การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพิ่มจำนวนยีน major outer membrane protein และ 16S rRNA เพื่อตรวจหา *Chlamydia pneumoniae*

นางสาว ขวัญใจ เกตุวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0615-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20609036 25 ก.พ. 2547

POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION OF MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN AND 16S r RNA GENES FOR DETECTION OF *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*

Miss Khuanjai Ketwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate school

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0615-2

Thesis Title	Polymerase Chain Reaction Amplification of Major Outer Membrane Protein and 16S rRNA Genes for Detection of *Chlamydia pneumoniae*
By	Miss Khuanjai Ketwong
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.)

.....Member

(Mrs. Siripan Wongwanich, M.Sc.)

นางสาวขวัญใจ เกตุวงษ์ : การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพิ่มจำนวนยีน (major outer membrane protein และ 16S rRNA เพื่อตรวจหา *Chlamydia pneumoniae*)อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สมหญิง ธัมวาสร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์,
92 หน้า. ISBN 974-03-0615-2

Chlamydia pneumoniae เป็นเชื้อสาเหตุของโรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะเป็นสาเหตุสำคัญของโรคปอดบวมที่เกิดภายนอกโรงพยาบาล การวินิจฉัยสาเหตุของการติดเชื้อจากอาการแสดงทางคลินิกไม่สามารถใช้แยกออกจากสาเหตุการติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดอื่นหรือการติดเชื้อไวรัสได้ การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็วเพื่อวินิจฉัยสาเหตุการติดเชื้อ *C. pneumoniae* จึงมีความสำคัญเพื่อให้การรักษาที่มีประสิทธิภาพและป้องกันการเกิดการติดเชื้อเรื้อรังในภายหลัง การศึกษานี้เป็นการประเมินวิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อ *C. pneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจ เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae* โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่จำเพาะต่อสปีชีส์ของเชื้อได้แก่ major outer membrane protein (*omp1*) และ 16S rRNA โดยการวิเคราะห์ PCR product ด้วยวิธี dot blot hybridization และทำด้วยวิธี nested PCR ได้มีการนำเอนไซม์ uracil-N-glycosylase (UNG) มาใช้ในการป้องกันการเกิดผลบวกปลอมที่อาจเกิดขึ้นจากการปนเปื้อนจาก PCR product ในการเพิ่มจำนวนยีนรอบแรก นอกจากนี้ได้สร้าง recombinant plasmid control ขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจหา inhibitors ในสิ่งส่งตรวจ ผลการทดลองพบว่า *omp1*-based PCR สามารถตรวจพบ DNA ของ *C. pneumoniae* ได้ในปริมาณต่ำสุด 1 IFU และ 16S rDNA-based PCR สามารถตรวจพบ DNA ของ *C. pneumoniae* ได้ในปริมาณต่ำสุด 0.1 IFU ได้ทำการเปรียบเทียบวิธี PCR กับการย้อมหาเชื้อด้วยวิธี Indirect fluorescent antibody (IFA) stain จากสิ่งส่งตรวจที่ป้ายจากคอ (throat swab) และการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อด้วยวิธี Microimmunofluorescence (MIF) test จากซีรั่มจำนวน 115 ตัวอย่างจากผู้ป่วยที่มีอาการปอดบวมที่เกิดภายนอกโรงพยาบาลจำนวน 114 ราย พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ *C. pneumoniae* จาก throat swab จำนวน 15 (13.0 %) ตัวอย่าง จากผู้ป่วย 14 (12.3 %) ราย การตรวจ throat swab ด้วยวิธี IFA ได้ผลลบทั้งหมด สิ่งส่งตรวจที่ป้ายจากคอ 12 ตัวอย่างให้ผลบวกด้วยวิธี PCR เก็บมาจากผู้ป่วย 11 รายซึ่งมีผลการตรวจ MIF ให้ผลบวก อีก 3 ตัวอย่างมีผล PCR บวกแต่ผลการตรวจทางน้ำเหลืองให้ผลลบดังนั้นจึงจัดให้เป็นตัวอย่างที่มีผลบวกปลอม เมื่อตรวจด้วยวิธี nested PCR ต่อยีน 16S rRNA สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ *C. pneumoniae* ได้จากสิ่งส่งตรวจทั้ง 15 ตัวอย่าง ส่วนวิธี PCR ต่อยีน *omp1* เมื่อตรวจ PCR product ที่ได้ด้วย dot blot hybridization สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ *C. pneumoniae* ได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 10 ตัวอย่าง และเมื่อตรวจด้วยวิธี *omp1* nested PCR ตัวอย่างทั้งหมดให้ผลลบ นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยมี inhibitor ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการแก้ไขโดยการเจือจางตัวอย่างพบว่าให้ผลลบทั้งหมด ผลการศึกษาที่ได้แสดงว่าวิธี nested PCR ต่อยีน 16S rRNA เป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการที่รวดเร็ว และเชื่อถือได้ เหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อ *C. pneumoniae*

สหสาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4175203730 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD : *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*/ *OMP1* GENE/ 16S rRNA/ POLYMERASE CHAIN RECTION

KHUANJAI KETWONG : POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION OF MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN AND 16S rRNA GENES FOR DETECTION OF *CHLAMYDIA PNEUMONIAE*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph. D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. PONGPUN NUNTHAPISUD, M. Sc. 92 pp. ISBN 974-03-0615-2

Chlamydia pneumoniae is a common cause of respiratory tract infection and community-acquired pneumonia. Diagnosis from clinical presentation cannot differentiate from infection caused by other bacteria or viruses. The rapid laboratory method for diagnosis of *C. pneumoniae* infection is important for effective treatment and prevention of chronic infection. To assess the utility of polymerase chain reaction (PCR) in detection of *C. pneumoniae* DNA from clinical specimens for diagnosis of acute infection with *C. pneumoniae*, two sets of primers were used for the direct species-specific detection of the major outer membrane protein (*omp1*) and 16S rRNA genes of *C. pneumoniae*. Two PCR protocols were employed; nested PCR and single-step PCR accompanied by dot blot hybridization. The false positive result due to amplicon carryover was prevented by the enzymatic degradation procedure with the use of uracil-N-glycosylase (UNG) in the first amplification. The recombinant plasmid controls were constructed and used for the detection of inhibitors in the samples. The sensitivity in the detection of purified *C. pneumoniae* DNA for *omp1*-based PCR and 16S rDNA-based PCR was 1 IFU and 0.1 IFU, respectively. We compared *omp1*-based PCR and 16S rDNA based PCR with indirect fluorescent-antibody (IFA) stain, and serology by Microimmunofluorescence (MIF) test. These tests were applied to 115 throat swab specimens and sera collected from 114 patients with community-acquired pneumonia. Fifteen specimens (13.0 %) from 14 patients (12.3 %) gave the positive results. None of the throat swabs samples was *C. pneumoniae* positive by IFA stain. Twelve throat swab samples that PCR positive obtained from 11 patients who had positive results in MIF test. Three specimens had PCR positive results without serologic evidence of acute infection and were considered to be false positive. When using 16S rDNA nested PCR, we could detect *C. pneumoniae* DNA from all of 15 positive samples. Of these 15 throat swab samples, 10 were positive by *omp1*-based PCR when analyzed with dot blot hybridization and all of them were negative by *omp1* nested PCR. PCR inhibitors were detected in 3.5% of all samples and after dilution, all of them gave negative result. This data indicates that 16S rDNA-nested PCR can be established as a rapid and reliable method for the diagnosis of acute infection with *C. pneumoniae*.

Department Medical Microbiology	Student's signature.....
Field of study Medical Microbiology	Advisor's signature.....
Academic year 2001	Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to the following individuals who help making this thesis possible :

Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her patience, valuable advice and supervision.

Associate Professor Pongpun Nunthapisud, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for helpful guidance and assistance.

Anun Vattanathum, M.D., Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Pramongkutklao College of Medicine for his kindness and helping in collecting blood and throat swab specimens.

Miss Ubolrat Rirerm, Mrs. Napawan Punakabutra, Miss Ajcharaporn Sawatpanich and Miss Kamoltada Naveejitpadung for their assistance in the laboratories.

Staff members of Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their help in providing facilities during the period of this study. Also many thanks to graduate students and Ph.D. students for their kindness, wonderful friendship and understanding.

Graduate school and Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their research grant.

Finally, I would like to express deepest gratitude to my parents, sister and brothers for their unlimited love, supporting, encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....x

ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II OBJECTIVE.....5

III LITERATURE REVIEW

HISTORY.....6

CLASSIFICATION.....7

MORPHOLOGY.....9

DEVELOPMENTAL CYCLE.....11

ANTIGENIC STRUCTURE.....13

GENOMIC STRUCTURE.....14

PATHOGENESIS.....15

IMMUNE RESSPONSE.....16

TRANSMISSION.....18

EPIDEMIOLOGY.....19

CLINICAL MANIFESTRATIONS.....19

TREATMENT.....23

VACCINE DEVELOPMENT.....23

LABORATORY DIAGNOSIS.....24

IV MATERIALS AND METHODS.....30

V RESULTS.....45

VI DISCUSSION.....67

VII CONCLUSION.....72

REFERENCES.....73

APPENDICES.....83

APPENDIX I.....84

APPENDIX II.....86

APPENDIX III.....87

BIOGRAPHY.....89

LIST OF TABLES

Tables Page

1 Characteristics of the four chlamydial species.....8

2 Oligonucleotides used in this study and size of PCR product.....38

3 Results of PCR methods in the detection of *C. pneumoniae* DNA from 115 clinical specimens.....62

4 Results of interpretation of MIF test in patients with PCR positive.....64

5 Results from MIF test of the clinical specimens positive by PCR and final interpretation.....65

6 Comparison of PCR methods for detection of *C. pneumoniae* in throat swab samples that had final interpretation.....66

LIST OF FIGURES

Figures Page

1 Electron micrograph of *C. pneumoniae* and *C. trachomatis*.....10

2 Chlamydial developmental cycle. EB: elementary body
RB: reticulate body.....12

3 Comparison of IgM and IgG *C. pneumoniae* antibody
Response.....17

4 Diagram of construction of *ompl*-based PCR
positive control.....34

5 Determination of *ompl*-based PCR sensitivity;
the first amplification with primers CP1 and CP2.....45

6 Determination of 16S rDNA-based PCR sensitivity;
the first amplification with primers CpnA and CpnB.....46

7 Determination of *ompl* nested PCR sensitivity;
the amplification with primers CPC and CPD.....47

8 Determination of 16S rDNA nested PCR sensitivity;
the amplification with primer pTW50 and pTW51.....48

9 Determination of *ompl*-based PCR sensitivity;
by dot blot hybridization.....49

10 Determination of 16S rDNA-based PCR sensitivity;
by dot blot hybridization.....50

11 Determination of the amount of *ompl*-based PCR
plasmid control.....52

Figures Page

12 Determination of the amount of 16S rDNA-based PCR plasmid control.....53

13 Determination of the amount of plasmid control by *omp1* nested PCR.....54

14 Determination of the amount of plasmid control by 16S rDNA nested PCR.....55

15 The results of first round amplification of *omp1*-based PCR for detection of *C. pneumoniae* in throat swab samples and analyzed by agarose gel electrophoresis.....57

16 The results of first round amplification of 16S rDNA-based PCR for detection of *C. pneumoniae* in throat swab samples and analyzed by agarose gel electrophoresis.....58

17 The results of 16S rDNA nested PCR for detection of *C. pneumoniae* in throat swab samples and analyzed by gel electrophoresis.....59

18 The results of first round of *omp1*-based PCR for detection of *C. pneumoniae* in throat swab samples and analyzed by dot blot hybridization.....60

19 The results of 16S rDNA-based PCR for detection of *C. pneumoniae* in throat swab samples and analyzed by dot blot hybridization 61

ABBREVIATIONS

Bp	base pair
° C	degree celsius
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DDW	deionized distilled water
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide 5'-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphossphate
dUTP	deoxyuridine 5'-triphosphate
EB	elementary body
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii
g	gram
hr	hour
IFA	indirect fluorescent antibody test
IFU	inclusion forming unit
Ig A	immunoglobulin A
Ig G	immunoglobulin G
Ig M	immunoglobulin M
LPS	lipopolysaccharide
M	molar

MIF	microimmunofluorescence test
min	minute
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
MOMP	major outer membrane protein
PCR	polymerase chain reaction
RB	reticulate body
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
2SP	0.2 M sucrose phosphate buffer
TE	Tris-EDTA buffer
μg	microgram
μl	microliter
μM	micromolar
w/v	weight/volume