**รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์**

# การเปรียบเทียบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วย และสิ่งแวดล้อมในจังหวัดสงขลา

# Comparison of PCR-based techniques for typing of *Vibrio cholerae* strains isolated from clinical and environmental samples in Songkhla Province


**คณะนักวิจัย**

**ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร** คณะวิทยาศาสตร์

**ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์** คณะวิทยาศาสตร์



**โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน**
**มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์**
**ประจำปีงบประมาณ 2558 รหัสโครงการ SCI580246b**

**ชื่อชุดโครงการ**

การศึกษาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ที่มีผลต่อสุขภาพ

Study of health affected pathogenic bacteria isolated from various sources

**ชื่อโครงการย่อย**

1. การหาเชื้อ *Vibrio* spp. ที่ก่อโรคในปลาเพาะเลี้ยง
   Investigation of pathogenic *Vibrio* spp. in cultured fish
2. การเปรียบเทียบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อมในจังหวัดสงขลา
   Comparison of PCR-based techniques for typing of *Vibrio cholerae* strains isolated from clinical and environmental samples in Songkhla Province
3. การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Vibrio vulnificus* ที่แยกได้จากอาหารทะเล และผู้ป่วย โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา
   Characterization of *Vibrio vulnificus* isolated from seafood and clinical specimens using molecular techniques
4. ความชุกของเชื้อ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) ในเนื้อสัตว์ค้าปลีก
   Prevalence of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in retailed meats
5. การตรวจหาเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* ในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์
   Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in Songklanagarind Hospital
6. การแยกแยะสายพันธุ์และการตรวจหาเชื้อ *Clostridium difficile* ที่รวดเร็วทางอณูวิทยา
   Molecular genotyping and rapid detection of *Clostridium difficile*

**คณะนักวิจัย**


| | | |
|---|---|---|
| 1. ผศ.ดร.ณัฐวรรณ เสริมวิทยวงศ์ | ภาควิชาจุลชีววิทยา | คณะวิทยาศาสตร์ |
| 2. ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร | ภาควิชาจุลชีววิทยา | คณะวิทยาศาสตร์ |
| 3. ดร.รัตนรุจิ พุ่มวิเศษ | ภาควิชาจุลชีววิทยา | คณะวิทยาศาสตร |
| 4. ผศ.ดร.ภารนัย สุขุมังกูร | ภาควิชาจุลชีววิทยา | คณะวิทยาศาสตร์ |
| 5. ดร.กาญจนา ศรีนิติวรวงศ์ | ภาควิชาจุลชีววิทยา | คณะวิทยาศาสตร์ |
| 6. ดร.กมนนัทธ์ ศิงฆมานันท์ | ภาควิชาชีวเวชศาสตร์ | คณะแพทยศาสตร์ |

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| **รายการตาราง** | i |
| **รายการภาพประกอบ** | ii |
| **กิตติกรรมประกาศ** | iii |
| **บทคัดย่อ** | iv |
| **Abstract** | v |
| **บทนำ** | 1 |
| **วัตถุประสงค์** | 2 |
| **บทตรวจเอกสาร** | 3 |
| **วิธีการทดลอง** | 12 |
| **ผลการทดลอง** | 27 |
| **วิจารณ์ผลการทดลอง** | 34 |
| **สรุปผลการทดลอง** | 36 |
| **เอกสารอ้างอิง** | 38 |
| **ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป** | 43 |
| **ภาคผนวก** | 44 |

# รายการตาราง


| | หน้า |
|---|---|
| **ตารางที่ 1** การจำแนก biotype ของ *Vibrio cholerae* O1 | 4 |
| **ตารางที่ 2** การจำแนก serotype ของ *Vibrio cholerae* | 4 |
| **ตารางที่ 3** แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา | 12 |
| **ตารางที่ 4** รูปแบบการมียีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของ *Vibrio cholerae* | 29 |
| **ตารางที่ 5** รายละเอียด และกลุ่ม *Vibrio cholerae* แบ่งตามรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ | 32 |
| **ตารางที่ 6** ประสิทธิภาพในการจำแนก (discriminatory power) ความสามารถในการจำแนก (typeability) และความแม่นยำในการทำซ้ำ (reproducibility) ของเทคนิค PCR ต่าง ๆ | 33 |
| **ตารางที่ 7** ความคุ้มค่าของเทคนิค PCR ต่าง ๆ ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* | 33 |
| **ตารางที่ 8** คุณสมบัติของเทคนิค PCR ต่าง ๆ ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Vibrio cholerae* ในการทดลองนี้ | 37 |

# รายการภาพ


| | หน้า |
|---|---|
| **รูปที่ 1** ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย | 13 |
| **รูปที่ 2** จำนวน *Vibrio cholerae* ที่ตรวจพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคต่าง ๆ | 28 |

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ วุฑฒะกุล ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ SCI580246b

คณะผู้วิจัย

**บทคัดย่อ**

*Vibrio cholerae* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรงในหลายพื้นที่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีระบบสุขาภิบาลที่ไม่ดี งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษา *V. cholerae* จำนวน 46 ไอโซเลท ซึ่งประกอบด้วย *V. cholerae* O1, O139 และ non-O1/non-O139 ที่แยกได้จากผู้ป่วย จำนวน 25 ไอโซเลท และจากสิ่งแวดล้อมจำนวน 21 ไอโซเลท ในระหว่าง พ.ศ.2544-2557 โดยทำการตรวจหายีนก่อโรคชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *ctxA*, *zot*, *tcpA*, *ctxA, tcpA, zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* (type III secretion system; T3SS) และ *vasH* (type VI secretion system; T6SS) และศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) 5 เทคนิค ได้แก่ Box-element PCR (BOX-PCR), enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR), arbitrarily primed-PCR (AP-PCR), *Vibrio cholerae* repeats-PCR (VCR-PCR) และ multi-locus variable-number of tandem-repeats analysis (MLVA) เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการจำแนก, ความสามารถในการจำแนก, ระยะเวลาที่ใช้ และความคุ้มค่า จากผลการทดลองพบว่า *V. cholerae* ที่แยกได้จำนวนร้อยละ 89 มียีน *hlyA* และ *vasH* (T6SS) ส่วน *V. cholerae* non-O1/non-O139 ส่วนใหญ่ไม่พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคที่พบใน *V. cholerae* O1 และ O139 อย่างไรก็ตามเชื้อกลุ่มนี้มักตรวจพบยีน *vcsV2* (T3SS) จากผลการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่า *V. cholerae* O1 และ O139 ส่วนใหญ่มีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่ *V. cholerae* non-O1/non-O139 ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย แต่ที่น่าสนใจคือ พบว่าเชื้อที่แยกจากแหล่งน้ำธรรมชาติใน พ.ศ. 2557 มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี MLVA เหมือนกับเชื้อที่แยกจากผู้ป่วยใน พ.ศ. 2553 เทคนิค MLVA เป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการจำแนกสูงที่สุด (0.98) รองลงมา คือ VCR-PCR (0.96), AP-PCR (0.92), ERIC-PCR (0.87) และ BOX-PCR (0.86) ตามลำดับ และพบว่าเทคนิคส่วนใหญ่มีความสามารถในการจำแนกสูง (100%) ยกเว้นเทคนิค VCR-PCR (86%) ที่มีความสามารถในการจำแนกค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้เทคนิค MLVA ยังสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลาที่แยกเชื้อและพื้นที่ที่แยกเชื้อได้ ดังนั้นเทคนิค MLVA จึงเป็นเทคนิคที่ดี และเหมาะสมที่สุดในการนำมาศึกษาด้านระบาดวิทยาของ *V. cholerae*

## Abstract

*Vibrio cholerae* is associated with serious watery diarrheal disease among people in many parts of the world, especially in countries with poor sanitation. In this study, a total of 46 *V. cholerae* isolates, including members of the O1, O139, and non-O1/non-O139 serogroups from cholera patients (*n*=25), as well as environmental samples (*n*=21) obtained during 2001 to 2014 were investigated for the presence of *ctxA*, *zot*, *tcpA*, *ctxA, tcpA, zot*, *ace*, *stn/sto*, *hlyA*, *vcsV2* (type III secretion system; T3SS), and *vasH* (type VI secretion system; T6SS) genes. Five PCR-based techniques including Box-element PCR (BOX-PCR), enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR), arbitrarily primed-PCR (AP-PCR), *Vibrio cholerae* repeats-PCR (VCR-PCR), and multi-locus variable-number of tandem-repeats analysis (MLVA) were used to discrimination among these isolates and evaluate the discriminatory power, typeability, reproducibility, cost-effective, and time-consuming. The *hlyA* and *vasH* (T6SS) were found in 89% of *V. cholerae* isolates. Most *V. cholerae* non-O1/non-O139 lacked virulence gene associated with toxigenic *V. cholerae* O1 or O139, however, these isolates harbor the *vcsV2* (T3SS) gene. Differentiation of these isolates with PCR methods revealed almost similar DNA pattern among *V. cholerae* O1 and O139 isolates. *V. cholerae* non-O1/non-O139 were more diverse than O1 strains. Interestingly, isolate from patients in 2009 exhibited the same MLVA profile as an environmental isolate obtained in 2014. Simpson's index indicated that MLVA targeting to the 3 previously described loci (VC0436-7, VC1650, and VCA0171) exhibited the highest discriminatory power (0.98) for typing these isolates followed by VCR-PCR (0.96), AP-PCR (0.92), ERIC-PCR (0.87), and BOX-PCR (0.86). Good typeability (100%) was obtained with all methods used, except for VCR-PCR. In addition, MLVA pattern of *V. cholerae* serogroup O1 correlated well with the isolation years and the geographic origin of the isolates. MLVA constitutes the most powerful tool for the molecular epidemiological study of *V. cholerae.*