



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ  
pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT  
โดยวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ  
Study on genetic diversity of  
pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT  
using DNA fingerprinting techniques

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร คณะวิทยาศาสตร์  
ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล คณะวิทยาศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI581208S

**ชื่อโครงการวิจัย** การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT โดยวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ  
Study on genetic diversity of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT using DNA fingerprinting techniques

**คณะนักวิจัย** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

## สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	i
รายการภาพ	ii
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อ	
ภาษาไทย	iv
ภาษาอังกฤษ	iv
บทสรุปผู้บริหาร	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
สรุปผลการทดลอง	4
เอกสารอ้างอิง	17
ภาคผนวก	
สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (reprint)	19
ผลงานวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์	21
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	23
บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (proceeding)	24

## รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ไพรเมอร์สำหรับการจำแนก <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาด	4
ตารางที่ 2	รายละเอียดของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาดที่ใช้ในการศึกษา	5
ตารางที่ 3	แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของ <i>V. parahaemolyticus</i>	6
ตารางที่ 4	รูปแบบการมียื่นก่อโรคของ <i>V. parahaemolyticus</i> จำนวน 46 สายพันธุ์	6
ตารางที่ 5	รายละเอียดของ VNTR loci	12
ตารางที่ 6	ไพรเมอร์สำหรับวิธี MLVA	12
ตารางที่ 7	PCR reaction สำหรับการทำให้ Multiplex MLVA	13
ตารางที่ 8	PCR condition สำหรับการทำให้ Multiplex MLVA	13
ตารางที่ 9	เปรียบเทียบคุณสมบัติของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR และ MLVA	15



## รายการภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	การสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin ของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนอาหาร Wagatsuma ที่ 35 ชั่วโมง	7
รูปที่ 2	การเคลื่อนที่แบบ twitching ของ <i>V. parahaemolyticus</i> ที่ย้อมด้วยสี crystal violet	7
รูปที่ 3	การเจริญของ <i>V. parahaemolyticus</i> บนอาหาร melted rich medium + 2, 2'-dipyridyl ที่มีฮีโมโกลบินความเข้มข้น 155 $\mu$ M of hemoglobin และไม่มีฮีโมโกลบิน	8
รูปที่ 4	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จาก วิธี AP2-PCR	9
รูปที่ 5	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จาก วิธี AP4-PCR	9
รูปที่ 6	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR	10
รูปที่ 7	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาดที่ได้จากวิธี PFGE	11
รูปที่ 8	Dendrogram สร้างจากรูปแบบ MLVA ของ <i>V. parahaemolyticus</i> สายพันธุ์ระบาด	14

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ SCI581208S

คณะผู้วิจัย

## บทคัดย่อ

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อในซีโรไทป์ O3:K6 ที่เป็นสาเหตุหลักของการระบาดทั่วโลก ปัจจุบันพบว่าสาเหตุของการระบาดเกิดจากซีโรไทป์ O1:K25 และ O1:K untypeable (KUT) ด้วย การศึกษาลักษณะของเชื้อและการประเมินเทคนิคใหม่ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจึงมีความจำเป็น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบรูปแบบการติดต่อยาปฏิชีวนะ และลักษณะที่เกี่ยวกับการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด ซีโรไทป์ O1:KUT, O1:K25 และ O3:K6 จำนวน 46 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2555 จากการศึกษาพบว่าเชื้อทั้งหมดติดต่อยา ampicillin และมีเชื้อจำนวน 7 (ร้อยละ 15) และ 1 (ร้อยละ 2) ไอโซเลท ติดต่อยา ciprofloxacin และ norfloxacin ตามลำดับที่น่าสนใจ คือ เชื้อมากกว่าร้อยละ 50 มีความไวในระดับปานกลางต่อยา ciprofloxacin และ/หรือ norfloxacin นอกจากนี้ยังพบการกระจายของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ type III secretion systems (T3SS1 และ T3SS2) และระบบ type VI secretion systems (T6SS1 และ T6SS2) ในเชื้อทุกซีโรไทป์ เชื้อทั้งหมดมีความสามารถในการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH) ได้ในระดับเดียวกัน เชื้อจำนวน 21 (ร้อยละ 46) และ 15 (ร้อยละ 33) ไอโซเลท มีความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ swarming และ twitching ตามลำดับในระดับสูง นอกจากนี้เชื้อจำนวน 45 ไอโซเลท สามารถใช้ฮีโมโกลบินเป็นแหล่งของธาตุเหล็กเพียงอย่างเดียวได้ โดยเชื้อมากกว่าร้อยละ 80 ของทั้งหมดสามารถเจริญในสภาวะที่มีฮีโมโกลบินในระดับความเข้มข้นต่ำเพียง 50 ไมโครโมลาร์ การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของรูปแบบการติดต่อยาปฏิชีวนะ และลักษณะที่เกี่ยวกับการก่อโรคในเชื้อที่มีซีโรไทป์ต่างกัน

ปัจจุบันมีข้อจำกัดของซีรัมที่ใช้ในการจำแนก K antigen จึงทำให้ไม่สามารถบ่งชี้แหล่งที่มาของเชื้อซีโรไทป์ KUT เพื่อศึกษาทางระบาดวิทยาได้ เทคนิคอณูชีวโมเลกุลจึงมีความจำเป็นในการจำแนกเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าว การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค arbitrarily primed PCR (AP2-PCR และ AP4-PCR) และเทคนิค enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) เป็นเทคนิคที่มีความละเอียดต่ำในการจำแนก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด ส่วนเทคนิค pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ไม่สามารถจำแนกเชื้อซีโรไทป์ O1:KUT ซึ่งแยกได้ในระหว่างปี พ.ศ. 2544-2548 ได้ การศึกษานี้จึงได้พัฒนาเทคนิค multiplex multiple-locus variable-number tandem repeat (MLVA) เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ โดยตรวจสอบจำนวนซ้ำของลำดับเบสบนโครโมโซมที่มีความผันแปร (variable number of tandem repeat; VNTR) จำนวน 4 ตำแหน่ง พบรูปแบบ MLVA ที่แตกต่างกัน 38 รูปแบบ มีค่า Nei's genetic diversity indices (DI) ของ VNTR ทั้ง 4 อยู่ระหว่าง 0.83-0.92 การศึกษาความเสถียรพบว่า TR2 มีความผันแปรไป เมื่อผ่านการ subculture และสภาวะเครียด เทคนิค MLVA ที่พัฒนาขึ้นสามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อซีโรไทป์ O1:KUT ที่มีรูปแบบ PFGE เหมือนกันออกจากกันได้ มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อ (D=0.99) สูงกว่าเทคนิค PFGE (0.52) มีความสามารถสูงกว่าเทคนิค PFGE ในการจำแนก *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O1:KUT สายพันธุ์ระบาด และมีความรวดเร็วกว่าเทคนิคอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอในครั้งนี้

การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงการติดต่อยาปฏิชีวนะและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคที่หลากหลายของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด โดยเฉพาะเชื้อซีโรไทป์ O1:KUT ซึ่งมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางระบาดวิทยาของเชื้อในอนาคต อีกทั้งเทคนิค multiplex MLVA ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถนำมาใช้เฝ้าระวังและตรวจสอบการระบาดของเชื้อได้ต่อไป

## Abstract

*Vibrio parahaemolyticus* is one of the important causative agents of gastroenteritis, especially O3:K6 serotype which is considered as a pandemic serotype disseminated worldwide. Recently, the outbreaks of *V. parahaemolyticus* infection occurred not only by O3:K6 serotype but also its serovariants, O1:K25 and O1:KUT (untypeable). It is imperative to explore their characteristics, and evaluate the novel method to discriminate the strains. In this study, A total of 46 pandemic *V. parahaemolyticus* isolates serotypes O1: KUT, O1:K25, and O3:K6 obtained from diarrhea patients in Hat Yai hospital, Songkhla during 2001-2012 were examined for their antimicrobial resistance profiles and virulence characteristics. Resistant towards ampicillin, ciprofloxacin and norfloxacin were found in all (100%), 7 (15%) and 1 (2%) isolates, respectively. Interestingly, more than 50% of the isolates were found to be intermediated susceptibility to ciprofloxacin and/or norfloxacin. The virulence-associated genes encoding type III secretion systems (T3SS1 and T3SS2), and type VI secretion systems (T6SS1 and T6SS2) were widely distributed among the isolates in all serotypes. All isolates were able to produce the similar level of thermostable direct hemolysin (TDH). Of 46 isolates, 21 (46%) and 15 (33%) displayed high level of swarming and twitching motilities, respectively. All isolates except one were able to use hemoglobin as the only iron source. More than 80% of the isolates were able to grow in iron-depleted medium under hemoglobin concentration as low as 50  $\mu$ M. There was no difference in the antimicrobial resistance profiles and virulence characteristics observed among different serotypes.

Due to the limitation of established K antisera, tracking the sources of KUT for epidemiological investigation is not available. Therefore, the effective molecular typing is required in order to discriminate the strains. This study demonstrated that arbitrarily primed PCR (AP2-PCR and AP4-PCR) and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) exhibited low resolution for typing among pandemic *V. parahaemolyticus* isolates. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), a gold standard method, showed low ability to discriminate among O1:KUT isolates obtained during 2001-2005. This study develops a multiplex multiple-locus variable-number tandem repeat (MLVA) assay for strain typing based on the analysis of 4 variable number of tandem repeat (VNTR) loci. MLVA analysis of *V. parahemolyticus* isolates generated 38 distinct profiles. The Nei's genetic diversity indices (DI) of the 4 VNTR loci ranged from 0.83-0.92. For stability study, some variations in TR2 were found after multiple subcultures and in stress conditions. In this work, MLVA resolved the isolates of O1:KUT obtained in 2001-2005 with identical PFGE patterns into unique profiles. The multiplex MLVA developed in this study has higher discriminatory power ( $D=0.99$ ) than PFGE (0.52), and is superior to PFGE for distinction pandemic *V. parahaemolyticus* including O1:KUT isolates. In addition, MLVA is more rapid than other typing methods used in this study.

This study highlight the antimicrobial resistant and multiple virulence characteristics among pandemic *V. parahaemolyticus* isolates which will be useful for further epidemiological and clinical investigations of this organism. In addition, the MLVA typing technique developed in this study would significantly contribute to surveillance and outbreak investigation of pandemic *V. parahaemolyticus*.

## บทนำ

*V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของ โรคอาหารเป็นพิษ หรือ ภาวะอาหารและลำไส้ อักเสบ การก่อโรคของเชื้ออาศัยปัจจัยก่อโรคที่สำคัญ คือ thermostable direct haemolysin (TDH) และ thermostable direct haemolysin-related haemolysin (TRH) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *tdh* และ ยีน *trh* ตามลำดับ (Nair *et al.*, 2007) *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคอาหารเป็นพิษ ในหลายประเทศแถบทวีปเอเชีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย โดยในประเทศไทยพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ของโรคอาหารเป็นพิษมาตลอด ในปี พ.ศ. 2540-2545 มีรายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* คิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยทั้งหมดตามลำดับ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) และจากสรุปรายงาน การเฝ้าระวังโรค ของสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปีต่อ ๆ มา พบว่าอัตราผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษมีจำนวนลดลง แต่ยังคงพบผู้ป่วยจาก *V. parahaemolyticus* มากที่สุด ส่วนข้อมูลเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษล่าสุด ช่วงเดือน มกราคม – เดือน กรกฎาคม 2558 พบผู้ป่วยโรค อาหารเป็นพิษ จำนวน 70,994 ราย โดยมีสาเหตุหลักจาก *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* รองลงมาคือ *Staphylococcus*

ปัจจุบันการจัดกลุ่มเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใช้วิธี serotyping โดยอาศัยลักษณะของ somatic (O) antigen และ capsular (K) antigen ปัจจุบัน *V. parahaemolyticus* มีจำนวนทั้งหมด 75 ซีโรไทป์ (Ishibashi *et al.*, 2000) ซึ่งสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ (pandemic) ในหลาย ๆ ประเทศ คือ *V. parahaemolyticus* O3:K6 โดยพบการระบาดครั้งใหญ่ ในปี พ.ศ. 2539 ณ เมือง Calcutta ประเทศอินเดีย และพบการระบาดอย่างต่อเนื่องไปยังหลาย ๆ ประเทศ แถบทวีปเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน รวมทั้งพบการระบาดข้ามทวีปไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาจึงจัดได้ว่า *V. parahaemolyticus* O3:K6 นี้เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาด (pandemic strain) ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นเชื้อที่มียีน *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* (*tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>) และให้ผลบวกกับ group specific-PCR (GS-PCR) ซึ่งใช้ยีน *toxRS* operon เป็นยีนเป้าหมาย (Matsumoto *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม ต่อมามีการ รายงานถึงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่นที่ให้ผล GS-PCR บวก ได้แก่ O4:K68, O1:KUT (untypeable) และ O1:K25 โดยซีโรไทป์เหล่านี้มีลำดับของ *toxRS* operon, รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี arbitrarily primed-PCR (AP-PCR), ribotyping และ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ที่เหมือนกับซีโรไทป์ O3:K6 (Nair *et al.*, 2007) และยังพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่น ๆ ที่มีลักษณะจีโนมไทป์เหมือนกับ O3:K6 เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เชื้อทั้งหมดมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงตรงส่วนของ antigen เพื่อตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (host) (Chowdhury *et al.*, 2004)

ผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลหาดใหญ่ จ.สงขลา ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2548 พบว่าส่วนใหญ่มีสาเหตุจากการติดเชื้อในซีโรไทป์ O3:K6, O4:K68, O1:KUT และ O1:K25 (Wootipoom *et al.*, 2007) ต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2549-2553 กลับไม่พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อซีโรไทป์ O4:K68 และ O1:K25 (Thongjun *et al.*, 2013) แต่ยังคงพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อซีโรไทป์ O1:KUT อยู่ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ประชาชนในพื้นที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ของเชื้อซีโรไทป์เดิม (O3:K6, O1:K25 และ

O4:K68) การที่ไม่สามารถระบุชนิดของ K antigen ได้นี้ อาจเป็นเพราะข้อจำกัดของ antisera มาตรฐานที่ขายเป็นการค้า ส่งผลให้การติดตามทางระบาดวิทยาทำได้ยากเนื่องจากไม่ทราบชนิดของ K antigen ที่แท้จริง ทั้งนี้ K antigen ของเชื้อเหล่านั้น อาจเป็นคนละชนิด หรือชนิดเดียวกันก็ได้ ดังนั้น การพัฒนาวิธีในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันและเฝ้าระวังการติดเชื้อ

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสามารถอธิบายความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้ เช่น แหล่งที่มา, ความสามารถในการก่อโรค และการดื้อยาปฏิชีวนะ มีรายงานจำนวนมากศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3: K6 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกอย่างรุนแรง อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉพาะเจาะจงไปที่เชื้อในซีโรไทป์ O1:KUT ยังมีน้อยมาก โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* นิยมศึกษาด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น AP-PCR, เทคนิค Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) โดยมี เทคนิค PFGE ที่ เป็น gold standard method (Okura *et al.*, 2003, Nair *et al.*, 2007) เทคนิค AP-PCR, ERIC-PCR และ PFGE มีข้อดี-ข้อเสียแตกต่างกัน โดย AP-PCR และ ERIC-PCR เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่ความสามารถในการทำซ้ำและการจำแนกต่ำ ส่วน PFGE ก็มีค่าใช้จ่ายและการลงทุนสูง, ใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ, ใช้ระยะเวลาและอุปกรณ์ที่เฉพาะ ซึ่งในบางห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อจากบริเวณของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน หรือ short sequence repeats (SSR) หรือ microsatellite (Jeffreys *et al.*, 1985) หรือ variable number of tandem repeats (VNTR) (Nakamura *et al.*, 1987) โดยอาศัยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับซ้ำที่เกิดจากการปรับตัวของแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อม โดยพบว่ายีนใดที่มีหน่วย SSR แทรกอยู่จะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่ายีนที่ไม่มี SSR แทรก และอาจทำให้แบคทีเรียมีการปรับเปลี่ยนความสามารถในการก่อโรคที่เหมาะสมกับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Peak *et al.*, 1996, van Belkum *et al.*, 1998) ด้วยเหตุที่ VNTR มีความผันแปรในระดับพันธุกรรมค่อนข้างสูง แม้จะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันแต่คนละสายพันธุ์กันก็อาจมีหน่วยซ้ำใน VNTR แตกต่างกันได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิค multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) ขึ้นมาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้วิธี PCR ซึ่งอาศัย primers ที่ครอบคลุมบริเวณ VNTR หลาย ๆ ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจสอบขนาด VNTR ด้วยวิธี gel electrophoresis จะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ (van Belkum *et al.*, 1998, Vogler *et al.*, 2006) วิธี MLVA จัดเป็นวิธีที่สะดวก, มีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่าย ทั้งนี้มีรายงานการใช้ VNTR ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในอาหารรวมถึงเชื้อก่อโรคติดต่อทางน้ำแล้ว เช่น *Escherichia coli* O157:H7 (Lindstedt *et al.*, 2004b) *Pseudomonas aeruginosa* (Onteniente *et al.*, 2003) และ *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium (Lindstedt *et al.*, 2004a) นอกจากนี้ยังมีการนำวิธีนี้มาวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Neisseria meningitidis* (Schouls *et al.*, 2006), *Listeria monocytogenes* (Lindstedt *et al.*, 2008), *Mycobacterium tuberculosis* (Valcheva *et al.*, 2008) และ *V. parahaemolyticus* (Harth-Chu *et al.*, 2009)

การศึกษา *V. parahaemolyticus* O3: K6 ด้วยเทคนิค MLVA พบว่า เทคนิคนี้มีความละเอียดและความสามารถในการทำซ้ำสูง (Kimura *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งทำการศึกษาความหลากหลายของ O3:K6, O4:K68 และ O1:K25 ร่วมกับ O1:KUT จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยเทคนิค PFGE และ AP-PCR พบว่า เชื้อสายพันธุ์ O1:KUT จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ O3:K6, O4:K68 และ O1:K25 (Okura *et al.*, 2003) และมีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* O1:KUT มีต้นกำเนิดมาจาก *V. parahaemolyticus* O3: K6 ที่เป็นสายพันธุ์ระบาด (Nair *et al.*, 2007) แม้ว่าจะมีการศึกษาเชื้อสายพันธุ์ O1:KUT ร่วมกับสายพันธุ์อื่น ๆ โดยเทคนิคต่าง ๆ แต่ข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่มีความละเอียดเพียงพอต่อการศึกษาระบาดวิทยาของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT และยังไม่เคยมีการศึกษาความเสถียรของ VNTR ตำแหน่งต่าง ๆ ในเชื้อที่กล่าวมา

งานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี MLVA และนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O1:KUT โดยศึกษาร่วมกับซีโรไทป์อื่น ๆ ที่เป็นเชื้อสายพันธุ์ระบาด การศึกษารูปแบบ VNTR ตำแหน่งต่าง ๆ ของเชื้อในครั้งนี้ และการพัฒนาเทคนิค MLVA จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* ต่อไป

**ระยะเวลาวิจัย** 2 ปี (ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560)

**แหล่งทุนสนับสนุน** ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ประเภทงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558  
สัญญาเลขที่ SCI581208S

#### **วัตถุประสงค์**

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค MLVA มาใช้ในการจำแนก pandemic *V. parahaemolyticus* O1:KUT โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์กับวิธี AP-PCR, ERIC-PCR และใช้วิธี PFGE เป็นวิธีมาตรฐาน
2. เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของ VNTR ของ pandemic *V. parahaemolyticus* O1:KUT

## สรุปผลการทดลอง

**ตอนที่ 1** การตรวจสอบลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด**1. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ (CLSI, 2012)**

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion โดยใช้ยาปฏิชีวนะจำนวน 6 ชนิด คือ ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), norfloxacin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), cotrimoxazole (25 µg) และ tetracyclin (30 µg) ผลการตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์ที่ต่อยา ampicillin และเชื้อจำนวนร้อยละ 60.9 ไวปานกลางต่อยา ciprofloxacin และที่น่าสนใจคือ มีเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ที่ต่อยาปฏิชีวนะมากถึง 3 ชนิด (ampicillin, norfloxacin และ ciprofloxacin) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ จำนวน ร้อยละ 95.7, 76.1 และ 97.8 ยังคงไวต่อ ยา chloramphenicol, norfloxacin และ cotrimoxazole ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ ไวต่อยา tetracycline จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ยังคงไวต่อ ยา chloramphenicol, norfloxacin และ cotrimoxazole อย่างไรก็ตามเชื้อจำนวนมากเริ่มให้ผล ไวปานกลางต่อยา norfloxacin และ ciprofloxacin ซึ่งใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับระบบ ทางเดินอาหาร จึงควรระมัดระวังการใช้ยาดังกล่าวให้มากขึ้น เนื่องจากอาจส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อได้ในอนาคต (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 1** ไพรเมอร์สำหรับการจำแนก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด

Target genes	PCR primer and sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>toxR</i>	tox R-F: 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' toxR-R: 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'	368	(Kim <i>et al.</i> , 1999)
GS-PCR	GS-VP.1: 5'-TAATGAGGTAGAAACA-3' GS-VP.2: 5'-ACGTAACGGGCCTACA-3'	651	(Matsumoto <i>et al.</i> , 2000)
<i>tdh</i>	tdh1 :5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3' tdh2 : 5'-CCACTACCACTCTCATATGC-3'	251	(Tada <i>et al.</i> , 1992)
<i>trh</i>	trh-F: 5'- GGCTCAAATGGTTAAGCG - 3' trh-R: 5'- CATTTCGCTCTCATATGC - 3'	250	(Tada <i>et al.</i> , 1992)



ตารางที่ 2 รายละเอียดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับชาติที่ใช้ในการศึกษา

Serotype	Year of isolation	No. of isolates	strain	Presence of gene		GS-PCR result
				<i>tdh</i>	<i>trh</i>	
Pandemic (46)						
O1:KUT	2001	1	PSU291	+	—	+
	2002	5	PSU732, PSU736, PSU748, PSU751, PSU752	+	—	+
	2003	2	PSU938, PSU974	+	—	+
	2004	4	PSU1297, PSU1352, PSU1601, PSU1918	+	—	+
	2005	3	PSU2030, PSU2453, PSU2487	+	—	+
	2006	2	PSU3031, PSU3460	+	—	+
	2008	2	PSU3916, PSU3972	+	—	+
	2009	7	PSU4792, PSU4793, PSU4915, PSU4918, PSU4994, PSU4998, PSU5009	+	—	+
	2011	5	PSU5126, PSU5139, PSU5140, PSU5150, PSU5221	+	—	+
	2012	1	PSU5291	+	—	+
O1:K25	2003	2	PSU1031, PSU1032	+	—	+
	2006	1	PSU2667	+	—	+
	2008	5	PSU3866, PSU3880, PSU3894, PSU3939, PSU3949	+	—	+
O3:K6	2008	6	PSU3868, PSU3872, PSU3887, PSU3892, PSU3896, PSU3921	+	—	+

ตารางที่ 3 แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *V. parahaemolyticus*

Antimicrobial agent	Pandemic <i>V. parahaemolyticus</i> (n=46)		
	No. (%) of R	No. (%) of I	No. (%) of S
Ampicillin (AMP)	46 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Chloramphenicol (CHL)	0 (0.0)	2 (4.3)	44 (95.7)
Norfloxacin (NOR)	1 (2.2)	10 (21.7)	35 (76.1)
Ciprofloxacin (CIP)	7 (15.2)	28 (60.9)	11 (23.9)
Cotrimoxazole (CO)	0 (0.0)	1 (2.2)	45 (97.8)
Tetracycline (TET)	0 (0.0)	0 (0.0)	46 (100.0)

<sup>1</sup>R, resistant; I, intermediate; S, susceptible

<sup>2</sup>AMP, ampicillin; C, chloramphenicol; NOR, norfloxacin; C, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TE, tetracycline

## 2. การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคใน *V. parahaemolyticus* จำนวน 46 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อจำนวนร้อยละ 57 มียีนก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับ T3SSs และ T6SSs ทุกยีนที่ตรวจสอบ ได้แก่ *vcrD1*, *vcrD2*, *vopQ*, *vopC*, *vipA1* และ *vipA2* โดยเชื้อที่เหลือจำนวนร้อยละ 47 พบยีนดังกล่าวอย่างน้อย 4 ยีน (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นศักยภาพในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus*

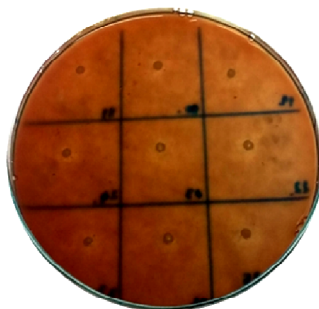
ตารางที่ 4 รูปแบบการมียีนก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 46 สายพันธุ์

Detection of virulence genes						No. of isolates (%)
T3SS1		T3SS2		T6SS1	T6SS2	
<i>vcrD1</i>	<i>vopQ</i>	<i>vcrD2</i>	<i>vopC</i>	<i>vipA1</i>	<i>vipA2</i>	
+	+	+	+	+	+	26 (57%)
+	+	+	+	+	-	8 (18%)
+	+	-	+	+	+	1 (2%)
+	+	+	+	-	+	2 (4%)
+	+	+	-	+	+	1 (2%)
+	+	+	+	-	-	1 (2%)
+	+	-	+	+	-	1 (2%)
-	+	+	+	+	+	3 (7%)
-	+	+	+	+	-	1 (2%)
+	+	-	+	-	-	1 (2%)
+	+	-	-	-	+	1 (2%)

+: พบยีนก่อโรค; -: ไม่พบยีนก่อโรค

### 3. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH)

ผลการทดสอบบนอาหาร Wagatsuma agar พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Wagatsuma agar ได้ แสดงให้เห็นความสามารถในการสร้างสารพิษ TDH ของเชื้อ โดยโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารที่เวลา 35 ชั่วโมง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 8.2 – 14.6 มิลลิเมตร (รูปที่ 1)



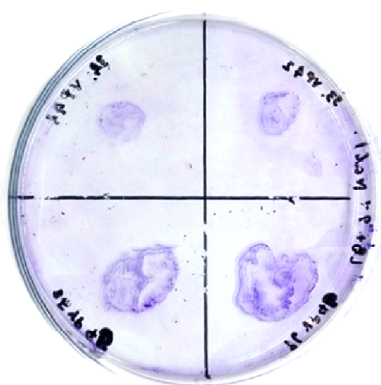
รูปที่ 1 การสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin ของ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร Wagatsuma ที่ 35 ชั่วโมง

### 4. การตรวจหาความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ swarming

*V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ swarming ที่แตกต่างกัน โดยที่เวลา 8 ชั่วโมง พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารระหว่าง 8.0-49.4 มิลลิเมตร

### 5. การตรวจหาความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ twitching

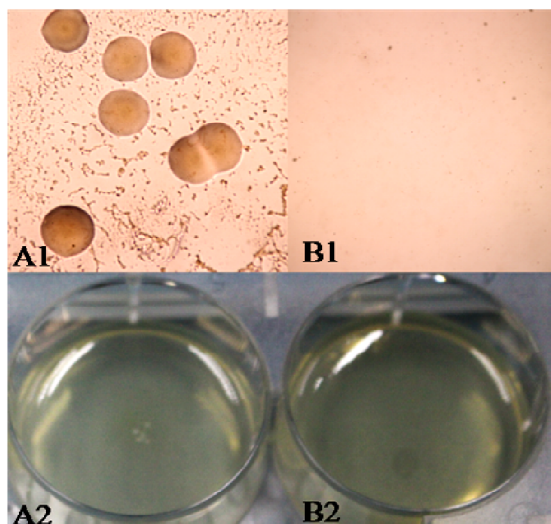
*V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ twitching ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2) โดยมีระยะของการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 4–34 มิลลิเมตร



รูปที่ 2 การเคลื่อนที่แบบ twitching ของ *V. parahaemolyticus* ที่ย้อมด้วยสี crystal violet

## 6. การตรวจสอบความสามารถในการใช้เหล็ก

การตรวจสอบความสามารถในการใช้เหล็ก (ฮีโมโกลบิน) ที่ความเข้มข้น 155 และ 50  $\mu\text{M}$  พบว่า เชื้อมีความสามารถในการใช้ฮีโมโกลบินแตกต่างกัน (รูปที่ 3) โดยเชื้อส่วนใหญ่จำนวนร้อยละ 83 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีฮีโมโกลบินทั้ง 2 ความเข้มข้น และมีเชื้อจำนวนร้อยละ 11 เจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 155  $\mu\text{M}$  เท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่า มีเชื้อร้อยละ 1 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีฮีโมโกลบินทั้ง 2 ความเข้มข้น

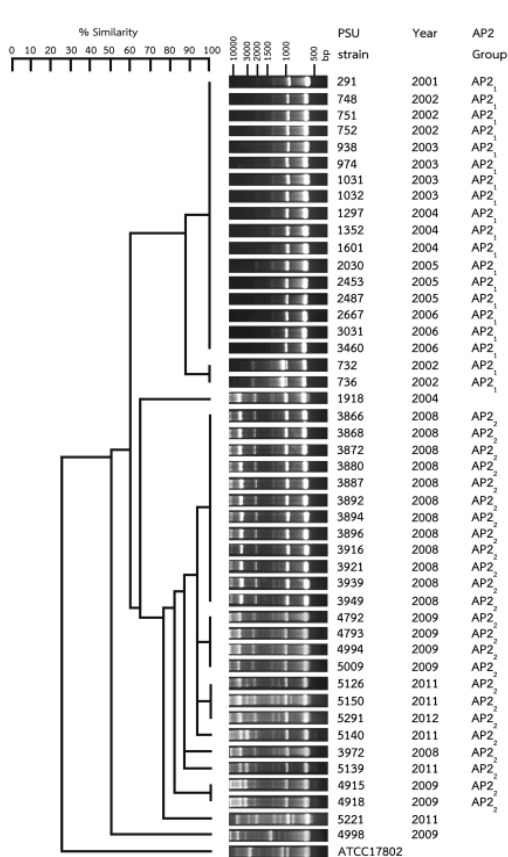


รูปที่ 3 การเจริญของ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร melted rich medium + 2, 2'-dipyridyl ที่มีฮีโมโกลบินความเข้มข้น 155  $\mu\text{M}$  of hemoglobin (A1: 10X; A2: 1X) และไม่มีฮีโมโกลบิน (B1: 10X; B2: 1X)

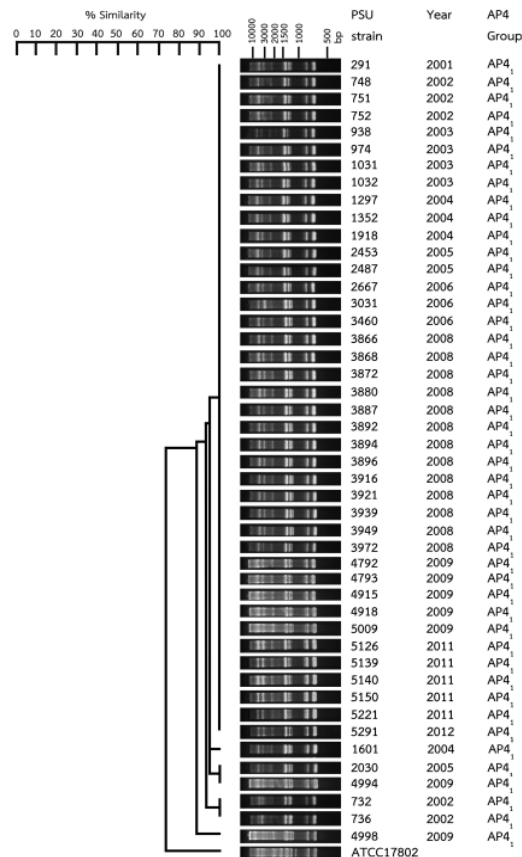
## ตอนที่ 2 การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด โดยเทคนิค AP-PCR, ERIC และ PFGE

### 1. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 4-12 และ 7-11 แถบ ตามลำดับ การจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่าเทคนิค AP2-PCR มีความสามารถในการจำแนกเชื้อสูงกว่าเทคนิค AP4-PCR (รูปที่ 4 และ 5) โดยที่ความเหมือนร้อยละ 80 เทคนิค AP2-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 2 กลุ่ม (AP<sub>2</sub><sub>1</sub> และ AP<sub>2</sub><sub>2</sub>) ส่วนเทคนิค AP4-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เพียง 1 กลุ่มเท่านั้น (AP<sub>4</sub><sub>1</sub>) ค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของเทคนิค AP2-PCR (1.00, 0.57-0.79) มีค่าสูงกว่า AP4-PCR (1.00, 0.00-0.24) โดยเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR ใช้เวลาในการจำแนกเชื้อค่อนข้างนาน คือ ประมาณ 17 ชั่วโมง 30 นาที (ตารางที่ 9)



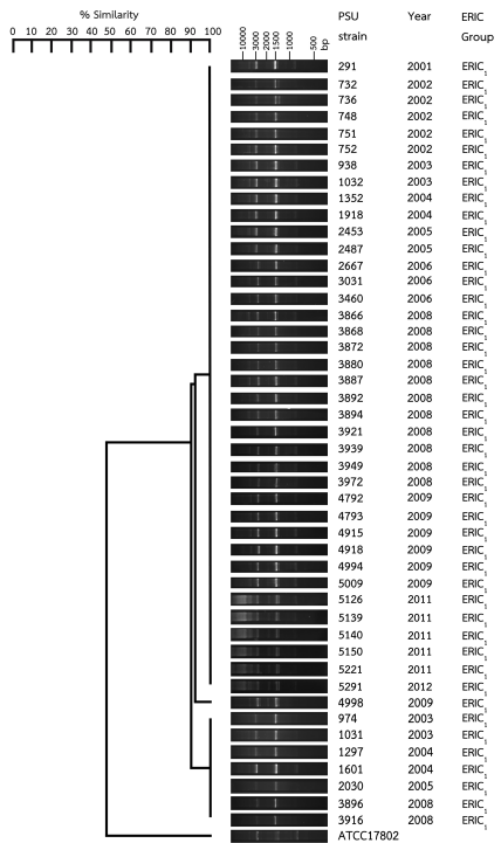
รูปที่ 4 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี AP2-PCR



รูปที่ 5 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี AP4-PCR

2. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค ERIC-PCR ในการจำแนก *V. parahaemolyticus*

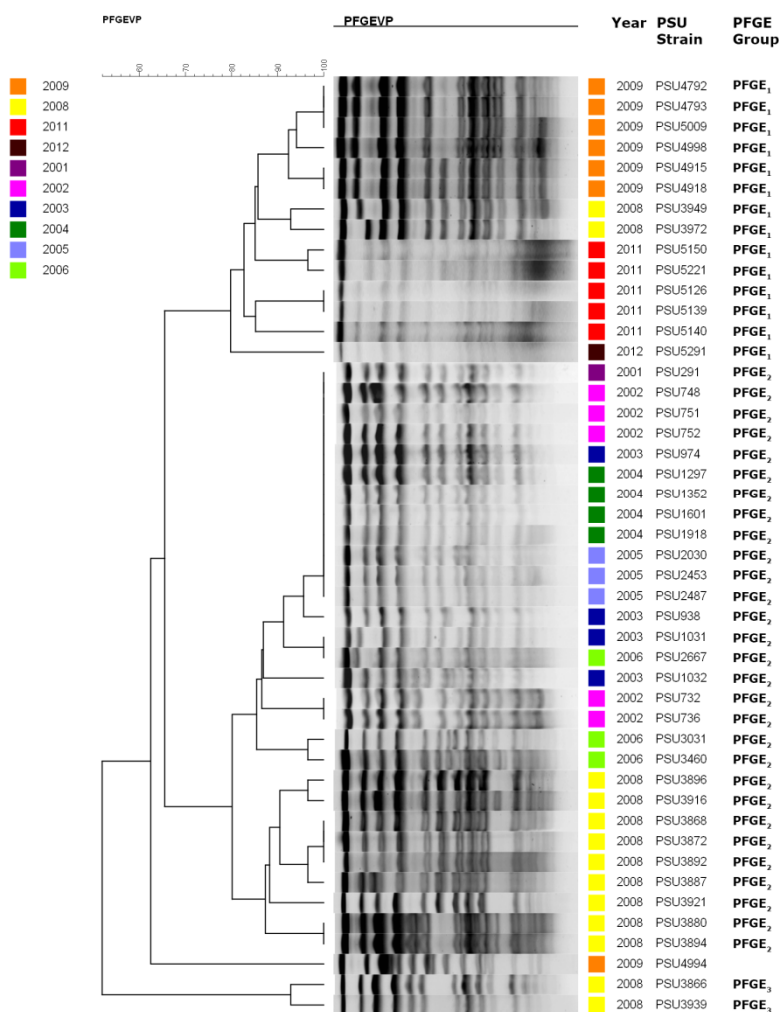
เทคนิค ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 5-11 แถบ การจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่าเทคนิค ERIC-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เพียง 1 กลุ่มเท่านั้น (ERIC<sub>1</sub>) (รูปที่ 6) ค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของเทคนิค ERIC-PCR เท่ากับ 1.00 และ 0.00-0.30 ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาเท่ากับ 12 ชั่วโมง 5 นาที (ตารางที่ 9)



รูปที่ 6 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR

3. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค PFGE ในการจำแนก *V. parahaemolyticus*

เทคนิค PFGE ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 10-13 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง <math>48.5-727.5\text{ kb}</math> แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีรูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อบางส่วนที่เหมือนกัน (รูปที่ 7) การจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่าเทคนิค PFGE สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 3 กลุ่ม (PFGE<sub>1</sub>, PFGE<sub>2</sub> และ PFGE<sub>3</sub>) ค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของเทคนิค PFGE เท่ากับ 1.00 และ 0.520-93 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเทคนิค PFGE มีระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษานานที่สุด คือ 26 ชั่วโมง 42 นาที (ตารางที่ 9)



รูปที่ 7 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดที่ได้จากวิธี PFGE

### ตอนที่ 3 การพัฒนาเทคนิค multiplex MLVA เพื่อศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด

#### 1. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VNTR และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี MLVA

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VNTR ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณสมบัติตรงตามที่ต้องการจำนวน 5 รูปแบบคือ TR1, TR2, TR3, TR4 และ TR5 ซึ่งเมื่อทำการ blast กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่า ส่วนของ TR1 และ TR3 แทรกอยู่ในส่วนของ non-coding region ส่วน TR2, TR4 และ TR5 แทรกอยู่ในส่วนของ hypothetical protein นอกจากนี้ยังพบว่า ส่วนของ VNTR markers ที่นำมาตรวจสอบมีตำแหน่งอยู่บนทั้งโครโมโซม 1 และ 2 ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 โดยส่วนของ TR1, TR2 และ TR4 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 และ ส่วนของ TR3 และ TR5 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 2 (ตารางที่ 5)

ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ที่จำเพาะกับ VNTR marker ทั้ง 5 รูปแบบ (ตารางที่ 6) และพบว่าไพรเมอร์ทั้งหมด ยกเว้นไพรเมอร์ TR5 สามารถเพิ่มจำนวน VNTR markers ของเชื้อทั้งหมดได้ และมีรูปแบบของ MLVA ที่หลากหลาย โดยเชื้อส่วนใหญ่ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ TR5 ดังนั้นในขั้นตอน MLVA จึงใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่เท่านั้น คือ TR1, TR2, TR3 และ TR4

ตารางที่ 5 รายละเอียดของ VNTR loci

VNTR loci	Repeat motif	Unit length (bp)	Copy number	Function	Chromosome
TR1	AGGTTCT	7	11.1	Non-coding region	1
TR2	GCTCTG	6	21.5	Hypothetical protein	1
TR3	CAGCTAAA	8	22.8	Non-coding region	2
TR4	ATAGAG	6	28.2	Hypothetical protein	1
TR5	TCTGGC	6	21.5	Hypothetical protein	2

ตารางที่ 6 ไพรเมอร์สำหรับวิธี MLVA

VNTR locus	F-primer sequence (5'→3')	R-primer sequence (5'→3')	Expected amplicon size (bp) <sup>a</sup>
TR1	GTGACGGCTGGTCAGAAGAT	TTCACGCCAACTTCCTCAAC	130
TR2	AGTTGCGGTGCGTAGTTTTTC	TCGCTCAGGAGCTATCCTCT	190
TR3	TTCACGGGTAAAAACACCAT	GCTGTGGTCTTTGTGTACGG	233
TR4	TCAGCCAGACACTCCATACAA	GGAAGACATATCCGGTTTGC	214
TR5	CTCTGCGTATTGCATCTGGA	GCAGGCGCTTGATGATTACT	229



## 2. การพัฒนาวิธี multiplex PCR สำหรับ MLVA

จากการทดลองสามารถปรับความเข้มข้นของส่วนประกอบใน PCR reaction และปรับสภาวะในการทำ PCR เพื่อให้เหมาะกับการทำงานของ primer ทั้ง 4 ชุดพร้อมกัน (multiplex PCR) ได้ ดังแสดงใน ตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 PCR reaction สำหรับการทำ Multiplex MLVA

PCR reaction	Final Conc.	μl /reaction
10X Buffer	1X	6.0
2.5mM dNTPs	0.20 mM	2.4
4μM PrimerTR1-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR1-R	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR2-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR2-R	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR3-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR3-R	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR4-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR4-R	0.2μM	1.5
5U/μl <i>Taq</i> polymerase	0.5 U	0.1
Template DNA	-	2.0
Water	-	7.5
Total volume	-	30.0

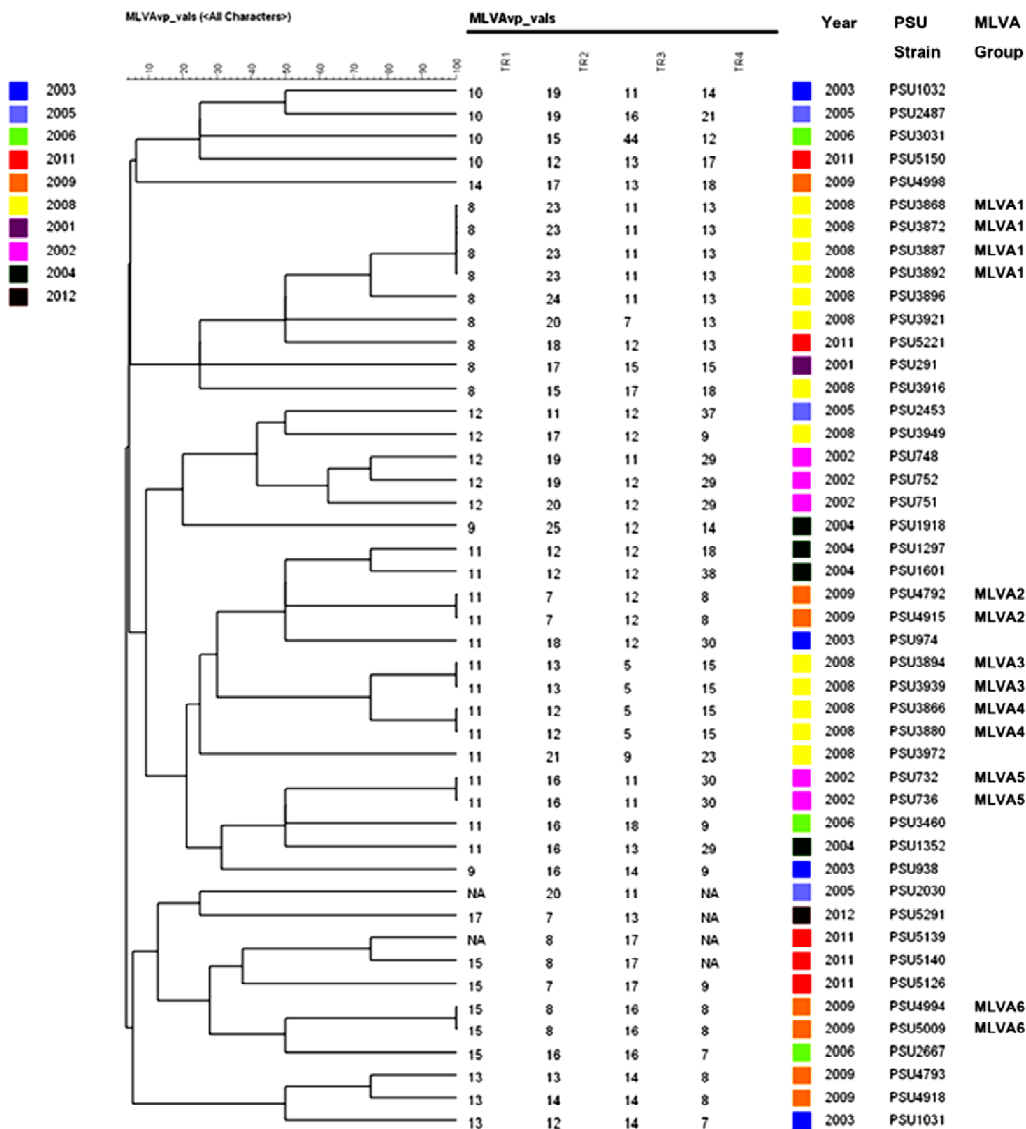
ตารางที่ 8 PCR condition สำหรับการทำ Multiplex MLVA

PCR condition	Temp. (°C)	Time(min)
Initial denaturation	95	3
Denaturation	95	1
Annealing	50	1
Elongation	68	1
final elongation	68	5

} 30 cycles

3. การตรวจสอบผล MLVA โดยวิธี capillary electrophoresis และการวิเคราะห์รูปแบบ VNTR จากการตรวจสอบรูปแบบ MLVA ใน *V. parahaemolyticus* จำนวน 46 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ VNTR markers จำนวน 4 รูปแบบ (TR1, TR2, TR3 และ TR4) ด้วยวิธี capillary electrophoresis พบรูปแบบ MLVA ที่แตกต่างกันจำนวน 38 รูปแบบ ซึ่งจำนวนซ้ำของ TR1, TR2, TR3 และ TR4 มีค่าอยู่ระหว่าง 8-17, 7-24, 5-44 และ 7-38 ตามลำดับ

การสร้าง dendrogram โดยอาศัยรูปแบบ MLVA ของเชื้อและจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของจำนวนซ้ำของ VNTR ที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่า สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 6 กลุ่ม (MLVA<sub>1</sub>, MLVA<sub>2</sub>, MLVA<sub>3</sub>, MLVA<sub>4</sub>, MLVA<sub>5</sub> และ MLVA<sub>6</sub>) (รูปที่ 8) เทคนิค MLVA มีค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงมาก คือ 1.00 และ 0.99 ตามลำดับ และมีระยะเวลาในการจำแนกเชื้อเพียง 4 ชั่วโมง 40 นาที (ตารางที่ 9)



รูปที่ 8 Dendrogram สร้างจากรูปแบบ MLVA ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับ

#### 4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนก *V. parahaemolyticus* ของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR, PFGE และ MLVA

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนก *V. parahaemolyticus* ของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR, PFGE และ MLVA พบว่า เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่มีค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงสุด (1.00 และ 0.99) รองลงมาคือ เทคนิค AP2-PCR (1.00 และ 0.57), PFGE (1.00 และ 0.52), ERIC-PCR (1.00 และ 0.00) และ AP4-PCR (1.00 และ 0.00) ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการจำแนกเชื้อพบว่า เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วที่สุด รองลงมาคือ เทคนิค ERIC-PCR, AP2-PCR, AP4-PCR และ PFGE ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง ในการจำแนก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับ

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR และ MLVA

คุณสมบัติ	AP2-PCR	AP4-PCR	ERIC-PCR	PFGE	MLVA
ความสามารถในการจำแนก $T=N_i/N$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ประสิทธิภาพในการจำแนก $D= 1- \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^r n_j(n_j-1)$	0.57	0.00	0.00	0.52	0.99
ระยะเวลาที่ใช้ (h) t=เวลาของ DNA extraction + PCR + Gel electrophoresis	17.30	17.30	12.05	26.42	4.40

#### ตอนที่ 4 การทดสอบความเสถียรของรูปแบบ VNTR ของเชื้อในสภาวะต่าง ๆ

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะต่าง ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง (TR1, TR2, TR3 และ TR4) ในเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษาในที่เย็นจัด (-80 องศาเซลเซียส) และทำให้ละลายเป็นจำนวนหลาย ๆ รอบ (repeated freezing storage and thawing) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อหลายครั้ง (multiple subcultures) ทำให้เชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท จากทั้งหมด 50 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR เมื่อเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในสภาวะด่างเคี้ยว (อุณหภูมิ, pH, ความเค็ม) พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ pH 11 และสภาวะที่มี NaCl สูงถึงร้อยละ 8 ไม่มีผลต่อจำนวนซ้ำของ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามพบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2 ในเชื้อบางไอโซเลทเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 และ 44 องศาเซลเซียส หรือในสภาวะที่มี pH ต่ำ (4.8) หรือมี NaCl ต่ำ (ร้อยละ 0.5)

### เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2550. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. เข้าถึงได้จาก <http://webdb.dmsc.moph.go.th>. (วันที่สืบค้น 1 เมษายน 2558)
- Chowdhury, N. R., Stine, O. C., Morris, J. G., and Nair, G. 2004. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*. 42: 1280-1282.
- Harth-Chu, E., Espejo, R. T., Christen, R., Guzmán, C. A., and 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: 4079-4088.
- Ishibashi, M., Ohta, K., Shimada, T., Honda, T., Sugiyama, J., Miwatani, T., and Yokoo, H. 2000. Current status of OK serotype combinations of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nippon Saikingaku Zasshi*. 55: 539-541.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*. 316: 76-79.
- Kimura, B., Sekine, Y., Takahashi, H., Tanaka, Y., Obata, H., Kai, A., Morozumi, S., and Fujii, T. 2008. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3: K6 strains. *Journal of microbiological methods*. 72: 313-320.
- Lindstedt, B.-A., Tham, W., Danielsson-Tham, M.-L., Vardund, T., Helmersson, S., and Kapperud, G. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of microbiological methods*. 72: 141-148.
- Lindstedt, B.-A., Vardund, T., Aas, L., and Kapperud, G. 2004a. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of microbiological methods*. 59: 163-172.
- Lindstedt, B.-A., Vardund, T., and Kapperud, G. 2004b. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *Journal of microbiological methods*. 58: 213-222.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y. B., and Albert, M. J. 2000. Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *Journal of clinical microbiology*. 38: 578-585.

- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., and Sack, D. A. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants. *Clinical microbiology reviews*. 20: 39-48.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., and Kumlin, E. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. 235: 1616-1622.
- Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. 2003. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 41: 4676-4682.
- Onteniente, L., Brisse, S., Tassios, P. T., and Vergnaud, G. 2003. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 41: 4991-4997.
- Peak, I. R., Jennings, M. P., Hood, D. W., Bisercic, M., and Moxon, E. R. 1996. Tetrameric repeat units associated with virulence factor phase variation in *Haemophilus* also occur in *Nettseria* spp. and *Moraxella catarrhalis*. *FEMS microbiology letters*. 137: 109-114.
- Schouls, L. M., van der Ende, A., Damen, M., and van de Pol, I. 2006. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*. 44: 1509-1518.
- Thongjun, J., Mittraparp-arthorn, P., Yingkajorn, M., Kongreung, J., Nishibuchi, M., and Vuddhakul, V. 2013. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Southern Thailand from 2006 to 2010. *Tropical medicine and health*. 41: 151.
- Valcheva, V., Mokrousov, I., Narvskaya, O., Rastogi, N., and Markova, N. 2008. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *Journal of clinical microbiology*. 46: 3005-3011.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., and Verbrugh, H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 62: 275-293.
- Vogler, A. J., Keys, C., Nemoto, Y., Colman, R. E., Jay, Z., and Keim, P. 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of bacteriology*. 188: 4253-4263.
- Wootipoom, N., Bhoopong, P., Pomwised, R., Nishibuchi, M., Ishibashi, M., and Vuddhakul, V. 2007. A decrease in the proportion of infections by pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in Hat Yai Hospital, southern Thailand. *Journal of medical microbiology*. 56: 1630-1638.

## ภาคผนวก

สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (reprint)





## ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเก็บรักษาเชื้อในที่เย็นจัดและทำให้ละลายต่อการเปลี่ยนแปลงของ VNTR

วิธีการทดลองทำโดยเลี้ยง *V. parahaemolyticus* PSU 3868 บนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 1 colony มาเลี้ยงในอาหาร TSB+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อใน 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อที่อุณหภูมิห้องแล้วนำกลับไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C อีกครั้ง (freezing storage and thawing) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งและละลายซ้ำเป็นจำนวน 9 รอบ จากนั้นแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 5 โคโลนี เพื่อนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้น โดยเก็บรักษาเชื้อใน 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งและละลายซ้ำอีก 10 รอบ จากนั้นแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกเชื้อจำนวน 10 โคโลนี มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction และตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ด้วยวิธี MLVA

#### 2. การเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำหลายครั้งต่อการเปลี่ยนแปลงของ VNTR

วิธีการทดลองทำโดยเลี้ยง *V. parahaemolyticus* PSU 3868 บนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 5 โคโลนี มาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA+1% NaCl ใหม่ทุก ๆ วัน จนครบจำนวน 10 วัน (multiple subcultures) แล้วคัดเลือกโคโลนีตัวแทนจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน จานละ 10 โคโลนี มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction แล้วจึงทำการตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ด้วยวิธี MLVA

#### 3. การเลี้ยงเชื้อในสภาวะตั้งเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของ VNTR

วิธีการทดลองทำโดยเลี้ยง *V. parahaemolyticus* PSU 3868 บนอาหาร TSA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 5 โคโลนี มาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเลี้ยงบนอาหาร TSB+1% NaCl ตามสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 5 และ 44 °C; pH4.8 และ pH11; NaCl: 0.5 และ 8% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ขึ้นในแต่ละสภาวะของการเลี้ยงมา streak บนอาหาร TSA+1% NaCl คัดเลือกโคโลนีตัวแทนจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน จานละ 10 โคโลนี มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction แล้วจึงทำการตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ด้วยวิธี MLVA

## ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะต่าง ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง (TR1, TR2, TR3 และ TR4) ในเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษาในที่เย็นจัด (-80 องศาเซลเซียส) และทำให้ละลายเป็นจำนวนหลาย ๆ รอบ (repeated freezing storage and thawing) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อหลายครั้ง (multiple subcultures) ทำให้เชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท จากทั้งหมด 50 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR เมื่อเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในสภาวะดิ่งเครียด (อุณหภูมิ, pH, ความเค็ม) พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ pH 11 และสภาวะที่มี NaCl สูงถึงร้อยละ 8 ไม่มีผลต่อจำนวนซ้ำของ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามพบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2 ในเชื้อบางไอโซเลทเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 และ 44 องศาเซลเซียส หรือในสภาวะที่มี pH ต่ำ (4.8) หรือมี NaCl ต่ำ (ร้อยละ 0.5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในเชื้อ *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas* sp. และ *E. coli* ที่รายงานว่า สภาวะดิ่งเครียดต่าง ๆ มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อดังกล่าว (Martinez and Baquero, 2000, Van Den Broek *et al.*, 2005, Cooley *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเสถียรของ VNTR ใน *E. coli* ซึ่งมีการรายงานไว้ว่า รังสี, อุณหภูมิสูง และสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน VNTR (Cooley *et al.*, 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงชี้ให้เห็นว่าสภาวะดิ่งเครียดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำภายใน VNTR ของ *V. parahaemolyticus* และในกระบวนการศึกษาตรวจหาจำนวนซ้ำของ VNTR ควรจะหลีกเลี่ยงการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำหลายครั้งเพราะอาจจะเกิดการผิดพลาดจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำของ VNTR ในระหว่างการตรวจสอบได้

## เอกสารอ้างอิง

- Cooley, M. B., Carychao, D., Nguyen, K., Whitehand, L., and Mandrell, R. 2010. Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and environmental microbiology*. 76: 3398-3400.
- Martinez, J., and Baquero, F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44: 1771-1777.
- Van Den Broek, D., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. 2005. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental microbiology*. 7: 1686-1697.

### ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค MLVA ในเชื้อสายพันธุ์ระดับที่แยกได้จากแหล่งอื่น ๆ เพิ่มเติม รวมทั้งที่แยกได้จากประเทศต่าง ๆ และเพิ่มการศึกษา *In vivo stability* ของ VNTR

บทความวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ (proceeding)

## บทนำ

*V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของ โรคอาหารเป็นพิษ หรือ ภาวะพิษอาหารและลำไส้ อักเสบ การก่อโรคของเชื้ออาศัยปัจจัยก่อโรคที่สำคัญ คือ thermostable direct haemolysin (TDH) และ thermostable direct haemolysin-related haemolysin (TRH) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *tdh* และ ยีน *trh* ตามลำดับ (Nair *et al.*, 2007) *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของโรคอาหารเป็นพิษ ในหลายประเทศแถบทวีปเอเชีย เช่น ประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย โดยในประเทศไทยพบว่า *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุอันดับ 1 ของโรคอาหารเป็นพิษมาตลอด ในปี พ.ศ. 2540-2545 มีรายงานผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* คิดเป็นร้อยละ 56, 56, 58, 60, 61 และ 78 ของผู้ป่วยทั้งหมดตามลำดับ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) และจากสรุปรายงาน การเฝ้าระวังโรค ของสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ในปีต่อ ๆ มา พบว่าอัตราผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษมีจำนวนลดลง แต่ยังคงพบผู้ป่วยจาก *V. parahaemolyticus* มากที่สุด ส่วนข้อมูลเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษล่าสุด ช่วงเดือน มกราคม – เดือน กรกฎาคม 2558 พบผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 70,994 ราย โดยมีสาเหตุหลักจาก *V. parahaemolyticus* และ *Salmonella* รองลงมาคือ *Staphylococcus*

ปัจจุบันการจัดกลุ่มเชื้อ *V. parahaemolyticus* ใช้วิธี serotyping โดยอาศัยลักษณะของ somatic (O) antigen และ capsular (K) antigen ปัจจุบัน *V. parahaemolyticus* มีจำนวนทั้งหมด 75 ซีโรไทป์ (Ishibashi *et al.*, 2000) ซึ่งสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ก่อให้เกิดการระบาดครั้งใหญ่ (pandemic) ในหลาย ๆ ประเทศ คือ *V. parahaemolyticus* O3:K6 โดยพบการระบาดครั้งใหญ่ ในปี พ.ศ. 2539 ณ เมือง Calcutta ประเทศอินเดีย และพบการระบาดอย่างต่อเนื่องไปยังหลาย ๆ ประเทศ แถบทวีปเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน รวมทั้งพบการระบาดข้ามทวีปไปยังประเทศสหรัฐอเมริกาจึงจัดได้ว่า *V. parahaemolyticus* O3:K6 นี้เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดการระบาด (pandemic strain) ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นเชื้อที่มียีน *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* (*tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>) และให้ผลบวกกับ group specific-PCR (GS-PCR) ซึ่งใช้ยีน *toxRS* operon เป็นยีนเป้าหมาย (Matsumoto *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม ต่อมามีการ รายงานถึงเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่นที่ให้ผล GS-PCR บวก ได้แก่ O4:K68, O1:KUT (untypeable) และ O1:K25 โดยซีโรไทป์เหล่านี้มีลำดับของ *toxRS* operon, รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี arbitrarily primed-PCR (AP-PCR), ribotyping และ pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ที่เหมือนกับซีโรไทป์ O3:K6 (Nair *et al.*, 2007) และยังพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์อื่น ๆ ที่มีลักษณะจีโนมไทป์เหมือนกับ O3:K6 เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เชื้อทั้งหมดมีต้นกำเนิดมาจากแหล่งเดียวกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงตรงส่วนของ antigen เพื่อตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (host) (Chowdhury *et al.*, 2004)

ผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลหาดใหญ่ จ.สงขลา ในช่วงปี พ.ศ. 2543-2548 พบว่าส่วนใหญ่มีสาเหตุจากการติดเชื้อในซีโรไทป์ O3:K6, O4:K68, O1:KUT และ O1:K25 (Wootipoom *et al.*, 2007) ต่อมาในช่วงปี พ.ศ. 2549-2553 กลับไม่พบผู้ป่วยที่ติดเชื้อซีโรไทป์ O4:K68 และ O1:K25 (Thongjun *et al.*, 2013) แต่ยังคงพบผู้ป่วยที่ติดเชื้อซีโรไทป์ O1:KUT อยู่ ซึ่งอาจเกิดจากการที่ประชาชนในพื้นที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อ antigen ของเชื้อซีโรไทป์เดิม (O3:K6, O1:K25 และ

O4:K68) การที่ไม่สามารถระบุชนิดของ K antigen ได้นี้ อาจเป็นเพราะข้อจำกัดของ antisera มาตรฐานที่ขายเป็นการค้า ส่งผลให้การติดตามทางระบาดวิทยาทำได้ยากเนื่องจากไม่ทราบชนิดของ K antigen ที่แท้จริง ทั้งนี้ K antigen ของเชื้อเหล่านั้น อาจเป็นคนละชนิด หรือชนิดเดียวกันก็ได้ ดังนั้น การพัฒนาวิธีในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันและเฝ้าระวังการติดเชื้อ

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการศึกษาสายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งสามารถอธิบายความแตกต่างของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ได้ เช่น แหล่งที่มา, ความสามารถในการก่อโรค และการดื้อยาปฏิชีวนะ มีรายงานจำนวนมากศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O3: K6 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกอย่างรุนแรง อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเฉพาะเจาะจงไปที่เชื้อในซีโรไทป์ O1:KUT ยังมีน้อยมาก โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* นิยมศึกษาด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น AP-PCR, เทคนิค Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR) โดยมี เทคนิค PFGE ที่ เป็น gold standard method (Okura *et al.*, 2003, Nair *et al.*, 2007) เทคนิค AP-PCR, ERIC-PCR และ PFGE มีข้อดี-ข้อเสียแตกต่างกัน โดย AP-PCR และ ERIC-PCR เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่ความสามารถในการทำซ้ำและการจำแนกต่ำ ส่วน PFGE ก็มีค่าใช้จ่ายและการลงทุนสูง, ใช้บุคลากรที่มีความชำนาญ, ใช้ระยะเวลาอันยาวนานและอุปกรณ์ที่เฉพาะ ซึ่งในบางห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อจากบริเวณของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ กัน หรือ short sequence repeats (SSR) หรือ microsatellite (Jeffreys *et al.*, 1985) หรือ variable number of tandem repeats (VNTR) (Nakamura *et al.*, 1987) โดยอาศัยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับซ้ำที่เกิดจากการปรับตัวของแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อม โดยพบว่ายีนใดที่มีหน่วย SSR แทรกอยู่จะมีอัตราการกลายพันธุ์ที่สูงกว่ายีนที่ไม่มี SSR แทรก และอาจทำให้แบคทีเรียมีการปรับเปลี่ยนความสามารถในการก่อโรคที่เหมาะสมกับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ (Peak *et al.*, 1996, van Belkum *et al.*, 1998) ด้วยเหตุที่ VNTR มีความผันแปรในระดับพันธุกรรมค่อนข้างสูง แม้จะเป็นแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันแต่คนละสายพันธุ์กันก็อาจมีหน่วยซ้ำใน VNTR แตกต่างกันได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิค multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) ขึ้นมาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยใช้วิธี PCR ซึ่งอาศัย primers ที่ครอบคลุมบริเวณ VNTR หลาย ๆ ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจสอบขนาด VNTR ด้วยวิธี gel electrophoresis จะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ (van Belkum *et al.*, 1998, Vogler *et al.*, 2006) วิธี MLVA จัดเป็นวิธีที่สะดวก, มีประสิทธิภาพ และประหยัดค่าใช้จ่าย ทั้งนี้มีรายงานการใช้ VNTR ในการแยกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในอาหารรวมถึงเชื้อก่อโรคติดต่อทางน้ำแล้ว เช่น *Escherichia coli* O157:H7 (Lindstedt *et al.*, 2004b) *Pseudomonas aeruginosa* (Onteniente *et al.*, 2003) และ *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium (Lindstedt *et al.*, 2004a) นอกจากนี้ยังมีการนำวิธีนี้มาวินิจฉัยเชื้อก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Neisseria meningitidis* (Schouls *et al.*, 2006), *Listeria monocytogenes* (Lindstedt *et al.*, 2008), *Mycobacterium tuberculosis* (Valcheva *et al.*, 2008) และ *V. parahaemolyticus* (Harth-Chu *et al.*, 2009)

การศึกษา *V. parahaemolyticus* O3: K6 ด้วยเทคนิค MLVA พบว่า เทคนิคนี้มีความละเอียดและความสามารถในการทำซ้ำสูง (Kimura *et al.*, 2008) นอกจากนี้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งทำการศึกษาความหลากหลายของ O3:K6, O4:K68 และ O1:K25 ร่วมกับ O1:KUT จำนวน 3 สายพันธุ์ โดยเทคนิค PFGE และ AP-PCR พบว่า เชื้อสายพันธุ์ O1:KUT จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ O3:K6, O4:K68 และ O1:K25 (Okura *et al.*, 2003) และมีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* O1:KUT มีต้นกำเนิดมาจาก *V. parahaemolyticus* O3: K6 ที่เป็นสายพันธุ์ระบาด (Nair *et al.*, 2007) แม้ว่าจะมีการศึกษาเชื้อสายพันธุ์ O1:KUT ร่วมกับสายพันธุ์อื่น ๆ โดยเทคนิคต่าง ๆ แต่ข้อมูลที่ได้ก็ยังไม่มีความละเอียดเพียงพอต่อการศึกษาระบาดของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT และยังไม่เคยมีการศึกษาความเสถียรของ VNTR ตำแหน่งต่าง ๆ ในเชื้อที่กล่าวมา

งานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธี MLVA และนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O1:KUT โดยศึกษาร่วมกับซีโรไทป์อื่น ๆ ที่เป็นเชื้อสายพันธุ์ระบาด การศึกษารูปแบบ VNTR ตำแหน่งต่าง ๆ ของเชื้อในครั้งนี และการพัฒนาเทคนิค MLVA จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจาก *V. parahaemolyticus* ต่อไป

**ระยะเวลาวิจัย** 2 ปี (ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560)

**แหล่งทุนสนับสนุน** ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ประเภทงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558  
สัญญาเลขที่ SCI581208S

#### วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาเทคนิค MLVA มาใช้ในการจำแนก pandemic *V. parahaemolyticus* O1:KUT โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์กับวิธี AP-PCR, ERIC-PCR และใช้วิธี PFGE เป็นวิธีมาตรฐาน
2. เพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อความเสถียรของ VNTR ของ pandemic *V. parahaemolyticus* O1:KUT

## สรุปผลการทดลอง

**ตอนที่ 1** การตรวจสอบลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด**1. การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ (CLSI, 2012)**

การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disk diffusion โดยใช้ยาปฏิชีวนะจำนวน 6 ชนิด คือ ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), norfloxacin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), cotrimoxazole (25 µg) และ tetracyclin (30 µg) ผลการตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะพบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์ที่ต่อยา ampicillin และเชื้อจำนวนร้อยละ 60.9 ไวปานกลางต่อยา ciprofloxacin และที่น่าสนใจคือ มีเชื้อจำนวน 1 สายพันธุ์ ที่ต่อยาปฏิชีวนะมากถึง 3 ชนิด (ampicillin, norfloxacin และ ciprofloxacin) อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อส่วนใหญ่ จำนวน ร้อยละ 95.7, 76.1 และ 97.8 ยังคงไวต่อ ยา chloramphenicol, norfloxacin และ cotrimoxazole ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ ไวต่อยา tetracycline จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *V. parahaemolyticus* ส่วนใหญ่ยังคงไวต่อ ยา chloramphenicol, norfloxacin และ cotrimoxazole อย่างไรก็ตามเชื้อจำนวนมากเริ่มให้ผล ไวปานกลางต่อยา norfloxacin และ ciprofloxacin ซึ่งใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับระบบ ทางเดินอาหาร จึงควรระมัดระวังการใช้ยาดังกล่าวให้มากขึ้น เนื่องจากอาจส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อได้ในอนาคต (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 1** ไพรเมอร์สำหรับการจำแนก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด

Target genes	PCR primer and sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>toxR</i>	tox R-F: 5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3' toxR-R: 5'-ATACGAGTGGTTGCTGTCATG-3'	368	(Kim <i>et al.</i> , 1999)
GS-PCR	GS-VP.1: 5'-TAATGAGGTAGAAACA-3' GS-VP.2: 5'-ACGTAACGGGCCTACA-3'	651	(Matsumoto <i>et al.</i> , 2000)
<i>tdh</i>	tdh1 :5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3' tdh2 : 5'-CCACTACCACTCTCATATGC-3'	251	(Tada <i>et al.</i> , 1992)
<i>trh</i>	trh-F: 5'- GGCTCAAATGGTTAAGCG - 3' trh-R: 5'- CATTTCGCTCTCATATGC - 3'	250	(Tada <i>et al.</i> , 1992)



ตารางที่ 2 รายละเอียดของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับชาติที่ใช้ในการศึกษา

Serotype	Year of isolation	No. of isolates	strain	Presence of gene		GS-PCR result
				<i>tdh</i>	<i>trh</i>	
Pandemic (46)						
O1:KUT	2001	1	PSU291	+	—	+
	2002	5	PSU732, PSU736, PSU748, PSU751, PSU752	+	—	+
	2003	2	PSU938, PSU974	+	—	+
	2004	4	PSU1297, PSU1352, PSU1601, PSU1918	+	—	+
	2005	3	PSU2030, PSU2453, PSU2487	+	—	+
	2006	2	PSU3031, PSU3460	+	—	+
	2008	2	PSU3916, PSU3972	+	—	+
	2009	7	PSU4792, PSU4793, PSU4915, PSU4918, PSU4994, PSU4998, PSU5009	+	—	+
	2011	5	PSU5126, PSU5139, PSU5140, PSU5150, PSU5221	+	—	+
	2012	1	PSU5291	+	—	+
O1:K25	2003	2	PSU1031, PSU1032	+	—	+
	2006	1	PSU2667	+	—	+
	2008	5	PSU3866, PSU3880, PSU3894, PSU3939, PSU3949	+	—	+
O3:K6	2008	6	PSU3868, PSU3872, PSU3887, PSU3892, PSU3896, PSU3921	+	—	+

ตารางที่ 3 แบบแผนความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *V. parahaemolyticus*

Antimicrobial agent	Pandemic <i>V. parahaemolyticus</i> (n=46)		
	No. (%) of R	No. (%) of I	No. (%) of S
Ampicillin (AMP)	46 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Chloramphenicol (CHL)	0 (0.0)	2 (4.3)	44 (95.7)
Norfloxacin (NOR)	1 (2.2)	10 (21.7)	35 (76.1)
Ciprofloxacin (CIP)	7 (15.2)	28 (60.9)	11 (23.9)
Cotrimoxazole (CO)	0 (0.0)	1 (2.2)	45 (97.8)
Tetracycline (TET)	0 (0.0)	0 (0.0)	46 (100.0)

<sup>1</sup>R, resistant; I, intermediate; S, susceptible

<sup>2</sup>AMP, ampicillin; C, chloramphenicol; NOR, norfloxacin; C, ciprofloxacin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TE, tetracycline

## 2. การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

การตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคใน *V. parahaemolyticus* จำนวน 46 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อจำนวนร้อยละ 57 มียีนก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับ T3SSs และ T6SSs ทุกยีนที่ตรวจสอบ ได้แก่ *vcrD1*, *vcrD2*, *vopQ*, *vopC*, *vipA1* และ *vipA2* โดยเชื้อที่เหลือจำนวนร้อยละ 47 พบยีนดังกล่าวอย่างน้อย 4 ยีน (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นศักยภาพในการก่อโรคของ *V. parahaemolyticus*

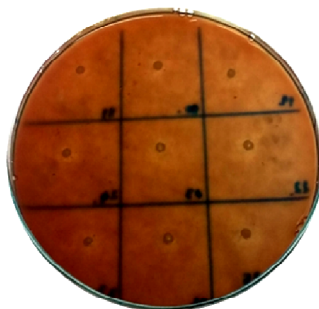
ตารางที่ 4 รูปแบบการมียีนก่อโรคของ *V. parahaemolyticus* จำนวน 46 สายพันธุ์

Detection of virulence genes						No. of isolates (%)
T3SS1		T3SS2		T6SS1	T6SS2	
<i>vcrD1</i>	<i>vopQ</i>	<i>vcrD2</i>	<i>vopC</i>	<i>vipA1</i>	<i>vipA2</i>	
+	+	+	+	+	+	26 (57%)
+	+	+	+	+	-	8 (18%)
+	+	-	+	+	+	1 (2%)
+	+	+	+	-	+	2 (4%)
+	+	+	-	+	+	1 (2%)
+	+	+	+	-	-	1 (2%)
+	+	-	+	+	-	1 (2%)
-	+	+	+	+	+	3 (7%)
-	+	+	+	+	-	1 (2%)
+	+	-	+	-	-	1 (2%)
+	+	-	-	-	+	1 (2%)

+: พบยีนก่อโรค; -: ไม่พบยีนก่อโรค

### 3. การตรวจสอบความสามารถในการสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin (TDH)

ผลการทดสอบบนอาหาร Wagatsuma agar พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Wagatsuma agar ได้ แสดงให้เห็นความสามารถในการสร้างสารพิษ TDH ของเชื้อ โดยโซนใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารที่เวลา 35 ชั่วโมง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 8.2 – 14.6 มิลลิเมตร (รูปที่ 1)



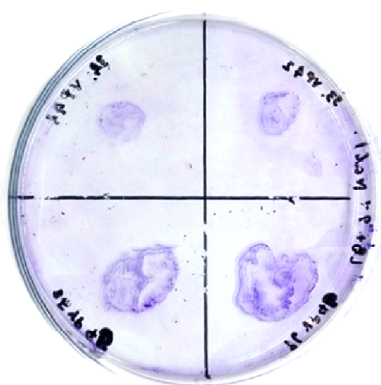
รูปที่ 1 การสร้างสารพิษ thermostable direct hemolysin ของ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร Wagatsuma ที่ 35 ชั่วโมง

### 4. การตรวจหาความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ swarming

*V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ swarming ที่แตกต่างกัน โดยที่เวลา 8 ชั่วโมง พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีบนอาหารระหว่าง 8.0-49.4 มิลลิเมตร

### 5. การตรวจหาความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ twitching

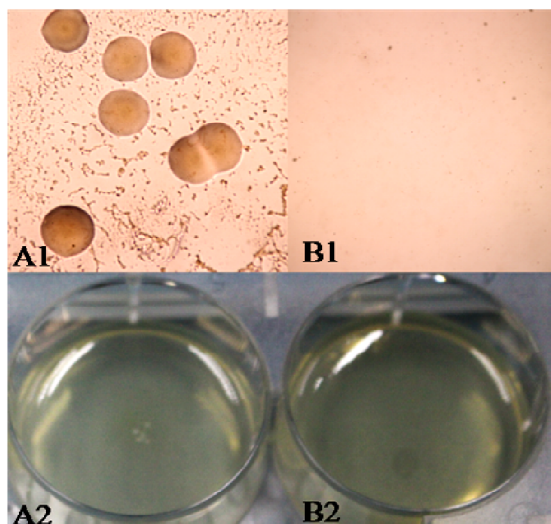
*V. parahaemolyticus* ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการเคลื่อนที่แบบ twitching ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2) โดยมีระยะของการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 4–34 มิลลิเมตร



รูปที่ 2 การเคลื่อนที่แบบ twitching ของ *V. parahaemolyticus* ที่ย้อมด้วยสี crystal violet

## 6. การตรวจสอบความสามารถในการใช้เหล็ก

การตรวจสอบความสามารถในการใช้เหล็ก (ฮีโมโกลบิน) ที่ความเข้มข้น 155 และ 50  $\mu\text{M}$  พบว่า เชื้อมีความสามารถในการใช้ฮีโมโกลบินแตกต่างกัน (รูปที่ 3) โดยเชื้อส่วนใหญ่จำนวนร้อยละ 83 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีฮีโมโกลบินทั้ง 2 ความเข้มข้น และมีเชื้อจำนวนร้อยละ 11 เจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีฮีโมโกลบินที่ความเข้มข้น 155  $\mu\text{M}$  เท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่า มีเชื้อร้อยละ 1 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีฮีโมโกลบินทั้ง 2 ความเข้มข้น

