การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน P1 และ16S rRNA เพื่อตรวจหา *Mycoplasma pneumoniae*

นางสาว อัจฉราพร สวัสดิ์พานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-020-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION OF GENES ENCODING P1 PROTEIN AND 16S rRNA FOR DETECTION OF *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

Miss Ajcharaporn Sawatpanich

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 1998

ISBN 974-332-020-2

Thesis Title	Polymerase Chain Reaction Amplification of Genes Encoding P1 Protein and 16S rRNA for Detection of *Mycoplasma pneumoniae*
By	Miss Ajcharaporn Sawatpanich
Inter - Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Nibondh Udomsantisuk , M.Sc.

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

.....Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Nibondh Udomsantisuk, M.Sc.)

.....Member
(Assistant Professor Mongkol Kunakorn, M.D.)

บทคัดย่อและบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นางสาวอัจฉราพร สวัสดิ์พานิช : การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุม การสร้างโปรตีน P1 และ 16S rRNA เพื่อตรวจหา *Mycoplasma pneumoniae*
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมหญิง ธัมวาสร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อ.นิพนธ์ อุดมสันติสุข , 80 หน้า.
ISBN 975-332-020-2.

Mycoplasma pneumoniae เป็นเชื้อก่อโรคที่สามารถพบได้ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเด็กและวัยหนุ่มสาว การวินิจฉัยทางคลินิกแต่เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถบอกความแตกต่างของการติดเชื้อนี้ออกจากการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นหรือการติดเชื้อไวรัสได้ ดังนั้นวิธีการวินิจฉัยเชื้ออย่างรวดเร็วจึงมีความสำคัญ เพื่อให้การรักษาเป็นไปอย่างถูกต้องและสามารถป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนที่รุนแรงได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินค่าการใช้วิธี nested polymerase chain reaction (NPCR) สำหรับการตรวจหา *M. pneumoniae* ในสิ่งส่งตรวจ โดยใช้ primer 2 ชุด primerชุดที่ 1 (MP-primer) จำเพาะสำหรับยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน P1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การยึดเกาะเซลล์ primerชุดที่ 2 (16S-rDNA primer) จำเพาะกับยีนที่ควบคุมการสร้าง 16S rRNA นอกจากนี้ได้มีการนำเอนไซม์ uracyl-N-glycosylase (UNG) มาใช้เพื่อเป็นการป้องกันการเกิดผลบวกปลอม เนื่องจากการปนเปื้อนจาก PCR product (amplicon carryover) ผลการทดลองพบว่า MP-nested PCR สามารถตรวจพบ DNA ของ *M. pneumoniae* ได้ในปริมาณต่ำสุด 1 fg และ 16S rDNA - nested PCR ตรวจพบได้ในปริมาณต่ำสุด 0.1 fg

การใช้ nested PCR ตรวจหา DNA ของเชื้อ *M. pneumoniae* จากตัวอย่างที่ป้ายจากคอผู้ป่วย (throat swab) ที่มีการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจจำนวน 100 ราย และกลุ่มควบคุม 100 รายพบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลของ PCR กับการเพาะเชื้อ และการทดสอบทางน้ำเหลืองด้วย microparticle agglutination assay วิธี nested PCR สามารถตรวจพบ DNA ของเชื้อ *M. pneumoniae* จาก throat swab ของผู้ป่วยผู้ใหญ่จำนวน 4 รายและเด็ก 3 ราย ซึ่งการทดสอบทางน้ำเหลืองให้ผลบวกทุกราย ยกเว้นในผู้ใหญ่ 1 ราย ที่ผลการตรวจทางน้ำเหลืองครั้งแรกให้ผลลบ แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างในครั้งที่สองมาตรวจหาการเพิ่มขึ้นของแอนติบอดีได้ การทดสอบในกลุ่มควบคุมปรากฏว่าไม่พบ DNA ของ *M. pneumoniae* จากการตรวจด้วยวิธี PCR ผลการตรวจทางน้ำเหลืองพบว่ามีระดับแอนติบอดีน้อยกว่า 1:40 , 1:40 และ 1:80 ในจำนวน 81 , 9 และ 10 รายตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมมี inhibitor ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยทำการเจือจางตัวอย่าง ส่วนการเพาะเชื้อจาก throat swab ไม่พบการเจริญของเชื้อทั้งในผู้ป่วยและในกลุ่มควบคุม

จากผลการทดสอบที่ได้พบว่า nested PCR มีความไว น่าเชื่อถือและเหมาะสมที่จะนำมาใช้ตรวจหา เชื้อ *M. pneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยอย่างรวดเร็ว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C845564 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*/P1 GENE/ 16S rRNA/ POLYMERASE CHAIN REACTION

AJCHARAPORN SAWATPANICH: POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION OF GENES ENCODING PI PROTEIN AND 16S rRNA FOR DETECTION OF *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMYING TUMWASORN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : NIBONDH UDOMSANTISUK, M.Sc. 80 pp. ISBN 974-332-020-2.

