Thesis title Laboratory Diagnosis and Genotyping of *Chlamydia trachomatis* by using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism

Author Mrs. Wimolporn Boonyaung

M.Sc. Medical Technology

Examining Committee :

Assist. Prof. Dr. Pranee Leechanachai	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Sungwal Rugpao	Member
Dr.Wasun Chantratita	Member
Assist. Prof. Dr.Wasna Sirirungsi	Member

ABSTRACT

In this study, The polymerase chain reaction (PCR) and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique were optimized for the detection and typing of *Chlamydia trachomatis*. Two sets of nucleotide primers, specific to the base sequence of the variable domain IV (VDIV) of the MOMP gene, were used to amplify the DNA fragments of 375 bp and 345 bp from the primary and nested PCR respectively. For genotyping, the amplified product from the nested PCR was digested separately with 4 restriction endonucleases (*AluI*, *DdeI*, *HindIII* and *EcoRII*). Two groups of subjects, low-risk and high-risk for STDs infection, were included in this study. In the low-risk group, 250 samples were collected from women attending the Obstetric and Gynaecology clinic at McCormick Hospital. Of these, 10 (4%) were found positive for *C. trachomatis* by using either PCR method. Two of these were found in those with cervicitis, while the other 8 were detected in asymptomatic women. The high-risk group comprised 210 women attending the Venereal Disease Control Center, Region 10, Chiang Mai. The prevalence of *C. trachomatis* infection was found to be 12.4% (26/210). The increased sensitivity of the test was observed in the nested PCR, which recovered at least 11 positive samples that were shown

negative by the primary PCR. Genotyping of 28 PCR positive samples collected from infected individuals in Chiang Mai province showed that serotype F (60.7%) and serotype H (J)(14.4%) are the most prevalent. Of the positive samples, 7.1% were found in each serotype E, K and L3, and serotype G was found in 3.6%. This study shows that the nested PCR could enhance the sensitivity of the *C. trachomatis* detection and the PCR-based RFLP was the rapid and simple method for genotyping. Both techniques were suitable for the large scale study of the *C. trachomatis* epidemiology.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการและจำแนกชนิดของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction และ Restriction Fragment Length Polymorphism

ผู้เขียน นาง วิมลพร บุญยวง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย	ประธานกรรมการ
รศ. พญ. สังวาลย์ รักษ์เผ่า	กรรมการ
อ. ดร. วสันต์ จันทราทิตย์	กรรมการ
ผศ. ดร. วาสนา ศิริรังษี	กรรมการ

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจหาและจำแนกทัยป์ของเชื้อ *Chlamydia trachomatis* โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) และ restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะต่อลำดับเบสบริเวณ variable domain 4 (VDIV) จำนวน 2 คู่ ทำการขยายปริมาณ DNA 2 ครั้ง โดยทำ primary และ nested PCR ได้ amplified product ขนาด 375 และ 345 ตามลำดับ และ amplified product จาก nested PCR ได้ถูกนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด (*AluI*, *DdeI*, *HindIII* และ *EcoRII*) เพื่อทำการจำแนกทัยป์ ในการศึกษาจากกลุ่มตัวอย่างสตรีแม่บ้านที่เข้ามารับการตรวจเพื่อค้นหามะเร็งปากมดลูกที่โรง

พยาบาลแมคคอร์มิค เชียงใหม่ จำนวน 250 ราย และกลุ่มสตรีอาชีพพิเศษที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่ศูนย์กามโรค เขต 10 จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 210 ราย พบว่ามีอัตราการติดเชื้อ *C. trachomatis* ร้อยละ 4 และ 12.4 ตามลำดับ และร้อยละ 0.8 ของกลุ่มสตรีแม่บ้านหรือกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำต่อการติดเชื้อมีการติดเชื้อร่วมกับการมีอาการปากมดลูกอักเสบ (cervicitis) ในขณะที่ร้อยละ 3.2 ติดเชื้อโดยไม่แสดงอาการ ในการทำ nested PCR สามารถให้ผลบวกเพิ่มขึ้นร้อยละ 30.5 (11/36) จาก primary PCR ซึ่งแสดงว่าการทำ nested PCR จะช่วยเพิ่มความไวของวิธีการทดสอบดังกล่าวได้ จากการศึกษาการจำแนกทัยป์ของเชื้อที่ตรวจพบในผู้ติดเชื้อในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 28 ตัวอย่าง พบทัยป์ F ได้สูงสุด 17 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 60.7 รองลงมาได้แก่ทัยป์ H (J) 4 ราย (14.4%) ทัยป์ E, L_3 และ K อย่างละ 2 ราย (7.1%) และทัยป์ G พบเพียง 1 ราย (3.6%)

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการทำ nested PCR สามารถเพิ่มความไวของการตรวจพบเชื้อ *C. trachomatis* จาก primary PCR และเทคนิค RFLP เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วในการจำแนกทัยป์ของ *C. trachomatis* จากสิ่งส่งตรวจซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป