เปรียบเทียบการตรวจหาเร็สปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัส ด้วยวิธี อิมมูโนฟลูออเรสเซนต์, ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา, การแยกเชื้อด้วยวิธีธรรมดาและวิธีเชลล์ไวอัล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาว จินตนา วุฒยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2532

ISBN 974-569-792-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015282

COMPARISON OF IMMUNOFLUORESCENCE, BIOTIN-AVIDIN-ELISA, CELL CULTURE AND SHELL VIAL TECHNIQUE FOR DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

Miss Jintana Woodtayagone

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN 974-569-792-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เปรียบเทียบการตรวจหาเร็สไปราทอรี ซินไซเทียลไวรัส ด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์, ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา, การแยกเชื้อด้วยวิธีธรรมดา และวิธีเชลล์ไวอัล
โดย	นางสาว จินตนา วุฒยากร
สหสาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วรรณา พรรณรักษา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ดิลก เย็นบุตร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณา พรรณรักษา)

..... กรรมการ
(อาจารย์ แพทย์หญิงชื่นฤดี ไชยวสุ)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุภรี สุวรรณจูฑะ)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จินตนา วุฑฒยากร : เปรียบเทียบการตรวจหาเร็สไปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา, การแยกเชื้อด้วยวิธีธรรมดาและวิธีเชลล์ไวอัล (COMPARISON OF IMMUNOFLUORESCENCE, BIOTIN-AVIDIN-ELISA, CELL CULTURE AND SHELL VIAL TECHNIQUE FOR DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS) อ.ที่ปรึกษา : รศ.พญ.วรรณา พรรณรักษา, หน้า.

เร็สไปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัส เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคระบบทางเดินหายใจส่วนล่างในเด็ก โดยเฉพาะในเด็กเล็กช่วงขวบปีแรก มักเกิดอาการรุนแรง และมีอัตราตายสูงเป็นปัญหาทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล การวินิจฉัยการติดเชื้อยังคงอาศัยวิธีทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงได้ดำเนินการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา และวิธีเชลล์ไวอัล และได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจหา เร็สไปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัสในสิ่งส่งตรวจจากคนไข้ 4 วิธีด้วยกันคือ วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์, ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา การเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีธรรมดาและวิธีเชลล์ไวอัล เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นประจำในห้องปฏิบัติการ

การพัฒนาวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา นี้ได้ใช้น้ำยาของบริษัท Dako โดยในขั้นตอนแรกจะเคลือบหลุมด้วย rabbit anti-RSV และ normal rabbit immunoglobulin แล้วเติมสิ่งส่งตรวจจากคนไข้ให้ทำปฏิกิริยากัน เติม biotinylated anti-RSV จากนั้นเติม avidin conjugated peroxidase และ substrate ตามลำดับ

การพัฒนาวิธีเชลล์ไวอัล อาศัยการปั่นมาช่วยเพิ่มความไวของการทดสอบ เมื่อใส่ตัวอย่างแล้วนำไปปั่นด้วยความแรง 1,300 g ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) นาน 1 ชั่วโมง อบไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 18-24 ชั่วโมง จึงนำมาย้อมหาแอนติเจนของไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์

เมื่อทำการเปรียบเทียบการตรวจหาเร็สไปราตอรี ซินไซเทียลใน nasopharyngeal secretion ของเด็กที่มีอาการของโรคในระบบทางเดินหายใจ ส่วนล่างจำนวน 133 ราย พบว่า วิธีเชลล์ไวอัลให้ผลบวก 45 ราย คิดเป็น 33.3% ในจำนวนนี้พบว่า ให้ผลบวกกับวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา 40 ราย (30%) วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ 36 ราย (27%) และให้ผลบวกกับการเพาะแยกเชื้อเพียง 32 ราย (24.1%) ซึ่งทำให้วิธีเหล่านี้มีความไวเมื่อเทียบกับวิธีเชลล์ไวอัลเป็น 88.9%, 80% และ 71% ความจำเพาะของวิธีทั้งหมดมีค่าเท่ากันคือ 100% ค่าความเชื่อถือเมื่อการทดสอบบอกผลบวกของวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา, วิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ และการแยกเชื้อด้วยวิธีธรรมดา มีค่าเป็น 100% เท่ากัน ส่วนค่าความเชื่อถือเมื่อการทดสอบบอกผลลบมีค่าเป็น 94.6%, 90.7% และ 88% ตามลำดับ

จากผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า วิธีเชลล์ไวอัลเป็นวิธีที่มีความไวและใช้เวลาน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสแบบธรรมดาในการวินิจฉัยการติดเชื้อเร็สไปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัส และเป็นวิธีที่มีความไวสูงสุด ในบรรดาวิธีที่นำมาศึกษาครั้งนี้ และเป็นวิธีที่ใช้อ้างอิงได้ สำหรับวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา เป็นวิธีที่มีความไวกว่าวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ อีกทั้งเป็นวิธีที่มีความสะดวก จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในการตรวจหาเร็สไปราตอรี ซินไซเทียล ไวรัส จากสิ่งส่งตรวจซึ่งทำเป็นประจำในห้องปฏิบัติการ

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2531 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

JINTANA WOODTAYAGONE : COMPARISON OF IMMUNOFLUORESCENCE, BIOTIN-AVIDIN ELISA, CELL CULTURE AND SHELL VIAL TECHNIQUE FOR DETECTION OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. WANNA PUNNARUGSA, M.D. PP.

Respiratory syncytial virus (RSV) is a major cause of severe lower respiratory infection in infants and young children, and often causes life threatening acute brochiolitis and pneumonia especially in infants under 1 year of age. The morbidity and mortality is considerable. Early and accurate diagnosis of RSV infection may reduce the use of antibiotic therapy and limit the spread of nosocomial infection. Definitive diagnosis depends on the laboratory. Thus, the objectives of this study were (i) to develope highly sensitive methods, biotin-avidin-ELISA and shell vial technique, for detection of RSV: and (ii) to compare the sensitivity and specificity of four methods: indirect immunofluorescence (IFA), biotin-avidin-ELISA, shell vial technique and conventional cell culture for detection of RSV from nasopharyngeal secretion (NPS) of infants with acute lower respiratory illness.

Development of biotin-avidin-ELISA employed available commercial reagents (Dako, Glostrup, Denmark). Rabbit anti-RSV and normal rabbit immunoglobulin were coated to wells of polystyrene microtiter plates, then the RSV antigens were bound to the coated antibodies. The complex was detected by biotinylated rabbit anti-RSV which then reacted with avidin conjugated peroxidase.

Shell vial technique with centrifugation was used for detection of RSV in the nasopharyngeal secretion. After inoculated the sample into shell vial cell culture, centrifuged at 1,300 g 25°C for 1 hour and incubate at 37°C for 18-24 hours. The viral antigen was determined by IFA using anti-RSV antibody.

One hundred and thirty-three NPS was collected from patients who had lower respiratory tract infection. The NPS was comparatively and parallelly studied for RSV by 4 methods mentioned above. The results yielded 45 RSV positive (33.3%) by shell vial technique. Of these positive specimens, there were 40 (30%) positive by biotin-avidin-ELISA, 36 (27%) by IFA and 32 (24.1%) by conventional cell culture. Comparison to shell vial, the sensitivity of the biotin-avidin-ELISA, IFA and conventional cell culture were 88.9%, 80% and 71% respectively, specificity of all methods were 100%. The positive predictive value of biotin-avidin-ELISA, IFA and conventional cell culture were 100% and the negative predictive value were 94.6%, 90.7% and 88% respectively.

The results indicated that shell vial technique was more sensitive than cell culture for detection of RSV. The shell vial technique was the most sensitive method for detection of RSV in NPS and was suitable to be used as comfirmatory method. The biotin-avidin-ELISA was more sensitive than IFA for detection of RSV and it was suitable for routine diagnosis of RSV infection.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2531

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวรรณา พรรณรักษา อาจารย์ที่ปรึกษา และควบคุมงานวิจัยที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ แพทย์หญิงนวลจันทร์ ปราบพาล อาจารย์ แพทย์หญิงสุภัทรา ลิ้มอุดมพร อาจารย์ประจำภาควิชากุมารเวชศาสตร์ ที่กรุณาจัดส่งตัวอย่างมาให้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์กวี ภู่ไพบูลย์ หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อนุญาตให้ใช้สถานที่ทำการศึกษาวิจัย

ขอขอบพระคุณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่กรุณาให้เซลล์ HEp-2 และ respiratory syncytial virus สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ห้องไวรัสวิทยาทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และให้ความสนับสนุนเป็นอย่างดี

ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์นี้

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณ มารดาของข้าพเจ้า ผู้ซึ่งให้ความรัก ความเอื้ออาทร ต่อข้าพเจ้า และพี่น้องที่รักทุกคนที่ได้เป็นกำลังใจอันสำคัญ จนทำให้การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก.
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข.
กิตติกรรมประกาศ	ค.
รายการตารางประกอบ	ง.
รายการรูปประกอบ	ช.
รายการกราฟประกอบ	ช.
คำย่อ	ฌ.
บทที่	
1. บทนำ	1.
2. วัสดุและวิธีการ	15.
3. ผลการทดลอง	37.
4. การวิจารณ์ผลการทดลอง	71.
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	83.
บรรณานุกรม	85.
ภาคผนวก	101.
ประวัติผู้เขียน	107.

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงยีนและโปรตีนต่าง ๆ ที่ได้จากยีนของ respiratory syncytial virus	6
2.	แสดงความเข้มของการเรืองแสงของเซลล์ที่ติดเชื้อ RSV เมื่อย้อมด้วย anti-RSV และ swine anti-rabbit immunoglobulin conjugated-FITC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของการตรวจด้วยวิธี IFA	45
3.	แสดงความแรงของการปั่นต่อการพบ foci ของ RSV ของการตรวจด้วยวิธีเซลล์ไวอัล	46
4.	แสดงผลของอุณหภูมิที่ใช้ ในการปั่นต่อการพบ foci ของ RSV ของการตรวจด้วยวิธีเซลล์ไวอัล	47
5.	แสดงระยะเวลาที่ใช้ ในการปั่นต่อการพบ foci ของ RSV ของการตรวจด้วยวิธีเซลล์ไวอัล	48
6.	แสดงค่า optical density ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ของbiotinylated anti-RSV และavidin conjugated peroxidase เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา	49
7.	แสดงค่า optical density ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ของโปรตีนที่ ใช้เคลือบ plate เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรวจด้วยวิธี ไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา	50

ตารางที่ หน้า

8. แสดงค่า optical density เมื่อเคลือบ plate ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 51

9. แสดงค่า optical density ของการเคลือบ plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในเวลาต่าง ๆ กัน 52

10. แสดงค่า optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนการเติม RSV-antigen ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 54

11. แสดงค่า optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนการเติม RSV-antigen ที่อุณหภูมิห้องในเวลาต่าง ๆกัน 55

12. แสดงค่า optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 57

13. แสดงค่า optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV ที่อุณหภูมิห้องในเวลาต่าง ๆ กัน 58

14. แสดงค่า optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin-conjugated peroxidase ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 60

15. แสดงค่า optical density สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin-conjugated peroxidase ที่อุณหภูมิห้องในเวลาต่าง ๆ กัน 61

16. แสดงค่า optical density ของการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ substrate ที่เวลาต่าง ๆ 63

17. แสดงค่า optical density ของการ titrate หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ biotinylated anti-RSV และ avidin conjugated peroxidase เมื่อทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม 64

ตารางที่ หน้า

18. แสดงค่า optical density ของการ titrate หา ความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปรตีนที่ใช้เคลือบ plate เมื่อทำปฏิกิริยาในสภาวะที่เหมาะสม 65

19. แสดงสภาวะและความเข้มข้นของน้ำยาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาสำหรับการตรวจหา RSV antigen ด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา 66

20. แสดงความเที่ยงตรง (precision) ของการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา 67

21. แสดงความเชื่อถือได้ (reproducibility) ของการตรวจด้วยวิธีไบโอติน-อวิดิน-อิไลซา 68

22. เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้ด้วยวิธี IFA, biotin-avidin-ELISA, shell vial technique และ cell culture 69

23. เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV ด้วยวิธี cell culture และวิธี shell vial technique 69

24. เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้จำนวน 133 ราย ด้วยวิธี biotin-avidin-ELISA กับวิธี shell vial technique 70

25. เปรียบเทียบผลการตรวจหา RSV จากสิ่งส่งตรวจของคนไข้จำนวน 133 ราย ด้วยวิธี IFA กับวิธี shell vial technique 70

26. เปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ RSV ด้วยวิธี shell vial technique, biotin-avidin-ELISA, IFA, และวิธี cell culture 80

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
1.	แสดงเซลล์ HEp-2 ปกติ	34
2.	แสดงการเกิด cytopathic effect (CPE) ของเซลล์ HEp-2 ที่เกิดจาก respiratory syncytial virus	34
3.	แสดงผลลบของการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)	35
4.	แสดงผลบวกของการตรวจด้วยวิธีเชลล์ไวอัล (shell vial technique)	35
5.	แสดงผลลบของการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (indirect immunofluorescence)	36
6.	แสดงผลบวกของการตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนต์ (Indirect immunofluorescence)	36

รายการกราฟประกอบ

กราฟรูปที่		หน้า
1.	แสดงค่าเฉลี่ยของผลต่างของ OD เมื่อเคลือบ plate ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ที่เวลาต่าง ๆ กัน	53
2.	แสดงค่าเฉลี่ยของผลต่างของ OD สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม RSV-antigen ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ที่เวลาต่าง ๆ กัน	56
3.	แสดงค่าเฉลี่ยของผลต่างของ OD สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม biotinylated anti-RSV ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ที่เวลาต่าง ๆ กัน	59
4.	แสดงค่าเฉลี่ยของผลต่างของ OD สำหรับปฏิกิริยาในขั้นตอนของการเติม avidin-conjugated peroxidase ที่อุณหภูมิห้อง (22-25°ซ.) ที่เวลาต่าง ๆ กัน	62

คำย่อ

เซลล์ไวอัล	การเพาะแยกเชื้อไวรัสด้วยวิธีเซลล์ไวอัล
ชม.	ชั่วโมง
°ซ	องศาเซนติเกรด
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
a-RSV	rabbit anti-respiratory syncytial virus
cell culture	conventional cell culture
CPE	cytopathic effect
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IgA	immunoglobulin A
IgM	immunoglobulin M
IFA	indirect immunofluorescence
IP	immunoperoxidase
kda	kilodaltons
MW	น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight)
NRI	normal rabbit immunoglobulin
NPS	nasopharyngeal secretion
nm	นาโนเมตร (nanometre)
OD	optical density
PBS	phosphate buffer saline
RSV	respiratory syncytial virus
TCID50	50 % tissue culture infective dose