# การตรวจหา *Chlamydia trachomatis* โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction

นางสาว กาญจนา หริ่มเพ็ง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-276-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17296894

# DETECTION OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Miss Karnjana Hrimpeng

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

1994

ISBN 974-584-276-1

Thesis Title Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction

By Miss Karnjana Hrimpeng

Inter-Department Medical Microbiology

Thesis Advisor Assistant Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.

Thesis Co-Advisor Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.

---

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

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean of Graduate School

( Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Somjai Reinprayoon ..... Chairman

(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

Somying Tumwasorn .....Thesis Advisor

(Assistant Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)

Pongpun Nunthapisud .....Thesis Co-Advisor

(Associate Professor Pongpun Nunthapisud,M.Sc.)

Vichien Rimphanitchayakit .....Member

(Instructor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กาญจนา หริ่มเพ็ง : การตรวจหา Chlamydia trachomatis โดยใช้วิธี Polymerase chain reaction (DETECTION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สมหญิง ธัมวาสร
อ.ที่ปรึกษารวม : รศ.ผองพรรณ นันทาภิสุทธิ์, 113 หน้า. ISBN 974-584-276-1

เพื่อการตรวจหา Chlamydia trachomatis อย่างรวดเร็ว ด้วยวิธี Polymerase chain reaction ( PCR ) ได้ใช้ oligonucleotide primers เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนขนาด 621-bp ของ pCHL2 ซึ่งเป็น plasmid DNA ที่พบได้ใน C. trachomatis ทุกสายพันธุ์ ป้องกันการเกิดผลบวกปลอมเนื่องจาก amplicon carryover โดยใช้ dUTP แทน dTTP และเติม uracil DNA glycosylase (UDG ) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา ตรวจหา amplified product บน agarose gel ซึ่งมี ethidium bromide ผสมอยู่ และพิสูจน์ยืนยันด้วย dot blot hybridization โดยใช้ 473-bp biotin-labelled probe เป็นตัวติดตาม จากผลการวิจัยพบว่าสามารถตรวจหา pCHL2 DNA ได้น้อยที่สุดเท่ากับ 2 fg ซึ่งเทียบเท่ากับ 243 copies ของ pCHL2 DNA ที่พบใน C. trachomatis จำนวน 24 elementary body

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของ PCR ในการตรวจหา C. trachomatis จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยคือ endocervical swab ของผู้ป่วยหญิงที่มารับการตรวจที่คลินิกโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ จำนวน 100 ราย นำมาตรวจหา C. trachomatis โดยใช้วิธี PCR และ cell culture ก่อนทำการทดสอบด้วยวิธี PCR นำสิ่งตรวจที่ได้รับมาปั่นตกตะกอน นำส่วนของตะกอนมาละลายใน lysis buffer ซึ่งประกอบด้วย nonidet P-40, tween 20 และ proteinase K ที่อุณหภูมิ 60 ซ 1 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปต้มนาน 10 นาที แบ่งตัวอย่างที่ได้จำนวน 5 ul มาทำ PCR และเติม pCHL2 DNA ลงในตัวอย่างอีกส่วนหนึ่ง เป็น control เพื่อตรวจหา amplification inhibitor ในสิ่งส่งตรวจ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหา C. trachomatis จาก endocervical specimen จำนวน 100 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR กับ cell culture พบว่า PCR ให้ผลบวกกับสิ่งส่งตรวจทั้ง 12 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี cell culture และสามารถตรวจหา C. trachomatis ได้จากสิ่งส่งตรวจ 2 ใน 88 ตัวอย่างที่ให้ผลลบโดยวิธี cell culture เมื่อนำสิ่งส่งตรวจทั้งสองตัวอย่างที่ PCR ให้ผลบวกแต่ cell culture ให้ผลลบ มาตรวจหา C. trachomatis โดยใช้ Gen-Probe Pace 2 system ( Gen-Probe, Inc. ,San Diego, CA) พบว่าทั้งสองตัวอย่างให้ผลบวก ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า PCR เป็นวิธีการตรวจหา C. trachomatis จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยแบบรวดเร็ววิธีหนึ่งที่มีความไวและความจำเพาะสูง

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พลนุกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## C245357 MAJOR INTER-DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: CHLAMYDIA TRACHOMATIS / POLYMERASE CHAIN REACTION
KARNJANA HRIMPENG : DETECTION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF.SOMYING TUMWASORN,Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF.PONGPUN NUNTHAPISUD, M.Sc. 113 pp. ISBN 974-584-276-1

A polymerase chain reaction (PCR) for the rapid detection of Chlamydia trachomatis was developed by using oligonucleotide primers to amplify a 621-bp fragment of pCHL2, a common plasmid of C. trachomatis False positive due to amplicon carryover was prevented by using dUTP instead of dTTP and uracil DNA glycosylase (UDG) in the PCR reaction. The amplified product was detected by agarose gel electrophoresis in the presence of ethidium bromide and dot blot hybridization by using a 473-bp biotin-labeled probe. The sensitivity of the assay was 2 fg of purified pCHL2 DNA which corresponds to 243 copies of plasmid found in 24 elementary bodies of C. trachomatis.

One hundred endocervical specimens obtained from women attending a clinic for sexually transmitted diseases were tested for the presence of C. trachomatis by PCR and cell culture. Pellet obtained from endocervical specimen in transport medium was resuspended in a lysis buffer containing nonidet P-40, tween 20 and proteinase K, incubated at 60 C for 1 hr and was boiled for 10 min prior to amplification. Part of each sample was spiked with pCHL2 DNA as a control to detect the presence of amplification inhibitor in clinical specimen. PCR results were compared with results from cell culture method for detection of C. trachomatis in 100 endocervical specimens. PCR was positive for all 12 culture-positive samples and detected C. trachomatis in 2 of 88 culture-negative samples. These PCR-positive,culture-nagative samples were tested with Gen-Probe Pace 2 system (Gen-Probe,Inc., San Diego,CA) and found that both samples were positive by this test. These results demonstrated that PCR assay is a sensitive and specific test for rapid detection of C. trachomatis in clinical specimen.

ภาควิชา สหสาขาวิชา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somying Tamwasorn

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Pongpun Nunthapisud

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present investigator wishes to express her deep gratitude to the following individuals who helped in making this thesis possible.

Assist.Prof. Dr. Somying Thumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for her kind and indispensable help in supervising this thesis.

Assoc. Prof. Pongpun Nunthapisud, Department of Microbiology, Faculty of Medicine,Chulalongkorn University,the co-advisor for her invaluable advice in this thesis.

Lieutenant-Colonel Krit Kuvanont, Research Division, Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS) for his supporting McCoy Cells and standard *C. trachomatis* serotype L2.

Assoc.Prof.Dr. Somjai Reinprayoon, head of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for giving the opportunity to undertake this thesis.

Sincere thanks to all persons in the Department of Microbiology and all graduate students for providing facilities and encouragement. Finally, the investigator is deeply indepted to her family for their help, encouragement and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....i

ENGLISH ABSTRACT.....ii

ACKNOWLEDGEMENT.....iii

CONTENTS.....iv

LIST OF TABLES.....v

LIST OF FIGURES.....vi

LIST OF DIAGRAM.....viii

ABBREVIATIONS.....ix

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEW

HISTORY.....4

BIOLOGY AND TAXONOMY.....6

CLINICAL FEATURE .....19

TREATMENT,PREVENTION AND CONTROL.....24

LABORATORY DIAGNOSIS.....25

III MATERIALS AND METHODS.....40

IV RESULTS.....52

V DISCUSSION.....72

VI CONCLUSION.....76

REFERENCES.....77

APPENDIX I.....99

APPENDIX II.....103

APPENDIX III.....105

APPENDIX IV.....108

BIOGRAPHY.....113

# LIST OF TABLES

Table Page

1 Characteristics of chlamydiae in relation to those of mycoplasma, bacteria, and viruses.....7

2 Characteristics of Elementary body (EB) and Reticulate body (RB).....11

3 Serovars and clinical spectrum of *Chlamydia trachomatis* infections.....15

4 Number of positive and negative specimens tested by culture and PCR.....71

# LIST OF FIGURES


| Figure | | Page |
|---|---|---|
| 1 | The developmental cycle of *C. trachomatis* | 9 |
| 2 | The restriction endonuclease cleavage map of 7.5 pCHL2 in pBR 322 | 19 |
| 3 | Position and sequences of primers A and B | 40 |
| 4 | Position and sequences of primers C and D | 45 |
| 5 | Analysis of pCHL2 isolated from *C. trachomatis* infected McCoy Cells by using agarose gel electrophoresis | 53 |
| 6 | The concentration of λ/HindIII fragments | 54 |
| 7 | Effect of $MgCl_2$ concentration on yield of the amplified product | 56 |
| 8 | Effect of *Taq* polymerase on yield of the amplified product | 57 |
| 9 | Effect of the number of PCR cycles on the yield of the amplified product | 59 |
| 10 | The PCR results of using dUTP instead of dTTP in the PCR reaction | 60 |
| 11 | Effect of $MgCl_2$ concentration on yield of the amplified product when concentration of dNTP was changed | 62 |
| 12 | Optimization of the PCR for amplification of the 473-bp probe | 63 |
| 13 | Analysis of the 473-bp biotinylated probe | 65 |

Figure page

14 Determination of the PCR sensitivity (amplified products were analysed by gel electrophoresis).....66

15 Determination of the PCR sensitivity (amplified products were analysed by dot blot hybridization).....67

16 The results of *C. trachomatis* detection from endocervical samples by PCR (amplified products were analysed by gel electrophoresis).....69

17 The results of *C. trachomatis* detection from endocervical samples by PCR (amplified products were analysed by dot blot hybridization).....70

# LIST OF DIAGRAM

diagram page

1 Taxonomy of chlamydiae.....13

## ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| ATP | adenosine triphosphate |
| bp | base pair |
| °C | degree celsius |
| Da | dalton |
| dATP | deoxyadenosine 5'-triphosphate |
| dCTP | deoxycytidine 5'-triphosphate |
| DDW | double distilled water |
| DEAE-dextran | diethylaminoethyl-dextran |
| DFA | direct fluorescence antibody |
| dGTP | deoxyguanosine 5'-triphosphate |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| dNTP | deoxyribonucleotide 5'-triphosphate |
| dTTP | deoxythymidine 5'-triphosphate |
| dUTP | deoxyuridine 5'-triphosphate |
| EB | elementary body |
| EDTA | ethylenediamine tetraacetic acid |
| eg | exampli gratia |
| EIA | enzyme immunoassay |
| et al | el alii |
| etc | et cetera |
| fg | femtogram |
| g | gram |
| x g | gravity (rotate centrifugal force) |
| G+C | guanine plus cytosine |
| GTP | guanosine triphosphate |
| HCl | hydrochloric acid |

| | |
|---|---|
| hr | hour |
| hrs | hours |
| ICN | inclusion conjunctivitis of the newborn |
| IgG | immunoglobulin G |
| IgM | immunoglobulin M |
| IuDR | 5-iodo-2-deoxyuridine |
| Kb | kilobase |
| KCl | potassium chloride |
| KDa | kilodalton |
| LGV | lymphogranuloma venereum |
| LPS | lipopolysaccharide |
| M | Molarity |
| mg | milligram |
| $MgCl_2$ | magnesium chloride |
| min | minute |
| ml | milliliter |
| mM | millimolar |
| MOMP | major outer membrane protein |
| NaCl | sodium chloride |
| NGU | nongonococcal urethritis |
| ng | nanogram |
| OM | outer membrane |
| pCHL2 | plasmid of *chlamydia trachomatis* serotype L2 |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PID | pelvic inflammatory disease |
| PGU | postgonococcal urethritis |
| RB | reticulate body |
| RNA | ribonucleic acid |

| | |
|---|---|
| SA-AP | streptavidin-alkaline phosphatase conjugated |
| SDS | sodium dodecyl sulfate |
| 2SP | 0.2 M sucrose phosphate buffer |
| 4SP | 0.4 M sucrose phosphate buffer |
| TE | tris-EDTA buffer |
| Tris | tris-(hydroxymethyl)-aminoethane |
| ug | microgram |
| ul | microliter |
| uM | micromolar |
| W/V | weight/volume |