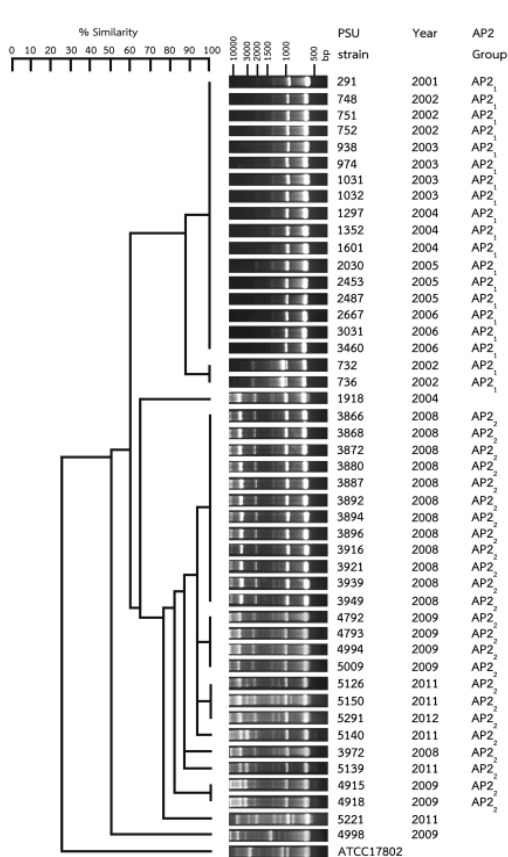


รูปที่ 3 การเจริญของ *V. parahaemolyticus* บนอาหาร melted rich medium + 2, 2'-dipyridyl ที่มีฮีโมโกลบินความเข้มข้น 155  $\mu\text{M}$  of hemoglobin (A1: 10X; A2: 1X) และไม่มีฮีโมโกลบิน (B1: 10X; B2: 1X)

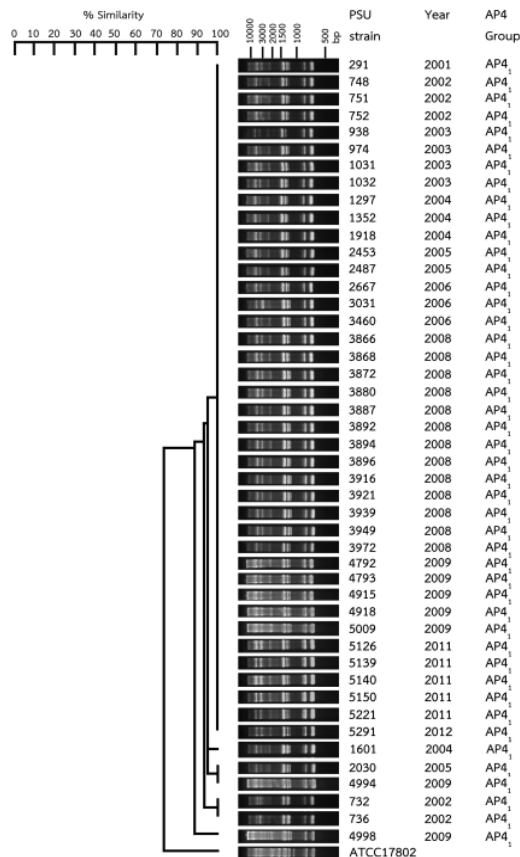
## ตอนที่ 2 การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด โดยเทคนิค AP-PCR, ERIC และ PFGE

### 1. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR

จากผลการทดลองพบว่าเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 4-12 และ 7-11 แถบ ตามลำดับ การจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่าเทคนิค AP2-PCR มีความสามารถในการจำแนกเชื้อสูงกว่าเทคนิค AP4-PCR (รูปที่ 4 และ 5) โดยที่ความเหมือนร้อยละ 80 เทคนิค AP2-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 2 กลุ่ม (AP<sub>2</sub><sub>1</sub> และ AP<sub>2</sub><sub>2</sub>) ส่วนเทคนิค AP4-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เพียง 1 กลุ่มเท่านั้น (AP<sub>4</sub><sub>1</sub>) ค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของเทคนิค AP2-PCR (1.00, 0.57-0.79) มีค่าสูงกว่า AP4-PCR (1.00, 0.00-0.24) โดยเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR ใช้เวลาในการจำแนกเชื้อค่อนข้างนาน คือ ประมาณ 17 ชั่วโมง 30 นาที (ตารางที่ 9)



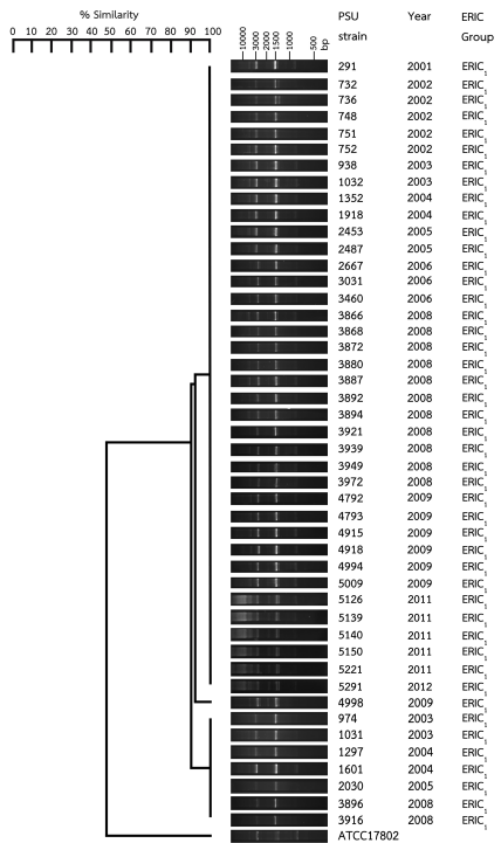
รูปที่ 4 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี AP2-PCR



รูปที่ 5 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี AP4-PCR

2. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค ERIC-PCR ในการจำแนก *V. parahaemolyticus*

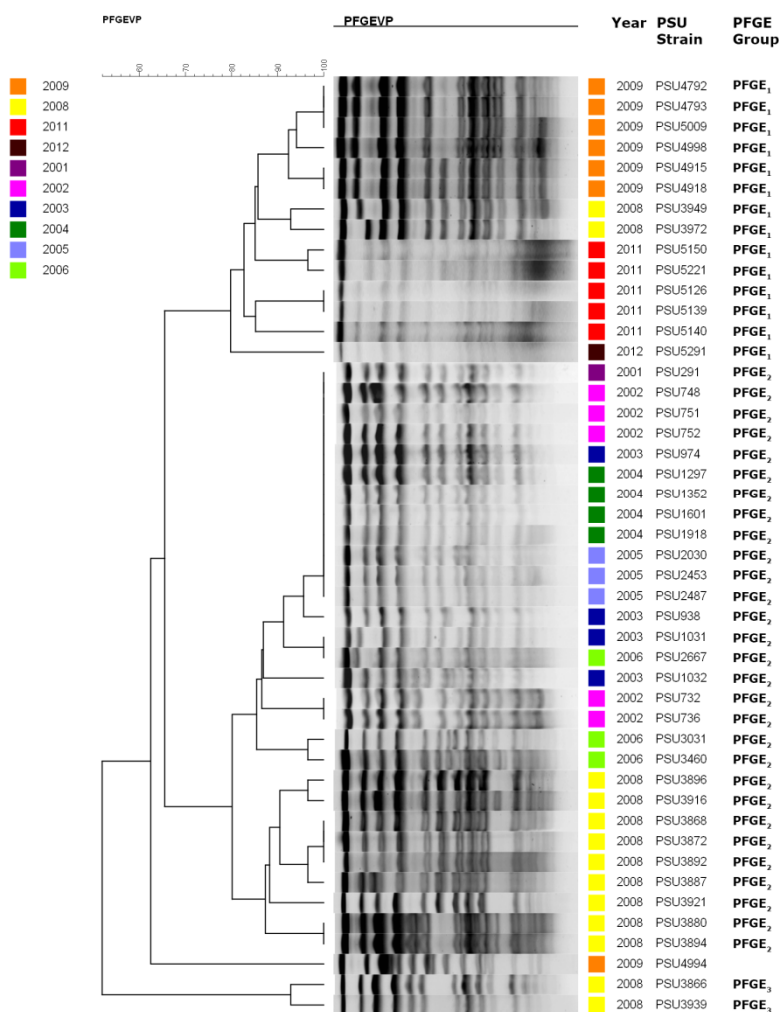
เทคนิค ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 5-11 แถบ การจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่าเทคนิค ERIC-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้เพียง 1 กลุ่มเท่านั้น (ERIC<sub>1</sub>) (รูปที่ 6) ค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของเทคนิค ERIC-PCR เท่ากับ 1.00 และ 0.00-0.30 ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาเท่ากับ 12 ชั่วโมง 5 นาที (ตารางที่ 9)



รูปที่ 6 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR

3. การประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค PFGE ในการจำแนก *V. parahaemolyticus*

เทคนิค PFGE ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 10-13 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง <math>48.5-727.5\text{ kb}</math> แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีรูปแบบลายพิมพ์ของเชื้อบางส่วนที่เหมือนกัน (รูปที่ 7) การจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่าเทคนิค PFGE สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 3 กลุ่ม (PFGE<sub>1</sub>, PFGE<sub>2</sub> และ PFGE<sub>3</sub>) ค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อของเทคนิค PFGE เท่ากับ 1.00 และ 0.520-93 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเทคนิค PFGE มีระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษานานที่สุด คือ 26 ชั่วโมง 42 นาที (ตารางที่ 9)



รูปที่ 7 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาดที่ได้จากวิธี PFGE

### ตอนที่ 3 การพัฒนาเทคนิค multiplex MLVA เพื่อศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด

#### 1. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VNTR และการออกแบบไพรเมอร์สำหรับวิธี MLVA

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ VNTR ในฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณสมบัติตรงตามที่ต้องการจำนวน 5 รูปแบบคือ TR1, TR2, TR3, TR4 และ TR5 ซึ่งเมื่อทำการ blast กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่า ส่วนของ TR1 และ TR3 แทรกอยู่ในส่วนของ non-coding region ส่วน TR2, TR4 และ TR5 แทรกอยู่ในส่วนของ hypothetical protein นอกจากนี้ยังพบว่า ส่วนของ VNTR markers ที่นำมาตรวจสอบมีตำแหน่งอยู่บนทั้งโครโมโซม 1 และ 2 ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ RIMD2210633 โดยส่วนของ TR1, TR2 และ TR4 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 และ ส่วนของ TR3 และ TR5 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 2 (ตารางที่ 5)

ผู้วิจัยได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ที่จำเพาะกับ VNTR marker ทั้ง 5 รูปแบบ (ตารางที่ 6) และพบว่าไพรเมอร์ทั้งหมด ยกเว้นไพรเมอร์ TR5 สามารถเพิ่มจำนวน VNTR markers ของเชื้อทั้งหมดได้ และมีรูปแบบของ MLVA ที่หลากหลาย โดยเชื้อส่วนใหญ่ให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ TR5 ดังนั้นในขั้นตอน MLVA จึงใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่เท่านั้น คือ TR1, TR2, TR3 และ TR4

ตารางที่ 5 รายละเอียดของ VNTR loci

VNTR loci	Repeat motif	Unit length (bp)	Copy number	Function	Chromosome
TR1	AGGTTCT	7	11.1	Non-coding region	1
TR2	GCTCTG	6	21.5	Hypothetical protein	1
TR3	CAGCTAAA	8	22.8	Non-coding region	2
TR4	ATAGAG	6	28.2	Hypothetical protein	1
TR5	TCTGGC	6	21.5	Hypothetical protein	2

ตารางที่ 6 ไพรเมอร์สำหรับวิธี MLVA

VNTR locus	F-primer sequence (5'->3')	R-primer sequence (5'->3')	Expected amplicon size (bp) <sup>a</sup>
TR1	GTGACGGCTGGTCAGAAGAT	TTCACGCCAACTTCCTCAAC	130
TR2	AGTTGCGGTGCGTAGTTTTTC	TCGCTCAGGAGCTATCCTCT	190
TR3	TTCACGGGTAAAAACACCAT	GCTGTGGTCTTTGTGTACGG	233
TR4	TCAGCCAGACACTCCATACAA	GGAAGACATATCCGGTTTGC	214
TR5	CTCTGCGTATTGCATCTGGA	GCAGGCGCTTGATGATTACT	229



## 2. การพัฒนาวิธี multiplex PCR สำหรับ MLVA

จากการทดลองสามารถปรับความเข้มข้นของส่วนประกอบใน PCR reaction และปรับสภาวะในการทำ PCR เพื่อให้เหมาะกับการทำงานของ primer ทั้ง 4 ชุดพร้อมกัน (multiplex PCR) ได้ ดังแสดงใน ตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 PCR reaction สำหรับการทำให้ Multiplex MLVA

PCR reaction	Final Conc.	μl /reaction
10X Buffer	1X	6.0
2.5mM dNTPs	0.20 mM	2.4
4μM PrimerTR1-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR1-R	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR2-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR2-R	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR3-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR3-R	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR4-F	0.2μM	1.5
4μM PrimerTR4-R	0.2μM	1.5
5U/μl <i>Taq</i> polymerase	0.5 U	0.1
Template DNA	-	2.0
Water	-	7.5
Total volume	-	30.0

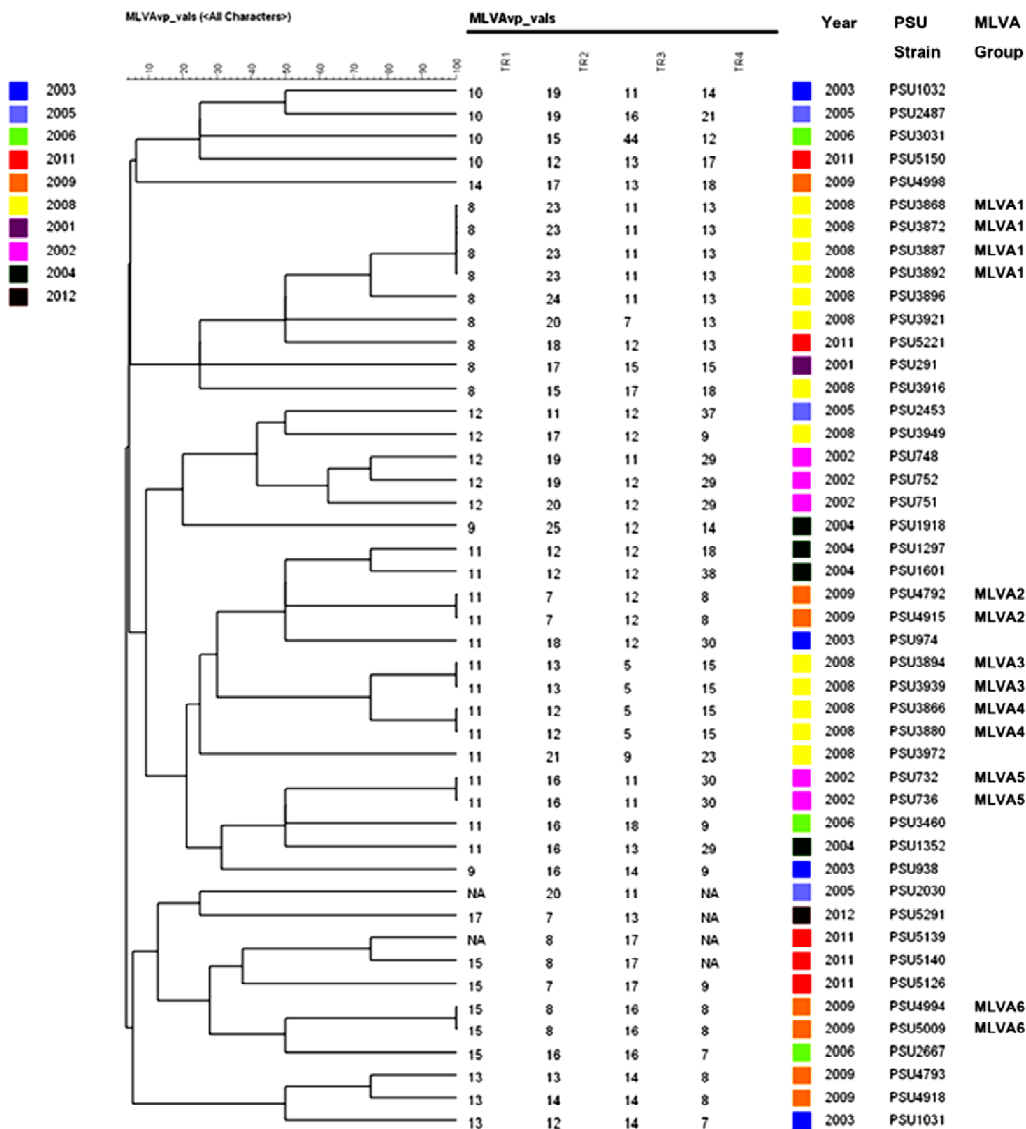
ตารางที่ 8 PCR condition สำหรับการทำให้ Multiplex MLVA

PCR condition	Temp. (°C)	Time(min)
Initial denaturation	95	3
Denaturation	95	1
Annealing	50	1
Elongation	68	1
final elongation	68	5

} 30 cycles

3. การตรวจสอบผล MLVA โดยวิธี capillary electrophoresis และการวิเคราะห์รูปแบบ VNTR จากการตรวจสอบรูปแบบ MLVA ใน *V. parahaemolyticus* จำนวน 46 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ VNTR markers จำนวน 4 รูปแบบ (TR1, TR2, TR3 และ TR4) ด้วยวิธี capillary electrophoresis พบรูปแบบ MLVA ที่แตกต่างกันจำนวน 38 รูปแบบ ซึ่งจำนวนซ้ำของ TR1, TR2, TR3 และ TR4 มีค่าอยู่ระหว่าง 8-17, 7-24, 5-44 และ 7-38 ตามลำดับ

การสร้าง dendrogram โดยอาศัยรูปแบบ MLVA ของเชื้อและจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัยความแตกต่างของจำนวนซ้ำของ VNTR ที่ความเหมือนร้อยละ 80 พบว่า สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 6 กลุ่ม (MLVA<sub>1</sub>, MLVA<sub>2</sub>, MLVA<sub>3</sub>, MLVA<sub>4</sub>, MLVA<sub>5</sub> และ MLVA<sub>6</sub>) (รูปที่ 8) เทคนิค MLVA มีค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงมาก คือ 1.00 และ 0.99 ตามลำดับ และมีระยะเวลาในการจำแนกเชื้อเพียง 4 ชั่วโมง 40 นาที (ตารางที่ 9)



รูปที่ 8 Dendrogram สร้างจากรูปแบบ MLVA ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับ

#### 4. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนก *V. parahaemolyticus* ของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR, PFGE และ MLVA

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนก *V. parahaemolyticus* ของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR, PFGE และ MLVA พบว่า เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่มีค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงสุด (1.00 และ 0.99) รองลงมาคือ เทคนิค AP2-PCR (1.00 และ 0.57), PFGE (1.00 และ 0.52), ERIC-PCR (1.00 และ 0.00) และ AP4-PCR (1.00 และ 0.00) ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการจำแนกเชื้อพบว่า เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วที่สุด รองลงมาคือ เทคนิค ERIC-PCR, AP2-PCR, AP4-PCR และ PFGE ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง ในการจำแนก *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระดับ

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR, ERIC-PCR และ MLVA

คุณสมบัติ	AP2-PCR	AP4-PCR	ERIC-PCR	PFGE	MLVA
ความสามารถในการจำแนก $T=N_i/N$	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ประสิทธิภาพในการจำแนก $D= 1- \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^r n_j(n_j-1)$	0.57	0.00	0.00	0.52	0.99
ระยะเวลาที่ใช้ (h) t=เวลาของ DNA extraction + PCR + Gel electrophoresis	17.30	17.30	12.05	26.42	4.40

#### ตอนที่ 4 การทดสอบความเสถียรของรูปแบบ VNTR ของเชื้อในสภาวะต่าง ๆ

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะต่าง ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง (TR1, TR2, TR3 และ TR4) ในเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษาในที่เย็นจัด (-80 องศาเซลเซียส) และทำให้ละลายเป็นจำนวนหลาย ๆ รอบ (repeated freezing storage and thawing) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อหลายครั้ง (multiple subcultures) ทำให้เชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท จากทั้งหมด 50 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR เมื่อเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในสภาวะด่างเคี้ยว (อุณหภูมิ, pH, ความเค็ม) พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ pH 11 และสภาวะที่มี NaCl สูงถึงร้อยละ 8 ไม่มีผลต่อจำนวนซ้ำของ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามพบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2 ในเชื้อบางไอโซเลทเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 และ 44 องศาเซลเซียส หรือในสภาวะที่มี pH ต่ำ (4.8) หรือมี NaCl ต่ำ (ร้อยละ 0.5)

### เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2550. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโรคติดเชื้อและพาหะนำโรค. เข้าถึงได้จาก <http://webdb.dmsc.moph.go.th>. (วันที่สืบค้น 1 เมษายน 2558)
- Chowdhury, N. R., Stine, O. C., Morris, J. G., and Nair, G. 2004. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*. 42: 1280-1282.
- Harth-Chu, E., Espejo, R. T., Christen, R., Guzmán, C. A., and 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: 4079-4088.
- Ishibashi, M., Ohta, K., Shimada, T., Honda, T., Sugiyama, J., Miwatani, T., and Yokoo, H. 2000. Current status of OK serotype combinations of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nippon Saikingaku Zasshi*. 55: 539-541.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., and Thein, S. L. 1985. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*. 316: 76-79.
- Kimura, B., Sekine, Y., Takahashi, H., Tanaka, Y., Obata, H., Kai, A., Morozumi, S., and Fujii, T. 2008. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3: K6 strains. *Journal of microbiological methods*. 72: 313-320.
- Lindstedt, B.-A., Tham, W., Danielsson-Tham, M.-L., Vardund, T., Helmersson, S., and Kapperud, G. 2008. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Listeria monocytogenes* using multicolour capillary electrophoresis and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of microbiological methods*. 72: 141-148.
- Lindstedt, B.-A., Vardund, T., Aas, L., and Kapperud, G. 2004a. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *Journal of microbiological methods*. 59: 163-172.
- Lindstedt, B.-A., Vardund, T., and Kapperud, G. 2004b. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis. *Journal of microbiological methods*. 58: 213-222.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y. B., and Albert, M. J. 2000. Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *Journal of clinical microbiology*. 38: 578-585.

- Nair, G. B., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S. K., Dutta, B., Takeda, Y., and Sack, D. A. 2007. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants. *Clinical microbiology reviews*. 20: 39-48.
- Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., and Kumlin, E. 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science*. 235: 1616-1622.
- Okura, M., Osawa, R., Iguchi, A., Arakawa, E., Terajima, J., and Watanabe, H. 2003. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of clinical microbiology*. 41: 4676-4682.
- Onteniente, L., Brisse, S., Tassios, P. T., and Vergnaud, G. 2003. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 41: 4991-4997.
- Peak, I. R., Jennings, M. P., Hood, D. W., Bisercic, M., and Moxon, E. R. 1996. Tetrameric repeat units associated with virulence factor phase variation in *Haemophilus* also occur in *Nettseria* spp. and *Moraxella catarrhalis*. *FEMS microbiology letters*. 137: 109-114.
- Schouls, L. M., van der Ende, A., Damen, M., and van de Pol, I. 2006. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *Journal of clinical microbiology*. 44: 1509-1518.
- Thongjun, J., Mittraparp-arthorn, P., Yingkajorn, M., Kongreung, J., Nishibuchi, M., and Vuddhakul, V. 2013. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Southern Thailand from 2006 to 2010. *Tropical medicine and health*. 41: 151.
- Valcheva, V., Mokrousov, I., Narvskaya, O., Rastogi, N., and Markova, N. 2008. Utility of new 24-locus variable-number tandem-repeat typing for discriminating *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates collected in Bulgaria. *Journal of clinical microbiology*. 46: 3005-3011.
- van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., and Verbrugh, H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 62: 275-293.
- Vogler, A. J., Keys, C., Nemoto, Y., Colman, R. E., Jay, Z., and Keim, P. 2006. Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of bacteriology*. 188: 4253-4263.
- Wootipoom, N., Bhoopong, P., Pomwised, R., Nishibuchi, M., Ishibashi, M., and Vuddhakul, V. 2007. A decrease in the proportion of infections by pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in Hat Yai Hospital, southern Thailand. *Journal of medical microbiology*. 56: 1630-1638.

## ภาคผนวก

สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (reprint)

# ANTIBIOGRAM PROFILES AND VIRULENCE CHARACTERISTICS OF PANDEMIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES FROM DIARRHEAL PATIENTS IN HAT YAI HOSPITAL, SOUTHERN THAILAND

Sutima Preeprem<sup>1</sup>, Phuangthip Bhoopong<sup>2</sup>, Kanchana Srinitiwara Wong<sup>1</sup>,  
Varaporn Vuddhakul<sup>1</sup> and Pimonsri Mittraparp-arhorn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla; <sup>2</sup>Institute of Allied Health Science and Public Health, Walailuk University, Nakhon Si Thammarat, Thailand

**Abstract.** Fifty-seven pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates (*tdh* positive, *trh* negative GS-PCR positive) obtained from diarrheal patients at Hat Yai Hospital, Songkhla, Thailand during 2001-2016 were examined for their antibiogram profiles and virulence characteristics. Resistance to ampicillin, ciprofloxacin and norfloxacin was present in 100%, 12% and 2% of the isolates, respectively, with over half of the isolates showing intermediate resistance to the two fluoroquinolones. Virulence-associated genes encoding type III secretion systems (T3SS1 and T3SS2) and type VI secretion systems (T6SS1 and T6SS2) were widely distributed among the isolates. All isolates were able to produce similar levels of thermostable direct hemolysin. Eighty-nine percent and 44% of the isolates exhibited swarming and twitching motility, respectively. Sixty-eight percent of the isolates were able to use 50  $\mu$ M hemoglobin as the only iron source and 81% in the presence of 155  $\mu$ M hemoglobin. This study highlights the antimicrobial resistance and multiple virulence characteristics of clinical *V. parahaemolyticus* isolates, information that will be useful in clinical and epidemiological investigations of this pathogenic organism.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, antibiogram, iron acquisition, motility, virulence gene, Thailand

## INTRODUCTION

*Vibrio parahaemolyticus* is one of the major causes of gastroenteritis in humans.

---

Correspondence: Dr Pimonsri Mittraparp-arhorn, Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, 15 Kanjanavanich Road, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand.

Tel: +66 (0) 74 288314; Fax: +66 (0) 74 288311

E-mail: pimonsri.m@psu.ac.th

Cases are often associated with eating raw or undercooked shellfish or even cooked foods that contaminated with raw shellfish (Yeung and Boor, 2004). Recently, the number of *V. parahaemolyticus* infections in Thailand has been gradually increasing and this is a major cause for concern (Bureau of Epidemiology, 2015). *V. parahaemolyticus* O3:K6 serotype, positive by PCR for group-specific *toxRS* regions and thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) but not *tdh*-related hemolysin gene (*trh*)



was shown to be responsible for pandemic outbreaks of diarrhea in various parts of the world, including Asia, America, Africa and Europe (Okuda *et al*, 1997; Daniels *et al*, 2000, Martinez-Urtaza *et al*, 2004; Ansaruzzaman *et al*, 2005; Bureau of Epidemiology, 2015). *V. parahaemolyticus* serotypes O1:K25, O4:K68, and O1:K untypeable (KUT) were also reported as pandemic serotypes originating from O3:K6 clone (Chowdhury *et al*, 2000; Matsumoto *et al*, 2000; Bhuiyan *et al*, 2002). In Thailand, these serotypes were reported to be continually detected in patients since 2000 (Wootipoom *et al*, 2007; Thongjun *et al*, 2013).

Pathogenicity of *V. parahaemolyticus* depends on multiple factors. TDH and type III (T3SSs) and type VI secretion systems (T6SSs) are recognized as virulence-associated factors of *V. parahaemolyticus* isolates (Ceccarelli *et al*, 2013; Zhang and Orth, 2013). TDH is responsible for *V. parahaemolyticus* cytotoxicity and hemolytic activity (Vuddhakul, 2008, Wang *et al*, 2015), while T3SSs and T6SSs are responsible for translocation of effector proteins [VcrD1(T3SS1), VcrD2 (T3SS2), VipA1 (T6SS1), and VipA2 (T6SS2)] by needle-like bacterial structures (Calder *et al*, 2014). VopC and VopQ of T3SSs (encoded by *vopC* and *vopQ*, respectively) are responsible for host cell cytotoxicity and enterotoxicity (Calder *et al*, 2014). T6SSs play an important role in environment fitness of *V. parahaemolyticus* (Salomon *et al*, 2013; Wang *et al*, 2013b) and are necessary for adhesion to host cells (Wang *et al*, 2015).

In addition to these factors, *V. parahaemolyticus* exhibits swarming and twitching forms of motility. Swarming motility enables bacteria to survive in the environment by enhancing colonization (Fraser and Hughes, 1999) and twitching

motility is involved in attachment, biofilm formation and pathogenesis (Ottemann and Miller, 1997; McCarter, 2001). Iron acquisition was reported to correlate with the infection ability of *V. parahaemolyticus* isolates (León-Sicairos *et al*, 2015). Under iron-limited conditions, *V. parahaemolyticus* produces a siderophore, vibrioferrin, considered one of the importance factors for pathogenicity of *V. parahaemolyticus* due to its ability to chelate host cell iron and association with iron transportation (Vuddhakul, 2008; León-Sicairos *et al*, 2015).

In order to extend our understanding of pandemic *V. parahaemolyticus* characteristics in this region, this study determined antibiogram profiles and virulence properties of clinical *V. parahaemolyticus* isolates from Hat Yai Province, southern Thailand.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection and identification of pandemic *V. parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* isolates were obtained from clinical samples at Hat Yai Hospital, Songkhla, Hat Yai Province during 2001-2016 as part of routine microbiological diagnosis. Species classification was confirmed by PCR amplification of *toxR* (Kim *et al*, 1999), and identification of pandemic clone-specific characteristics (*tdh* and *toxRS* positive and *trh* negative) was performed by PCR as described previously (Tada *et al*, 1992; Matsumoto *et al*, 2000) using primers listed in Table 1. In brief, reaction mixture (20 µl) containing 2 µl of template DNA for *toxR*, *tdh* and *trh* or 2.5 µl of template DNA for *toxRS*, 0.2 mM dNTPs for *toxR*, *tdh* and *trh* or 0.125 mM dNTPs for *toxRS*, 0.2 mM of each primer or 1 mM of *vopQ* primers, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (NEB, Ipswich,

Table 1  
Primers used in this study.

Target gene	Encoded protein	Primer name	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>toxR</i>	ToxR regulatory protein	tox R-F toxR-R	GTCITCTGACGCAATCGTIG ATACGAGTGGITGCTGTCATG	368	63	Kim <i>et al</i> (1999)
<i>toxRS</i>	ToxRS regulatory protein	GS-VP.1 GS-VP.2	TAATGAGGTAGAAAACA ACGTAAACGGGCCTACA	651	45	Matsumoto <i>et al</i> (2000)
<i>tdh</i>	Thermostable direct hemolysin	tdh 1 tdh 2	GGTACTAAATGGCTGACATC CCACTACCCACTCTCATATGC	251	55	Tada <i>et al</i> (1992)
<i>trh</i>	TDH-related hemolysin	trh-F trh-R	GGTCAAAAATGGTTAAGCG CAITTCGGCTCTCATATGC	250	55	Tada <i>et al</i> (1992)
<i>vcrD1</i>	T3SS1-structure VcrD1	vcrD1F vcrD1R	CTGCTGGTCTTGTTCGCTCT TCTGGTCGCTTCCTTCTGTG	493	58	Yu <i>et al</i> (2003)
<i>vopQ</i>	T3SS1-effector VopQ	VP1680F VP1680R	GCCGAAAGCGTATCATCAACTC CACAGAGCTTACACCAAACGTACC	183	65	Makino <i>et al</i> (2003)
<i>vcrD2</i>	T3SS2-structure VcrD2	vcrD2(F) vcrD2(R)	GGTAAACACTGCCTGGTGGTCAATCG GTCTCTCAAAGTCTTCAAACCTCACCTGC	196	55	Okada <i>et al</i> (2009)
<i>vopC</i>	T3SS2-effector VopC	VPA132IF VPA132IR	GGTTAGTGAATCCAAACCAACCCGC TTGCCGTGCATGTCATACAACCAG	485	55	Makino <i>et al</i> (2003)
<i>vipA1</i>	T6SS1-structure VipA1	vipA1F vipA1R	CACGTGACGGCTCGGTGG CTCTTCTTTTCGGGTCTTTGGTCCG	500	60	Salomon <i>et al</i> (2013)
<i>vipA2</i>	T6SS2-structure VipA2	vipA2F vipA2R	CGAGTATCCACTCGAAACITTC TTCIGTCCCTCAGTACITTTCTG	524	58	Salomon <i>et al</i> (2013)

MA), and 1X Thermopol buffer (NEB) was subjected to thermocycling using a PCR T100 thermocycler (BioRad, Hercules, CA) as follows: 96°C for 5 minutes; for *toxR*: 35 cycles of 94°C for 1 minute, 63°C for 1.5 minutes and 72°C for 1.5 minutes; for *toxRS*: 25 cycles of 96°C for 1 minute, 45°C for 2 minutes and 72°C for 3 minutes; for *tdh* and *trh*: 35 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute and 72°C for 1 minute; all followed by a final heating at 72°C for 7 minutes. Amplicons were analyzed by 1% agarose gel-electrophoresis and ethidium bromide staining.

O (somatic) and K (capsular) serotypes were determined by a slide agglutination test using commercial anti-O and anti-K antibodies (Denka Seiken, Tokyo, Japan). *V. parahaemolyticus* isolates were stored at -80°C for further analysis.

#### Antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial susceptibility test was carried out using standard disk diffusion method on Mueller-Hilton agar (Difco, Sparks, MD) plate according to guidelines of the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2010; CLSI, 2017). Antimicrobial disks (Oxoid, Hampshire, UK) contained ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), cotrimoxazole (25 µg), norfloxacin (10 µg), and tetracyclin (30 µg). The data were interpreted as sensitive (S), intermediate (I) or resistant (R) following CLSI (2017) criteria.

#### Detection of *V. parahaemolyticus* secretion genes

Chromosomal DNA of pandemic *V. parahaemolyticus* was extracted by a boiling method (Thaithongnum *et al*, 2006). Detection of T3SSs and T6SSs genes (*vcrD1*, *vcrD2*, *vopC*, *vopQ*, *vipA1*, and *vipA2*) was performed by a PCR method as previously described (Laohaprertthisan

*et al*, 2003; Makino *et al*, 2003; Yu *et al*, 2003; Okada *et al*, 2009) using primers listed in Table 1 and amplification conditions as described above.

#### Detection of *V. parahaemolyticus* TDH

Pandemic *V. parahaemolyticus* isolates were cultured on tryptic soy agar (TSA) (Difco, Detroit, MI) supplemented with 1% NaCl at 37°C for 18 hours. Then, a single colony was spotted onto Wagatsuma blood agar prepared as previously described (Hara-Kudo *et al*, 2003) and incubated at 37°C for 18-35 hours. TDH production was detected by presence of a clear zone around the colony.

#### Detection of *V. parahaemolyticus* swarming and twitching motilities

Swarming motility assay was performed on a swarming plate prepared by adding 6 g of Bacto agar (Difco) to 1,000 ml of Luria Bertani (LB) medium (Difco). In short, pandemic *V. parahaemolyticus* isolate was cultured in LB broth (Difco) at 37°C for 18 hours, then bacteria concentration was adjusted to 0.5 McFarland unit. A 2 µl aliquot of bacteria culture was added onto the swarming plate and diameter of swarm zone was measured after incubation at 37°C for 4 and 8 hours (Inoue *et al*, 2007).

Twitching motility assay was carried out on LB agar (Difco) supplemented with 1.5% NaCl. In brief, pandemic *V. parahaemolyticus* isolate was cultured on TSA (Difco) supplemented with 1% NaCl at 37°C for 18 hours. Then a single colony was inoculated into an LB agar (Difco) supplemented with 1.5% NaCl and incubation at 37°C for 24 hours. The agar layer was removed and twitching zones were visualized at the agar plate interface by staining the zone with 0.1% (w/v) of crystal violet. The diameter of twitch zone was measured from the point of inocula-

tion (Antunes *et al*, 2011).

#### Detection of *V. parahaemolyticus* iron acquisition

Iron acquisition assay was performed as previously described (Wong *et al*, 1996; Almeida *et al*, 2008) with minor modifications. In short, 2  $\mu$ l aliquots of hemoglobin (50  $\mu$ M and 155  $\mu$ M) were spotted on melted rich medium (1% peptone, 3% NaCl, 0.5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5% glucose, and 1.5% agar) supplemented with 150  $\mu$ M 2, 2'-dipyridyl to chelate any exogenous iron in the medium. After incubation for 1 hour, 2  $\mu$ l aliquot of *V. parahaemolyticus* suspension was placed onto the medium and incubated at 37°C overnight. Growth of bacteria was determined directly by eye and under a light microscope (4x magnification).

## RESULTS

#### Clinical pandemic *V. parahaemolyticus* isolates

During 2001-2016, 57 clinical pandemic *V. parahaemolyticus* isolates were collected from diarrheal patients at Hat Yai Hospital, Songkhla (Table 2).

#### Antibiogram profiles

Using a disc diffusion assay, *V. parahaemolyticus* isolates showed resistance to ampicillin (100%), followed by ciprofloxacin (12%) and norfloxacin (2%) (Table 3). Intermediate susceptibility to chloramphenicol, ciprofloxacin, cotrimoxazole, and norfloxacin was observed in 2 (4%), 38 (67%), 1 (2%) and 10 (18%) isolates, respectively. Forty (70%) isolates were susceptible to all six antimicrobials tested except ampicillin. Interestingly, one isolate possessed resistance to ampicillin, ciprofloxacin and norfloxacin.

#### Presence of secretion genes

Gene of T3SS1 effector (*vopQ*) and

structural (*vcrD1*) protein was identified in 100% and 93%, respectively of isolates, and that of T3SS2 effector (*vopC*) and structural (*vcrD2*) protein in 96% and 93%, respectively (Table 2). All four T3SS genes were present in 84% of the isolates, both T3SS1 genes in 93% and both T3SS2 genes in 91%. Two T6SS genes were identified in 74% of the isolates.

#### Virulence-related characteristics

All *V. parahaemolyticus* isolates were positive for the Kanagawa phenomenon, *ie* TDH production and manifested twitching motility (zone diameter ranging from 4 to 52 mm), while 89% possessed swarming motility (diameter of migration zone ranging from 5 to 49 mm) (Table 4). Forty-three (81%) isolates were able to grow on iron-depleted medium supplemented with 155  $\mu$ M hemoglobin (Fig 1) and 68% in the presence of 50  $\mu$ M hemoglobin (Table 4). Interestingly, 37 *V. parahaemolyticus* isolates were positive for all tested virulence-related characteristics including Kanagawa phenomenon, motility phenotype and iron-dependent growth.

## DISCUSSION

Diarrheal disease remains one of the most important health problems worldwide. Infections by *V. parahaemolyticus* are commonly reported in several areas, especially in Southeast Asia (Ottaviani *et al*, 2010; Bureau of Epidemiology, 2015; Li *et al*, 2015). Treatment with antimicrobial can reduce disease severity and symptom duration.

Our results show that all *V. parahaemolyticus* isolates were resistant to ampicillin, consistent with results reported in China, India, Indonesia, and Mexico where 100%, 87%, 98%, and 94% of the isolates from clinical samples are resistant ( Pazhani *et al*, 2014; de Jesús Hernández-Díaz

Table 2  
 Characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates from Hat Yai Hospital, Songkhla, Thailand collected during 2001 - 2016.

Year of collection	Isolate	Serotype	Virulence gene			Secretion gene					Antibiotic resistance	
			<i>toxRS</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	T3SS1		T3SS2		T6SS1		T6SS2
						<i>vcrD1</i>	<i>vopQ</i>	<i>vcrD2</i>	<i>vopC</i>	<i>vipA1</i>		<i>vipA2</i>
2001	PSU 1	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP, CIP
2002	PSU 2	O1:KUT	+	+	-	-	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 3	O1:KUT	+	+	-	-	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 4	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 5	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 6	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
2003	PSU 7	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP, CIP
	PSU 8	O1:KUT	+	+	-	+	-	+	+	+	+	AMP
	PSU 33	O1:K25	+	+	-	+	-	+	+	+	-	AMP, CIP
	PSU 34	O1:K25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP, CIP
2004	PSU 9	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 10	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 11	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	-	-	AMP
	PSU 12	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
	PSU 13	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
2005	PSU 14	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
	PSU 15	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
2006	PSU 16	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
	PSU 17	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
	PSU 35	O1:K25	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
2008	PSU 18	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	AMP
	PSU 19	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 36	O1:K25	+	+	-	+	-	+	+	-	-	AMP

Table 2 (Continued)

Year of collection	Isolate	Serotype	Virulence gene				Secretion gene					Antibiotic resistance	
			<i>toxRS</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	T3SS1		T3SS2	T6SS1		T6SS2		
						<i>vcrD1</i>	<i>vopQ</i>		<i>vcrD2</i>	<i>vopC</i>			<i>vipA1</i>
2009	PSU 37	O1:K25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 38	O1:K25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 39	O1:K25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP, CIP, NOR
	PSU 40	O1:K25	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 41	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 42	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 43	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 44	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP, CIP
	PSU 45	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 46	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP, CIP
	PSU 20	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	AMP
	PSU 21	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	AMP
2011	PSU 22	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 23	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 24	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	AMP
	PSU 25	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 26	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 27	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 28	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 29	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 30	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	AMP
	PSU 31	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP

Table 2 (Continued)

Year of collection	Isolate	Serotype	Virulence gene				Secretion gene					Antibiotic resistance	
			toxRS	tdh	trh	T3SS1		T3SS2	T6SS1		T6SS2		
						vcrD1	vopQ		vcrD2	vopC			vipA1
2012	PSU 32	O1:KUT	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
2013	PSU 47	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
2014	PSU 48	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 49	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 50	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 51	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
2016	PSU 52	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 53	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 54	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 55	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 56	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
	PSU 57	O3:K6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	AMP
Prevalence (%)						93	100	93	96	91	79		

+, present; -, absent. AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; NOR, norfloxacin.

*et al*, 2015; Chen *et al*, 2016). As resistance to ampicillin has become widespread, fluoroquinolones, such as ciprofloxacin and norfloxacin, have been the first-line drug for initial treatment of acute diarrhea in adult patients (Riddle *et al*, 2016). In Thailand, fluoroquinolone is the most commonly prescribed antibiotic for treatment of acute diarrhea in adults (Supcharassaeng and Suankratay, 2011). In our study, intermediate resistance of clinical *V. parahaemolyticus* isolates to the fluoroquinolones were present in over 50% and (of concern) complete resistance in 12% of the samples. Ciprofloxacin-resistant *V. parahaemolyticus* isolates (11%) have been reported in Indonesia since 2001 (Tjaniadi *et al*, 2003). Not only in *V. parahaemolyticus* but resistance to ciprofloxacin and other fluoroquinolones was present in *Campylobacter* spp isolated from patients with diarrhea in Thailand and Indonesia (Kuschner *et al*, 1995; Tjaniadi *et al*, 2003). Careful surveillance and appropriate use of antimicrobial

Table 3

Antibiogram profile of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates from Hat Yai Hospital, Songkhla, Thailand collected during 2001 - 2016.

Antimicrobial agent	<i>V. parahaemolyticus</i> isolates (n = 57)		
	Resistant <sup>a</sup> n (%)	Intermediate resistant <sup>a</sup> n (%)	Sensitive <sup>a</sup> n (%)
Ampicillin	57 (100)	-	-
Chloramphenicol	-	2 (4)	55 (96)
Ciprofloxacin	7 (12)	38 (67)	12 (21)
Cotrimoxazole	-	2 (4)	55 (96)
Norfloxacin	1 (2)	10 (18)	46 (80)
Tetracycline	-	-	57 (100)

<sup>a</sup>Based on CLSI (2017).

agents are required to preventing emergence of drug-resistant bacteria. The increase in resistance among pathogens might be due to overuse of antibiotics.

T3SSs and T6SSs are believed to be responsible for pathogenicity of *V. parahaemolyticus* (Ceccarelli *et al*, 2013; Zhang and Orth, 2013). All *V. parahaemolyticus* isolates in this study carried at least one gene encoding for T3SS. T3SS1 and T3SS2 genes are detected by microarray hybridization in all pandemic *V. parahaemolyticus* isolates (Meador *et al*, 2007). In this study, the prevalence of T3SS genes *vcrD1*, *vcrD2*, *vopC*, and *vopQ* were >90%. T6SS genes were detected at lower frequency than those of T3SS. An earlier study described all clinical isolates possess T3SS1, whereas 84% and 92% of clinical isolates were positive for T6SS1 and T6SS2, respectively, but no information regarding the pandemic genetic background (GS-PCR, *tdh*<sup>+</sup>, *trh*) is provided (Kongrueng *et al*, 2015). Further studies are needed to examine the prevalence of other genes in the T6SS group.

Production of TDH (Kanagawa phe-

nomenon-positive) among clinical *V. parahaemolyticus* isolates and its relationship with *V. parahaemolyticus* pathogenicity has been reported (Ceccarelli *et al*, 2013). This phenomenon was previously shown to be strongly associated with *tdh*<sup>+</sup> *trh*<sup>-</sup> *V. parahaemolyticus* isolates (Suzuki *et al*, 1997). In the current study all *tdh*<sup>+</sup> *trh*<sup>-</sup> *V. parahaemolyticus* isolates were TDH producers of similar levels.

*V. parahaemolyticus* isolates demonstrated variations in swarming and twitching motilities, but all isolates possessed at least a swarming or twitching motility. *V. parahaemolyticus* can be motile by several ways, depending on the environment (McCarter, 1999; Kim and McCarter, 2000; Broberg *et al*, 2011) and also on the presence of number of genetic regulatory mechanisms, motility proteins, and surface sensors (Kim and McCarter, 2000; Mattick, 2002; Wang *et al*, 2013a). The inability to swarm observed in six isolates might be due to defects in cell division during the swarm cell cycle, lateral flagella formation or ability to produce auto



Table 4  
 Clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates from Hat Yai Hospital, Songkhla, Thailand collected during 2001 - 2016 grouped according to virulence-related phenotypes.

Group	Number of isolates	Isolate ID	Serotype	Kanagawa phenomenon <sup>a</sup>	Motility phenotype		Iron-dependent growth <sup>d</sup>	
					Swarming <sup>b</sup>	Twitching <sup>c</sup>	155 $\mu$ M hemoglobin	50 $\mu$ M hemoglobin
1	2	PSU 40, 44	O3:K6	+	+	++	+	+
2	3	PSU 45, 46	O3:K6	+	+	++	+	-
3	7	PSU 28	O1:KUT					
		PSU 43, 53	O3:K6	+	+	++	+	+
4	9	PSU 4, 10, 11, 12, 22	O1:KUT					
		PSU 47, 48, 49, 51, 52, 54, 55, 57	O3:K6	+	+	++	-	-
5	28	PSU 21	O1:KUT					
		PSU 41, 42	O3:K6	+	+	+	+	+
6	2	PSU 33, 34, 36, 37, 38, 39	O1:K25					
		PSU 3, 5, 6, 7, 8, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32	O1:KUT					
7	2	PSU 35	O1:K25	+	+	+	+	-
		PSU 1	O1:KUT					
8	2	PSU 2, 14	O1:KUT	+	-	++	+	-
		PSU 50, 56	O3:K6	+	-	++	-	-
9	1	PSU 13	O1:KUT	+	-	++	+	+
10	1	PSU 24	O1:KUT	+	-	+	+	+

<sup>a</sup>+, positive; -, negative. <sup>b</sup>+, swarm zone >5 mm; -, no swarm zone. <sup>c</sup>+, twitch zone >4 mm (above mean value); ++, twitch zone >13mm (above mean value); -, no twitch zone. <sup>d</sup>+, growth; -, no growth.

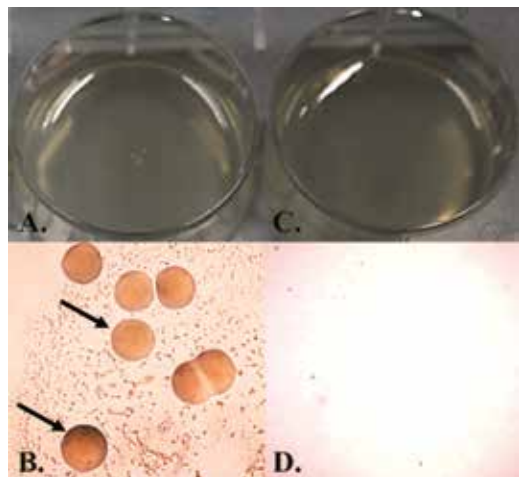


Fig 1-Growth of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates on melted rich medium supplemented with 150  $\mu$ M 2, 2'-dipyridyl and 155  $\mu$ M hemoglobin. A). 1x magnification. B). 4x magnification. C). Negative control, 1x magnification. D). Negative control, 4x magnification. Arrow indicates *V. parahaemolyticus* colony.

inducers (McCarter, 1999).

Iron is essential for almost all bacteria including *V. parahaemolyticus*. During infection, *V. parahaemolyticus* utilizes siderophores for uptake of iron during growth in iron-limited environment (León-Sicairos *et al*, 2015). Isolates were examined for ability to utilize iron from hemoglobin on iron-limited agar plate. A minority of *V. parahaemolyticus* isolates were unable to grow when tested with 50  $\mu$ M hemoglobin in agreement with a previous report (Wong *et al*, 1996) suggesting these isolates might possess low virulence in humans where "free" iron is limited. In this study, 65% of isolates were able to grow at low iron concentration with swarming and twitching motility. These phenotypes could help *V. parahaemolyticus* to survive under stress condition, especially during infection.

In summary, the study reveals the majority of clinical *V. parahaemolyticus* isolates collected from a hospital in southern Thailand over a 16-year period had pandemic properties; all isolates were resistant to ampicillin and over 50% partially or completely resistant to the first-line drugs, fluoroquinolones; all isolates possessed virulence characteristics, such as secretion, twitching and/or swarming motility and iron acquisition, as well as genes required for hemolytic activity. The antibiogram profiles identified in these clinical isolates are of importance for both clinical and epidemiological purposes. Moreover, data from these investigations should be of assistance in furthering our understanding of virulence properties and underlying mechanisms of this pathogenic organism.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by Prince of Songkla University (contract no. SCI5812085). The authors thank the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand for supporting a scholarship under the Strategic Scholarships Fellowships Frontier Research Networks (specific for the southern region).

#### REFERENCES

- Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, *et al*. The hyphal-associated adhesin and invasins Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLOS Pathog* 2008; 4: e1000217.
- Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen JL, *et al*. Pandemic serovars (O3: K6 and O4: K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2559-62.

- Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLOS One* 2011; 6: e22674.
- Bhuiyan N, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, *et al.* Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 284-6.
- Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microb Infect* 2011; 13: 992-1001.
- Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health. Annual epidemiological surveillance report (AESR). Food poisoning. Nonthaburi: Bureau of Epidemiology, 2015. [Cited 2017 Nov 5]. Available from: [http://www.boe.moph.go.th/Annual/AESR2015/aesr2558/Part%201/07/food\\_poisoning.pdf](http://www.boe.moph.go.th/Annual/AESR2015/aesr2558/Part%201/07/food_poisoning.pdf)
- Calder T, de Souza Santos M, Attah V, *et al.* Structural and regulatory mutations in *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems display variable effects on virulence. *FEMS Microbiol Lett* 2014; 361: 107-14.
- Ceccarelli D, Hasan NA, Huq A, Colwell RR. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3: 1-9.
- Chen Y, Chen X, Yu F, *et al.* Serology, virulence, antimicrobial susceptibility and molecular characteristics of clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains circulating in southeastern China from 2009 to 2013. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 258. e9-16.
- Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T, *et al.* Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 631-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition M45-A2. Wayne: CLSI, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne: CLSI, 2017.
- Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *J Infect Dis* 2000; 181: 1661-6.
- de Jesús Hernández-Díaz L, Leon-Sicairos N, Velazquez-Roman J, *et al.* A pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 clone causing most associated diarrhea cases in the Pacific Northwest coast of Mexico. *Front Microbiol* 2015; 6: 221.
- Fraser GM, Hughes C. Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 630-5.
- Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, *et al.* Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 3883-91.
- Inoue T, Shingaki R, Hirose S, Waki K, Mori H, Fukui K. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 2007; 189: 950-7.
- Kim Y-K, McCarter LL. Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* 2000; 182: 3693-704.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1173-7.
- Kongrueng J, Yingkajorn M, Bunpa S, Sermwittayawong N, Singkhamanan K, Vudhakul V. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J Fish Dis* 2015; 1-10.
- Kuschner RA, Trofa AF, Thomas RJ, *et al.* Use of azithromycin for the treatment of *Campylobacter enteritis* in travelers to Thailand, an area where ciprofloxacin resistance is prevalent. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 536-41.

- Laohaprertthisan V, Chowdhury A, Kongmuang U, *et al.* Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 395-406.
- León-Sicairos N, Angulo-Zamudio UA, de la Garza M, Velázquez-Román J, Flores-Villaseño HM, Canizalez-Román A. Strategies of *Vibrio parahaemolyticus* to acquire nutritional iron during host colonization. *Front Microbiol* 2015; 6: 702.
- Li B, Luo J, Tan H, *et al.* Phenotypic and phylogenetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolates recovered from diarrhea cases in Guangdong Province, China. *Int J Food Microbiol* 2015; 200: 13-7.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, *et al.* Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 2003; 361: 743-9.
- Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, *et al.* Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4672-8.
- Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, *et al.* Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 578-85.
- Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 289-314.
- McCarter L. The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Molec Microbiol Biotechnol* 1999; 1: 51-7.
- McCarter LL. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65: 445-62.
- Meador CE, Parsons MM, Bopp CA, Gerner-Smidt P, Painter JA, Vora GJ. Virulence gene-and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1133-9.
- Okada N, Iida T, Park K-S, *et al.* Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infect Immun* 2009; 77: 904-13.
- Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, *et al.* Emergence of a unique O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3150-5.
- Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, *et al.* *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3: K6 pandemic clone and emergence of O1: KUT serotype. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66: 452-5.
- Ottemann KM, Miller JF. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* 1997; 24: 1109-17.
- Pazhani GP, Bhowmik SK, Ghosh S, *et al.* Trends in the epidemiology of pandemic and non-pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Kolkata, India. *PLOS Negl Trop Dis* 2014; 8: e2815.
- Riddle MS, DuPont HL, Connor BA. ACG clinical guideline: diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. *Am J Gastroenterol* 2016; 111: 602.
- Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2. *PLOS One* 2013; 8: e61086.
- Supcharassaeng S, Suankratay C. Antibiotic prescription for adults with acute diarrhea at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand. *J Med Assoc Thai* 2011; 94: 545.
- Suzuki N, Yasufumi, Furukawa T, *et al.* Incidence of Kanagawa phenomenon-positive and -negative *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhea and their relation to *tdh* and *trh* genes.

- Kansenshogaku Zasshi* 1997; 71:417-20.
- Tada J, Ohashi T, Nishimura N, *et al.* Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 477-87.
- Thaithongnum S, Ratanama P, Weeradechapol K, Sukhoom A, Uddhakul V. Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture* 2006; 261: 1-9.
- Thongjun J, Mittraparp-arthorn P, Yingkajorn M, Kongreung J, Nishibuchi M, Uddhakul V. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Southern Thailand from 2006 to 2010. *Trop Med Health* 2013; 41: 151.
- Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D, *et al.* Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 666-70.
- Uddhakul V. *Vibrio parahaemolyticus*: an important seafood-borne pathogen. 1<sup>st</sup> ed. Songkla: iQue media, 2008.
- Wang L, Ling Y, Jiang H, *et al.* AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 2013a; 160: 245-51.
- Wang R, Zhong Y, Gu X, Yuan J, Saeed A F, Wang S. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*. *Front Microbiol* 2015; 6: 144.
- Wang L, Zhou D, Mao P, *et al.* Cell density- and quorum sensing-dependent expression of type VI secretion system 2 in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLOS One* 2013b; 8: e73363.
- Wong H-C, Liu C-C, Yu C-M, Lee Y-S. Utilization of iron sources and its possible roles in the pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 791-8.
- Wootipoom N, Bhoopong P, Pomwised R, Nishibuchi M, Ishibashi M, Uddhakul V. A decrease in the proportion of infections by pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in Hat Yai Hospital, southern Thailand. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1630-8.
- Yeung PM, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog Dis* 2004; 1: 74-88.
- Yu WT, Jong KJ, Lin YR, Tsai SE, Tey YH, Wong HC. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster and clam culturing environments in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 2003; 160: 185-92.
- Zhang L, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Curr Opin Microbiol* 2013; 16: 70-7.

# Multiplex Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT Isolates

Sutima Preeprem,<sup>1</sup> Kamonnut Singkhamanan,<sup>2</sup> Mitsuaki Nishibuchi,<sup>3</sup>  
Varaporn Vuddhakul,<sup>1</sup> and Pimonsri Mittraparp-arhorn<sup>1</sup>

## Abstract

Pandemic O3:K6 *Vibrio parahaemolyticus* emerged in 1996. Since then, this strain of pathogen and its sero-variants (predominantly O1:KUT [untypable], O1:K25 and O4:K68) have caused gastroenteritis worldwide. Owing to the limitation in established K antisera, tracking the sources of KUT for epidemiological investigation is difficult. Therefore, the effective molecular typing is required to discriminate the strains. The aim of this study was to develop a multiplex multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) assay for typing pandemic *V. parahaemolyticus*, including various O1:KUT isolates. The assay was based on the analysis of four variable number tandem repeat loci. Forty-six pandemic isolates, including O1:KUT, O1:K25, and O3:K6, were investigated. MLVA generated 38 distinct MLVA profiles, whereas only 16 types were obtained from pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). In this work, MLVA resolved the 12 isolates of O1:KUT obtained in 2001–2005 with identical PFGE patterns into unique profiles. Our data indicated that multiplex MLVA developed in this study has high discriminatory power ( $D=0.99$ ), and is superior to PFGE for distinct pandemic *V. parahaemolyticus*, including O1:KUT isolates.

**Keywords:** molecular epidemiology, MLVA, PFGE, VNTR, *V. parahaemolyticus*

## Introduction

*VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* is a marine bacterium that causes seafoodborne gastroenteritis outbreaks worldwide (CDC, 2016). In 1996, infection by pandemic O3:K6 serotype that possesses the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene but not the *tdh*-related (*trh*) gene appeared suddenly and was responsible for diarrhea outbreaks in various parts of the world (Okuda *et al.*, 1997; Daniels *et al.*, 2000; Martinez-Urtaza *et al.*, 2004; Ansaruzzaman *et al.*, 2005; AESR, 2014). Group-specific polymerase chain reaction (GS-PCR) was established to detect nucleotide variations within the *toxRS/new* region that are unique to the pandemic group of *V. parahaemolyticus* (Matsumoto *et al.*, 2000). In addition, four genomic islands, VPai-1, VPai-4, VPai-5, and VPai-6, were proposed to be pandemic markers for *V. parahaemolyticus* (Hurley *et al.*, 2006).

In recent years, O3:K6 and other distinct serotypes, such as O1:KUT, O1:K25 and O4:K68, have been demonstrated in Asia, America, Africa, and Europe (Nair *et al.*, 2007; Ser-

ichantalergs *et al.*, 2007). In Thailand, those serotypes are predominant and have been reported in clinical specimens (Wootipoom *et al.*, 2007). Molecular analysis of those sero-variant strains reveals that they are nearly identical and may originate from the pandemic O3:K6 clone by alteration of the O:K antigens and a genetic recombination (Chowdhury *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Bhuiyan *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2011). However, for epidemiological investigations, some isolates could not be typed to the existing K serogroups (KUT). Therefore, tracking the origins of those various KUT isolates in epidemiological investigations may be difficult. Thus, a high-sensitivity technique is required for differentiating those strains.

Many molecular typing techniques have been developed to gain a better understanding of genetic relatedness among strains of *V. parahaemolyticus*. Several PCR-based typing methods, such as arbitrarily primed PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR sequence, have been demonstrated for *V. parahaemolyticus* strain typing. Although these techniques are affordable, rapid, and easy-to-perform, they are occasionally associated with low discriminatory

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

<sup>2</sup>Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

<sup>3</sup>Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.

power and low reproducibility (Wong and Lin, 2001; Sabat *et al.*, 2013; Oyarzabal and Kathariou, 2014). A standard method for epidemiological investigation of this pathogen is pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). However, this technique requires an expensive specialized equipment, it is time-consuming, and PFGE banding patterns are sometimes difficult to interpret.

Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) has been developed for typing of bacterial pathogens based on the detection of variable number tandem repeats (VNTRs) at multiple VNTR loci (Lindstedt, 2005). MLVA results can be easily and unambiguously interpreted allowing inter-laboratory comparisons. This method has been demonstrated to provide high-resolution information and reproducibility for epidemiological studies of *V. parahaemolyticus*, especially for pandemic O3:K3 serotype. The five previously reported MLVA typing protocols differ in the number of VNTR loci that were used, including 7 (Ansedo-Bermejo *et al.*, 2010), 8 (Kimura *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2016), 10 (Harth-Chu *et al.*, 2009), and even 12 (Lüdeke *et al.*, 2015). So far, 19 VNTRs has been used for typing of *V. parahaemolyticus* (Kimura *et al.*, 2008; Harth-Chu *et al.*, 2009; Ansedo-Bermejo *et al.*, 2010; Lüdeke *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

The aims of this study were to identify novel potential VNTR loci and develop a new multiplex MLVA scheme using fewer VNTR loci than previous protocols for typing pandemic *V. parahaemolyticus*, especially O1:KUT serotype. The results were compared with those obtained by PFGE. This technique may be useful for molecular epidemiological investigations of other O serogroups *V. parahaemolyticus* that possess KUT.

## Materials and Methods

### Bacterial strains included in the study

All *V. parahaemolyticus* isolates used in this study were obtained from clinical specimens in southern Thailand and were confirmed by PCR targeting the *toxR* gene (Kim *et al.*, 1999). A total of 46 pandemic isolates, including 32, 8, and 6 isolates of O1:KUT, O1:K25, and O3:K6, respectively were used (Table 1). Nonpandemic *V. parahaemolyticus* isolates ( $n=20$ ) were included for evaluation of pandemic-specific VNTR marker. The pandemic-clone specific characteristics (*tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>, and GS-PCR<sup>+</sup>) were determined by PCR as described previously (Tada *et al.*, 1992; Matsumoto *et al.*, 2000). The O and K serotypes were evaluated by the slide agglutination test using commercial anti-O and anti-K antibodies (Denka Seiken, Tokyo, Japan), according to the manufacturer's instructions.

### Pulsed-field gel electrophoresis

PFGE of pandemic isolates was carried out as described previously with slight modification (Wang *et al.*, 2008). In brief, agarose-embedded genomic DNA was digested with *NotI* restriction enzyme (NEB, Ipswich MA), and the digested DNA fragments were separated by electrophoresis using 1% pulse-field certified agarose in 0.5 × Tris-borate-ethylene diamine tetraacetic acid running buffer at 14°C for 19 h with use of the CHEF-DRIII system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Electrophoresis was performed with pulse times of 2.2–54.2 s, a 120° angle, and a 6 V/cm gradient. The gel was stained with ethidium bromide and the DNA patterns were

TABLE 1. CHARACTERISTICS AND GROUP-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION RESULTS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES USED IN THIS STUDY

Serotype (no. of isolates)	Year of isolation	No. of isolates	Presence of gene		GS-PCR result	
			<i>tdh</i>	<i>trh</i>		
Pandemic (46)						
O1:KUT (32)	2001	1	+	-	+	
	2002	5	+	-	+	
	2003	2	+	-	+	
	2004	4	+	-	+	
	2005	3	+	-	+	
	2006	2	+	-	+	
	2008	2	+	-	+	
	2009	7	+	-	+	
	2011	5	+	-	+	
	2012	1	+	-	+	
	O1:K25 (8)	2003	2	+	-	+
		2006	1	+	-	+
2008		5	+	-	+	
O3:K6 (6)	2008	6	+	-	+	
Nonpandemic (20)						
	2000–2007	7	+	-	-	
	2009–2011	3	+	+	-	
	2007–2011	3	-	+	-	
	2008–2011	7	-	-	-	

GS-PCR, group-specific polymerase chain reaction; *tdh*, thermostable direct hemolysin; *trh*, *tdh*-related.

analyzed both visually and with Bionumeric software (v.7.0) (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Dendrogram based on the Dice coefficient was constructed by unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA).

### VNTR analyses

For the selection of VNTR markers, the genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633 was screened to locate the presence of VNTR sequences (<http://minisatellites.u-psud.fr>) (Denœud and Vergnaud, 2004) according to the following criteria: (1) a repeat unit range of 3–9 bp, (2) a minimum copy numbers of 10, (3) a minimum repeat size of 50 bp, and (4) percentage matches between 80 and 100. Three VNTR loci common to the previous studies (TR1, TR2, and TR4) (Kimura *et al.*, 2008; Harth-Chu *et al.*, 2009; Ansedo-Bermejo *et al.*, 2010; Lüdeke *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016) and one novel VNTR loci (TR3) were identified (Table 2). Primer sets specific for those four VNTR loci were designed with Primer3Plus software (<http://primer3plus.com>) (Rozen and Skaletsky, 1999). The 5' forward primers were labeled with distinctive fluorescent dyes (VIC, PET, NED, or FAM) to generate multiplex PCR products, which were further separated by multicolored capillary electrophoresis. In VNTR amplification, bacterial DNA was extracted by boiling method (Kayali *et al.*, 2015) and subjected to a multiplex PCR amplification using primer mix to simultaneously amplify the VNTR loci. Each 30 µL multiplex PCR mixture contained 1 × GoTaq<sup>®</sup> Reaction buffer, 0.5 U of GoTaq<sup>®</sup> DNA polymerase (Promega, Madison, WI), 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (Promega), 0.2 µM of each primer, and 2 µL of

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF THE VARIABLE NUMBER TANDEM REPEAT LOCI AND LIST OF PRIMERS USED FOR MULTILOCUS VARIABLE-NUMBER TANDEM-REPEAT ANALYSIS

VNTR locus name (chromosome)	Repeat consensus sequences	VNTR copy number <sup>a</sup>	Function	DI	Primer	Expected amplicon size (bp) <sup>b</sup>
TR1 (I)	AGGTTCT	11	Noncoding region	0.83	F: 5'-VIC <sup>c</sup> -GTGACGGCTGG TCAGAAGAT-3' R: 5'-TTCACGCCAACTTC CTCAAC-3'	130
TR2 (I)	TCTGGC	21	Hypothetical protein	0.92	F: 5'-PET <sup>c</sup> -AGTTGCGGTG CGTAGTTTTTC-3' R: 5'-TCGCTCAGGAGCTA TCCTCT-3'	190
TR3 (II)	CAGCTAAA	22	Noncoding region	0.85	F: 5'-NED <sup>c</sup> -TTCACGGGTA AAAACACCCAT-3' R: 5'-GCTGTGGTCTTTGT GTACGG-3'	233
TR4 (I)	ATAGAG	28	Hypothetical protein	0.91	F: 5'-FAM <sup>c</sup> -TCAGCCAGAC ACTCCATACAA-3' R: 5'-GGAAGACATATCCG GTTTGC-3'	214

<sup>a</sup>Repeat times were counted using the genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain RIMD2210633.

<sup>b</sup>Amplicon size of each VNTR locus was estimated using the genome sequence of *V. parahaemolyticus* strain RIMD2210633.

<sup>c</sup>Fluorescent dyes.

DI, diversity index; F, forward; R, reverse; VNTR, variable number tandem repeat.

template DNA. The multiplex amplification was carried out on a T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories) using a thermal profile of beginning at 95°C for 3 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 50°C for 1 min, and 68°C for 1 min. Each run ended with a final elongation step at 68°C for 5 min. The PCR products were analyzed by capillary electrophoresis using ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied BioSystems, Foster City, CA). Fragment sizes from each VNTR loci were determined by GeneMapper software (v.4.1) (Applied BioSystems) and were converted into VNTR copy numbers using the following equation (Slack *et al.*, 2005):

$$\text{Number of repeats (bp)} = \frac{[\text{fragment size (bp)} - \text{flanking regions (bp)}]}{\text{repeat size (bp)}}$$

The combination of four numbers reflecting the number of repeats in four VNTR loci generated an MLVA profile. A dendrogram was constructed based on the categorical (mapping) with UPGMA method by Bionumeric software (v.7.0) (Applied Maths).

#### Statistical analysis

The polymorphism information index or diversity index (DI) of each VNTR locus was calculated individually using the formula;  $D = 1 - \sum (\text{allele frequency})^2$  (Weir, 1990). The discriminatory power was calculated as previously described (Castañeda *et al.*, 2005). The congruence between typing methods was determined using the Wallace coefficients (W) (Fowlkes and Mallows, 1983).

## Results

#### Genotyping by PFGE

The *NotI* PFGE of 46 pandemic *V. parahaemolyticus* isolates was performed and 16 distinct PFGE types were gen-

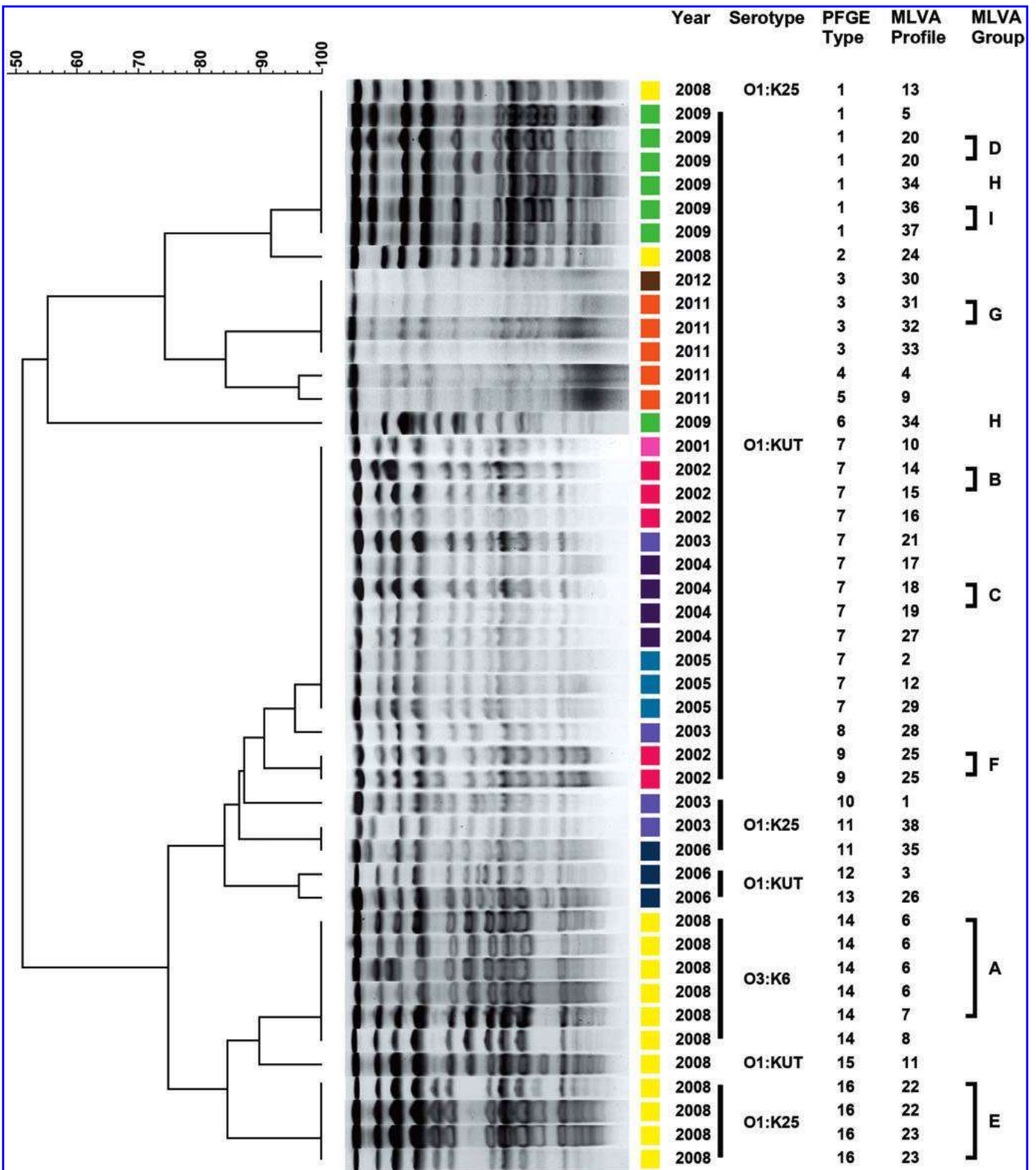
erated. The discriminatory power of PFGE was 0.89. At 80% cutoff, all isolates obtained during 2001–2006 were grouped together regardless of serotypes (Fig. 1). It is of interest that 12 isolates of O1:KUT obtained during 2001–2005 exhibited indistinguishable PFGE patterns (Fig. 1). All O3:K6 isolates had similar PFGE pattern and were clustered closely with four of five O1:K25 isolates obtained in the same year (Fig. 1). New PFGE types were observed among the O1:KUT isolates obtained during 2009–2012. Similarity values of >70% were observed among these isolates (Fig. 1). A minimum spanning tree (MST) based on PFGE illustrated that phylogenetic groupings of all pandemic *V. parahaemolyticus* isolates were well correlated with serotype (Fig. 2A), except for one O1:K25 isolate, and period of isolation (Fig. 2B).

#### Analysis of VNTR loci and MLVA analysis

In this work, four VNTR loci (TR1–TR4) with repeat consensus sequences between six and eight were selected. Analysis of these loci indicated that three (TR1, TR2, and TR4) and one VNTR (TR3) loci were located on chromosome I and II, respectively (Table 2). TR1 and TR3 were localized in the noncoding regions; however, TR2 and TR4 were located in the open reading frame regions of hypothetical proteins, VP2226 and VP2892, respectively. TR3 primers could also amplify VPA1263 region, which is located in the VPAI-6 (Fig. 3). In this study, all pandemic isolates were positive with the TR3 primers, whereas amplified DNA was not detected in all 20 nonpandemic isolates.

Specific primers that targeted each VNTR locus were newly designed to support multiplex PCR method (Table 2). The numbers of flanking nucleotides in TR1 to TR4 are 53, 88, 57, and 46 bp, respectively. A multiplex PCR simultaneously amplified four VNTR loci of *V. parahaemolyticus* and generated the copy number of each locus ranging from 8 to 17 (TR1), 7 to 24 (TR2), 5 to 44 (TR3), and 7 to 38 (TR4),

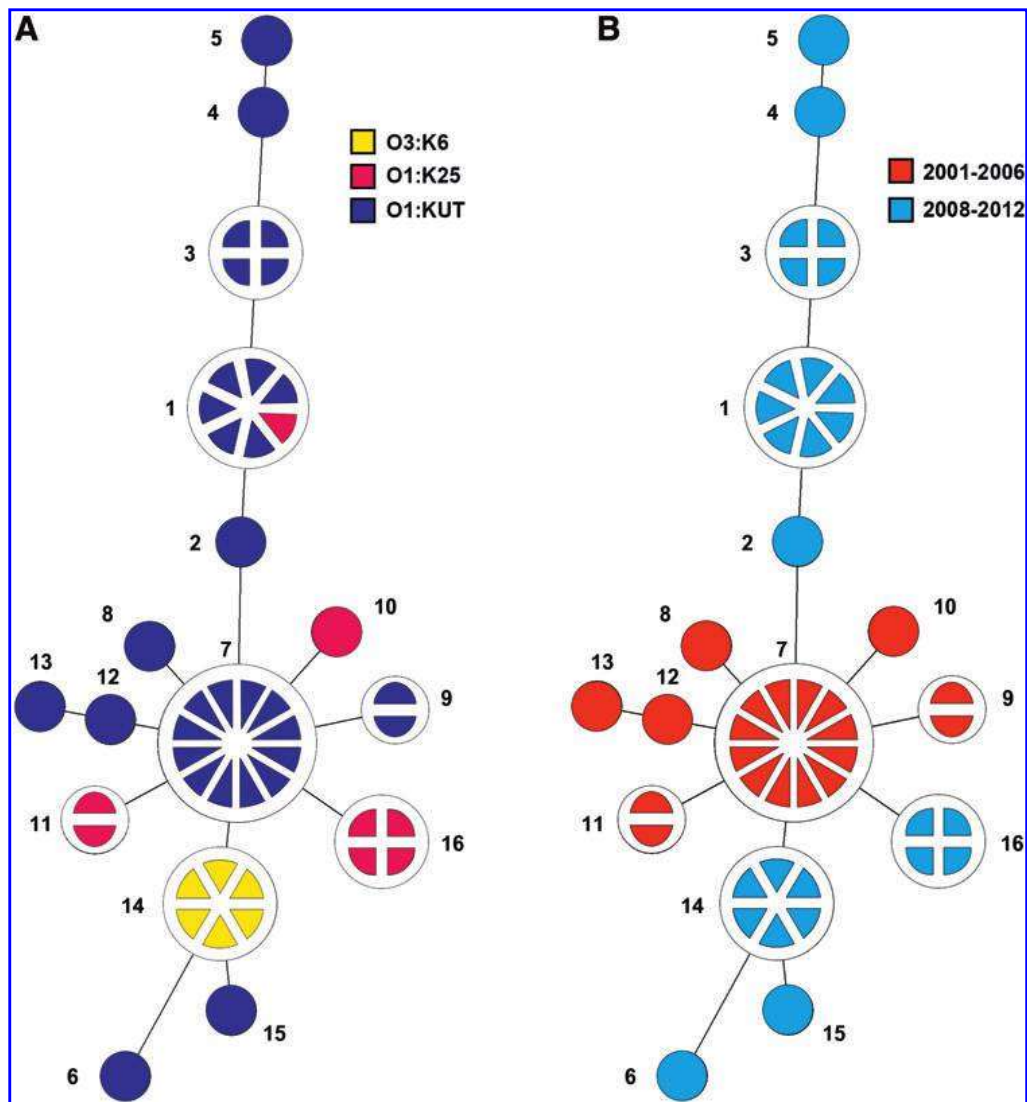




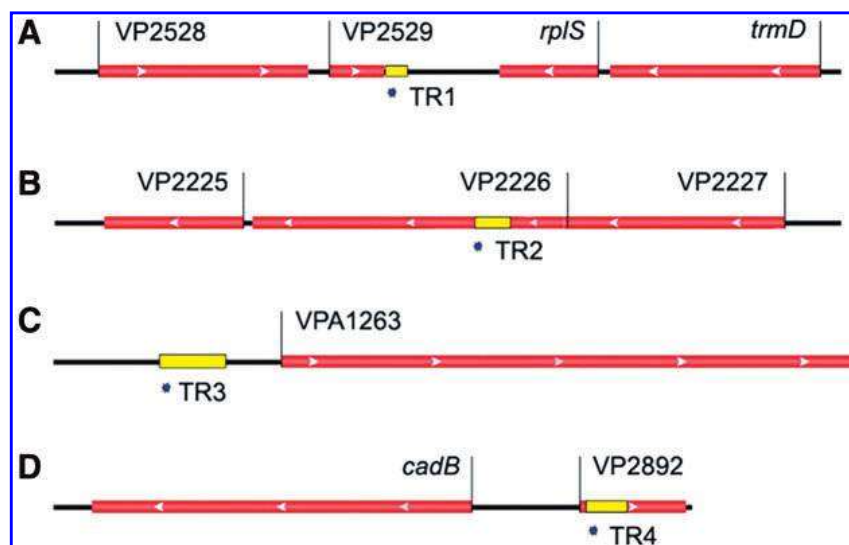
**FIG. 1.** Dendrogram was generated with *NorI*-digested PFGE patterns of the 46 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. Colors within the squares correspond to year of isolation. Year of isolation and serotype of the isolate are included along each PFGE lane. MLVA profiles and MLVA groups (A–I) are provided for direct comparison. MLVA, multilocus variable-number tandem-repeat analysis; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis. Color images available online at [www.liebertpub.com/fpd](http://www.liebertpub.com/fpd)

respectively (Fig. 4). The DI based on genetic diversity for the four VNTR loci ranged from 0.83 to 0.92 (Table 2). TR2 locus was the most polymorphic loci (Table 2). No amplification product of TR1 and/or TR4 loci was observed in some isolates (Fig. 4).

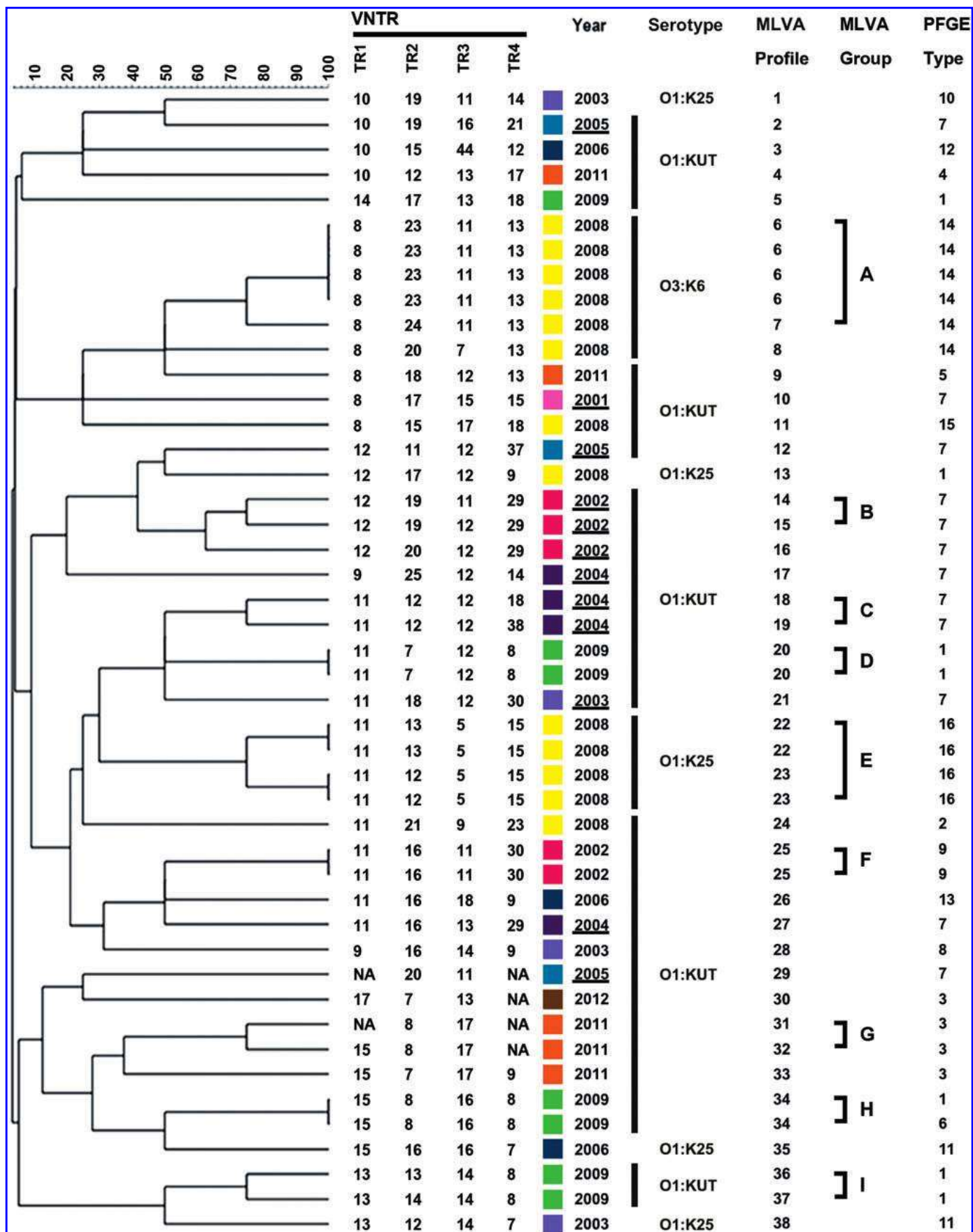
Based on MLVA using these four VNTR loci, 38 distinct MLVA profiles revealing high genetic diversity were detected among 46 isolates of pandemic *V. parahaemolyticus* (Fig. 4). Similar MLVA profiles were observed in some isolates of the same serotype obtained during the same periods



**FIG. 2.** Minimum spanning tree of the 46 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on PFGE. Each circle represents a unique PFGE type. The colored pie chart sections inside circles correspond to serotypes (A) or period of isolation (B). The circle size indicates the number of isolates with that PFGE type. The numbers indicate PFGE types. PFGE, pulsed-field gel electrophoresis. Color images available online at [www.liebertpub.com/fpd](http://www.liebertpub.com/fpd)

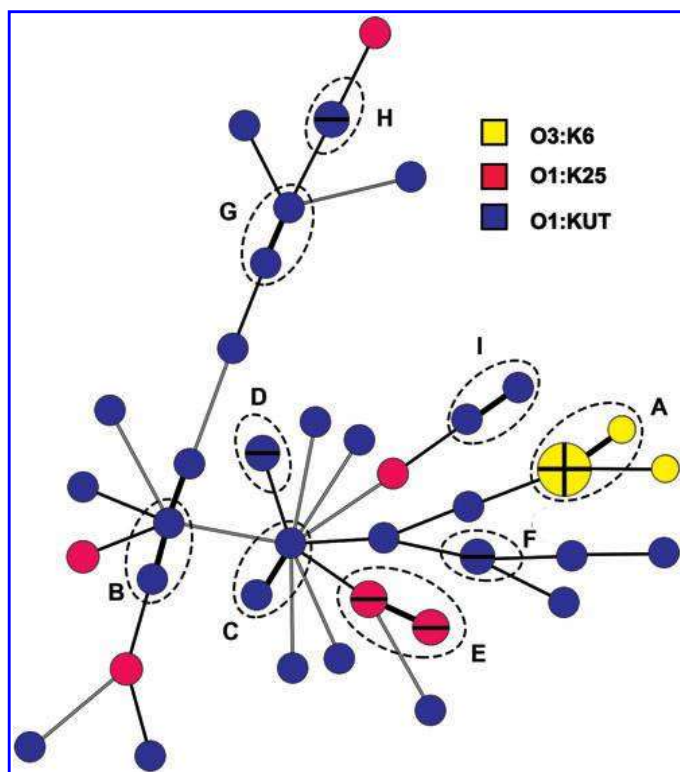


**FIG. 3.** *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633 genome regions containing the VNTR loci used for the MLVA. Each region corresponded to the VNTR locus TR1 (A), TR2 (B), TR3 (C), and TR4 (D), respectively. Arrows indicate the direction of transcription. MLVA, multilocus variable-number tandem-repeat analysis; VNTR, variable number tandem repeat. Color images available online at [www.liebertpub.com/fpd](http://www.liebertpub.com/fpd)



**FIG. 4.** Dendrogram of the 46 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on MLVA profiles. Colors within the squares correspond to year of isolation. The number of tandem repeats is indicated. The MLVA groups are indicated (A–I). NA was given when no amplification was observed at a given locus. PFGE types are provided for direct comparison. Underlined letters refer to the 2001–2005 isolates, which are indistinguishable by PFGE. MLVA, multilocus variable-number tandem-repeat analysis; NA, not amplified; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; VNTR, variable number tandem repeat. Color images available online at [www.liebertpub.com/fpd](http://www.liebertpub.com/fpd)





**FIG. 5.** Minimum spanning tree of the 46 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on MLVA profiles. Each circle represents a unique MLVA profile. The color of the circles corresponds to serotypes. The circle size is proportional to the number of isolates. A distance of one locus between two MLVA profiles is indicated by a thick line, a distance of two loci is indicated by a thin line, and a distance of three loci is indicated by a gray line. Dotted circle indicated the nine MLVA groups A–I. MLVA, multilocus variable-number tandem-repeat analysis. Color images available online at [www.liebertpub.com/fpd](http://www.liebertpub.com/fpd)

(Fig. 4). However, the results of this study showed that pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT isolates were heterogeneous. The discriminatory power of MLVA was 0.99.

MST analysis revealed that all MLVA profiles were linked with other profiles regardless of the serotypes (Fig. 5). MLVA profiles were grouped together if two neighboring profiles did not differ in more than one VNTR locus. Nine MLVA groups (A–I) were found in this study (Figs. 4 and 5).

#### Comparison of MLVA with PFGE

MLVA separated the 12 PFGE-indistinguishable O1:KUT isolates obtained in 2001–2005 (PFGE type 7) into unique profiles (Fig. 1). Thirty-two isolates of O1:KUT *Vibrio parahaemolyticus* revealed 12 PFGE types and 29 MLVA profiles (Fig. 4). MLVA offered a higher discriminatory power (0.99) than that of the PFGE (0.89).

The results showed that all isolates with the same MLVA profile had a high probability of having the same PFGE type. As calculated by using *W*, MLVA predicted PFGE type ( $W=0.86$ ). However, PFGE profile did not predict MLVA profile ( $W=0.33$ ).

#### Discussion

Most serotypes of O3:K6, O1:K25, O4:K28, and O1:KUT pandemic *V. parahaemolyticus* have been continually de-

tected among patients worldwide (Nair *et al.*, 2007; Wootipoom *et al.*, 2007; Thongjun *et al.*, 2013). MLVA technique has been demonstrated for typing pandemic *V. parahaemolyticus* isolates; however, there is no direct evidence of this technique for differentiation among O1:KUT. In this work, MLVA technique has been constructed to discriminate pandemic O1:KUT and other pandemic serogroups *V. parahaemolyticus* strains.

Previous MLVA protocols have been associated with a number of VNTR loci and primer sets (Kimura *et al.*, 2008; Harth-Chu *et al.*, 2009; Ansele-Bermejo *et al.*, 2010; Lüdeke *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016). In this study, we optimized the criteria for the selection of VNTR loci and redesigned a set of fluorescence-labeled specific primers for single-tube multiplex VNTR amplification. A novel VNTR locus (TR3) was used in combination with three of the previously described loci (TR1, TR2, and TR4) (Kimura *et al.*, 2008; Harth-Chu *et al.*, 2009; Ansele-Bermejo *et al.*, 2010; Lüdeke *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016). Thus, the MLVA developed in this study differs considerably from the MLVA previously described. In this study, MLVA scheme yielded a higher discriminatory power than that of the standard PFGE.

VNTR can be found in both noncoding and coding regions of bacterial genomes. TR1 locus was located in noncoding region downstream of the gene encoded for a zinc-binding protein (Makino *et al.*, 2003). Thus, copy number variation in this region may have no effect on the downstream gene. However, TR2 was located within the gene encoded for a hypothetical protein ortholog to chemotaxis protein CheW that was necessary for the control of bacterial motility patterns (Miller *et al.*, 2009). Variations in the repeat numbers could affect protein synthesis and structure. Effects of changing the repeat length on virulence and phenotypes have been demonstrated in many pathogens, including *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus* sp., and *Streptococcus* sp. (Schouls *et al.*, 2005; Walecka *et al.*, 2009; Naseer *et al.*, 2012). VNTRs were also shown to be involved in the variation of promoter activity (Tantivitayakul *et al.*, 2010). Amplified DNA derived from TR2 primers revealed the highest variability in copy numbers. Therefore, this is one of the important regions to generate diversity among *V. parahaemolyticus* isolates. For TR3 locus, primers were designed to target the pandemic region found within *V. parahaemolyticus* genomic island VP<sub>Pa</sub>-6 (Hurley *et al.*, 2006), which was located next to the TR3 locus. In this study, TR3 was specific to all 46 pandemic strains. In this study, four isolates belonging to the O1:KUT were negative for the TR1 and/or TR4 amplification. This might be due to either sequence variation in the PCR binding regions or lack of those VNTR loci. This also can indicate the variation among isolates. In addition, four-loci combination of MLVA in this work could generate distinguishable profiles of those isolates.

Identical PFGE type and MLVA profile of the isolates obtained from patients indicated that the infection might be associated with the same clones because the isolates were taken from the patients in the same period and geographic region.

MST analysis based on MLVA revealed the link between pandemic O1:KUT isolates with other pandemic serotypes. Previous study suggested that the O1:KUT and O1:K25 isolates are originated from the pandemic O3:K6 strains by

alteration of their O:K antigens in response to the host's immunological pressure (Chowdhury *et al.*, 2004; Nair *et al.*, 2007). The results obtained in this study confirmed the genetic relatedness of pandemic O3:K6, O1:KUT, and O1:K25 serotypes.

Two isolates defined as unrelated by PFGE (PFGE types 1 and 6) were not distinguished by MLVA (MLVA profile 34). This may be due to the reason that tandem repeats in these isolates evolved slower than others (Noller *et al.*, 2006). MLVA and PFGE detect different genetic variation in different regions of the chromosome. Variations in MLVA profiles are caused by the mutation in tandem repeats; however, mutations in enzyme restriction sites have been shown to affect PFGE type (Tenover *et al.*, 1995). Therefore, MLVA may be capable to detect the fast evolution among bacterial strains, which other methods such as PFGE are unable to detect, and beneficial for fast surveillance and tracking the source of foodborne disease outbreaks (Lüdeke *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016). Although, the high variation of VNTR can indicate the differentiation of bacteria strains, it can cause the limitation in the correlated investigation between bacteria strains isolated from different periods (Lam *et al.*, 2012). The discriminatory values >0.90 are acceptable for epidemiological typing of bacterial strains (Hunter and Gaston, 1988). Thus, this indicates that four VNTR loci used in this study are suitable genetic markers for differentiation of pandemic *V. parahaemolyticus*, especially among various O1:KUT isolates, and can be applied for molecular epidemiological investigations of other O serogroups *V. parahaemolyticus* with KUT serotype. In addition, MLVA technique is considerably more rapid than PFGE technique. It is of interest for future studies to evaluate relationship between the difference in the VNTR copy numbers among the various loci and virulence or phenotypic variation of *V. parahaemolyticus*.

## Conclusions

This study demonstrated a reliable multiplex MLVA assay for typing pandemic *V. parahaemolyticus*, including various O1:KUT isolates based on four VNTR loci (TR1–TR4). It is highly reproducible with high discriminatory power and would significantly contribute to surveillance and outbreak investigation of pandemic *V. parahaemolyticus* with untypable serotypes.

## Acknowledgments

This study was financially supported by Prince of Songkla University (Contract No. SCI581208S). The authors thank the Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand for supporting a scholarship under the Strategic Scholarships Fellowships Frontier Research Networks (Specific for Southern region), Thailand. They also thank the Unit of Human–Nature Interlaced Life Science and Unit for Development of Global Sustainability, Kyoto University Research Coordination Alliance, Kyoto, Japan.

## Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

- AESR. Food Poisoning. 2014. Available at: [http://www.boe.moph.go.th/Annual/AESR2014/aesr2557/Part%201/1-7/food\\_poisoning.pdf](http://www.boe.moph.go.th/Annual/AESR2014/aesr2557/Part%201/1-7/food_poisoning.pdf), accessed November 1, 2015.
- Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen JL, Bhuiyan N, Wang X-Y, Safa A, Sultana M, Chowdhury A, Nair GB, Sack DA. Pandemic serovars (O3: K6 and O4: K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: Spread of the pandemic into the African continent. *J Clin Microbiol* 2005;43:2559–2562.
- Ansedo-Bermejo J, Gavilan RG, Trinanes J, Espejo RT, Martinez-Urtaza J. Origins and colonization history of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in South America. *Mol Ecol* 2010;19:3924–3937.
- Bhuiyan N, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, Alam K, Chowdhury N, Nishibuchi M, Faruque SM, Sack DA, Takeda Y, Nair GB. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes. *J Clin Microbiol* 2002;40:284–286.
- Castañeda NC, Pichel M, Orman B, Binsztein N, Roy PH, Centrón D. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* isolates from Argentina by *V. cholerae* repeated sequences–polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53:175–183.
- CDC. *Vibrio* Species Causing Vibriosis. 2016. Available at: <https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html>, accessed June 1, 2017.
- Chen Y, Stine OC, Badger JH, Gil AI, Nair GB, Nishibuchi M, Fouts DE. Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: Serotype conversion and virulence. *BMC Genomics* 2011;12:294.
- Chowdhury N, Chakraborty S, Eampokalap B, Chaicumpa W, Chongsa-Nguan M, Moolasart P, Mitra R, Ramamurthy T, Bhattacharya S, Nishibuchi M. Clonal dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* displaying similar DNA fingerprint but belonging to two different serovars (O3: K6 and O4: K68) in Thailand and India. *Epidemiol Infect* 2000;125: 17–25.
- Chowdhury NR, Stine OC, Morris JG, Nair G. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multiple-locus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2004;42:1280–1282.
- Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruuse S, Ray B, Hammond RM, Thompson S, Wilson S, Bean NH, Griffin PM. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *J Infect Dis* 2000;181:1661–1666.
- Deneud F, Vergnaud G. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: A web-based resource. *BMC Bioinformatics* 2004;5:4.
- Fowlkes EB, Mallows CL. A method for comparing two hierarchical clusterings. *J Am Stat Assoc* 1983;78:553–569.
- Harth-Chu E, Espejo RT, Christen R, Guzmán CA, Höfle MG. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:4079–4088.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26:2465–2466.
- Hurley CC, Quirke A, Reen FJ, Boyd EF. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *BMC Genomics* 2006;7:104.
- Jiang M, Zhang J, Li Y, Shi X, Qiu Y, Lin Y, Chen Q, Jiang Y, Hu Q. Feasibility of using multiple-locus variable-number

- tandem-repeat analysis for epidemiology study of *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathog Dis* 2016;13:575–581.
- Kayali A, Escalante-Maldonado O, Vuddhakul V, Seto K, Nakaguchi Y. Development of a method for detection of shigatoxin-producing *Escherichia coli* belonging to clinically important twelve O serotypes based on the combination of PickPen-assisted immunomagnetic separation and loop-mediated isothermal amplification. *Int J Immunol Immunother* 2015;2:1–7.
- Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Takahashi N, Hashimoto S, Nishibuchi M. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J Clin Microbiol* 1999;37:1173–1177.
- Kimura B, Sekine Y, Takahashi H, Tanaka Y, Obata H, Kai A, Morozumi S, Fujii T. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3: K6 strains. *J Microbiol Methods* 2008;72:313–320.
- Lam C, Octavia S, Reeves PR, Lan R. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of 7th pandemic *Vibrio cholerae*. *BMC Microbiol* 2012;12:82.
- Lindstedt B-A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005;26:2567–2582.
- Lüdeke CH, Gonzalez-Escalona N, Fischer M, Jones JL. Examination of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates by multi-locus sequence typing (MLST) and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA). *Front Microbiol* 2015;6:564.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* 2003;361:743–749.
- Martinez-Urtaza J, Lozano-Leon A, DePaola A, Ishibashi M, Shimada K, Nishibuchi M, Liebana E. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:4672–4678.
- Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, Wong H-C, Depaola A, Kim YB, Albert MJ. Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J Clin Microbiol* 2000;38:578–585.
- Miller LD, Russell MH, Alexandre G. Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. *Adv Appl Microbiol* 2009;66:53–75.
- Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:39–48.
- Naseer U, Olsson-Liljequist BE, Woodford N, Dhanji H, Canton R, Sundsfjord A, Lindstedt B-A. Multi-locus variable number of tandem repeat analysis for rapid and accurate typing of virulent multidrug resistant *Escherichia coli* clones. *PLoS One* 2012;7:e41232.
- Noller AC, McEllistrem MC, Shutt KA, Harrison LH. Locus-specific mutational events in a multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157: H7. *J Clin Microbiol* 2006;44:374–377.
- Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya S, Nair GB, Nishibuchi M. Emergence of a unique O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 1997;35:3150–3155.
- Oyarzabal OA, Kathariou S. *DNA Methods in Food Safety: Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2014.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Misener S, Krawetz SA (eds.) Totowa, NJ: Humana Press, 1999, pp. 365–386.
- Sabat A, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Van Diji J, Laurent F, Grundmann H, Friedrich A, Markers ESGoE. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 2013;18:20380.
- Schouls LM, van der Ende A, van de Pol I, Schot C, Spanjaard L, Vauterin P, Wilderbeek D, Witteveen S. Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2005;43:2741–2749.
- Serichantalergs O, Bhuiyan NA, Nair GB, Chivaranonond O, Srijan A, Bodhidatta L, Anuras S, Mason CJ. The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhoea in Thailand, and a new emergent serovar (O3: K46) with pandemic traits. *J Med Microbiol* 2007;56:608–613.
- Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML, Smythe LD. Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005;4:10.
- Tada J, Ohashi T, Nishimura N, Shirasaki Y, Ozaki H, Fukushima S, Takano J, Nishibuchi M, Takeda Y. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 1992;6:477–487.
- Tantivitayakul P, Panapruksachai S, Billamas P, Palittapongpim P. Variable number of tandem repeat sequences act as regulatory elements in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2010;90:311–318.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–2239.
- Thongjun J, Mittraparp-arhorn P, Yingkajorn M, Kongreung J, Nishibuchi M, Vuddhakul V. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in southern Thailand from 2006 to 2010. *Trop Med Health* 2013;41:151–156.
- Wałęcka E, Bania J, Dworniczek E, Ugorski M. Genotypic characterization of hospital *Enterococcus faecalis* strains using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:79–84.
- Wang Y-W, Chern L-L, Cam PD, Chiou C-S. Evaluation of restriction enzymes for standardizing pulsed-field gel electrophoresis protocol for rapid subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61:251–255.

- Weir BS. *Genetic Data Analysis. Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., 1990.
- Wong H-C, Lin C-H. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:4233–4240.
- Wootipoom N, Bhoopong P, Pomwised R, Nishibuchi M, Ishibashi M, Vuddhakul V. A decrease in the proportion of infections by pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in Hat Yai Hospital, southern Thailand. *J med Microbiol* 2007;56:1630–1638.

Address correspondence to:  
*Pimonsri Mittraparp-arthorn, PhD*  
*Department of Microbiology*  
*Faculty of Science*  
*Prince of Songkla University*  
*15 Karnjanavanich Road*  
*Songkhla 90110*  
*Thailand*  
*E-mail: pimonsri.m@psu.ac.th*

**This article has been cited by:**

1. Gary P. Richards, Lathadevi K. Chintapenta, Michael A. Watson, Amanda G. Abbott, Gulnihal Ozbay, Joseph Uknalis, Abolade A. Oyelade, Salina Parveen. 2019. Bacteriophages Against Pathogenic Vibrios in Delaware Bay Oysters (*Crassostrea virginica*) During a Period of High Levels of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Food and Environmental Virology* **279**. . [[Crossref](#)]



## ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์ แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

### วิธีการทดลอง

#### 1. การเก็บรักษาเชื้อในที่เย็นจัดและทำให้ละลายต่อการเปลี่ยนแปลงของ VNTR

วิธีการทดลองทำโดยเลี้ยง *V. parahaemolyticus* PSU 3868 บนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 1 colony มาเลี้ยงในอาหาร TSB+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเก็บเชื้อใน 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการละลายเชื้อที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำกลับไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -80°C อีกครั้ง (freezing storage and thawing) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งและละลายซ้ำเป็นจำนวน 9 รอบ จากนั้นแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวจำนวน 5 โคโลนี เพื่อนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้น โดยเก็บรักษาเชื้อใน 15% glycerol ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งและละลายซ้ำอีก 10 รอบ จากนั้นแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกเชื้อจำนวน 10 โคโลนี มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction และตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ด้วยวิธี MLVA

#### 2. การเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำหลายครั้งต่อการเปลี่ยนแปลงของ VNTR

วิธีการทดลองทำโดยเลี้ยง *V. parahaemolyticus* PSU 3868 บนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 5 โคโลนี มาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA+1% NaCl ใหม่ทุก ๆ วัน จนครบจำนวน 10 วัน (multiple subcultures) แล้วคัดเลือกโคโลนีตัวแทนจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน จานละ 10 โคโลนี มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction แล้วจึงทำการตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ด้วยวิธี MLVA

#### 3. การเลี้ยงเชื้อในสภาวะตั้งเครียดต่อการเปลี่ยนแปลงของ VNTR

วิธีการทดลองทำโดยเลี้ยง *V. parahaemolyticus* PSU 3868 บนอาหาร TSA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 5 โคโลนี มาเลี้ยงบนอาหาร TSA+1% NaCl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นเลี้ยงบนอาหาร TSB+1% NaCl ตามสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิ 5 และ 44 °C; pH4.8 และ pH11; NaCl: 0.5 และ 8% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ขึ้นในแต่ละสภาวะของการเลี้ยงมา streak บนอาหาร TSA+1% NaCl คัดเลือกโคโลนีตัวแทนจากอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละจาน จานละ 10 โคโลนี มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform extraction แล้วจึงทำการตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ด้วยวิธี MLVA

## ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR ของ *V. parahaemolyticus* ในสภาวะต่าง ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง (TR1, TR2, TR3 และ TR4) ในเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษาในที่เย็นจัด (-80 องศาเซลเซียส) และทำให้ละลายเป็นจำนวนหลาย ๆ รอบ (repeated freezing storage and thawing) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเชื้อหลายครั้ง (multiple subcultures) ทำให้เชื้อจำนวน 1 ไอโซเลท จากทั้งหมด 50 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2

การตรวจสอบความเสถียรของ VNTR เมื่อเลี้ยง *V. parahaemolyticus* ในสภาวะดัดเครียด (อุณหภูมิ, pH, ความเค็ม) พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ pH 11 และสภาวะที่มี NaCl สูงถึงร้อยละ 8 ไม่มีผลต่อจำนวนซ้ำของ VNTR markers ทั้ง 4 ตำแหน่ง อย่างไรก็ตามพบการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน TR2 ในเชื้อบางไอโซเลทเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 และ 44 องศาเซลเซียส หรือในสภาวะที่มี pH ต่ำ (4.8) หรือมี NaCl ต่ำ (ร้อยละ 0.5) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในเชื้อ *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas* sp. และ *E. coli* ที่รายงานว่า สภาวะดัดเครียดต่าง ๆ มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อดังกล่าว (Martinez and Baquero, 2000, Van Den Broek *et al.*, 2005, Cooley *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเสถียรของ VNTR ใน *E. coli* ซึ่งมีการรายงานไว้ว่า รังสี, อุณหภูมิสูง และสภาวะที่มีสารอาหารจำกัดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำภายใน VNTR (Cooley *et al.*, 2010) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงชี้ให้เห็นว่าสภาวะดัดเครียดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจำนวนซ้ำภายใน VNTR ของ *V. parahaemolyticus* และในกระบวนการศึกษาตรวจหาจำนวนซ้ำของ VNTR ควรจะหลีกเลี่ยงการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำหลายครั้งเพราะอาจจะเกิดการผิดพลาดจากการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำของ VNTR ในระหว่างการตรวจสอบได้

## เอกสารอ้างอิง

- Cooley, M. B., Carychao, D., Nguyen, K., Whitehand, L., and Mandrell, R. 2010. Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157: H7. *Applied and environmental microbiology*. 76: 3398-3400.
- Martinez, J., and Baquero, F. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 44: 1771-1777.
- Van Den Broek, D., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. 2005. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental microbiology*. 7: 1686-1697.

### ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค MLVA ในเชื้อสายพันธุ์ระดับที่แยกได้จากแหล่งอื่น ๆ เพิ่มเติม รวมทั้งที่แยกได้จากประเทศต่าง ๆ และเพิ่มการศึกษา *In vivo stability* ของ VNTR

บทความวิจัยที่นำเสนอในงานประชุมวิชาการ (proceeding)



Proceeding : รายงานสืบเนื่องการประชุม

# The 36<sup>th</sup> National Graduate Research Conference

การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัย  
ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 36

29-31 ตุลาคม 2558

ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

Graduate School, Maejo University

การเปรียบเทียบเทคนิคการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม  
ของ *Vibrio parahaemolyticus* ซีโรไทป์ O1:KUT สายพันธุ์ระบาด  
**Comparison of DNA Fingerprint Techniques for Studying Genetic Diversity  
of Pandemic O1:KUT *Vibrio parahaemolyticus***

สุติมา ปรีเปรม (Sutima Preeprem)\* พิมลศรี มิตรภาพอาทร (Pimonsri Mittraparp-arthorn)\*\*

วารารณ วุฑฒะกุล (Varaporn Vuddhakul)\*\*\*

**บทคัดย่อ**

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ปัจจุบันพบการระบาดจากเชื้อโนซีโรไทป์ O1:KUT (K untypeable) เพิ่มสูงขึ้น การที่ไม่สามารถจำแนกลักษณะ K antigen ของเชื้อกลุ่มนี้ได้ การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงมีประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและระบาดวิทยาของเชื้อกลุ่มนี้ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบเทคนิค arbitrarily primed PCR (AP2-PCR และ AP4-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาดจำนวน 41 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากผู้ป่วยโรงพยาบาลหาดใหญ่ในช่วงปี ค.ศ. 2001-2009 โดยวิเคราะห์ความสามารถและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อ และระยะเวลาที่ใช้ พบว่าเทคนิค AP2-PCR มีความสามารถและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงสุด (0.24, 0.69) รองลงมาคือ AP4-PCR (0.16, 0.14) และ ERIC-PCR (0.12, 0.09) ตามลำดับ ซึ่งเทคนิค AP2-PCR แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่แยกได้ในปี ค.ศ. 2008-2009 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ERIC-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ระยะเวลาในการจำแนกเชื้อน้อยที่สุด จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น จึงควรนำเทคนิค AP2-PCR มาใช้ในการจำแนก *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด อย่างไรก็ตามเทคนิคทั้งสองยังมีความละเอียดน้อยในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ

**ABSTRACT**

*Vibrio parahaemolyticus* is one of the major causes of gastroenteritis in humans. Recently, O1:KUT (K untypeable) serotype emerged as the pandemic strains. Because of the untypeable K antigen in O1:KUT strains, the use of DNA fingerprint patterns is therefore useful in studying the genetic diversity and tracing the source of its infection. This study was aimed to compare various DNA fingerprinting techniques including arbitrarily primed PCR (AP2-PCR and AP4-PCR), and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) for studying the genetic diversity of 41 pandemic O1:KUT *V. parahaemolyticus* isolates from patients in Hat Yai Hospital from 2001-2009. Typeability, discriminatory power and time-consuming were compared. The result indicated that AP2-PCR scored the highest in discriminatory power and typeability (0.24, 0.69) followed by AP4-PCR (0.16, 0.14) and ERIC-PCR (0.12, 0.09), respectively. Moreover, using AP2-PCR showed that bacterial isolated during 2008-2009 were clustered within the same group. However, ERIC-PCR was less time-consuming than that of other 2 methods. Considering typeability, discriminatory power and time-

\* นักศึกษา หลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

\*\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

\*\*\* ศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



consuming, therefore AP2-PCR was considered as the most suitable method for typing of pandemic *V. parahaemolyticus* O1:KUT. However, these 3 methods exhibited low resolution for diversity study.

**คำสำคัญ:** ความหลากหลายทางพันธุกรรม *V. parahaemolyticus* O1:KUT AP-PCR ERIC-PCR

**Key Words:** Genetic diversity, *V. parahaemolyticus* O1:KUT, AP-PCR, ERIC-PCR

## บทนำ

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญของโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ โดยเชื้อสายพันธุ์ที่มักก่อให้เกิดการระบาดทั่วโลกคือ *V. parahaemolyticus* O3:K6 แต่อย่างไรก็ตามการระบาดในปัจจุบันยังมีสาเหตุมาจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งได้แก่ ซีโรไทป์ O4:K68, O1:K25 และ O1:KUT (K untypeable) (Yeung and Boor, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งซีโรไทป์ O1:KUT ซึ่งในปัจจุบันพบมีการระบาดเพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งยังเป็นซีโรไทป์ที่ไม่สามารถจำแนกลักษณะของ K antigen ได้ เนื่องจากเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง K antigen เพื่อหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านจึงทำให้ไม่สามารถจำแนกลักษณะของ antigen ดังกล่าวด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาได้ (Boyd et al., 2008) ดังนั้นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลจึงเป็นเทคนิคที่น่าสนใจในการใช้ศึกษาทางด้านระบาดวิทยาและติดตามการระบาดของเชื้อสายพันธุ์นี้ เทคนิค arbitrarily primed PCR (AP2-PCR และ AP4-PCR) และเทคนิค enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) เป็นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินอาหาร เทคนิคทั้งสองนี้เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการพื้นฐานของ PCR (Oyarzabal and Kathariou, 2014) ซึ่งเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR จะอาศัยไพรเมอร์สายสั้น ๆ เพียงเส้นเดียวในการเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบแบบสุ่ม (Penner et al., 1993; Kumar and Gurusubramanian, 2011) ส่วนเทคนิค ERIC-PCR จะอาศัยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับส่วนของ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence ซึ่ง

สามารถพบได้ในเชื้อกลุ่มที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (Enteric bacteria) รวมถึง *V. parahaemolyticus* ด้วย (Matsumoto et al., 2000; Oyarzabal and Kathariou, 2014) อย่างไรก็ตามก่อนหน้านี้ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเปรียบเทียบเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด ซึ่งเป็นเชื้อที่ไม่สามารถระบุลักษณะของ K antigen ได้ ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าจึงต้องการเปรียบเทียบเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อดังกล่าว

## วัตถุประสงค์การวิจัย

เปรียบเทียบเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR ใน การ ค ี ข าค ว ม ห ล า ก ห ล า ย ทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด

## วิธีดำเนินการวิจัย

### แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

*V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 41 ไอโซเลตซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงระหว่างปี ค.ศ. 2001-2009 (ตารางที่ 1) และผ่านการยืนยันว่าเป็น *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ระบาด โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *toxR*, *tdh* และ *trh* และหาซีโรไทป์ด้วยวิธี agglutination test โดยทดสอบกับ anti-O1 antiserum และ anti-K antiserum แล้ว และใช้ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 เป็นเชื้อนอกกลุ่ม (outgroup)

ตารางที่ 1 รายละเอียดของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด

Year of isolation	No. of isolates	Strain
2001	1	PSU291
2002	5	PSU732, PSU736, PSU748, PSU751, PSU752
2003	4	PSU938, PSU974, PSU1031, PSU1032
2004	4	PSU1297, PSU1352, PSU1601, PSU1918
2005	4	PSU2030, PSU2453, PSU2487, PSU2519
2006	3	PSU2667, PSU3031, PSU3460
2007	0	-
2008	13	PSU3866, PSU3868, PSU3872, PSU3880, PSU3887, PSU3892, PSU3894, PSU3896, PSU3916, PSU3921, PSU3939, PSU3949, PSU3972
2009	7	PSU4792, PSU4793, PSU4915, PSU4918, PSU4994, PSU4998, PSU5009

#### การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan) จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง NanoDrop® spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) และปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR

#### เทคนิค AP-PCR (Williams et al., 1990)

การศึกษาความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT ด้วยเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR ดัดแปลงมาจากวิธีของ Williams และคณะ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 (5'-GTTTCGCTCC-3') และไพรเมอร์ 4 (5'-AAGAGCCCGT-3') ตามลำดับ

โดยส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1X buffer (NEB, USA), 0.33 mM dNTPs, 0.83 µM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (NEB, USA), และ DNA 2.5 ไมโครลิตร แล้วจึงปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 30 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สภาวะในการทำ AP-PCR ประกอบด้วย ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 4 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 36°C นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที โดยทำซ้ำขั้นตอน denaturation, annealing และ extension จำนวน 44 รอบ จากนั้นจึงทำขั้นตอน final extension 72°C นาน 7 นาที

การตรวจสอบ AP-PCR product ทำด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 5-7 นาที แล้วปรับเป็น 15 mA ประมาณ 10 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้อมเจลด้วย ethidium bromide และส่องดูภายใต้แสง UV แล้วจึงสร้าง dendrogram โดยโปรแกรม Bioprofile image analysis (Vilber Lourmat, France)

#### เทคนิค ERIC-PCR (Zulkifli et al., 2009)

การศึกษาความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT ด้วยเทคนิค ERIC-PCR ทำการโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Zulkifli และคณะ โดยใช้ไพรเมอร์ ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTC CTGGGGATTAC-3') และ ERIC 2 (5'-AAGTAAG TGACTGGGGTGAGCG-3') ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1X buffer (NEB, USA), 0.05 mM dNTPs, 0.4 µM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (NEB, USA) และ DNA 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 25 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ สภาวะในการทำ ERIC-PCR ประกอบด้วย ขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 7 นาที, denaturation ที่อุณหภูมิ 90°C นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 58°C นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 8 นาที โดย



ทำซ้ำขั้นตอน denaturation, annealing และ extension จำนวน 29 รอบ จากนั้นจึงทำขั้นตอน final extension 68°C นาน 8 นาที

การตรวจสอบ ERIC-PCR product ทำด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE และใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 5-7 นาที แล้วปรับเป็น 50 โวลต์ ประมาณ 6 ชั่วโมง จากนั้นจึงย้อมเจลด้วย ethidium bromide และส่องดูภายใต้แสง UV แล้วจึงสร้าง dendrogram โดยโปรแกรม Bioprofile image analysis (Vilber Lourmat, France)

**การวิเคราะห์ความสามารถในการจำแนกเชื้อ, ประสิทธิภาพการจำแนกเชื้อ, และระยะเวลาที่ใช้** (Shuan Ju Teh et al., 2011)

ความสามารถในการจำแนกเชื้อ (T), ประสิทธิภาพการจำแนกเชื้อ (D) และระยะเวลาที่ใช้ของเทคนิค AP-PCR และ ERIC-PCR จะถูกวิเคราะห์โดยสูตรดังต่อไปนี้

$$T = N_i / N$$

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^i n_j(n_j-1)$$

ระยะเวลาที่ใช้ = เวลาของ PCR + เวลาของ gel electrophoresis

โดย  $N_i$  = จำนวนรูปแบบ;  $N$  = จำนวนเชื้อทั้งหมด;

$s$  = จำนวนกลุ่มเชื้อ (ที่ความเหมือน=80%);

$n_j$  = จำนวนเชื้อในแต่ละกลุ่ม

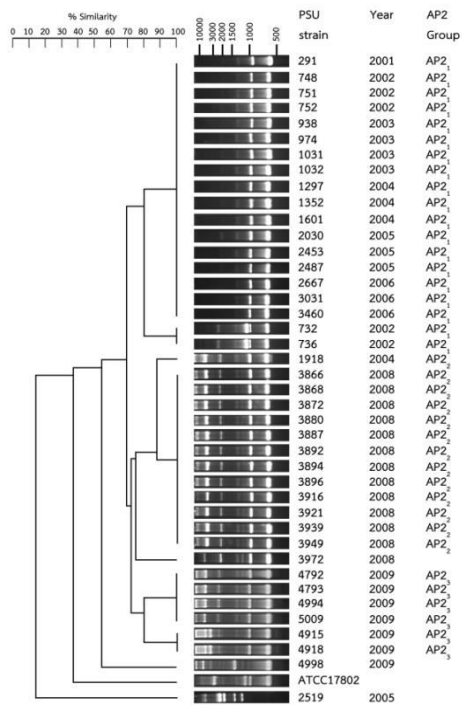
### ผลการวิจัย

จากผลการวิจัยพบว่า เทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อส่วนใหญ่ที่คล้ายคลึงกัน โดยให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 4-12, 7-10 และ 6-8 แถบ ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.5-10 kb และจากจัดกลุ่มเชื้อโดยอาศัย ความแตกต่างของรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากทั้ง สามเทคนิค (ภาพที่ 1, 2 และ 3) พบว่า เทคนิค AP2-PCR สามารถแสดงให้เห็น

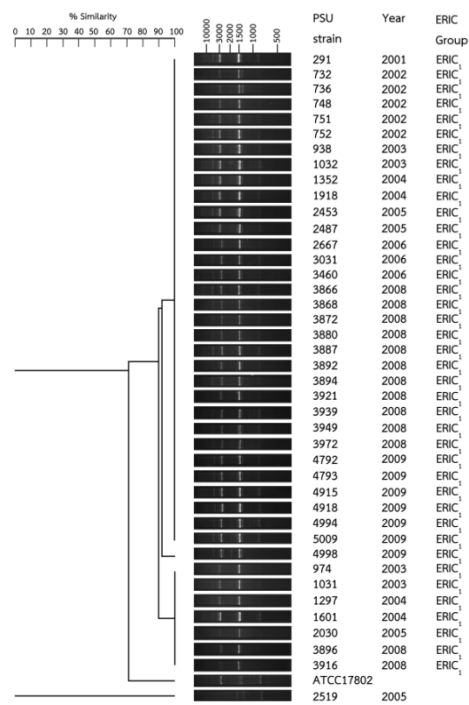
ความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT ทั้ง 41 ไอโซเลทได้มากที่สุด และที่ความเหมือนเท่ากับ 80% พบว่า AP2-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อได้ 3 กลุ่ม (AP2<sub>1</sub>, AP2<sub>2</sub> และ AP2<sub>3</sub>) ส่วน AP4-PCR และ ERIC-PCR สามารถจัดกลุ่มเชื้อ ได้เพียงเทคนิคละ 1 กลุ่มเท่านั้น (AP4<sub>1</sub> และ ERIC<sub>1</sub>) นอกจากนี้จากการคำนวณค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อพบว่าเทคนิค AP2-PCR มีค่าทั้งสองสูงที่สุด (0.24, 0.69) รองลงมาคือ AP4-PCR (0.16, 0.14) และ ERIC-PCR (0.12, 0.09) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาของแต่ละเทคนิคพบว่า ERIC-PCR เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็วที่สุด โดยใช้เวลา 11 ชั่วโมง 35 นาที ส่วนเทคนิค AP2-PCR และ AP4-PCR ใช้เวลานานถึง 17 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า เทคนิค AP2-PCR แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันของเชื้อที่แยกได้ในปี ค.ศ. 2008-2009 แต่อย่างไรก็ตามทั้งสามเทคนิคไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่าง *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระดับ และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ซึ่งเป็นเชื้อ outgroup ได้

**ตารางที่ 2** เปรียบเทียบคุณสมบัติของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR

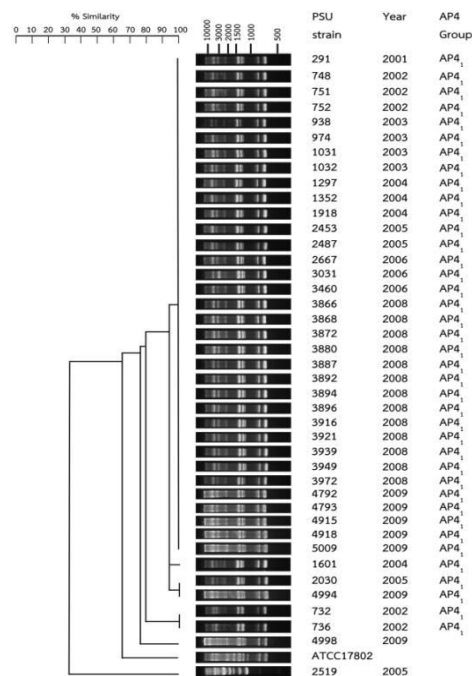
คุณสมบัติ	AP2-PCR	AP4-PCR	ERIC-PCR
ความสามารถในการจำแนก $T = N_i / N$	0.24	0.16	0.12
ประสิทธิภาพในการจำแนก $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^i n_j(n_j-1)$	0.69	0.14	0.09
ระยะเวลาที่ใช้ (h)	17	17	11.35



ภาพที่ 1 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT และ ATCC17802 ที่ได้จากวิธี AP2-PCR



ภาพที่ 3 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT และ ATCC 17802 ที่ได้จากวิธี ERIC-PCR



ภาพที่ 2 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอและ dendrogram ของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT และ ATCC 17802 ที่ได้จากวิธี AP4-PCR

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระดับสูง ซึ่งพบว่าเทคนิค AP2-PCR มีค่าในการจำแนกเชื้อและประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงที่สุด รองลงมาคือเทคนิค AP4-PCR และ ERIC-PCR ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ใช้เทคนิค AP4-PCR และ ERIC-PCR ในการศึกษาความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากหอยแครง ในประเทศอินโดนีเซีย พบว่า AP-PCR สามารถให้เห็นถึงความหลากหลายของ *V. parahaemolyticus* ได้มากกว่า ERIC-PCR (Zulkifli et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษา *V. parahaemolyticus* O1:KUT ที่แยกได้ก่อนและหลังปี ค.ศ. 1995 ซึ่งพบว่า AP-PCR

สามารถแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของเชื้อที่แยกจากต่างช่วงเวลาได้ (Okuda et al., 1997; Matsumoto et al., 2000) ทั้งนี้การที่ AP-PCR สามารถให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลายมากกว่า ERIC-PCR อาจเกิดจากไพรเมอร์ของ AP-PCR เป็นไพรเมอร์สายสั้น ๆ และเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบแบบสุ่มซึ่งหากเชื้อมีวิวัฒนาการและมีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอไปบางส่วนก็จะทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับกับ ดีเอ็นเอแม่แบบได้และทำให้รูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างไปจากเชื้อเดิม ซึ่งแตกต่างจากไพรเมอร์ของ ERIC-PCR ที่จำเพาะกับส่วนของ ERICs ซึ่งสามารถพบได้ในเชื้อกลุ่ม enteric bacterial จึงเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะมากกว่าไพรเมอร์ของ AP-PCR (Penner et al., 1993; Zulkifli et al., 2009; Kumar and Gurusubramanian, 2011; Oyarzabal and Kathariou, 2014) นอกจากนี้ยังพบว่า AP2-PCR สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันของเชื้อที่แยกได้ในปี ค.ศ. 2008-2009 ซึ่งชี้ให้เห็นถึงเทคนิคดังกล่าวสามารถให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมและช่วงเวลาการระบาดของเชื้อได้ ส่วนด้านของความเร็วพบว่า ERIC-PCR เป็นเทคนิคที่รวดเร็วกว่า AP-PCR แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้พบว่าทั้งสามเทคนิคที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบนั้นยังไม่สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่าง *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด และ *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 ซึ่งเป็นเชื้อ outgroup ได้

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AP2-PCR, AP4-PCR และ ERIC-PCR ในข้างต้นจึงแสดงให้เห็นว่า ควรเลือกใช้เทคนิค AP2-PCR ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด แต่อย่างไรก็ตามค่าความสามารถในการจำแนกเชื้อ และประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาดของเทคนิคทั้งสามที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ยังมีค่าอยู่ในระดับต่ำและให้ข้อมูลที่ยัง

ไม่เพียงพอต่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาด ซึ่งอาจจะเกิดจากเชื้อดังกล่าวมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันมากจึงยากที่จะจำแนกความแตกต่างของเชื้อดังกล่าวได้ ดังนั้นในอนาคตจึงควรมีการศึกษาเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลอื่น ๆ ที่สามารถให้ข้อมูลที่มีความละเอียดสูงและเพียงพอต่อการศึกษาทางระบาดวิทยาของ *V. parahaemolyticus* O1:KUT สายพันธุ์ระบาดต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนโครงการพัฒนาอาจารย์และบุคลากรสำหรับสถาบันอุดมศึกษาในเขตพัฒนาเฉพาะกิจจังหวัดชายแดนภาคใต้ และได้รับการสนับสนุนเครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### เอกสารอ้างอิง

- Boyd, E.F., Cohen, A.L., Naughton, L.M., Ussery, D.W., Binnewies, T.T., Stine, O.C. and Parent, M.A. (2008). Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. BMC microbiology, 8(1), 1-14.
- Kumar, N.S. and Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. Sci. Vision, 11(3), 116-124.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H.-C., Depaola, A., Kim, Y.B. and Albert, M.J. (2000). Pandemic spread of an O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and

- emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses. *Journal of clinical microbiology*, 38(2), 578-585.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Garg, S., Bhattacharya, S., Nair, G.B. and Nishibuchi, M. (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 35(12), 3150-3155.
- Oyarzabal, O.A. and Kathariou, S. (2014). *DNA Methods in Food Safety: Molecular Typing of Foodborne and Waterborne Bacterial Pathogens*. USA: John Wiley & Sons.
- Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. and Fedak, G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research*, 2(4), 341-345.
- Shuan Ju Teh, C., Thong, K.L., Osawa, R. and Heng Chua, K. (2011). Comparative PCR-based fingerprinting of *Vibrio cholerae* isolated in Malaysia. *The Journal of general and applied microbiology*, 57(1), 19-26.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- Yeung, P.M. and Boor, K.J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens & Disease*, 1(2), 74-88.
- Zulkifli, Y., Alitheen, M., Banu, N., Radu, S., Abdul Rahim, R., Lihan, S. and Yeap, S. (2009). Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in Padang, Indonesia. *International Food Research Journal*, 16, 141-150.