

**Thesis title** Genotyping and Nucleotide Sequence Polymorphism of the VD4 - MOMP Gene of *Chlamydia trachomatis* Detected in Chiang Mai

**Author** Miss Punnarai Veerasetakul

**M.S.** Medical Technology

**Examining Committee**

Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Sungwal Rugpao	Member
Asst. Prof. Dr. Wasana Sirirungsi	Member
Dr. Kriengsak Jitvacharanun	Member

**ABSTRACT**

Fifty *Chlamydia trachomatis* positive samples collected from women with a high risk of STD attending the Venereal Disease and AIDS Control Center, Region 10, Chiang Mai province were investigated for genotype distribution and nucleotide sequence polymorphism of the variable domain 4 (VD4) in the major outer membrane protein (MOMP) gene. For genotyping, the polymerase chain reaction (PCR) based restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used. In this method, VD4 DNA was amplified by using the PCR technique followed by 4 restriction endonuclease digestion; *AluI*, *HindIII*, *DdeI* and *EcoRII*. The results were confirmed by the nucleotide sequencing technique. Eight distinct *C. trachomatis* genotypes were observed; genotype D (42%), F (18%), B/Ba (12%), K

(10%), H/Ia (8%), G (6%), E (2%) and J (2%). The high prevalence of genotype D instead of E presented in this study might represent a unique pattern of *C. trachomatis* genotypes circulated in this area. The nucleotide sequence polymorphism of the VD4 DNA was determined by using the nucleotide sequencing technique. Twenty four samples (48%) were genotype B/Ba, E, F, G, H/Ia and J that had a sequence identical to the prototypes, while 26 samples (52%) of genotype D and K were sequence variant. The nucleotide substitution type mutation, which resulted in the amino acid transition, was the major mechanism observed in these variants. The present study provided the data in molecular epidemiology of *C. trachomatis* as well as the sequence variation in the major antigen coding gene that would be critical for vaccine development.

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การจำแนกหัยป์และความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VD4 - MOMP gene ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ที่ตรวจพบใน เชียงใหม่

**ชื่อผู้เขียน** นางสาว พรรณราย วีระเศรษฐกุล

**วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต** สาขาเทคนิคการแพทย์

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

ผศ.ดร. ปราณีย์ ลิ้นนะชัย	ประธานกรรมการ
รศ.พญ. สິงวาลย์ รักษ์เผ่า	กรรมการ
ผศ.ดร. วาสนา ศิริรังษี	กรรมการ
นพ. เกรียงศักดิ์ จิตวัชรนันท์	กรรมการ

### บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้ทำการจำแนกหัยป์และศึกษาความหลากหลายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ variable domain 4 (VD4) ใน major outer membrane protein (MOMP) gene ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* ในตัวอย่างจากผู้หญิงที่มีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อทางเพศสัมพันธ์ที่มาเข้ารับการตรวจที่ ศูนย์กามโรคและโรคเอดส์ เขต 10 เชียงใหม่ จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยทำการเพิ่มขยายปริมาณ DNA บริเวณ VD4-MOMP gene โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) แล้วนำ PCR product ที่ได้มาทำการจำแนกหัยป์โดยวิธี restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *AluI*, *HindIII*, *DdeI* และ *EcoRII* และตรวจยืนยันโดยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing) จากการจำแนกหัยป์ได้ทั้งหมด 8 หัยป์ โดยตรวจ

พบ ทัยป์ D จำนวน 21 ตัวอย่าง (42%) ทัยป์ F จำนวน 9 ตัวอย่าง (18%) ทัยป์ B/Ba จำนวน 6 ตัวอย่าง (12%) ทัยป์ K จำนวน 5 ตัวอย่าง (10%) ทัยป์ H/Ia จำนวน 4 ตัวอย่าง (8%) ทัยป์ G จำนวน 3 ตัวอย่าง (6%) ทัยป์ E และ J พบอย่างละ 1 ตัวอย่าง (2%) การศึกษานี้ พบทัยป์ D แทนการพบทัยป์ E ได้สูงสุด ซึ่งอาจจะเป็นลักษณะเฉพาะของการติดเชื้อ *C. trachomatis* ในท้องถิ่นนี้

จากการศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ VD4 ของเชื้อ *C. trachomatis* ที่ตรวจพบในเชียงใหม่ พบว่า 24 ตัวอย่าง (48%) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ VD4 เหมือนกับ prototype ที่เป็นทัยป์มาตรฐาน โดยตรวจพบใน ทัยป์ B/Ba, E, F, G, H/Ia and J ขณะที่ 26 ตัวอย่าง (52%) ซึ่งเป็น ทัยป์ D และ K มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าว แตกต่างจาก prototype และจัดเป็น type variant กลไกที่สำคัญในการเกิดความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ VD4-MOMP gene ของเชื้อ *C. trachomatis* พบเป็นการผ่าเหล่าเกิดขึ้นในลักษณะการแทนที่กันของนิวคลีโอไทด์ โดยมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนดังกล่าว จากการศึกษาที่น่าจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในด้านงานระบาดวิทยาในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อ *C. trachomatis* และการเปลี่ยนแปลงของ MOMP ที่เป็นแอนติเจนที่สำคัญของเชื้อ สามารถนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่เหมาะสมต่อไป