Thesis Title Establishment of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Detection by Using In-house Taqman®-based Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction

Author Mr. Sirichai Pookkapund

Degree Master of Science (Medical Technology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai

ABSTRACT

Background: *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* are the most common species of bacteria that cause sexually transmitted diseases worldwide. Clinical symptoms range from asymptomatic to severe disease, with various complications. Detection of infections caused by these two organisms is largely dependent on conventional assays, such as direct staining and cultural methods, which may be time consuming and which often have problems in regard to sensitivity and specificity.

Objectives: To establish and compare the diagnostic performance of In-house Taqman-base multiplex real time PCR for detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis*.

Methods: In-house Taqman-base multiplex real time PCR for detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* was performed by using 2 pairs of primers specific to each organism's cryptic plasmid DNA sequence; these produced *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* PCR products of 147 and 118 base pairs, respectively. Two Taqman labled probes were used simultaneously Confirmation of *N. gonorrhoeae* infection was done using In-house Taqman- based Real Time PCR for the *N. gonorrhoeae* porin A pseudogene. The ß-globin gene control assay was performed by using conventional PCR and employed human leukocyte extracted DNA as the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

target Diagnostic performance of the assay was compared with Roche Multiplex AMPLICOR CT/NG PCR.

Results: Sensitivity of In-house Taqman-base multiplex real time PCR for detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* was 5 fg. For In-house Taqman-based Real Time PCR detection of *N. gonorrhoeae* porin A pseudogene the sensitivity was 50 fg. When compared with commercial test kit, In-house Taqman-base multiplex real time PCR for detecting *N. gonorrhoeae* had concordant result of 2 positive samples and 179 negative samples while 9 positive samples and 1 negative sample were discordant. For detecting *C. trachomatis*, the assay had concordant results as all positive samples and 165 negative samples while 4 positive samples were discordant. This study demonstrated the prevalence of *N. gonorrhoeae cppB* plasmid less strain at 2.84 %.

Conclusion: We establish a rapid In-house Taqman-base multiplex real time PCR had sensitivity, specificity comparable to those obtained from Roche Multiplex AMPLICOR CT/NG PCR. When the infection was to be diagnosed, urine sample was benefit in both sensitivity and less invasiveness compared to the standard urethral swab, despite the slightly lower sensitivity and specificity. For Porin A pseudogene confirmation assay, the assay demonstrated the well specificity and remarkable sensitivity.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจหาเชื้อ ไนซีเรีย โกโนเรีย และเชื้อคลามัยเดีย ทราโคมาติส โดยวิธี มัลติเพล็ก แทกแมนเบส เรียลไทม์ โพลี เมอร์เรสเชน รีแอ็คชัน ที่พัฒนาขึ้นเอง

ผู้เขียน นายสิริชัย พุกกะพันธุ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. ปราณี ลิ้ชนะชัย

บทคัดย่อ

ที่มาและปัญหา: เชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* และ *Chlamydia trachomatis* เป็นแบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุของโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ที่พบได้บ่อยทั่วโลก อาการของโรคพบตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงอาการรุนแรงร่วมกับมีภาวะโรคแทรกซ้อนต่างๆ การตรวจการติดเชื้อโดยมากใช้วิธีดั้งเดิม คือการย้อมสี และการเพาะเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความจำเพาะและความไวต่ำ ใช้เวลานาน

วัตถุประสงค์: เพื่อพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพวิธี Taqman-base multiplex real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเอง ในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ *C. trachomatis*

วิธีการ: Taqman-base multiplex real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองนี้ใช้ primer 2 คู่ ที่จำเพาะต่อ cryptic plasmid ของแต่ละเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้สร้างดีเอ็นเอผลผลิตขนาด147 และ 108 คู่เบส ของเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ *C. trachomatis* ตามลำดับ จากนั้นใช้ probe 2 เส้น ที่ติดฉลากแบบแทกแมน เพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตไปพร้อมๆกัน ด้านการตรวจยืนยันผลบวกของการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยวิธี Taqman-based Real Time Pพัฒนาขึ้นเอง เพื่อตรวจหา *N. gonorrhoeae* porin A pseudogene นอกจากนี้การตรวจหา ß–globin gene โดยวิธี PCR ปกติเป็นการทดลองควบคุมนั้น ใช้ดีเอนเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ เป็นเป้าหมายการสร้างดีเอนเอผลผลิต จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีทดสอบโดยเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Roche Multiplex AMPLICOR CT/NG PCR

ผลการทดลอง: วิธี Taqman-base multiplex real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองมีความไวในการตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* และ *C. trachomatis* ที่ความเข้มข้น 5 fg และวิธี Taqman-based Real Time PCR พัฒนาขึ้นเอง เพื่อตรวจหา *N. gonorrhoeae* porin A pseudogene มีค่าความไวเท่ากับ 50 fg เมื่อเปรียบเทียบกับชุดน้ำยาสำเร็จรูปพบว่า วิธี Taqman-base multiplex real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองนี้ เมื่อตรวจหา *N. gonorrhoeae* มีผลการตรวจที่เป็นบวกตรงกันกับวิธีอ้างอิง 2 ราย และมีผลการตรวจที่เป็นลบตรงกัน 179 ราย ในขณะที่ผลการตรวจที่เป็นบวก 9 ราย และให้ผลลบ 1 ราย มีผลขัดแย้งกันกับวิธีอ้างอิง และในการตรวจหา *C. trachomatis* พบว่า ให้ผลที่เป็นบวกตรงกันกับ วิธีอ้างอิงทุกราย และผลที่เป็นลบที่ตรงกัน 165 ราย ในขณะที่ผลการตรวจที่เป็นบวกอีก 4 รายที่ให้ผลไม่ตรงกับวิธีอ้างอิง ในการศึกษานี้ยัง ได้ แสดงให้เห็นอุบัติการณ์ของ เชื้อ *N. gonorrhoeae* ที่ไม่มี cppB plasmid ที่ร้อยละ 2.84

สรุปผลการทดลอง: วิธี Taqman-base multiplex real time PCR ที่พัฒนาขึ้นเองมีความรวดเร็ว ความไว ความจำเพาะ ในการตรวจหา *N. gonorrhoeae* และ *C. trachomatis* เทียบเท่าได้กับชุดน้ำยาสำเร็จรูป การใช้สิ่งส่งตรวจที่เป็นปัสสาวะมีข้อดีทั้งในด้านความไวในการตรวจและไม่ทำให้เกิดความเจ็บปวดขณะทำการเก็บสิ่งส่งตรวจเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเก็บด้วยไม้ป้ายท่อปัสสาวะ สำหรับ วิธีการตรวจยืนยันผลการติดเชื้อ *N. gonorrhoeae* ด้วยการตรวจหา porin A pseudogene นั้น แสดงให้เห็นถึงค่าความไวและความจำเพาะที่น่าพอใจในการนำไปตรวจหาเชื้อ *N. gonorrhoeae* ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved