4

การตรวจหาพิไลแอนติเจนที่บริสุทธิ์ของเชื้อหนองในจากเชื้อไนส์ซีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย

นาย สุชาติ ชะนะมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2531

ISBN 974-568-860-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014480

THE DETERMINATION OF PURIFIED GONOCOCCAL PILI ANTIGEN IN CLINICAL ISOLATED NEISSERIA

Mr. Suchart Chanama

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
1988

ISBN 974-568-860-6

Thesis Title	The Determination of Purified Gonococcal Pili Antigen in Clinical Isolated Neisseria
By	Mr. Suchart Chanama
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Reutai Sakulramrung,M.D.,Ph.D.
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.

Thavorn Vajrabhaya .....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Commitee

Kawee Pupaibul .....Chairman

(Associate Professor Kawee Pupaibul, M.D.)

Reutai Sakulramrung .....Thesis Advisor

(Assistant Professor Reutai Sakulramrung, M.D.,Ph.D.)

Pongpun Nunthapisud .....Member

(Associate Professor Pongpun Nunthapisud, M.Sc.)

Somsak Pakdewongse .....Member

(Dr.Somsak Pakdewongse, M.D.)

สุชาติ ชะนะมา : การตรวจหาพิไลแอนติเจนที่บริสุทธิ์ของเชื้อหนองในจากเชื้อไนสซีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย (THE DETERMINATION OF PURIFIED GONOCOCCAL PILI ANTIGEN IN CLINICAL ISOLATED NEISSERIA) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.พญ.ฤทัย สกุลแรมรุ่ง, 153 หน้า.

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจหาพิไลแอนติเจนที่บริสุทธิ์จากเชื้อหนองในที่แยกได้จากผู้ป่วย จากการศึกษาเชื้อหนองใน 31 สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยโดยอาศัยลักษณะโคโลนีและการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีพิไล พบว่าเชื้อหนองในที่แยกได้จากผู้ป่วย 13 สายพันธุ์เท่านั้นมีพิไลและวิธีการคัดเลือกเชื้อที่มีพิไลโดยอาศัยลักษณะโคโลนียังคงเป็นวิธีที่มีประโยชน์และยังใช้ได้ในปัจจุบัน การเตรียมพิไลให้บริสุทธิ์นั้นยังประสบกับปัญหาหลายประการ ได้แก่ การปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่น, ปริมาณที่เตรียมได้น้อยมาก และต้องใช้เวลานาน จากการเตรียมพิไลของเชื้อหนองในที่มีพิไลจำนวน 12 สายพันธุ์พบว่าสามารถเตรียมพิไลได้จากเชื้อหนองในเพียง 5 สายพันธุ์และปริมาณพิไลที่เตรียมได้น้อยมากเพียง 0.22 ถึง 1.03 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเปียกของเชื้อบักเตรี 10กรัม

การวิเคราะห์รูปร่างของพิไลที่เตรียมได้ 5 สายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงให้เห็นว่าพิไลของเชื้อหนองในมีลักษณะเป็นเส้น สายยาว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 นาโนเมตรและรูปร่างยังคงเหมือนเดิมหลังจากผ่านขบวนการสกัด รูปร่างของพิไลของเชื้อหนองในที่เตรียมได้แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะเหมือนกันและไม่แตกต่างไปจากพิไลของ E.coli เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของพิไลที่เตรียมได้ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าพิไลที่เตรียมได้ส่วนใหญ่บริสุทธิ์และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงตั้งแต่ 18,000 ถึง 22,500 ดาลตัน

การเตรียมแอนติบอดีต่อพิไลหนึ่งสายพันธุ์จากกระต่าย พบว่าพิไลที่เตรียมได้มีความสามารถกระตุ้นให้กระต่ายตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดีได้ดี โดยให้ระดับแอนติบอดีสูงถึง 1:81920 ด้วยวิธี Indirect Hemagglutination และแอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะสูงโดยไม่ทำปฏิกริยาข้ามกลุ่มกับเชื้อบักเตรีอื่นๆด้วยวิธี Coagglutination ดังนั้นแอนติบอดีนี้จึงนำไปใช้ในการศึกษา antigenicity ของพิไลแอนติเจนด้วยวิธี ELISA ผลจากการตรวจหาพิไลแอนติเจนจากพิไลและจากเชื้อหนองในสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสามารถตรวจพบแอนติเจนนี้ในพิไลและเชื้อหนองในที่มีพิไลสายพันธุ์อื่นๆได้เพียง 1(1/4) และ 4(4/35) สายพันธุ์ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอนติเจนของพิไลที่ต่างสายพันธุ์มีความแตกต่างกันและยังบ่งชี้ให้เห็นว่าส่วนที่เป็น variable epitope ของพิไลเป็นบริเวณที่กระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูง

เนื่องจากแอนติบอดีต่อพิไลมีความจำเพาะสูงมากและแอนติเจนของพิไลแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จึงเป็นปัญหาที่สำคัญในการพัฒนาวิธี ELISA เพื่อการตรวจหาพิไลแอนติเจน ดังนั้นการใช้แอนติบอดีต่อพิไลเพียงสายพันธุ์เดียวไม่สามารถนำมาใช้ช่วยในการวินิจฉัยโรคหนองในได้ ถ้านำเอาแอนติบอดีต่อพิไลแต่ละสายพันธุ์รวมกัน และ/หรือ นำเอาแอนติบอดีที่ได้จากการกระตุ้นด้วยบริเวณหรือส่วนที่เป็นแอนติเจนร่วมของพิไลมาใช้ อาจจะเพิ่มความไวในการตรวจหาพิไลแอนติเจนได้สูงยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามแอนติบอดีต่อพิไลแอนติเจนซึ่งมีความจำเพาะสูงนี้อาจสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกเชื้อทางด้านอนุกรมวิธาน และการศึกษาทางด้านวิทยาการระบาดของเชื้อหนองใน

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

SUCHART CHANAMA : THE DETERMINATION OF PURIFIED GONOCOCCAL PILI ANTIGEN IN CLINICAL ISOLATED NEISSERIA. THESIS ADVISOR : ASSI. PROF. REUTAI SAKULRAMRUNG,M.D.,Ph.D.153 PP.

The present investigations attempt to examine the purified gonococcal pili antigen in clinical isolated Neisseria. Thirteen piliated gonococci were selected from thirty-one clinical isolates on the basis of colony typing system and electron microscopy. The former method remains the useful test for sorting out piliated gonococci from gonococcal population. Purification of pili was encountered with protein contamination,poor out put and time consumption. Only five pili preparations out of twelve piliated strains could be obtained, at a low yield of 0.22 to 1.03 mg/10 g wet weight of bacteria.

Visualization of gonococcal pili under electron microscopy revealed long filamentous strands with a diameter of 7 nm. The 5 pili preparations retain their morphology after purification process and are indistinguishable both among themselves and from E.coli pili. Most pili preparations showed a single band upon SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis from which the subunit molecular weights were calculated (ranging from 18,000 to 22,500 daltons).

Antigenicity and immunogenicity of pilin were explored by raising anti-pili antibody for ELISA test. Immunization of one pili preparation in rabbits could elicit a good antibody response with a titer of 1:81920 by Indirect Hemagglutination. This antibody afforded high specificity when tested against other bacteria by coagglutination and was further used for the detection of pili antigen by ELISA. Only one pili out of 4 heterologous pili preparation and 4 out of 35 piliated gonococci were reactive with this anti-pili antibody by ELISA system, indicating extreme pili heterogeneity among strains. It is also indicative of high specificity of rabbit antibody against a variable epitope on the immunized pilin.

The high specificity of anti-pili antibody and pili heterogeneity presents problems in developing an ELISA system for pili antigen determination. Therefore, the use of rabbit antipili against a single local strain of gonococcal pili could not be feasible for the diagnosis of gonococcal infection. The employing of polyvalent anti-pili antibodies from pools of antisera against different strains and/or immunization of purified common fragment of gonococcal pili may be solutions to increase the capacity for pili antigen detection. Nevertheless, antipili antibodies could be invaluable in the analysis of gonococci for taxonomic and epidemiological purposes.

ภาควิชา สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2530 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ACKNOWLEDGEMENT

This thesis would never have been successed without any heartfully supports and advices of the following persons whom I would like to express my very special thanks to their valuable helps. Their great memorable honors shall be recognized by me and those who find the usefulness of this work.

My deeply appreciation to :

Assistant Professor Dr. Reutai Sakulramrung, Division of Immunology, my advisor, and Associate Professor Pongpun Nunthapisud, Division of Bacteriology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for their valuable advices, strong encouragement and constructive criticisms , I thank them and appreciated gratefully.

Associate Professor Dr. Tada Sueblinvong and Dr. Nuanthip Kamolvarin, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their kindness, and helpful guidance in the SDS-PAGE study.

Assistant Professor Dr.Vinida Bundit and Miss Kledkaew Panyoung, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their kindness, and helpful

guidance in the electron microscopic technique.

Dr. Soonthorn Rakyutitam and Mr. Surapol Kaewsnan, V.D. Clinic, Rajdamri, Bangkok Metropolitan, and Mr. Amporn Soontrararaksa Mr. Anukool Buateing,and staffs of Laboratory and Research Section, V. D. Division, Bangrak, for their kindness,and help in collecting specimens and subcultures of N.gonorrhoeae.

Miss Wilai Saksirisumpun, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her kindness and supply of the ultrasonic disintegrator.

The Staffs and personels in Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Scientific Division of Red Cross Society, for their enthusiastic co-operation and supply of the equipments needed for the laboratorial work.

The staffs and personels in the Division of Medical Illustration for their valuable aid in photographic work.

The committee of the Graduate School, Chulalongkorn University, for the research grant to support this study.

Finally, I am deeply indebted to my family for their help, encouragement and understanding.

CONTENT

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

LIST OF TABLES..... xi

LIST OF FIGURES.....xii

ABBREVIATIONS..... xv

OBJECTIVES.....xvi

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

LITERATURE REVIEW..... 5

SURFACE STRUCTURE OF NEISSERIA GONORRHOEAE..... 5

Capsule..... 5

Peptidoglycan..... 7

Lipopolysaccharide..... 9

Outer Membrane Proteins..... 10

Pili..... 14

THE STUDY OF GONOCOCCAL PILI..... 15

Structure and Physicochemical Properties of Gonococcal Pili..... 15

Pili and Colony Forms..... 19

Phase Variation..... 20

Antigenic Relationship..... 23

Antigenic Variation..... 24

Common Antigenic Determinant..... 27

Haemagglutinating Activity..... 28

Receptor Binding Domain..... 30

Function of Gonococcal Pili..... 32

Pili Relationships to Virulence..... 32

The Role of Pili in Attachment..... 33

II. MATERIALS AND METHODS..... 40

1. Bacterial Strains..... 40

2. Laboratory Animal..... 40

3. Culture of N.gonorrhoeae..... 41

4. Colony Typing of N.gonorrhoeae..... 41

5. Electron Microscopy..... 42

6. Protein Determination..... 43

7. Immunodiffusion..... 43

8. Purification of Gonococcal Pili..... 43

9. SDS-PAGE..... 44

10. Preparation of Rabbit Anti-gonococcal Pili Antibody..... 46

11. Indirect Haemagglutination test..... 47

12. Coagglutination Test..... 49

13. Isolation of IgG from Rabbit Antiserum..... 51

14. Immunoelectrophoresis..... 52

15. Preparation of Alkaline Phosphatase Conjugated Rabbit Anti-gonococcal Pili IgG... 52

16. Determination of Working Strength of Antipili conjugate and of Antipili IgG Coating level.. 53

17. Determination of Optimal Antigen and Conjugate Incubation Time..... 54

18. Double Antibody Sandwich ELISA for Detection of Gonococcal Pili Antigen..... 55
III. RESULTS..... 57
1. Purification of the Gonococcal Pili..... 57
2. Assessment of Purity..... 58
3. Morphology and Subunit Molecular Weight of Gonococcal Pili..... 59
4. Rabbit Antiserum against Purified Gonococcal Pili..... 60
5. Analysis of Rabbit Anti-pili Antibody by Coagglutination Test..... 60
6. Preparation of Rabbit Anti-pili IgG..... 61
7. Setting Up an ELISA for the Determination of Pili Antigen..... 61
8. Determination of Pili Antigen by ELISA..... 64
IV. DISCUSSION..... 65
V. CONCLUSION..... 73
REFERENCES.....113
APPENDIX.....140
BIOGRAPHY.....153

LIST OF TABLES

Table — Page

1. Molecular Weights of Pilin as Determined by SDS-PAGE..... 75
2. Amino-terminal Amino Acid Sequences of Pili Protein from Isogenic Transparent Clones of Gonococcal Strains MS 11 and R 10 and from M. nonliquefaciens, P. aeruginosa and E.coli..... 76
3. Characteristics of Colonial Types of N. gonorrhoeae..... 77
4. Composition of SDS-Polyacrylamide Gels..... 78
5. Relationship of Colony Type to the Presence of Pili among Strains of N. gonorrhoeae..... 79
6. Subunit Molecular Weight and Yield of Gonococcal Pili from Gonococcal Isolates..... 80
7. Distribution of Optical Density Values of Bacterial Isolates in ELISA..... 81
8. Pili Detection : Electron Microscopic Examination as Compared to ELISA..... 82

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Components of the Surface of the Gonococcus	83
2.	Gonococcal Colony Types 1-5	84
3.	Location of Certain Chromosomal Genes for Pilin or Protein II	85
4.	Transitions between Pilus$^+$ and Pilus$^-$ Phenotypes	86
5.	Cyanogen Bromide Cleavage of Pilus Protein	87
6.	Functional and Antigenic Domains of the Gonococcal Pilus Subunit	88
7.	Variability of Pilin Structure as Revealed by Primer Extension DNA Sequencing of Expressed pil Genes	89
8.	Model of the Adherence of Piliated Bacteria to an Epithelial Cell Surface	90
9.	Apparatus for Slab SDS-PAGE	91
10.	Apparatus for Slab SDS-PAGE (continued)	92
11.	Checkerboard for Determination of Working Dilution of Reagents in the Double Antibody Sandwich ELISA for Pili Antigen	93
12.	Transmission Electron Micrograph of a Negatively Stained Piliated Gonococcal Isolate Strain S 040629 (Type 1)	94
13.	Electron Micrograph of Type 1 Gonococci Strain S 040629 That Had Been Blended for 2 Minutes	95

14. SDS-PAGE Analysis of Various Stages of Gonococcal Pili Purification from Strain S 040629..... 96
15. SDS-PAGE of Gonococcal Pili Strains J 070229, S 280229, S 200329, S 040629, S 160829, and Molecular Weight Markers..... 97
16. Electron Micrographs of Purified Gonococcal Pili from Strain S 040629 and S 280229..... 98
17. Migration of Gonococcal Pili and Molecular Weight Markers in 12.5% Separating Gel in SDS-PAGE..... 99
18. Reaction of Purified Gonococcal Pili S 040629 with 2-Fold Serial Dilution of Rabbit Antiserum against Its Pili.....100
19. An Indirect Haemagglutination Test for Titration of Rabbit Antigonococcal Pili Antibody.....101
20. Typical Coagglutination Test Results with N. gonorrhoeae Strain S 040629.....102
21. Isolation of IgG from Rabbit Serum on DE-52 Cellulose in 0.01 M Potassium Phosphate Buffer pH 8.0.....103
22. Immunodiffusion of Early Fractions of Isolation of Rabbit IgG.....104
23. Immunoelectrophoresis of Fraction Containing Purified Rabbit IgG Demonstrating Purity.....105
24. The Optimal Antibody Concentration for Coating ELISA Plate.....106

25. The Optimum of Conjugate Dilution and of Enzyme Substrate Incubation Times..... 107
26. The Optimal Pili Antigen Binding..... 108
27. The Optimal Conjugate Binding..... 109
28. The Typical Curve of the Reference Purified Gonococcal Pili S 040629 Antigen..... 110
29. The Comparison of Absorbance Values Obtained by ELISA Using Whole Cells and Whole Cell Lysates of Gonococcal Strain S 040629..... 111
30. Determination of Cross Reactivity of Rabbit Antigonococcal Pili Antiserum with Gonococcal Pili of Different Strains by ELISA..... 112

ABBREVIATIONS

B	=	beta
°C	=	degree celsius
ca.	=	circa
CFU	=	Colony Forming Unit
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ed.	=	editor
EDTA	=	Ethylenediaminetetra acetic acid
et al.	=	et alii
Fig.	=	Figure
g	=	gram
xg	=	gravity
K	=	Kilo
Ibs	=	pounds
M	=	Molar
ul	=	microlitre
um	=	micrometre
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
min	=	minute
N	=	Normal
nm	=	nanometre
Vol.	=	Volume

OBJECTIVES

1. To prepare purified pili of N. gonorrhoeae from local clinical specimen.
2. To study the morphology of gonococcal pili preparations by electron microscopy and determine the subunit molecular weights.
3. To prepare rabbit anti gonococcal pili antiserum and study the specificity of its antiserum.
4. To develop an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting gonococcal pili antigen using rabbit anti gonococcal pili antiserum.
5. To evaluate the possibility and/or the problem of pili antigen for the diagnosis of gonococcal infection.