

ไฮโดรเมกะโลไวรัสในระยะต่างๆของการตั้งครรภ์ปกติ



ร้อยโทหญิง ธรธิดา โพธิ์ทัด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคำหลักสูตร์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2529

ISBN 974-566-429-4

013300

I1582400๓

CYTOMEGALOVIRUS IN DIFFERENT PERIODS OF NORMAL GESTATION

LIEUTENANT (W) DHARADHIDA BODHIDATTA

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

1986

Thesis Title Cytomegalovirus in Different Periods of Normal Gestation
By Lieutenant (W) Dharadhida Bodhidatta
Inter-Department Medical Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University
in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

..... *S. Ph. II*

Associate Professor Sorachai Bhisalbutra, Ph.D.
Acting Associate Dean for Academic Affairs
for
Acting Dean of the Graduate School

Thesis Committee

..... *Dilok Yenbutra* Chairman
(Associate Professor Dilok Yenbutra, M.D.)
..... *Vanna Punnarugsa M.D.* Member
(Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.)
..... *Surang Tantivanich* Member
(Associate Professor Surang Tantivanich, M.Sc.)
..... *Kobchitt Limpaphayom M.D.* Member
(Associate Professor Kobchitt Limpaphayom, M.D.)
..... *Pricha Singharaj* Member
(Colonel Pricha Singharaj, M.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ไซโตเมกะโลไวรัสในระยะต่างๆของการตั้งครรภ์ปกติ
ชื่อนิสิต	ร้อยโทหญิง ธรธิดา โพธิ์ทศ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วรณา พรรณรักษา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ สุรางค์ คันทิวณิช รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง กอบจิตต์ ลิ้มปพยอม
สหสาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา	2528

บทคัดย่อ



การติดเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส (Cytomegalovirus) มักเป็นการติดเชื้อแฝง (latent infection) และไม่ปรากฏอาการของโรค (subclinical) สภาวะการตั้งครรภ์ อาจกระตุ้นให้มีการติดเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส และเชื้อไวรัสที่มีอยู่เดิมอาจเพิ่มจำนวนมากขึ้น มีผลกระทบต่อทารกในครรภ์ได้ การศึกษาอัตราการตรวจพบเชื้อไซโตเมกะโลไวรัสโดยวิธีเพาะแยกเชื้อด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง (Human Foreskin Fibroblast Cell Culture) ตรวจพบเชื้อจากสิ่งคัดหลั่งจากปากมดลูก (cervical excretion) ในสตรีตั้งครรภ์ปกติ ที่มาฝากครรภ์ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ เป็นจำนวน 16 คน จากจำนวนทั้งหมด 107 คน คิดเป็นร้อยละ 14.9 และในสตรีวัยเจริญพันธุ์ปกติที่แต่งงานแล้วซึ่งมารับการตรวจร่างกายที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เป็นจำนวน 4 คน จากจำนวนทั้งหมด 75 คน คิดเป็นร้อยละ 5.3 แสดงว่า อัตราการตรวจพบเชื้อไซโตเมกะโลไวรัสในสตรีตั้งครรภ์ สูงกว่าในสตรีวัยเจริญพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (โดยวิธี Chi Square Test, $df = 1, P < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะของการตั้งครรภ์ที่ทำให้ฮอร์โมนในร่างกายเกิดการเปลี่ยนแปลง (hormonal change) และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันต้านทานต่ำลง (mild immunosuppression) ทำให้ร่างกายอยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับการเพิ่มจำนวนมากขึ้นของเชื้อไวรัส ในกลุ่มสตรีตั้งครรภ์ที่ตรวจพบเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส จากจำนวน 16 คน ตรวจพบ

ในไตรมาสที่ 1 ร้อยละ 18.75 (3 คน) ในไตรมาสที่ 2 ร้อยละ 62.50 (10 คน) และในไตรมาสที่ 3 ร้อยละ 31.25 (5 คน) มีเพียง 1 คน เท่านั้น ที่ตรวจพบเชื้อทั้งสามไตรมาส การตรวจพบเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส จะลดน้อยลงในสตรีที่ตั้งครรภ์มากกว่า 2 ครั้ง เมื่อเทียบกับสตรีที่ตั้งครรภ์ 2 ครั้ง และ 1 ครั้ง โดยตรวจพบเชื้อจากสตรีที่ตั้งครรภ์ 3 ครั้ง, 2 ครั้ง และ 1 ครั้ง จำนวน 1 คน, 6 คน และ 9 คน ตามลำดับ และสตรีที่ตั้งครรภ์มากกว่า 3 ครั้ง จะตรวจไม่พบเชื้อเลย นอกจากนี้ยังตรวจพบเชื้อไซโตเมกะโลไวรัสในสตรีตั้งครรภ์ที่มีอายุระหว่าง 18-36 ปี และตรวจไม่พบในกลุ่มอายุมากกว่า 36 ปีขึ้นไป

เกี่ยวกับสภาวะภูมิคุ้มกันทาน(antibody) ต่อเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส ซึ่งทำการศึกษาโดยวิธีทดสอบตรึงคอมพลีเมนต์ (Complement Fixation Test) ในสตรีตั้งครรภ์ขณะตั้งครรภ์ไตรมาสแรก สามารถตรวจพบภูมิคุ้มกันทาน ร้อยละ 26.17 (28/107) และตรวจไม่พบร้อยละ 73.83 (79/107) ในกลุ่มที่ไม่มีภูมิคุ้มกันทาน ตรวจพบภูมิคุ้มกันทาน(seroconversion) ต่อเชื้อไซโตเมกะโลไวรัสในไตรมาสต่อไป คิดเป็นร้อยละ 37.9 (30/79) และตรวจพบเชื้อไซโตเมกะโลไวรัสจากสิ่งคัดหลั่งจากปากมดลูกในขณะนั้นด้วย คิดเป็นร้อยละ 33.3 (10/30) ในกลุ่มของสตรีตั้งครรภ์ที่มีเชื้อไซโตเมกะโลไวรัส จะตรวจพบมีภูมิคุ้มกันทาน ร้อยละ 93.75 (15/16) และมีระดับภูมิคุ้มกันทานเปลี่ยนแปลง (seroconversion) ร้อยละ 66.7 (10/15) ซึ่งแสดงถึงสภาวะการติดเชื้อไซโตเมกะโลไวรัสในขณะนั้น (Primary Infection) ส่วนร้อยละ 20.0 (3/15) แสดงสภาวะการติดเชื้อซ้ำ (Reactivation) จากเชื้อที่มีอยู่เดิม

Thesis Title Cytomegalovirus in Different Periods of Normal Gestation
Name Lieutenant (W) Dharadhida Bodhidatta
Thesis Advisor Associate Professor Vanna Punnarugsa, M.D.
Co-Advisor Associate Professor Surang Tantivanich, M.Sc.
 Associate Professor Kobchitt Limpaphayom, M.D.
Inter-Department Medical Microbiology
Academic Year 1985



ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) infections are usually asymptomatic and go unnoticed. It may be exaggerated by pregnancy and spread to the fetus. This study involved 107 Thai pregnant women who attended the Antenatal Care Unit of Chulalongkorn Hospital as group studied and 75 married women who attended the National Cancer Institute for having routine examination as a control group. By employing the human foreskin fibroblast cell culture, CMV was recovered from the cervix of pregnant women in 14.9% (16 of 107) and of married women in 5.3% (4 of 75), respectively. In comparison of the cervical excretion between the two groups of the women, recovery rate of CMV in the pregnant women was significantly higher than that of in the non-pregnant married women (By Chi Square Test at $df = 1$, $P < 0.05$). The reasons are thought to be the influence of mild immunosuppression and hormonal change during pregnancy. Among 16 CMV-positive culture pregnant women, the culture was positive in the first, the second and the third trimester at the rate of 18.75% (3 of 16), 62.50% (10 of 16) and 31.25% (5 of 16), respectively; and there was only one of them had viral shedding in all 3 trimesters. According to number of

gravida, CMV was recovered in 9, 6 and 1 of those who were pregnant for the first, the second and the third time, respectively; none of the group was pregnant more than 3 times. The age of all 16 CMV-positive culture pregnant women was between 18 and 36 years old, and none was found in the age group more than 36 years.

Seropositive rate of the pregnant women at first trimester, documented by Complement Fixation Test (CFT), was 26.17% (28 of 107) and seronegative rate was 73.83% (79 of 107). Among the seronegative women, 37.97% (30 of 79) of them had seroconversion in the second or the third trimester; and 10 (33.3%) of them shed virus at the time of seroconversion. In the 16 CMV-positive culture pregnant women, 93.75% (15 of 16) had antibody to CMV. Among these 66.7% (10 of 15) had seroconversion, indicating of primary infection. In addition, 20.0% (3 of 15) of these had evidence of reactivation of CMV.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT



The completion of my study at the graduate school, Chulalongkorn University for the Master's Degree in Medical Microbiology could never been happened without any heartfully supports and advices of the following persons whom I wish to express my very special thanks to and to acknowledge their valuable helps in this thesis. Their great memorable honors shall be recognized by me and those who find its usefulness forever.

My deeply appreciation to:-

Associate Professor Vanna Punnarugsa M.D., Virology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her valuable advices concerning every important things needed to be done throughout the study. Her super helpful flavours which I impressively recognized are structural planning, specimen collection, lab. facilities provision, lab. inspection, lab. results analysis, presented preparation, manuscript correcting, and many many more. With her straight criticism and strongly encouragement, I thank you and appreciated gratefully.

Associate Professor Surang Tantivanich M.Sc., Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, for her grateful guidance of the primay cell culture preparation and viral isolation, and correcting the munuscript with several helpful comments.

Associate Professor Kobchitt Limpaphayom M.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her valuable helps, particularly in the collection and authentication of cervical swab specimens.

Dr. Pornthep Tiensiwakul Ph.D., Department of Medical Technology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, a thoughtful instructor who puts lots of his times correcting the manuscript with useful criticism and giving me advices and guidances for the right procedure of my presentation.

Associate Professor Saree Chitinand M.D., Department of Pediatrics and Assistant Professor Nakorn Sirisabya M.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, have special skill in circumcision, who supplied the human foreskin tissues regularly for primary cell culture preparation.

Associate Professor Dilok Yenbutra M.D., Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kindness, guidance and criticism of this thesis.

Colonel Pricha Singharaj M.D., Chief, Research Division, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), Supreme Commander Headquarters, for providing facilities used in AFRIMS laboratory and for his kindly support and encouragement throughout the entire study.

Miss Somrat Charnrit, Department of Preventive and Social Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her best effort evaluation of laboratorial results in statistically analysis.

Nurses and staffs of the Antenatal Care Unit, Chulalongkorn Hospital, for their assistance in making appointment with patients for the specimens collection required in virological and serological studies.

Staffs of Virology Unit, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their enthusiastic co-operation in supplying the equipments needed for the laboratorial work.

The committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Lieutenant Junior Grade (W) Benjawan Khuntirat, Department of Biological Production and Standardization, Analytic Division, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), Supreme Commander Headquarters, my wonderful co-worker and a joyful friend, for spending her private times, day and night, giving a helping hand, from company keeping to course-worked participating, during the entire study. That makes the study more important than ever.

The Bodhidattas, my supportive family members, for giving strong encouragements and hopes to go on with the study day after day, year after year until my goal of achievement is finally reached.

Mr. Sontaya Thonprayoon, International Banking Officer, International Banking Division, The Siam Commercial Bank Limited, who finds the busy times typing this complicated thesis for me. With his patient and willingness, I salute.



CONTENT

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	vi
ACKNOWLEDGEMENT	viii
LIST OF TABLES	xv
LIST OF FIGURES	xvii
ABBREVIATIONS	xviii
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
History of Human Cytomegalovirus	2
Characteristic of Human Cytomegalovirus	3
Morphology	4
Properties	5
Replication	6
Strain Variation	6
The Detection of Cytomegalovirus Infection	7
Pathology	11
Congenital Infection	11
Perinatal Infection	12
Postnatal Infection	14
Mononucleosis Syndrome	15
Cytomegalovirus and Malignant Disease	16

	Page
Epidemiology	16
Treatment and Prevention of Cytomegalovirus Infection	18
Cytomegalovirus During Pregnancy	21
II MATERIALS AND METHODS	26
MATERIALS	26
1 Collection of Specimens	26
1.1 Cervical Swab Specimens	27
1.2 Venous Blood Specimens	27
2 Cell Cultures	27
2.1 Human Foreskin Fibroblast Cells	28
2.2 Vero-Cells	28
3 Culture Media	28
4 Reagents	32
4.1 Reagents for Cell Cultures	32
4.2 Reagents for Indirect Immunofluorescent Antibody Test	39
4.3 Reagents for Complement Fixation Test	41
METHODS	45
1 Cell Cultures	45
1.1 Human Foreskin Fibroblast Cells	45
1.2 Vero-Cells	49
1.3 Virus Isolation	50
1.4 Virus Identification	51

	Page
2 Serological Study	59
The Complement Fixation Test	59
2.1 Titration of the Hemolysin	59
2.2 Titration of the Complement	64
2.3 Titration of the Antigen	65
2.4 Performance of the Diagnostic Test	69
III RESULTS	74
1 Study of Populations	74
1.1 Pregnant Women Group Studied	74
1.2 Married Women Group Control	76
2 Virological Study	76
2.1 Isolation of Cytomegalovirus from Cervical Excretions of Pregnant Women and Married Women	77
2.2 Isolation of Cytomegalovirus According to Age Group from Cervical Excretions of Pregnant Women	81
2.3 Number of Pregnancies and Cytomegalovirus Isolation from Cervical Excretions in Pregnant Women	81
2.4 Cervical Cytomegalovirus Infection Rate According to Stages of Gestation	85
3 Serological Study	85
3.1 Immune Status of the Pregnant Women	87
3.2 Immunity to Cytomegalovirus of Pregnant Women at Different Gestational Stages	87

	Page
3.3 The Association of Cervical Cytomegalovirus Recovery and the Presence of Cytomegalovirus Antibody in the Pregnant Women	92
IV DISCUSSION	95
REFERENCES	102
VITA	123



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Preparation of Hemolysin Dilutions	60
2	Preparation of Complement Dilutions	62
3	Setting Up the Diagnostic Test	71
4	Characteristics of the Women in This Study: Pregnant Women and Married Women	75
5	Isolation of Cytomegalovirus from Cervical Excretions of Pregnant Women and Married Women	80
6	Characteristics of CMV-Positive Culture Women	82
7	Isolation of Cytomegalovirus According to the Age Group from Cervical Excretions of Pregnant Women and Married Women	83
8	Number of Pregnancies and Cytomegalovirus Isolation from Cervical Excretions in Pregnant Women	84
9	Cervical Cytomegalovirus Infection Rate According to Stages of Gestation	86
10	CMV-CF-Antibody Titer of Pregnant Women at the First Trimester	88
11	Characteristics of Pregnant Women with Seropositive and Seronegative at First Trimester	89

Table		Page
12	CMV-CF-Antibody Titer in 30 Seroconversion Pregnant Women	91
13	CMV-CF-Antibody Titer Levels of Pregnant Women at Different Gestational Stages	93
14	CMV-CF-Antibody Titer in 16 CMV-Positive Cervical Culture Pregnant Women	94



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Primary Explant from Human Foreskin Tissue	47
2	The Confluent Monolayer of Primary Human Foreskin Fibroblast Cells	48
3	Setting Up the Hemolysin Titration	63
4	Setting Up the Antigen Titration	67
5	The Characteristic Cytopathic Effect of Human Cytomegalovirus in Human Foreskin Fibroblast Cells ..	78
6	The Monolayer of Normal human Foreskin Fibroblast Cells	78
7	Typical Fluorescence of Human Cytomegalovirus Infected Cells	79
8	Immune Status of the Pregnant Women	90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS



Ab	=	Antibody
ACIF	=	Anticomplementary Immunofluorescence
Ag	=	Antigen
Anti-C	=	Anticomplementary
ara-A	=	Adenine arabinoside
ara-C	=	Cytosine arabinoside
CF-antigen	=	Complement Fixing antigen
CFT	=	Complement Fixation Test
CF-titer	=	Complement Fixing Titer
CID	=	Cytoplasmic Inclusion Disease
CMI	=	Cell Mediated Immunity
CMV	=	Cytomegalovirus
CNS	=	Central Nervous System
CPE	=	Cytopathic Effect
°C	=	degree celcius
DMSO	=	Dimethyl Sulfoxide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EBV	=	Epstein - Barr Virus
EDTA	=	Ethylenediaminetetra - acetic acid
e.g.	=	exempli gratia
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	=	et alii
FCS	=	Fetal Calf Serum
FITC	=	Fluorescein Isothiocyanate
FT	=	Freeze Thaw (antigen)
g	=	gramme
ug	=	microgramme

G + C	=	Guanine and Cytosine
GE	=	Glycine Extract (antigen)
GM	=	Growth Medium
HCMV	=	Human Cytomegalovirus
HEPES	=	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid
HMI	=	Humoral Immunity
HSV	=	Herpes Simplex Virus
ICNV	=	International Committee for the Nomenclature of Viruses
IFA	=	Indirect Immunofluorescent Antibody Test
IFN	=	Interferon
IgG	=	Immunoglobulin G
IgM	=	Immunoglobulin M
kb	=	kilobasc
lb	=	pound
M	=	Molar
mM	=	millimolar
MEM	=	Minimum Essential Medium
M199	=	Medium 199
min	=	minutes
ml	=	millilitre
ul	=	microlitre
MM	=	Maintenance Medium
mm	=	millimetre
um	=	micrometre
nm	=	nanometre
NSS	=	Normal Saline Solution
PBS	=	Phosphate Buffer Saline

RIA	=	Radioimmunoassay
RNA	=	Ribonucleic acid
RPM	=	revolutions per minute
TV-solution	=	Trypsin Versene - solution
u	=	unit
UV-light	=	Ultraviolet-light
VBS	=	Veronal Buffer Saline



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย