LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

5 SEP 1996

# POLYMERASE CHAIN REACTION AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* INFECTION

SOMCHAI LOKPICHAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

With compliments
of
มหาวิทยาลัย ม.มหิดล

TH
S693p
1996

Copyright by Mahidol University

36051

| | |
|---|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส สำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อ *คลามิเดีย แทรกโคมาติส* |
| ชื่อผู้วิจัย | สมชัย หลกภิชาติ |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) |
| คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ | จันทพงษ์ วะสี, พ.บ. |
| | อุไรวรรณ โฆษิตานนท์, วท.ม. |
| | สนทนา ศิริตันติกร, Ph.D. |
| | สมศักดิ์ ภักดีวงศ์, พ.บ., ส.ม. |
| วันที่สำเร็จการศึกษา | 15 พฤษภาคม พ.ศ. 2539 |

## บทคัดย่อ

การติดเชื้อ *Chlamydia trachomatis* เป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่เป็นปัญหาสำคัญ มักติดเชื้อร่วมกับ *Neisseria gonorrhoeae* และก่อโรคที่มีอาการคล้ายคลึงกัน ในหญิงทำให้เกิดอาการปากมดลูกอักเสบ ตกขาว หรือติดเชื้อโดยไม่มีอาการแต่แพร่เชื้อไปยังคู่สมรสหรือทารกที่ผ่านทางคลอดที่มีเชื้อ บางคนอาจมีการติดเชื้อรุนแรง เกิดการอักเสบในอุ้งเชิงกราน และเป็นสาเหตุของภาวะมีบุตรยาก ในชายมักทำให้เกิด nonspecific urethritis หรือ post gonococcal urethritis , epididymitis อาจมีอาการแทรกซ้อนเกิดการอักเสบของ prostate และเป็นสาเหตุของ Reiter's syndrome การวินิจฉัย และรักษาการติดเชื้อ *C. trachomatis* จึงมีความสำคัญในการป้องกันไม่ให้โรคลุกลามรุนแรง และควบคุมการแพร่ระบาด

Copyright by Mahidol University

การวินิจฉัย *C. trachomatis* ทางห้องปฏิบัติการยุ่งยากกว่า การวินิจฉัย *N. gonorrhoeae* วิธีที่ถือเป็นวิธีมาตรฐานในการวินิจฉัย *C. trachomatis* ในผู้ป่วย non-gonococcal urethritis คือ การเพาะเลี้ยงแยกเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยง นอกจากนี้อาจวินิจฉัยโดยการตรวจ antigen ด้วยวิธี ELISA และตรวจหา DNA หรือ RNA โดยวิธี hybridization

การวิจัยครั้งนี้ ได้พยายามพัฒนาเทคนิคขยาย DNA ของ *C. trachomatis* โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส แบบขยายสองช่วง (Nested PCR) คือ ขยายส่วนนอกด้วย primers FLS และ FLA แล้วขยายส่วนในด้วย primers NEST 2 และ NEST 4 บริเวณที่ขยายคือ DNA ที่ควบคุมการสร้าง major outer membrane protein เทคนิค PCR เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. trachomatis* อ้างอิง พบว่าไวกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแยกเชื้อประมาณ 100 เท่า

ได้ศึกษาความไวและความจำเพาะของวิธี nested PCR เพื่อตรวจหา DNA ของเชื้อ *C. trachomatis* จากเซลล์ที่ได้จาก urethral swab และจากตะกอนปัสสาวะ เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแยกเชื้อ ในรายที่ได้ผลไม่ตรงกัน ได้นำ swab ที่เก็บสำรองไว้มาทำการทดสอบยืนยัน โดยตรวจหา *C. trachomatis* antigen ด้วยน้ำยา ELISA หรือ ตรวจหา RNA ด้วยวิธี RNA-DNA hybridization (Gen-Probe)

ผลการศึกษาในผู้ป่วยที่มารักษาด้วยอาการ nonspecific urethritis ที่โรงพยาบาลบางรัก กองกามโรค จำนวน 198 ราย พบว่าให้ผลบวก 52 ราย คิดเป็น 26.26% โดยการเพาะเชื้อ *C. trachomatis* จาก urethral swab ใน McCoy cell พบเชื้อ 22.22% ผลทดสอบด้วยวิธี nested PCR จาก urethral swab พบ 25.76% ผลการทดสอบด้วยวิธี PCR โดยเก็บปัสสาวะผู้ป่วย และขยาย DNA ของเชื้อในตะกอนปัสสาวะพบ 17.17% ผลการตรวจด้วยวิธี nested PCR จาก urethral swab และ urine sediment เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติกับวิธีเพาะแยกเชื้อไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่การตรวจโดยวิธี PCR จาก urethral swab ให้ผลบวกสูงกว่า PCR จากตะกอนปัสสาวะ ($p<0.05$)

Copyright by Mahidol University

ค่าความไวและความจำเพาะของวิธี PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อพบว่า การตรวจตัวอย่างจากท่อปัสสาวะด้วยวิธี PCR มี Sensitivity 97.72% , Specificity 94.81% , Positive predictive value 84.31 % และ Negative predictive value 99.33% และการตรวจด้วยวิธี PCR โดยใช้ตัวอย่างตรวจเป็นตะกอนจากปัสสาวะ มี Sensitivity 75.00%, Specificity 99.35% , Positive predictive value 97.06 % และ Negative predictive value 93.28%

ตัวอย่างตรวจจากท่อปัสสาวะที่ให้ผลเพาะเชื้อและ PCR ไม่ตรงกันมี 9 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างตรวจจากท่อปัสสาวะที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR แต่ให้ผลลบโดยวิธีเพาะเชื้อ จำนวน 8 ตัวอย่าง มาตรวจหา antigen ด้วยวิธี ELISA หรือตรวจหา RNA ด้วยวิธี RNA-DNA hybridization พบว่าให้ผลบวกจำนวน 6 ตัวอย่าง เนื่องจากวิธีการเพาะเชื้อจำเป็นต้องใช้เชื้อที่มีชีวิตและเป็นระยะติดต่อ ตัวอย่างตรวจ 6 ตัวอย่างนี้อาจไม่มีเชื้อที่มีชีวิตอยู่หรือเป็นเชื้อที่ไม่ใช่ระยะติดต่อ หรือเชื้ออาจตายในระหว่างนำส่งห้องปฏิบัติการ จึงไม่สามารถเพาะเชื้อได้ PCR จึงมีความไวในการตรวจเชื้อ *C. trachomatis* มากกว่าการเพาะเชื้อ อย่างไรก็ดี มีตัวอย่างตรวจจากท่อปัสสาวะ 1 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธีเพาะเชื้อและตรวจพบแอนติเจน แต่ให้ผลลบโดยวิธี PCR

วิธีแยกเชื้อคลามิเดียด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบันมีความยุ่งยากในการปฏิบัติ เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ราคาแพง การนำส่งตัวอย่างตรวจต้องรีบนำส่งและเก็บในสภาวะที่กำหนดเพื่อไม่ให้เชื้อตาย วิธี PCR เป็นการตรวจหา DNA ที่มีความไวสูงสามารถตรวจในตัวอย่างตรวจได้เกือบทุกชนิด กลุ่มผู้ที่สงสัยว่าติดเชื้อ *C. trachomatis* แต่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างจากท่อปัสสาวะ อาจวินิจฉัยโดยใช้ตะกอนที่ปั่นจากปัสสาวะที่เก็บอย่างเหมาะสม นำมาตรวจโดยวิธี PCR ถึงแม้อุปกรณ์

Copyright by Mahidol University

ต่างๆจะมีราคาแพงแต่มีแนวโน้มที่จะราคาลดลงมาอีกมากและสามารถใช้กับเชื้ออื่นๆได้ จึงน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไป

Copyright by Mahidol University

| | |
|---|---|
| Thesis Title | Polymerase Chain Reaction as A Diagnostic tool for *Chlamydia trachomatis* Infection |
| Name | Somchai Lokpichat |
| Degree | Master of Science (Microbiology) |
| Thesis Supervisory Committee | |
| | Chantapong Wasi, M.D. |
| | Uraiwan Kositanont, M.Sc. |
| | Sontana Siritantikorn, Ph.D. |
| | Somsak Pakdewongse, M.D. , M.P.H. |
| Date of Graduation | 15 May B.E. 2539 (1996) |

## ABSTRACT

*Chlamydia trachomatis* is the common sexually transmitted disease, *C. trachomatis* infections often associated with *Neisseria gonorrhoeae* and produces quite similar clinical syndromes and sequelae. In female, *C. trachomatis* is the cause of cervicitis and abnormal vaginal discharge, some women had asymptomatic infections and may spread the agent to sex partners and newborns. In some cases, *C. trachomatis* is the causative agent of pelvic inflammatory diseases, leading to infertility. In male, *C. trachomatis* commonly causes the nonspecific urethritis or post gonococcal urethritis, complicated by epididymitis, prostatitis and other symtoms include Reiter's syndrome. The accurate diagnosis and proper treatment of *C. trachomatis* infection is very important for prevention of the sequelae and control of the spreading.

Copyright by Mahidol University

The conventional technique for diagnosis of *C. trachomatis* is the isolation method in cell culture. The new available techniques are detection of *C. trachomatis* antigen by ELISA and detection of the chlamydial RNA or DNA by hybridization. The proper techniques of urethral specimen collection in male urethritis is recommended.

In this study, the new techniques of polymerase chain reaction (PCR) has been established. The nested polymerase chain reaction (PCR) was used to detect major outer membrane protein (MOMP) gene sequence of *C. trachomatis*. The nested PCR was performed with two different sets of primers, FLS and FLA as the outer primers and NEST 2 and NEST 4 as the inner primers. The sensitivity of the established nested PCR was determined by the reference strain of *C. trachomatis*. The sensitivity of 100 folds greater than cell culture technique was demonstrated.

The urethral swab and first voided urine specimen were collected from 198 male patients who attended Bangrak Hospital with nonspecific urethritis . The rates of *C. trachomatis* detection were 22.22, 25.76 and 17.17% by isolation method, nested PCR with urethral specimens and nested PCR with urine sediments, respectively. The overall positivity rate was 26.26%. There was no statistically significant difference in positive results obtained by isolation and PCR techniques as using two kinds of clinical samples ($p>0.05$). However, detection rate by PCR in urethral specimens was significantly higher than that in urine sediments ($p< 0.05$).

The diagnostic values of the PCR were compared to that of isolation technique. PCR for detection of *C. trachomatis* in urethral specimens had 97.72% sensitivity, 94.81% specificity, 84.31% positive predictive value and 99.33% negative predictive

Copyright by Mahidol University

value. PCR for detection of *C. trachomatis* detection in urine sediment had 75.00% sensitivity, 99.35% specificity, 97.06% positive predictive value and 93.28% negative predictive value.

There were 9 discordant results by cell culture and nested PCR. The other two techniques, ELISA for specimens which showed antigen detection and RNA-DNA hybridization were used to verifiy the results. Among 8 PCR positive specimens, 6 specimens were confirmed positive by antigen or hybridization. Thus, the nested PCR is more sensitive than isolation since cell culture technique requires living *C. trachomatis* at the infectious form.

The nested PCR for detection of *C. trachomatis* in urethral swab specimen was higher sensitive and specific than the isolation technique in cell culture. Furthermore, PCR is much faster and less laborious. In the future, the PCR is a promising technique for used as a diagnostic tool for *C. trachomatis* infection.

Copyright by Mahidol University