M. pneumoniae is a causative agent of human respiratory tract, especially in children and young adults. Clinical diagnosis cannot be differentiated from infection caused by other bacteria or viruses. The rapid method for diagnosis of *M. pneumoniae* infection is important for effective treatment and the prevention of severe complications. This study was designed to evaluate nested polymerase chain reaction (nested-PCR) assay by the use of two sets of primers for detection of *M. pneumoniae* in clinical samples. Primers were selected from the gene encoding P1 protein (MP-primer) which is responsible for cell adherence, and a fragment of 16S rRNA gene (16S rDNA primer) which is highly conserved in cell. The false-positive due to amplicon carryover was prevented by the enzymatic degradation procedure with the use of uracil-N-glycosylase (UNG). The sensitivity for detection of purified *M. pneumoniae* DNA for MP-and 16S rDNA-nested PCR was 1 fg and 0.1 fg, respectively. Throat swab specimens obtained from 100 patients with respiratory complaints and 100 healthy volunteers were subjected to nested-PCR. The results of PCR were compared to those obtained by culture, and serologic testing by microparticle agglutination. In patients, PCR detected *M. pneumoniae* DNA in 4 adults and 3 children who were all seropositive, except in one adult. This patient had seronegative result in the first serum but the second serum was not available for detecting rising in antibody titer. *M. pneumoniae* DNA was not detected in healthy volunteers. Antibody titers of <1:40, 1:40 and 1:80 were found in 81, 9, and 10 healthy volunteers, respectively. PCR inhibitors were detected in 20% of all samples : after dilution of these samples, all samples were reactive. Colonies of live *M. pneumoniae* were not detected on modified Hayflick agar plate by culture. The results suggest that MP- and 16S rDNA-nested PCR were sensitive, reliable, and suitable for rapid detection of *M. pneumoniae* in respiratory tract samples of patients with respiratory complaints.

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

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

Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my advisor, for her kindness and indispensable help in supervising this thesis.

Instructor Nibondh Udomsantisuk, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University my co-advisor, for his valuable advice and assistance.

Associate Professor Pongpun Nunthapisud , the chairman of thesis committee and Department of Microbiology , Faculty of Medicine , Chulalongkorn University , and Assistant professor Mongkol Kunakorn, M.D., the member of thesis committee for their constructive criticisms.

Wudthichai Suttithawil, M.D., Division Allergy and Immunology, and Anun Vattanathum, M.D., Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Pramongkutklao College of Medicine. Associate professor Sasithorn Likitnukul, M.D., Department of Pediatric, Faculty of Medicine,Chulalongkorn University. Miss Tasanee Sakuldamrongpanich, the National Blood Centre, Thai Red Cross Society for their kindness and helping in collecting the blood and throat swab specimens.

Graduate school and Research Affairs , Chulalongkorn University , for research assistant grant.

Sincere thanks go to the staffs of the Department of Microbiology and the fellow students for providing facilities and encouragement. Finally, I am deeply indebted to my parents and sisters for their love , concern , help, encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....vii

LIST OF FIGURES.....ix

ABBREVIATIONS.....xi

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

II OBJECTIVE.....4

III LITERATURE REVIEW

HISTORY.....5

ORGANTISM.....6

EPIDEMIOLOGY 7

CLINICAL FEATURES.....8

PATHOGENESIS 9

LABORATORY DIAGNOSIS 10

IV MATERIALS AND METHODS.....25

V RESULTS.....33

VI DISCUSSION.....51

VII CONCLUSION.....57

REFERENCES.....58

APPENDIX I.....73

APPENDIX II.....78

BIOGRAPY.....80

LIST OF TABLES

Tables		Page
1	Sequences of primers and size of PCR products	29
2	Detection of *M. pneumoniae* by culture, serology by MAG assay and PCR in 100 healthy volunteers	38
3	Correlation among results obtained by amplification of *M. pneumoniae* DNA in clinical samples	39
4	Correlation among positive results obtained by amplification of *M. pneumoniae* DNA (MP-and 16S rDNA- nested PCR) with those by serology test and culture	47
5	Correlation among negative results obtained by amplification of *M. pneumoniae* DNA (MP- and 16S rDNA-nested PCR) with those by serology test and culture	48
6	Results of *M. pneumoniae* PCR compared with that of serology by the MAG assay in patients with respiratory complaints	49
7	Results for patients with respiratory complaints and whose samples were positive for *M. pneumoniae* by any of the diagnostic tests	50

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Determination of MP-PCR sensitivity analysed by agarose gel electrophoresis	34
2	Determination of MP-nested PCR sensitivity, using and analysed by agarose electrophoresis	35
3	Determination of 16S rDNA PCR sensitivity analysed by agarose gel electrophoresis	36
4	Determination of 16S rDNA nested sensitivity, using and analysed by agarose gel electrophoresis	37
5	Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.1	40
6	Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.2	41
7	Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.3	42
8	Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.4	43
9	Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.5	44

Figure Page

10 Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.6..... 45

11 Detection of *M. pneumoniae* by PCR in throat swab obtained from patient No.7..... 46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

bp	base pair
° C	degree Celsius
CCU	Color changing unit
CFU	Colony forming unit
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
DDW	deionized distilled water
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleoside 5'-triphosphate
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
dUTP	deoxyuridine 5'-triphosphate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
et al.	et alii
pg	picogram (10^{-12})
fg	femtogram (10^{-15})
g	gram
xg	gravity (centrifugal force)
HCl	hydrochloric acid
hr	hour
hrs	hours
IgA	Immunoglobulin A

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
KCl	potassium chloride
M	molar
mg	milligram
$MgCl_2$	magnesium chloride
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
ng	nanogram
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulphate
STE	sodium Tris-EDTA buffer
TE	Tris-EDTA buffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
U	unit
ug	microgram
ul	microliter
uM	micromolar
UV	Ultraviolet
V	Voltage
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย