while investigation on incomplete clinical specimens could diagnose viral infection in 49.0% (128 of 261 cases) of ALRI.

Among a total of 125 study cases with complete clinical specimens, RSV infection was diagnosed in 50.4% (63 cases) of whom investigation by ELISA and CF could diagnose 44.8% (56 cases). Seroconversion by ELISA was observed in all 56 cases while only 11 cases of them showed seroconversion by CF test.

Among 56 RSV infected cases who developed seroconversion, 31 cases (55.4%) produced one class of specific immunoglobulin, 23 cases (41.1%) produced two classes, and only 2 cases (3.6%) produced three classes. The most common immunoglobulin class detected was IgG (76.8%, 33 of 56 cases), followed by IgA (44.6%, 25 of 56 cases) and IgM (26.8% 15 of 56 cases), respectively. It also demonstrated that major CF activity in RSV infection was present in IgG, not in IgA and IgM classes.

Copyright by Mahidol University

The present study showed that most infants and small children could develop seroconversion to RSV infection. Nevertheless, their immune response was incomplete such that only some classes of immunoglobulin were produced. Among 7 RSV infected cases who could not develop seroconversion, 6 of them had pre-existing antibody in the acute sera. It was not known whether this antibody was derived from maternal origin or from previous infection. Nevertheless, pre-existing antibody may elicit suppression effect on development of seroconversion.

An attempt to determine the O.D. value at single serum dilution as the cut-off point for RSV infection has been made. Unfortunately, there were a large overlapping in the O.D. values from different study groups. And the O.D. values diagnostic of RSV infection could not be established.

Copyright by Mahidol University