ประเมินผลการใช้วิธี RAPID IMMUNOPEROXIDASE สำหรับตรวจการติดเชื้อ CHLAMYDIA TRACHOMATIS ในผู้ป่วยหนองในเทียม

นางสาว วิมล จันทร์แจ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN 974-577-163-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016546
I 10306705

EVALUATION OF RAPID IMMUNOPEROXIDASE ASSAY FOR DETECTING *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* INFECTIONS IN NON-SPECIFIC URETHRITIS PATIENTS

Miss Wimon Chanchaem

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
1990

ISBN 974-577-163-5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	Evaluation of rapid immunoperoxidase assay for detecting *Chlamydia trachomatis* infections in non-specific urethritis patients
By	Miss Wimon Chanchaem
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.

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

.....Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman
(Associate Professor Somjai Reinprayoon, M.D.)

.....Thesis Advisor
(Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.)

.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Reutai Sakulramrung, M.D., Ph.D.)

.....Member
(Lieutenant-Colonel Krit Kuvanont, M.Sc.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิมล จันทร์แจ่ม : ประเมินผลการใช้วิธี RAPID IMMUNOPEROXIDASE สำหรับตรวจการติดเชื้อ CHLAMYDIA TRACHOMATIS ในผู้ป่วยหนองในเทียม (EVALUATION OF RAPID IMMUNOPEROXIDASE FOR DETECTING CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTIONS IN NON-SPECIFIC URETHRITIS PATIENTS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. พญ.ฤทัย สกุลแรมรุ่ง, 112 หน้า. ISBN 974-577-163-5

ผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีการตรวจ Chlamydial antibody ด้วยเทคนิคของ Rapid immunoperoxidase (IP) และ Avidin-biotin immunoperoxidase (avidin-biotin IP) และประเมินผลการตรวจวิธีนี้ในหมู่ผู้ป่วยโรคหนองในเทียมเทียบผลกับวิธีมาตรฐานคือ Micro-immunofluorescence (m-IF) และการเพาะเชื้อ

วิธี IP ใช้แอนติเจนซึ่งเป็น inclusion body ของเชื้อ Chlamydia trachomatis serotype L2 บนแผ่นกระจกสไลด์ นำมาทำปฏิกิริยากับสิ่งตรวจจากคนไข้ ซึ่งได้แก่ น้ำเหลือง หรือสิ่งคัดหลั่งจากท่อปัสสาวะ จากนั้นจึงทำปฏิกิริยากับ anti-human Ig peroxidase conjugate และ substrate ตามลำดับ

จากผลการตรวจผู้ป่วยหนองในเทียม 200 ราย เพาะเชื้อขึ้น 69 ราย (34.5%) พบ Chlamydial antibody ส่วนใหญ่ในน้ำเหลืองเป็นชนิด IgG โดยพบมากถึง 173 และ 186 ราย (86.5 และ 93.0%) ด้วยวิธี m-IF และ IP ตามลำดับ ผู้ป่วยที่มี IgG antibody เหล่านี้ตรวจพบเชื้อเพียง 36.0% เมื่อศึกษา Chlamydial antibody ในสิ่งคัดหลั่ง พบว่าส่วนใหญ่เป็น IgA (29.0% วิธี m-IF, 26.5% วิธี IP) กับ IgG (27.0% วิธี m-IF, 23.5% วิธี IP) เมื่อใช้วิธี avidin-biotin IP สามารถตรวจพบแอนติบอดีย์ชนิด IgA ในสิ่งคัดหลั่งเพิ่มขึ้นเป็น 42%

เมื่อวิเคราะห์วิธี IP เทียบกับวิธี m-IF ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานพบว่าสามารถใช้วิธี IP ตรวจหาระดับแอนติบอดีย์ชนิด IgG ในน้ำเหลืองได้ผลสอดคล้องกับวิธี m-IF (r=0.97) การตรวจน้ำเหลืองด้วยวิธี IP ยังมีความไว และความจำเพาะเป็น 98.84% และ 44.44% ตามลำดับ ส่วนการตรวจแอนติบอดีย์ในสิ่งคัดหลั่งด้วยวิธี IP ก็มีความไวและความจำเพาะเทียบได้กับ m-IF โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจแอนติบอดีย์ชนิด IgA วิธี avidin-biotin IP มีความไวสูงสุด (94.83%) เมื่อประเมินผลการตรวจแอนติบอดีย์กับผลการเพาะเชื้อ และแอนติบอดีย์ชนิด IgA ในสิ่งคัดหลั่งโดยวิธี avidin-biotin IP มีความสัมพันธ์กับผลการเพาะเชื้อดีที่สุด เมื่อนำวิธีนี้มาประเมินผลเทียบกับผลการตรวจพบเชื้อ และหรือผลการตรวจพบ IgA ในสิ่งคัดหลั่งด้วยวิธี m-IF ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ภาวะติดเชื้อขณะปัจจุบัน พบว่ามีความไว และความจำเพาะเป็น 79.71% และ 77.86% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลการเพาะเชื้ออย่างเดียว และ 81.40% และ 86.21% ตามลำดับ เมื่อใช้ผล IgA ในสิ่งคัดหลั่งร่วมด้วย

การตรวจหาแอนติบอดีย์ชนิด IgA ในสิ่งคัดหลั่งด้วยวิธี avidin-biotin IP สามารถนำไปใช้ช่วยบ่งชี้ถึงการติดเชื้อ C. trachomatis ในผู้ป่วยหนองในเทียมได้

ภาควิชา สัตศาสตร์

สาขาวิชา จุลชีวิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 1532

ลายมือชื่อนิสิต วิมล จันทร์แจ่ม

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

WIMON CHANCHAEM : EVALUATION OF RAPID IMMUNOPEROXIDASE ASSAY FOR DETECTING CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTIONS IN NON-SPECIFIC URETHRITIS PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PONGPUN NUNTHAPISUD, M.Sc., THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. REUTAI SAKULRAMRUNG, MD., Ph.D., 112 PP. ISBN 974-577-163-5

A rapid immunoperoxidase (IP) and an avidin-biotin immunoperoxidase test have been set up for the detection of chlamydial antibody as an adjunct to the diagnosis of chlamydial infection in non-specific urethritis (NSU) patients. The results of which were evaluated in comparison with the standard method of micro-immunofluorescence (m-IF) and bacterial cultivation.

Inclusion bodies of C. trachomatis serotype L2 in infected McCoy cells on glass slides were employed as antigen. Clinical specimens such as sera and secretions were allowed to react with antigen followed by reactions with rabbit anti-human Ig peroxidase conjugate and its substrate respectively.

Of the 200 NSU patients studied, C. trachomatis were identified in 69 (34.5%) upon cultivation. The majority of chlamydial antibodies in serum being IgG were found in 173 (86.5%) patients by m-IF and 186 (93.0%) by IP, 36% of which revealed C. trachomatis upon culture. In secretion, the main antibodies being IgA and IgG were detected in 58 (29.0%) and 54 (27.0%) respectively by m-IF and 53 (26.5%) and 47 (23.5%) respectively by IP. With the use of avidin-biotin IP method, secretory IgA antibody could be recognized in 84 (42%).

In an analysis of IP method in comparison with m-IF, the titers of serum IgG antibody from both methods correlated well with each other (r=0.97), the sensitivity and specificity of IP being 98.84% and 44.44% respectively. As for the detection of antibodies in secretion, IP technique is also comparable to m-IF. Particularly, avidin-biotin IP IgA method produced highest sensitivity (94.83%). Evaluation of antibody finding against bacterial culture also revealed correlation especially of avidin-biotin IP IgA with chlamydial isolation. This was further analysed by combining the results of cultivation and the m-IF secretory IgA antibody as golden standard for the diagnosis of current chlamydial infection. Avidin-biotin IP IgA presented a sensitivity and specificity of 79.71% and 77.86% respectively when compared with bacterial culture alone and a respective sensitivity and specificity of 81.40% and 86.21% when compared with the aforementioned combined standard.

An investigation of chlamydial IgA antibody in the secretion of NSU patients by avidin-biotin IP is applicable for the diagnosis of current infection with C. trachomatis.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สูติศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต วิมล จันทร์แจ่ม

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา เผ่อิงพรรณ ณ ระนอง

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

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

Mrs. Pongpun Nunthapisud, Assoc. Prof. of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for her kind and indispensable help in supervising this thesis.

Dr. Reutai Sakulramrung, Assoc. Prof. of the Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the co-advisor for her invaluable advice in this thesis.

Mrs. Pakathip Reynolds, Division of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kind suggestion in the study of laboratory methods.

Lieutenant-Colonel Krit Kuvanont, Research Division, Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIMS), for his supporting McCoy cells and Standard C. trachomatis serotype L_2.

Washington Research Foundation for supplying the chlamydial antigen used in the standard immunofluorescence test.

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Dr. Kanyarat Silaparasamee, Head of V.D. Clinic, Division of Infectious Disease Control, Department of Health, Bangkok, for diagnosis and selection of patients for the study.

Mrs. Rapeepan Anekvorapong, Division of Infectious Disease Control, Department of Health, Bangkok, for help collecting the specimens.

Dr. Tassani Boonyatthiti, Department of Preventive & Social Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for helping in diagnosis of patients and collecting specimens.

Dr Chit Sitthiarmorn, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his invaluable advice on statistical analysis.

Miss Karnjana Hrimpeng and Miss Ubolrat Rirerm for their assistance in the laboratory.

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, encourangement and understanding.

This thesis was supported by the Graduate School, and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENT.....viii

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURES.....xii

ABBREVIATIONS.....xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

History.....4

Biology and Classification.....6

Clinical Signification, Pathology and Epidemiology.....15

Immune Response to Genital Tract Infection...17

Treatment, Prevention and Control.....18

Laboratory Diagnosis.....18

II MATERIALS AND METHODS

Chlamydial antigens and cell line.....24

Collection of specimens.....24

Cultivation of C. trachomatis.....25

Micro-immunofluorescent test.....27

Development of rapid immunoperoxidase test...28

Avidin-biotin immunoperoxidase assay for specific IgA antibody.....38

III RESULTS

Development the rapid immunoperoxidase technique.....42

Isolation of C. trachomatis.....48

Specific anti-chlamydial antibody detection
-Antibodies in serum.....48
-Antibodies in secretion.....50

IV DISCUSSION.....60
Conclusion.....66
REFERENCES.....67
APPENDIX I.....86
APPENDIX II.....88
APPENDIX III.....90
APPENDIX IV.....93
APPENDIX V.....95
APPENDIX VI.....104
BIOGRAPHY.....112

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1	Comparison of characteristics of C. trachomatis with other microorganisms	7
2	Features distinguishing between C. trachomatis and C. psittaci	11
3	Characteristics of elementary body (EB) and Reticulate body (RB)	13
4	Serotypes and clinical spectrum of C. trachomatis infection	15
5	Antigen pools for m-IF test of chlamydia	22
6	Result of storing temperature for inclusion antigen slides	47
7	Serum IgG, IgM and IgA chlamydial antibodies by m-IF versus C. trachomatis isolation	54
8	Serum IgG, IgM and IgA chlamydial antibodies by IP versus C. trachomatis isolation	55
9	Comparison of serum IgG chlamydial antibody detected by IP and m-IF	56
10	Incidence of serum and secretory chlamydial antibodies detected by m-IF and IP	57
11	Evaluation of secretory chlamydial antibodies detected by IP in comparison with m-IF	58
12	Secretoy IgG, IgM and IgA chlamydial antibodies versus C. trachomatis cultivation	58
13	Comparison of secretory IgA antibody demonstrated by avidin-biotin IP and isolation of C. trachomatis	59
14	Comparison of secretory IgA antibody demonstrated by avidin-biotin IP and m-IF and/or isolation of C. trachomatis	59

15 Serological manifestation of 69 patients with positive chlamydial isolation.....104
16 Serum IgG chlamydial antibody by m-IF versus isolation of C. trachomatis.....105
17 Serum IgG chlamydial antibody by IP versus isolation of C. trachomatis.....106
18 Comparison of IgG antibody detection in secretion by IP and m-IF.....107
19 Comparison of secretory IgA antibody detection by IP and m-IF.....108
20 Comparison of secretory IgA antibody detection by avidin-biotin IP and m-IF.....109
21 Comparison of IgG antibody in secretion demonstrated by IP and isolation of C. trachomatis.....110
22 Comparison of secretory IgA demonstrated by IP and isolation of C. trachomatis.....111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES AND DIAGRAMS

FIGURE PAGE

1 Antigens of C. trachomatis..... 9
2 Chlamydial growth cycle.....12
3 Negative control of m-IF test for C. trachomatis antibody (100x).....29
4 Positive high titer of m-IF test for C. trachomatis antibody (100x).....30
5 Negative control of IP test for C. trachomatis antibody (40x).....34
6 Positive 1+ of IP test for C. trachomatis antibody (40x)...35
7 Positive 2+ of IP test for C. trachomatis antibody (40x)...35
8 Positive 3+ of IP test for C. trachomatis antibody (40x)...36
9 Positive 4+ of IP test for C. trachomatis antibody (40x)...36
10 C. trachomatis inclusion bodies in McCoy cells with iodin staining (10x).....49
11 C. trachomatis inclusion bodies in McCoy cells with iodin staining (40x).....49
12 Scatter diagram of serum IgG antibody detected by m-IF and IP.....51

DIAGRAM

1 Taxonomy of Chlamydia.....1
2 A summary of final optimum conditions for rapid immunoperoxidase test.....44
3 A summary of final optimum conditions for avidin-biotin immunoperoxidase test.....45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

Ab	Antibody
cm	centimeter
°C	degree celsius
DDW	double distilled water
EB	elementary body
ed.	editor, edited by
eg	exampli gratia
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al	el alii
etc	et cetera
g	gram
hr	hour
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IP	immunoperoxidase
Kdal	Kilo-dalton
LGV	Lymphogranuloma venereum
Mdal	Mega-dalton
mg	milligram
ml	millilitre
ug	microgram
ul	microlitre
um	micrometer
min	minute
m-IF	micro-immunofluorescent test
mol/l	mole per litre
nm	nanometer
no.	number

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NGV	Non-gonococcal urethritis
NHS	Normal human serum
NSV	Non-specific urethritis
PBS	phosphate buffer saline
RB	reticulate body
RT	room temperature
rpm	round per minute
2SP	0.2 mol/l sucrose phosphate buffer
4SP	0.4 mol/l sucrose phosphate buffer
STD	Sexually Transmitted Diseases
TRIC	Trachoma Inclusion Conjunctivitis

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย