การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยด้วยวิธี arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ variable number of tandem repeat (VNTR)

Molecular Typing of *Vibrio Parahaemolyticus* Isolated from Patient Specimens by Arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) Methods Compared with Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis

ปัญจพร นิ่มมณี*, พรทิพย์ พึ่งม่วง, ชนิสรา รุ่งรำพรรณ, ณัฏฐนิช คณะผล,
ปวีณ์นุช มะโนน้อม, นัจมีย์ ขุนเศษ, ชฮาราห์ ดอเลาะ
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
*Email : pnimmanee@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารอักเสบและอาหารเป็นพิษ จำนวน 30 ไอโซเลต (Isolates) ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธี Arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) กับการวิเคราะห์ Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) ผลการศึกษาพบว่า วิธี AP-PCR โดยใช้ AP-primer 2 สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้เป็น 10 รูปแบบ ในขณะที่การวิเคราะห์ VNTR ทั้งสองตำแหน่งสามารถจำแนกเชื้อได้เพียง 1 รูปแบบ นอกจากนี้ค่า Discriminatory Index ของวิธี AP-PCR และการวิเคราะห์ VNTR ทั้งสองตำแหน่ง มีค่าเท่ากับ 0.87, 0 และ 0.07 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในการศึกษานี้วิธี AP-PCR นั้นมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์สูงกว่าการวิเคราะห์ VNTR ผลที่ได้นี้สามารถนำไปพัฒนาหาวิธีจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ต่อไป

คำสำคัญ : *Vibrio parahaemolyticus*, Arbitrarily-primed PCR (AP-PCR), Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)

Abstract

Vibrio parahaemolyticus is a bacterium that causes gastroenteritis and food poisoning. The objective of this study is to type 30 isolates of *V. parahaemolyticus* isolated from patient specimens by comparing between arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) method and variable number of tandem repeat (VNTR) analysis. The results demonstrated that AP-PCR method using AP-primer 2 could discriminate to 10 types whereas, VNTR analysis of both loci could discriminate only one type. In addition, the discriminatory index of AP-PCR and two VNTR loci were 0.87, 0 and 0.07, respectively. This suggested that AP-PCR method had more discriminatory ability than VNTR

analysis. These results could be used to develop methods for *V. parahaemolyticus* typing in the future.

Keywords : *Vibrio parahaemolyticus*, Arbitrarily-primed PCR (AP-PCR), Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)

บทนำ (Introduction)

Vibrio parahaemolyticus เป็นสาเหตุของโรคที่เกิดจากอาหาร (food borne disease) (Letchumanan et al., 2014) *V. parahaemolyticus* โดยแต่ละสายพันธุ์มีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของโรค (virulence factors) ที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย adhesin, thermostable direct hemolysin (TDH), TDH related hemolysis (TRH) และ type III secretion systems (T3SS1, T3SS2) จากการศึกษาพบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยส่วนใหญ่ผลิต TDH และ TRH ในขณะที่เชื้อที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมและในอาหารพบเพียงส่วนน้อยที่สร้างสารชนิดนี้ (Xie et al., 2017) เชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ที่พบได้ทั่วโลก เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบหรือปรุงไม่สุกโดยเฉพาะสัตว์จำพวกหอย (Mala et al., 2016) สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นหนึ่งในผู้ส่งออกอาหารทะเลที่สำคัญ อาหารทะเลที่ปนเปื้อน เช่น กุ้ง และ หอยแครง เป็นแหล่งสำคัญของเชื้อก่อโรคที่มากับอาหาร เช่น *V. parahaemolyticus* โดยอาหารทะเลเหล่านี้จะถูกขนส่งจากแหล่งผลิตไปยังส่วนต่างๆ ของประเทศ (Mala et al., 2016) จากรายงานการเฝ้าระวังโรค ของสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ตั้งแต่ มกราคม ถึง พฤษภาคม 2560 พบว่ามีแนวโน้มการระบาดของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น โดยพบสูงเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาคือเชื้อ *Staphylococcus* spp. และ *Salmonella* spp. ตามลำดับ (สำนักระบาดวิทยา, 2560) ในการศึกษาด้านระบาดวิทยา การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความสำคัญในการใช้สืบค้นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค การควบคุม การเฝ้าระวัง และการป้องกันการติดเชื้อ

เชื้อ *V. parahaemolyticus* แบ่งออกเป็น 13 O serotypes และ 71 K serotypes โดยขึ้นกับความแตกต่างของ somatic หรือ O antigen และ capsular หรือ K antigen (Mala et al., 2016) โดยในปี 1996 serotype O3:K6 ถูกพบครั้งแรกในเมือง Calcutta ประเทศอินเดีย ตั้งแต่นั้นมา serotype O3:K6 และ serovariants (O4:K68, O1:K25, O1:KUT) พบเป็นสาเหตุของการระบาดใหญ่ทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ความแตกต่างของ O และ K antigen นี้เป็นหนึ่งในวิธีการทางฟีโนไทป์ (phenotype) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก ราคาถูก และนิยมใช้มากในห้องปฏิบัติการทั่วไป อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ต่ำ ใช้ระยะเวลานาน และบ่อยครั้งที่พบว่าผลการทดสอบไม่ตรงกับความเป็นจริง ทำให้มีการพัฒนาการจำแนกสายพันธุ์แบบจีโนไทป์ (genotype) ขึ้นมาโดยใช้เครื่องมือทางอณูชีววิทยาเพื่อหาความแตกต่างของเชื้อในระดับดีเอ็นเอ โดยวิธีการนี้มีความถูกต้อง แม่นยำ ประหยัดเวลา และมีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการทางอณูชีววิทยาที่ถูกนำมาใช้เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ ได้แก่ ribotyping, pulse-filed gel electrophoresis (PFGE), group-specific PCR (GS-PCR), multilocus sequence typing (MLST), arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) และ variable number of tandem repeat (VNTR) analysis (Kimura et al., 2008) วิธีมาตรฐาน (gold standard) ที่ใช้ในการจำแนกเชื้อคือวิธี PFGE จัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่จำเป็นต้องใช้

อุปกรณ์จำเพาะและผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผล สำหรับวิธี RFLP โดยใช้ยีน ribosomal RNA (rRNA) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้จำแนกสายพันธุ์ได้ดีแต่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ทั้งสองวิธีจึงไม่นิยมนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป (พรทิพย์ พึ่งม่วง และคณะ, 2557)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธี AP-PCR กับการวิเคราะห์หา VNTR ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำไปปรับใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปเพื่อศึกษาทางด้านการระบาดของเชื้อชนิดนี้ได้

ระเบียบวิธีวิจัย (Method)

1. ขั้นตอนการวิจัย

1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร ในช่วงเดือนมิถุนายน ถึงกันยายน 2560 จำนวน 30 ไอโซเลต

1.2 การทดสอบเพื่อยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus*

นำเชื้อที่แยกได้มาตรวจยืนยันด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยนำเชื้อมาเพาะบน plate TCBS agar incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เป็น non- sucrose fermenting มาทดสอบทางชีวเคมี คือ ทดสอบ oxidase, TSI, MIL, Urea, Citrate, OD-AD, MR-VP และ nutrient broth ที่มี NaCl อยู่ร้อยละ 0-10

1.3 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, Poland) โดยทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ ประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ การทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก การย่อยโปรตีนและ RNA การตกตะกอนดีเอ็นเอ การ load ดีเอ็นเอลง column การล้างและการ elute ดีเอ็นเอ เมื่อได้ดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

1.3.1 เทคนิค arbitrarily–primed polymerase chain reaction (AP-PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ของเชื้อแต่ละไอโซเลตมาเพิ่มจำนวนโดยวิธี AP-PCR ด้วย random primer 2 (Bhoopong et al., 2007) (5’-GTT TCG CTC C-3’) ที่ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 100 pmole AP-primer 2, 0.5 units *Taq* DNA polymerase และ 25-100 ng ของ template DNA และใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 45 รอบของ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.3.2. การวิเคราะห์ variable-number tandem-repeat (VNTR)

ค้นหา Whole genome sequence ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้ววิเคราะห์หา tandem repeat โดยใช้โปรแกรม tandem repeat Finder (http://tandem.bu.edu/trf/trf.submit.options.html) คัดเลือก tandem repeat ตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR โดยพิจารณาจาก copy number, consensus size และ percent matches ที่ เมื่อได้ตำแหน่งของ tandem repeat ที่ต้องการแล้วนำส่วน 5' และ 3' flanking regions ของ tandem repeat มาใช้ออกแบบ primer ด้วยโปรแกรม primer3 version 0.4.0 (www.frodo.wi.mit.edu) นำ primer ที่ได้มาเพิ่มจำนวน tandem repeat ที่ต้องการด้วยวิธี PCR ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 µM dNTPs, 0.5 units *Taq* DNA polymerase, 50 pmole ของ primer แต่ละเส้น และ 25-100 ng ของ template DNA และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน tandem repeat ทั้งสองตำแหน่งคือ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย 30 รอบของ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2. การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูล

2.1 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำ PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาณ 2 ไมโครลิตร มาแยกขนาดของสายดีเอ็นเอบน 2% agarose gel ใน 1X Tris–Acetate–EDTA (TAE) buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 1-2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอกับ DNA marker จากนั้นนำ 2% agarose gel ไปย้อมสี ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพภายใต้เครื่อง UV-transilluminator

ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* เป็นสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิเคราะห์ผลของขนาดและจำนวนของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค AP-PCR และวิธีการวิเคราะห์หา VNTR และเปรียบเทียบความสามารถในการจำแนกความหลากหลายของสายพันธุ์ ของทั้ง 2 วิธี

2.2 การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) ของแต่ละวิธี

การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power; D) ทำโดยคำนวณหาค่าดัชนีของความหลากหลาย (diversity index) ตามวิธีของ Hunter and Gaston (Hunter and Gaston, 1988; Hunter, 1990) ซึ่งคำนวณค่า Simpson's index of diversity ตามสูตร ดังนี้

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} x_j(x_j - 1)$$

เมื่อ D = index of discriminatory power

N = จำนวนเชื้อทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ

S = จำนวนสายพันธุ์ (types) ที่จำแนกได้ทั้งหมด

x_j = จำนวนไอโซเลตที่พบในสายพันธุ์ (types) นั้นๆ (j^{th} type)

ในงานวิจัยนี้คำนวณค่า discriminatory power (D) ใช้เครื่องมือคำนวณ discriminatory power calculator จากเว็บไซต์: http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/?show= forura

ผลการศึกษา (Result)

1. การทดสอบยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus*

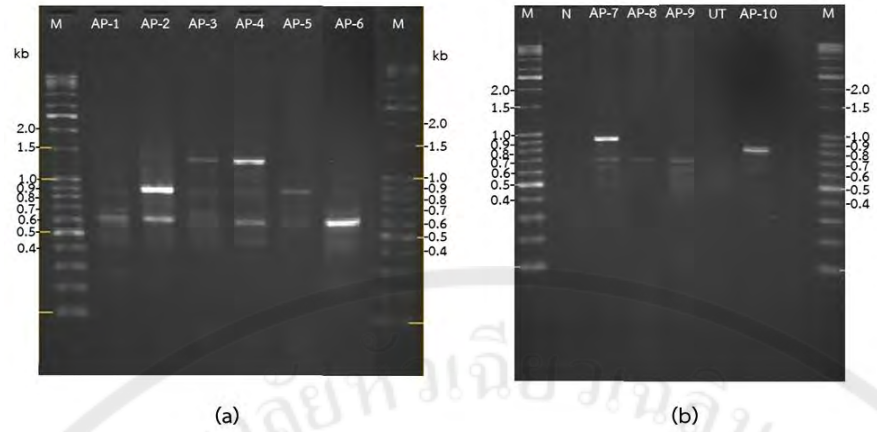
ผลการทดสอบด้วยชุดชีวเคมีพบว่าตัวอย่างเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยให้ผลการทดสอบเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 30 ไอโซเลต เชื้อทั้ง 30 ไอโซเลตนี้ให้ชื่อ Vp1 ถึง Vp30

2. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี AP-PCR

ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ random primer 2 ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าขนาดของ PCR product ที่ได้มีความหลากหลายระหว่าง 450 base pair ถึง 1,300 base pair และจำนวนของ PCR product ก็มีความหลากหลายตั้งแต่ 1 ถึง 5 product (ตารางที่ 1) ทำให้สามารถแยกเชื้อจำนวน 30 ไอโซเลตได้เป็น 10 สายพันธุ์ ได้แก่ AP-1, AP-2, AP-3, AP-4, AP-5, AP-6, AP-7, AP-8, AP-9 และ AP-10 (รูปที่ 1) สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ AP-2 พบทั้งสิ้น 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 23.3 (7/30) ในขณะที่สายพันธุ์ AP-3, AP-5, AP-8, AP-9 และ AP-10 พบเพียงสายพันธุ์ละ 1 ไอโซเลต นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่ไม่สามารถแยก สายพันธุ์ได้ (untypable) เนื่องจากไม่พบ PCR product จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ Vp11, Vp26, Vp28 และ Vp30 คิดเป็นร้อยละ 13.3 (4/30)

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 30 ไอโซเลตด้วยวิธี AP- PCR

รูปแบบ (type)	ขนาดของ PCR product (bp)	ไอโซเลต	จำนวน (ร้อยละ)
AP-1	450, 600. 700	Vp1, Vp19	2 (6.67)
AP-2	450, 600, 900	Vp2, Vp6, Vp10, Vp12, Vp13, Vp18, Vp20	7 (23.33)
AP-3	450, 600, 700, 900, 1300	Vp3	1 (3.33)
AP-4	450, 600, 900, 1300	Vp4, Vp7, Vp9, Vp14, Vp15, Vp23	6 (20)
AP-5	600, 900	Vp5	1 (3.33)
AP-6	450, 600	Vp8, Vp16, Vp17	3 (10)
AP-7	450, 600, 700, 900	Vp21, Vp22, Vp25	3 (10)
AP-8	700	Vp24	1 (3.33)
AP-9	400, 450, 600, 700	Vp27	1 (3.33)
AP-10	600, 850	Vp29	1 (3.33)
Untypable	No PCR product	Vp11, Vp26, Vp28, Vp30	4 (13.33)
total			30 (100)

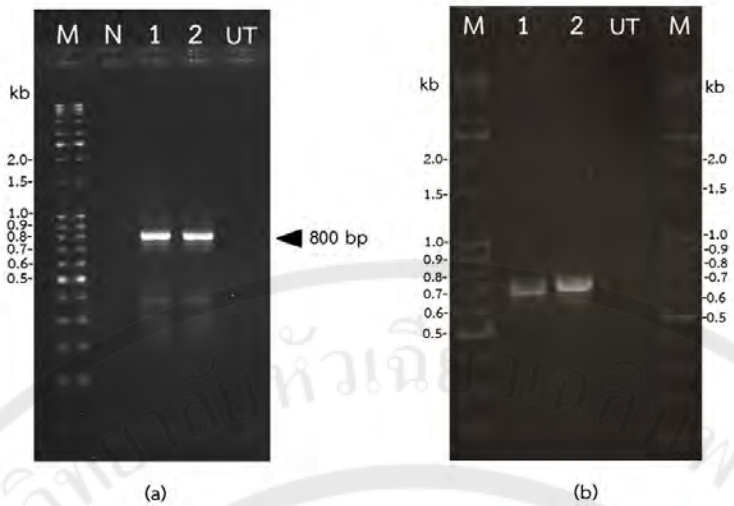


รูปที่ 1 Agarose gel electrophoresis แสดงผลของ AP-PCR ที่ใช้ random AP primer 2 จำนวน 10 patterns (AP-1 ถึง AP-10) และใช้ genomic DNA ของ *V. parahaemolyticus* เป็น DNA template UT แทนเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (untypable) M แทน VC DNA ladder mix และ N แทน negative control

3. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการวิเคราะห์ VNTR analysis

Tandem repeat 2 ตำแหน่ง (loci) ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยดูจากขนาด (consensus size) จำนวนซ้ำ (copy number) และ percent match ถูกเลือกนำมาศึกษา ตำแหน่งแรกอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ณ ตำแหน่ง (loci) 234842-234878 มี consensus size เท่ากับ 7 copy number เท่ากับ 5.36 และ percent match เท่ากับ 95 เมื่อนำมาทำการคัดเลือก primer ที่จำเพาะ ได้เป็น primer Vp1L1-F (5'-AGC GAT GCG TGA ACG TAC-3') และ Vp1L1-R (5'-CGG GAC CTG TGA TTG AAC-3') ที่มี PCR product ขนาด 794 base pair ส่วน tandem repeat ตำแหน่งที่สอง อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ณ ตำแหน่ง (loci) 2919153-2919178 มี consensus size เท่ากับ 7 copy number เท่ากับ 3.7 และ percent match เท่ากับ 100 เมื่อนำมาทำการคัดเลือก primer ที่จำเพาะ ได้เป็น primer Vp1L2-F (5'-AAT GGA GAG TTC ACC GAT GG-3') และ Vp1L2-R (5'-GCG ATT GTG CTA GTG AGT CG-3') ที่มี PCR product ขนาด 693 base pair

เมื่อนำ primer ที่จำเพาะไปเพิ่มจำนวน tandem repeat ตำแหน่งที่ 1 พบ PCR product เพียงขนาดเดียว คือ 794 base pair (รูปที่ 2a) ทำให้แยกเชื้อจำนวน 30 ไอโซเลต ได้เพียง 1 รูปแบบ (type) เรียกว่า type VN-1 โดยเชื้อที่ให้ PCR product มีเพียง 9 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 30 (9/30) และมีเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกรูปแบบได้ (untypable) เนื่องจากไม่ให้ PCR product ถึง 21 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 70 (21/30) เช่นเดียวกับตำแหน่งแรก primer ที่จำเพาะกับ tandem repeat ตำแหน่งที่สอง พบ PCR product เพียงขนาดเดียวคือประมาณ 693 base pair (รูปที่ 2b) ทำให้สามารถแยกเชื้อได้เพียง 1 รูปแบบ คือ type VN-2 โดยมีเชื้อ 1 ไอโซเลตที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (untypable) คิดเป็น ร้อยละ 10 (1/30)



รูปที่ 2 Agarose gel electrophoresis แสดง PCR product ที่ได้จากเทคนิค VNTR ใช้ primer Vp1L1-F และ Vp1L1-R (a) และ Vp1L2-F และ Vb1L2-R (b) และใช้ genomic DNA ของ *V. parahaemolyticus* เป็น DNA template สามารถจำแนกเชื้อได้เพียง 1 รูปแบบ เนื่องจากให้ PCR product เพียงขนาดเดียว (lane 1, 2) เชื้อที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (UT) คือเชื้อที่ไม่มี PCR product M แทน VC DNA ladder mix และ N แทน negative control

4. การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ

เมื่อทำการประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทั้งวิธี AP-PCR และ VNTR พบว่า การจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธี AP-PCR มีความสามารถในการจำแนก สายพันธุ์ (discriminatory power) สูงกว่าวิธี VNTR โดย discriminatory index ของ AP-PCR, VNTR ตำแหน่งที่ 1 และ VNTR ตำแหน่งที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0.87, 0 และ 0.07 ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผล (Conclusion and discussion)

V. parahaemolyticus เป็นเชื้อก่อโรคในอาหารที่สำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้งในอาหารทะเลและผู้ป่วยมีอุบัติการณ์การดื้อยาปฏิชีวนะ เช่น streptomycin เพิ่มขึ้น (Xie et al., 2017) ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เชื้อชนิดนี้สามารถแยกได้จากอาหารทะเล เช่น กุ้งที่ขายตามท้องตลาด (Letchumanan et al., 2014) สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นหนึ่งในผู้ผลิตและส่งออกกุ้งรายใหญ่ของโลก พบว่าสามารถแยก *V. parahaemolyticus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะได้จากกุ้งที่เพาะเลี้ยงไว้ในบ่อ (Yano et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มการระบาดของเชื้อในผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะพฤติกรรมของผู้บริโภคบางกลุ่มที่นิยมรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงไม่สุกและไม่สะอาด การศึกษาทางระบาดวิทยาจึงเป็นเครื่องมือหนึ่งในการควบคุมป้องกัน และเฝ้าระวังการติดเชื้อได้ โดยในการค้นหาสายพันธุ์ของเชื้อที่เป็นสาเหตุของการระบาด จำเป็นต้องอาศัยวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่ให้ผลถูกต้อง แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ การใช้วิธีการทางน้ำเหลืองวิทยา เช่น antiserum-based approach นั้นใช้เวลานาน และเสี่ยงต่อการเกิด cross-reaction (Letchumanan et al., 2014) ในขณะที่วิธีทางอณูชีววิทยามีการใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากรวดเร็ว และแม่นยำกว่าเพราะแยกความแตกต่างถึงระดับดีเอ็นเอ การศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 30 ไอโซเลต ด้วยวิธี AP-PCR และเทคนิคการวิเคราะห์หา VNTR พบว่าวิธี AP-PCR

สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ 10 รูปแบบ โดยรูปแบบ ส่วนใหญ่ที่พบคือ AP-2 (ร้อยละ 22.3) และ AP-4 (ร้อยละ 20) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามี PCR product ขนาด 450 bp และ 600 bp เกือบทุกรูปแบบ แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้อาจเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน ในส่วนของวิธีวิเคราะห์ VNTR ซึ่งหาความแตกต่างของ tandem repeat จำนวน 2 ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 สามารถแยกจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้เพียงตำแหน่งละ 1 รูปแบบ จึงสรุปได้ว่าในการศึกษานี้ วิธี AP-PCR มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่าการวิเคราะห์หา VNTR ซึ่งสอดคล้องกับค่าความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ (discriminatory index) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.87, 0 และ 0.07 ตามลำดับ

ฐากร เลียงครุฑ และคณะ (2553) ได้ทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลนครปฐม โดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค AP-PCR โดยใช้ random AP primer 4 กับเทคนิคการวิเคราะห์หา VNTR พบว่าเทคนิค AP-PCR สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจำนวน 30 ไอโซเลตได้ทั้งสิ้น 13 รูปแบบ แต่การวิเคราะห์หา VNTR สามารถจำแนกได้เพียง 1 รูปแบบ และในปี ค.ศ. 2007 Bhoopong และคณะ ได้ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากโรงพยาบาลหาดใหญ่จำนวน 629 ไอโซเลต ด้วยวิธี AP-PCR เปรียบเทียบกันระหว่าง random AP primer 2 และ AP primer 4 พบว่า AP primer 2 สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ดีกว่า โดยที่ AP primer 4 ไม่สามารถจำแนกเชื้อออกเป็นสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ (Bhoopong et al., 2007)

การจำแนกสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์หา VNTR พบว่า tandem repeat ตำแหน่งที่ 1 ที่เลือกมาสามารถจำแนกเชื้อได้เพียง 1 รูปแบบและมีเชื้อที่ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ (ไม่พบ PCR product) ถึง 21 ไอโซเลต เมื่อนำ tandem repeat ที่ตำแหน่งนี้ไปศึกษาพบว่าบริเวณที่เลือกเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ lipopolysaccharide O antigen regulator ซึ่งอาจพบในเชื้อบางสายพันธุ์เท่านั้น แสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง tandem repeat ที่เลือกยังไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ เพราะไม่คลอบคลุมเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์ ในขณะเดียวกัน tandem repeat ตำแหน่งที่ 2 ที่เลือกมา เมื่อนำมาศึกษาต่อพบว่าตำแหน่งนั้นเป็นส่วนหนึ่งของยีนที่แสดงออกเป็นโปรตีน glutathione peroxidase ซึ่งอาจเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserve) ของยีน ทำให้มีลำดับเบสเหมือนกันในเชื้อทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้ consensus size ของ tandem repeat ที่เลือกอาจสั้นเกินไป ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์ที่มี copy number ห่างกันเพียงเล็กน้อยได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป ควรเลือก tandem repeat ที่มี consensus size ที่มีความยาวเพียงพอที่จะสามารถแยกความแตกต่างได้ และควรใช้ tandem repeat มากกว่า 1 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มโอกาสในการจำแนกสายพันธุ์ ในปี ค.ศ. 2009 Harth-Chu และคณะ ได้ศึกษาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ระบาดในประเทศชิลีในช่วงปี ค.ศ. 1998 จำนวน 81 ไอโซเลต ด้วยการวิเคราะห์ VNTR โดยศึกษา VNTR 8 ตำแหน่งที่อ้างอิงจากงานของ Kimura และคณะในปี ค.ศ. 2008 และทำการวิเคราะห์ VNTR เพิ่มอีก 2 ตำแหน่ง พบว่าสามารถแยก VNTR pattern ที่แตกต่างกันทั้งสิ้น 59 รูปแบบ (Kimura et al., 2008; Harth-Chu et al., 2009)

จากการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าวิธี AP-PCR จะสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีกว่าการวิเคราะห์หา VNTR อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อด้อยคือให้ผล reproducibility ต่ำ เพราะใช้ random primer นอกจากนี้ขั้นตอนในการแปลผลค่อนข้างยาก เนื่องจาก PCR product มีความหลากหลายทั้งจำนวน และขนาด ในขณะที่การวิเคราะห์หา VNTR แม้จะมีความสามารถในการจำแนกต่ำ แต่มีความจำเพาะสูง เพราะใช้ specific

primer ที่จำเพาะกับเชื้อ ทั้งยังสามารถอ่านผลและแปลผลได้ง่ายกว่า และหากเราสามารถออกแบบ primer ได้มากกว่า 1 ตำแหน่งและนำมาใช้ร่วมกันแบบ multi locus อาจทำให้ความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ดีกว่าการใช้เพียงตำแหน่งเดียว อย่างไรก็ตามทั้งวิธี AP-PCR และ VNTR analysis ใช้เทคนิคที่ไม่ยุ่งยากและซับซ้อนมากนัก จึงเหมาะจะนำมาพัฒนาใช้ในงานด้านระบาดวิทยาได้

เอกสารอ้างอิง (Reference)

ฐากร เลียงครุธ, นิตยา ทมแก้ว, มัธธุรส โพธิ์ทอง, อานนท์ นัยยุติ. (2553). *การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Vibrio parahaemolyticus ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลนครปฐมโดยวิธีทางอณูชีววิทยา*. ภาคนิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์), มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.

พรทิพย์ พึ่งม่วง, พจมาน ผู้มีสัตย์, สุทัศน์ บุญยงค์. (2557). การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธีทางศึกษาทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี), 11*, 25-41.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2560). *สรุปผลการเฝ้าระวังโรคอาหาร เป็นพิษปี พ.ศ. 2560*. สืบค้นเมื่อ 19 พฤษภาคม 2560 เว็บไซต์: http://www.boemoph.go.th/boedb/d506_1/ds_wk2pdf.pphp?ds=03&yr=60.

Bhoopong, P., Palittapongarnpim, P., Pomwised, R., *et al*. (2007). Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolate from individual patients. *Journal of Clinical Microbiology, 45*(5), 1544-1550.

Harth-Chu, E., Espejo, R. T., Christen, R., Guzmán, C. A., & Höfle, M.G. (2009). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(12), 4079-4088.

Hunter, P. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology, 28*(9), 1903-1905.

Hunter, P. R., & Gaston MA. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology, 26*(11), 2465-2466.

Kimura, B., Sekine, Y., Takahashi, H., Tanaka, Y., Obata, H., Kai, A. et al. (2008). Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. Journal of Microbiological Methods, *72*, 313-320.

Letchumanan, V., Chan, K. G. , & Lee, L. H. (2014). *Vibiro pahrahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontier in Microbiology, 5*(705), doi:10.3389/fmicb.2014.00705.

Mala, W., Alam, M., Angkititrakul, S., Wongwajana, S., Lulitanond, V., Huttayananont, S. et al. (2016). Serogroup, virulence, and molecular traits of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical and cockle sources in northeastern Thailand. *Infection, Genetics and Evolution, 39*, 212-128.

Xie, T., Wu,, Q., Zhang, J., Xu, X., & Cheng, J. (2017). Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from aquatic products and clinical by antibiotic susceptibility, virulence, and molecular characterization. *Food control, 71*, 315-321.

Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban M., & Aue-Umneoy D. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of Vibrio species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in Thailand. Food Control 2014; 38:30-36.