

## การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* โดยวิธีการศึกษาทางพีเอ็นไอพีและจีเอ็นไอพี

### PHENOTYPING AND GENOTYPING OF *Vibrio parahaemolyticus*

พรทิพย์ พึ่งม่วง<sup>1\*</sup> พจมาน ผู้มีสัตย์<sup>2</sup> สุทัศน์ บุญยงค์<sup>3</sup>

Porntip Paungmoung<sup>1\*</sup>, Potjaman Pumeesat<sup>2</sup>, Sutas Boonyong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

<sup>1</sup>Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Thailand.

<sup>2</sup>ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

<sup>2</sup>Department of Medical Technology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thailand.

<sup>3</sup>กลุ่มงานพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลนครปฐม

<sup>3</sup>Department of Clinical Pathology, Nakhonpathom Hospital, Thailand.

\*Corresponding author, E-mail: porntip19@yahoo.com

#### บทคัดย่อ

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารทะเลเป็นพิษ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประโยชน์ทางด้านการศึกษาาระบาดวิทยา รวมถึงการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ การวิจัยครั้งนี้ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยวิธีการศึกษาแบบแผนการดีอียา (antibiotyping), arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) พบว่าเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยจำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท จำแนกโดยวิธี antibiotyping, AP-PCR และ ERIC-PCR ได้เป็น 1, 16 และ 24 สายพันธุ์ ตามลำดับ จากการประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อพบว่า antibiotyping มีความสามารถในการจำแนกต่ำที่สุด (discriminatory index เท่ากับ 0) ซึ่งไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อได้ ขณะที่ ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ AP-PCR โดยมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.932 และ 0.901 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามวิธี AP-PCR มีข้อดีคือ PCR product ที่ได้มีจำนวนแถบน้อยกว่า ในทางปฏิบัติทำให้ง่ายต่อการแปลผล และหากจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR และ ERIC-PCR พบว่าประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงขึ้น (discriminatory index เท่ากับ 0.986) โดยสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งสิ้น 48 สายพันธุ์ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค PCR พื้นฐาน เช่น AP-PCR, ERIC-PCR และการใช้ AP-PCR ร่วมกับ ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูง เหมาะสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในงานทางด้านระบาดวิทยาได้ดี

คำสำคัญ: *Vibrio parahaemolyticus* โรคอาหารทะเลเป็นพิษ ระบาดวิทยา แบบแผนการดีอียา AP-PCR, ERIC-PCR

## Abstract

*Vibrio parahaemolyticus* is most commonly associated with seafood-borne gastroenteritis. Several typing methods have been developed for epidemiologic investigations or controlling the spread of this pathogen. In this study, a total of 70 clinical isolates of *V. parahaemolyticus* were typed by antibiotyping and the PCR-based typing methods: an arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) and the enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). The seventy isolates were classified into 1, 16 and 24 types, with discriminatory indexes of 0.000, 0.901 and 0.932, by antibiotyping, AP-PCR and ERIC-PCR, respectively. The discriminatory power of antibiotyping was lowest and all clinical isolates tested were indistinguishable by this method. ERIC-PCR was preferable to AP-PCR because of the higher discriminatory power. However, AP-PCR might be a practical method because it generated fewer amplification bands and patterns than ERIC-PCR. The combination of AP-PCR and ERIC-PCR analysis allowed us to classify the isolates into 48 types with the highest discriminatory index of 0.986. These data demonstrate that AP-PCR and ERIC-PCR are useful for strain typing of *V. parahaemolyticus* and the combination of these two techniques is recommended for epidemiologic investigations.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, seafood poisoning, epidemiology, antibiotyping, AP-PCR, ERIC-PCR

## บทนำ

*Vibrio parahaemolyticus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้งงอ พบทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ชายฝั่งทะเล ตะกอนโคลนตมในทะเล สามารถแยกเชื้อได้จากอาหารทะเลหลายชนิด เช่น กุ้ง หอยนางรม หอยแครง ปู เป็นต้น *V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญของโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ในหลายประเทศทั้งในเอเชีย อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป [1-4] การติดเชื้อเกิดจากรับประทานอาหารทะเลที่ปรุงไม่สุก หรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อภายหลังจากการปรุง ระยะฟักตัวของเชื้ออยู่ระหว่าง 4-96 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย อาเจียน ปวดศีรษะ มีไข้ อาการป่วยมีตั้งแต่เล็กน้อยไปจนถึงต้องเข้ารับการรักษาตัวในโรงพยาบาล สำหรับประเทศไทยพบว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) ถึงร้อยละ 60 ในช่วงปี พ.ศ. 2535-2543 [5] และมีแนวโน้ม

สูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2548 และ 2549 พบสูงถึงร้อยละ 64.5 และ 73.3 ตามลำดับ [6] นอกจากนี้ยังมีรายงานการระบาดของเชื้อสายพันธุ์หรือซีโรวาร (serovar) เกิดขึ้นในส่วนต่างๆ ของโลก เช่น การระบาดใหญ่ (pandemics) ของสายพันธุ์ใหม่ O3:K6 ในประเทศอินเดีย และเกิดการระบาดอย่างต่อเนื่องในหลายประเทศแถบภูมิภาคเอเชีย รวมทั้งในอเมริกา [7] ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้อาจกลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญสำหรับหลายประเทศในอนาคตก็เป็นได้ และการระบาดที่ประเทศแคนาดาเมื่อปี ค.ศ. 1997 และอเมริกาเมื่อปี ค.ศ. 1997-1998 ทำให้มีการพัฒนาวิธีในระดับโมเลกุล (molecular technique) เข้ามาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* เพื่อเป็นข้อมูลด้านความสัมพันธ์ของพันธุกรรมและระบาดวิทยาของสายพันธุ์ของเชื้อ [2, 7]

ในการศึกษาความหลากหลายหรือการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) โดยศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping) การทดสอบทางซีโรไทป์ (serotyping) และการศึกษาคุณสมบัติทางจีโนไทป์ (genotypic characteristic) โดยวิธี pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), restriction fragment length polymorphism (RFLP), arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR), enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป [8-9] โดยที่การศึกษาทางฟีโนไทป์เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก สามารถทำได้ในงานประจำ (routine) แต่ความสามารถในการจำแนกต่ำเมื่อเทียบกับการศึกษาทางจีโนไทป์ เพราะปัจจัยหลายอย่าง เช่น สภาวะแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงเชื้อส่งผลต่อการแสดงออกของยีน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า การจำแนกสายพันธุ์โดยการทดสอบทางซีโรไทป์ไม่สามารถจำแนกเชื้อบางสายพันธุ์ได้ (untypable) อย่างไรก็ตามการศึกษาทางจีโนไทป์บางวิธีก็ยุ่งยาก เช่น PFGE ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบผล สำหรับวิธี RFLP ของยีน rRNA เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ดีแต่ก็เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องใช้ restriction enzyme และใช้เทคนิคทาง hybridization ร่วมด้วย ดังนั้นการจำแนกเชื้อโดยใช้ DNA marker ชนิดต่างๆ ซึ่งอาศัยพื้นฐานเทคนิค PCR เช่น AP-PCR, ERIC-PCR น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ [10-13] ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเป็นเครื่องมือสำคัญชนิดหนึ่งในการศึกษาด้านระบาดวิทยา วิธีการการจำแนกสายพันธุ์ที่ถูกต้อง รวดเร็ว และมีความสามารถในการจำแนกสูง เป็นสิ่งจำเป็น

เพื่อประโยชน์ในการค้นหาแหล่งแพร่กระจายของเชื้อ โดยเฉพาะสายพันธุ์ดื้อยา รวมถึงการควบคุม เฝ้าระวังและป้องกันการติดเชื้อ

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วย โดยเปรียบเทียบ 3 วิธี คือ ศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping), AP-PCR และ ERIC-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ เนื่องจากใช้หลักการ PCR พื้นฐาน เพื่อเป็นแนวทางในการนำวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเหล่านี้มาใช้ในการศึกษาด้านระบาดวิทยาของเชื้อต่อไป

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. ตัวอย่างเชื้อ

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมิถุนายน 2551 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2552 จำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท ทดสอบยืนยันเชื้อโดยการย้อมสีแกรม ทดสอบ oxidase และฟิสจัน เชื้อโดยชุดทดสอบชีวเคมี TSI, MIL+1%NaCl, Simmon's Citrate agar, Urea agar, MR-VP broth+1%NaCl, OD+1%NaCl, AD+1%NaCl, LD+1%NaCl, Nutrient broth+0%NaCl, Nutrient broth+1%NaCl, Nutrient broth+8%NaCl, Nutrient broth+10%NaCl

2. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทางฟีโนไทป์ โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiotyping) ด้วยวิธี disc diffusion [14]

เพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus* บน Tryptic soy agar+2%NaCl บ่มที่อุณหภูมิ  $35\pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่นใน 0.85% normal saline ให้มีความ

ชุ่นเทียบเท่ากับ 0.5 McFarland standard (เชื้อประมาณ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml) ใช้ sterile swab จุ่มเชื้อแล้วนำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)+2%NaCl จากนั้นวางแผ่นยาทดสอบ 12 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 µg), ceftriaxone (30 µg), cephalothin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), oxytetracycline (30 µg), sulfisoxazole (250 µg), tetracycline (30 µg) และ trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) บนเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (inhibition zone) เปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใสตามตารางมาตรฐานของ CLSI (CLSI, 2009) รายงานผลเป็นไวต่อยา (susceptible) ไวต่อยาปานกลาง (intermediate) หรือดื้อต่อยา (resistant) และทำการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อตามแบบแผนการดื้อยาทั้ง 12 ชนิด

### 3. การจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ทางจีโนมไทป์ โดยวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR)

#### 3.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก *V. parahaemolyticus*

เพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth+2%NaCl ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ  $35 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ (GF-1 Bacterial DNA extraction kit, Vivantis) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิต ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Tris-EDTA (TE) buffer

pH 8.0 ปริมาตร 50 µl วัดปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เจือจางดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้น 25 ng/µl เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบ

#### 3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อด้วยวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนโดยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR ด้วย primer และสภาวะที่ใช้แสดงดังตารางที่ 1 โดยทำปฏิกิริยาที่ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย 1XPCR buffer, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 200 µM dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µM ของ primer แต่ละชนิด, 0.5 units *Taq* DNA polymerase และ 25 ng template DNA

**ตารางที่ 1** แสดง primer และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อด้วยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR

วิธี	Primer	สภาวะ
<b>1. AP-PCR</b>	Random primer 2 [12]: 5'-GTTTCGCTCC-3'	Denaturation: 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing : 36 องศาเซลเซียส 1 นาที Extension: 72 องศาเซลเซียส 2 นาที - ทำทั้งหมด 45 รอบ โดยรอบแรกทำการ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที รอบสุดท้าย extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
<b>2. ERIC-PCR</b>	ERIC 1R primer [10]: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' ERIC 2 primer [10]: 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	Denaturation: 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing: 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที Extension: 72 องศาเซลเซียส 2 นาที - ทำทั้งหมด 30 รอบ โดยรอบแรกทำการ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที รอบสุดท้าย extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

**4. การตรวจวิเคราะห์ขนาดสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis**

นำ PCR product ปริมาตร 10 µl ผสมกับ 6xloading dye ปริมาตร 2 µl มาแยกขนาดของสายดีเอ็นเอบน 1.5% agarose gel ใน 1XTris-Acetate-EDTA (TAE) buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 45-60 นาที เปรียบเทียบขนาดของสายดีเอ็นเอกับ 100-3,000 base pair ladder DNA marker ย้อมสีด้วย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ และบันทึกภาพด้วยเครื่อง UV-transilluminator

**5. การประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแต่ละวิธี**

คำนวณหาค่าดัชนีของความหลากหลาย (discriminatory index) ตามวิธีของ Hunter and Gaston [15-16] ตามสูตรดังนี้

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

เมื่อ D = Discriminatory index

N = จำนวนเชื้อทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ

S = จำนวนสายพันธุ์ (types) ที่จำแนกได้ทั้งหมด

$x_j$  = จำนวนไอโซเลทที่พบในสายพันธุ์ (types) นั้นๆ ( $j^{\text{th}}$  type)

ในงานวิจัยนี้ discriminatory index ที่ได้ ใช้ในการวิเคราะห์ผลการวิจัยทุกวิธีที่ใช้ทดสอบ

## ผลการวิจัย

### 1. การทดสอบยืนยันเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เมื่อนำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม ระหว่างเดือนมิถุนายน 2551 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2552 จำนวนทั้งสิ้น 70 ไอโซเลท มาทดสอบยืนยันจีโนมและสปีชีส์ด้วยการทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทุกไอโซเลท

### 2. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทางพีโนไทป์ โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ (antibiotyping) ด้วยวิธี disc diffusion

จากการศึกษาแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทดสอบโดยใช้ยาต้านจุลชีพ 12 ชนิด พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 70 ไอโซเลท ดื้อต่อยา ampicillin และไวต่อยา ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline, sulfisoxazole,

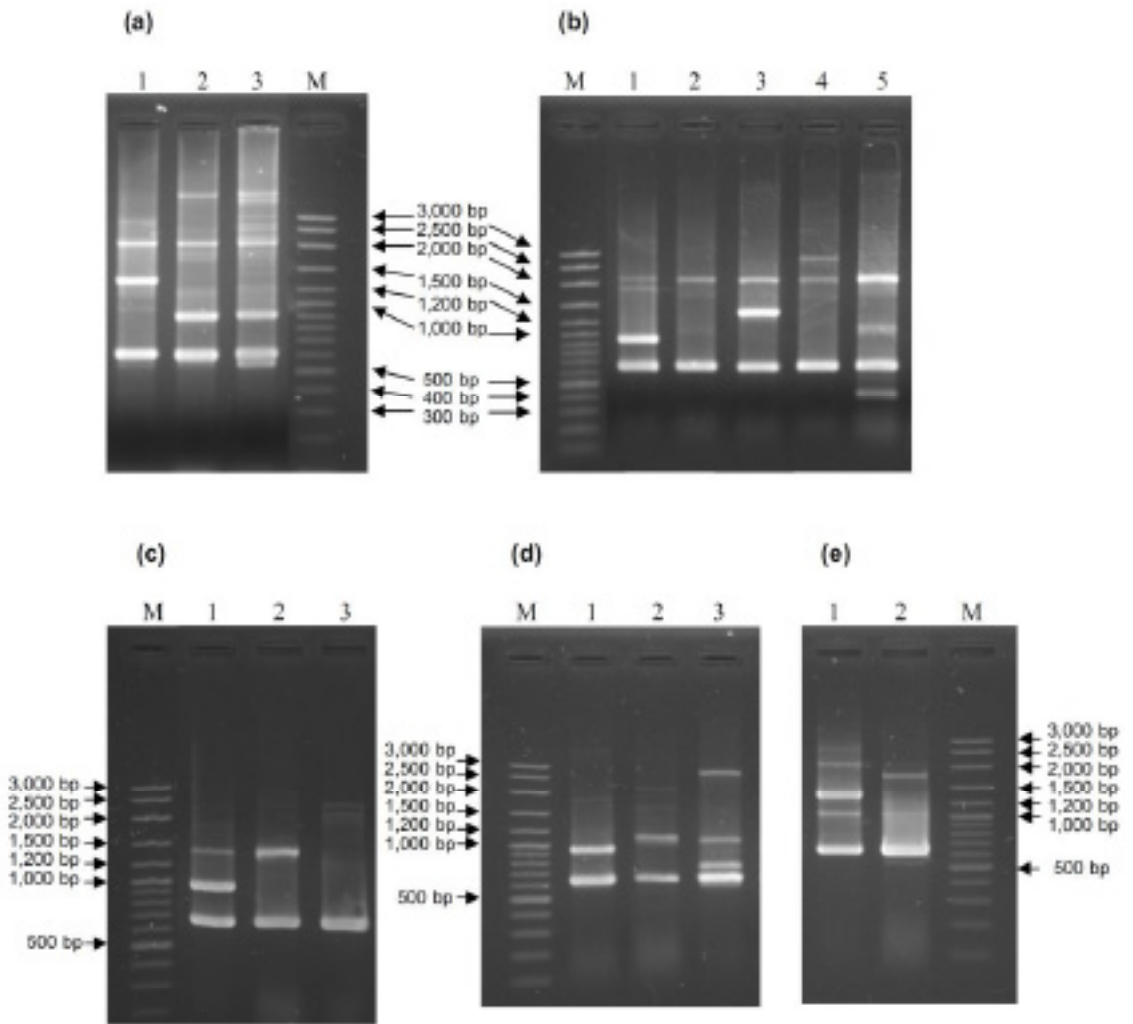
tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole ซึ่งเป็นแบบแผนเดียวที่พบจึงทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น

### 3. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทางจีโนไทป์ ด้วยวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR)

จากการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 70 ไอโซเลท โดยวิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) ได้ PCR product ที่มีความแตกต่างหลากหลายจำนวน 1 ถึง 4 แถบ มีขนาดระหว่าง 450±20 base pair ถึง 2,700±20 base pair ทำให้สามารถจำแนกเชื้อเป็นสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ ได้แก่ AP-A ถึง AP-P ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มี AP-PCR pattern ที่แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1 โดย AP-PCR pattern ที่พบส่วนใหญ่ คือ AP-O, AP-L, AP-D และ AP-F พบจำนวน 12, 11, 10 และ 10 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 17.14, 15.71, 14.29 และ 14.29 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 AP-PCR patterns ของ *V. parahaemolyticus*

AP-PCR patterns	ขนาดของ PCR product (bp)	จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ)
AP-A	2,100, 1,350, 600	2 (2.86)
AP-B	2,100, 950, 600	3 (4.29)
AP-C	2,100, 950, 650, 550	1 (1.43)
AP-D	2,100, 1,800, 950, 650	10 (14.29)
AP-E	2,100, 650	4 (5.71)
AP-F	2,100, 1,350, 650	10 (14.29)
AP-G	2,700, 2,100, 650	2 (2.86)
AP-H	2,100, 1,100, 650, 450	1 (1.43)
AP-I	1,350, 950, 650	1 (1.43)
AP-J	1,350, 650	6 (8.57)
AP-K	650	2 (2.86)
AP-L	950, 650	11 (15.71)
AP-M	1,100, 650	2 (2.86)
AP-N	2,700, 1,100, 750, 650	2 (2.86)
AP-O	2,100, 1,350, 1,100, 600	12 (17.14)
AP-P	1,800, 1,100, 600	1 (1.43)



ภาพที่ 1 Agarose gel electrophoresis แสดง AP-PCR patterns ของ *V. parahaemolyticus*

(a) Lanes: 1, pattern AP-A; 2, pattern AP-B; 3, pattern AP-C

(b) Lanes: 1, pattern AP-D; 2, pattern AP-E; 3, pattern AP-F; 4, pattern AP-G;

5, pattern AP-H

(c) Lanes: 1, pattern AP-I; 2, pattern AP-J; 3, pattern AP-K

(d) Lanes: 1, pattern AP-L; 2, pattern AP-M; 3, pattern AP-N

(e) Lanes: 1, pattern AP-O; 2, pattern AP-P

Lane M, 100-3,000 base pair ladder DNA marker

**4. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทางจีโนมโดยใช้วิธี enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR)**

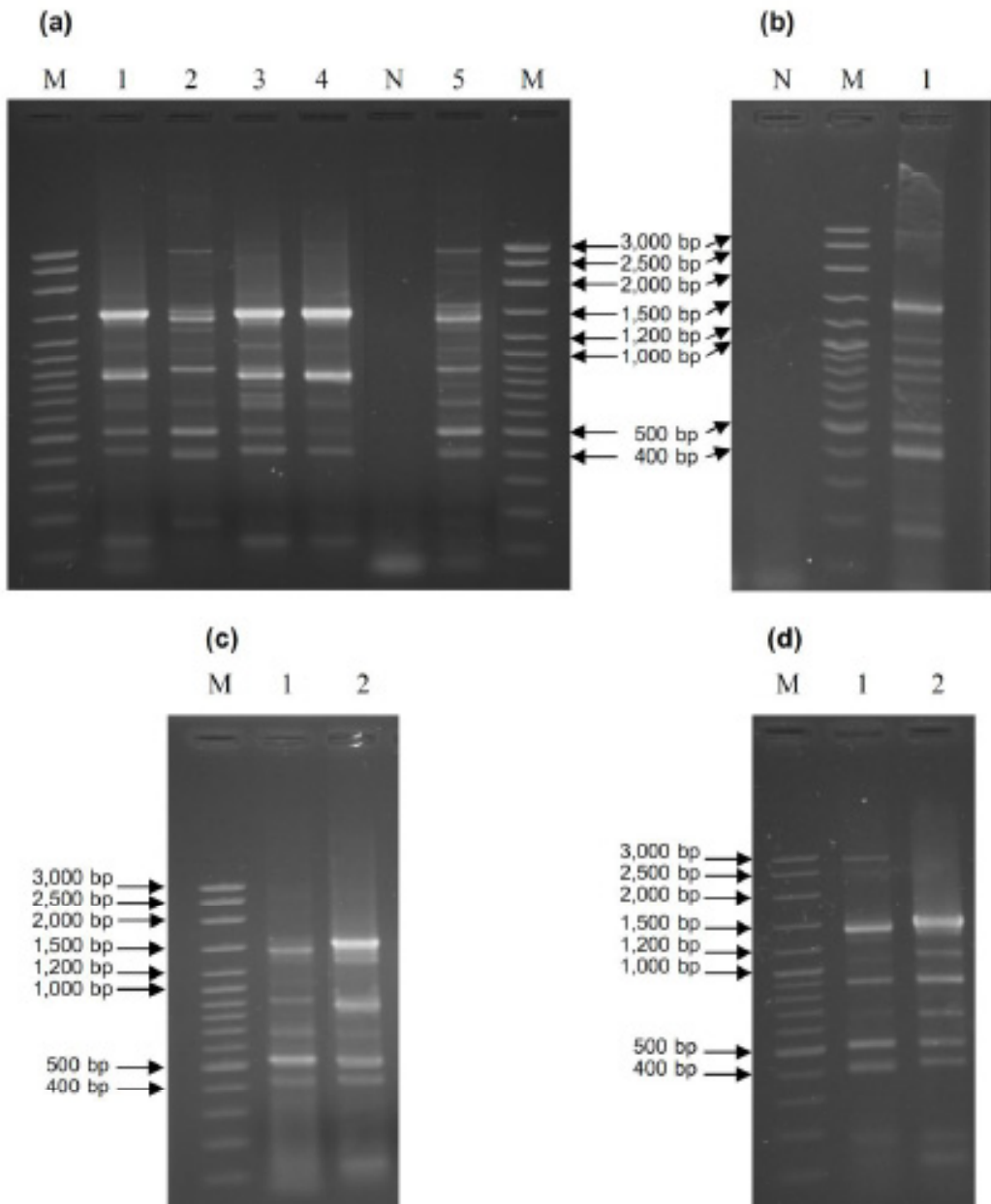
การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ทั้ง 70 ไอโซเลท ด้วยวิธี enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) ได้ PCR product ที่มีความแตกต่างหลากหลาย

หลายจำนวน 1 ถึง 10 แถบ มีขนาดระหว่าง 410±20 base pair ถึง 2,800±20 base pair ทำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ทั้งสิ้น 24 สายพันธุ์ ได้แก่ ERIC-1 ถึง ERIC-24 แต่ละสายพันธุ์มี ERIC-PCR pattern ที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 3 และภาพที่ 2 โดยสายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ ERIC-3, ERIC-10, ERIC-4 และ ERIC-5 จำนวน 13, 8, 7 และ 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 18.57, 11.43, 10.00 และ 7.14 ตามลำดับ

**ตารางที่ 3** ERIC-PCR patterns ของ *V. parahaemolyticus*

ERIC-PCR patterns	ขนาดของ PCR product (bp)	จำนวนไอโซเลท (ร้อยละ)
ERIC-1	1,500, 925, 875, 675, 525, 425	4 (5.71)
ERIC-2	2,800, 1,500, 1,400, 1,300, 925, 675, 525, 410	3 (4.29)
ERIC-3	1,500, 1,150, 925, 875, 800, 725, 675, 525, 425	13 (18.57)
ERIC-4	1,500, 875, 675, 525, 425	7 (10.00)
ERIC-5	2,800, 1,600, 1,400, 1,300, 1,100, 925, 800, 675, 525, 410	5 (7.14)
ERIC-6	2,800, 1,400, 1,100, 925, 800, 675, 525, 410	1 (1.43)
ERIC-7	1,400, 925, 675, 525, 410	3 (4.29)
ERIC-8	1,500, 1,300, 875, 675, 525, 425	4 (5.71)
ERIC-9	2,800, 1,400, 925, 675, 525, 410	3 (4.29)
ERIC-10	1,500, 1,150, 925, 675, 525, 425	8 (11.43)
ERIC-11	1,500, 1,150, 1,000, 800, 675, 525, 410	2 (2.86)
ERIC-12	1,500, 1,150, 1,000, 925, 800, 675, 525, 410	1 (1.43)
ERIC-13	1,500, 525, 425	2 (2.86)
ERIC-14	1,000, 925, 875, 800, 675, 525, 410	1 (1.43)
ERIC-15	1,500, 1,150, 1,000, 800, 675, 525, 425	1 (1.43)
ERIC-16	1,500, 875, 675, 525, 410	1 (1.43)
ERIC-17	1,500	1 (1.43)
ERIC-18	1,500, 925, 525, 410	2 (2.86)
ERIC-19	1,500, 625, 525, 425	1 (1.43)
ERIC-20	2,800, 1,500, 1,400, 1,150, 800, 675, 575, 525, 410	1 (1.43)
ERIC-21	2,800, 1,500, 1,400, 1,150, 1,000, 925, 800, 675, 525, 425	1 (1.43)
ERIC-22	2,800, 1,500, 1,400, 1,300, 1,150, 800, 675, 525, 410	1 (1.43)
ERIC-23	1,500, 1,150, 675, 525, 410	3 (4.29)
ERIC-24	1,500, 1,150, 800, 675, 575, 525, 410	1 (1.43)





ภาพที่ 2 Agarose gel electrophoresis แสดง ERIC-PCR patterns ของ *V. parahaemolyticus*

(a) Lanes: 1, pattern ERIC-1; 2, pattern ERIC-2; 3, pattern ERIC-3; 4, pattern ERIC-4; 5, pattern ERIC-5

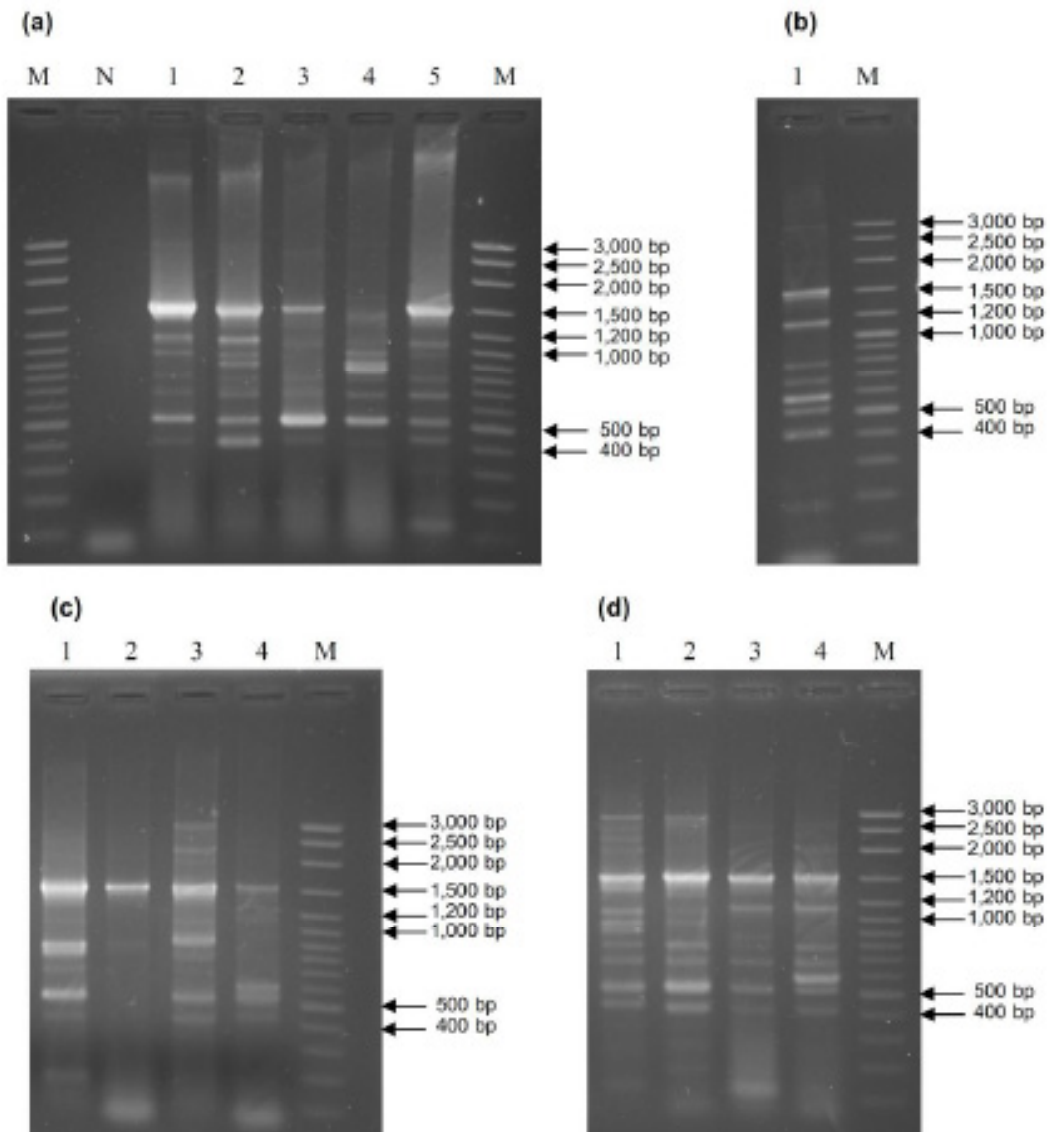
(b) Lane: 1, pattern ERIC-6

(c) Lanes: 1, pattern ERIC-7; 2, pattern ERIC-8

(d) Lanes: 1, pattern ERIC-9; 2, pattern ERIC-10

Lane: N, Negative control (Sterile UltraPure water)

Lane: M, 100-3,000 base pair ladder DNA marker



ภาพที่ 3 Agarose gel electrophoresis แสดง ERIC-PCR patterns ของ *V. parahaemolyticus* (ต่อ)

(a) Lanes: 1, pattern ERIC-11; 2, pattern ERIC-12; 3, pattern ERIC-13;  
4, pattern ERIC-14; 5, pattern ERIC-15

(b) Lane: 1, pattern ERIC-20

(c) Lanes: 1, pattern ERIC-16; 2, pattern ERIC-17; 3, pattern ERIC-18;  
4, pattern ERIC-19

(d) Lanes: 1, pattern ERIC-21; 2, pattern ERIC-22; 3, pattern ERIC-23;  
4, pattern ERIC-24

Lane: N, Negative control (Sterile UltraPure water)

Lane: M, 100-3,000 base pair ladder DNA marker

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อทางจีโนมไทป์โดยวิธี AP-PCR และ ERIC-PCR พบว่าการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ของเชื้อแต่ละไอโซเลททำให้สามารถจำแนกสายพันธุ์

ของเชื้อได้หลากหลายมากยิ่งขึ้น โดยสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้งสิ้น 48 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มี AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 4

**ตารางที่ 4** การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR และ ERIC-PCR

สายพันธุ์ที่	AP/ERIC-PCR pattern	จำนวนไอโซเลทที่พบ ในแต่ละสายพันธุ์ (ร้อยละ)
1	L/E3	5 (7.14)
2	D/E3	4 (5.71)
3-5	D/E4, D/E10, O/E8	3 (4.29)
6-14	B/E4, E/E11, F/E10, L/E4, M/E18, O/E1, O/E3, O/E5, O/E7	2 (2.86)
15-48	A/E5, A/E10, B/E1/, C/E3, E/E12, E/E23, F/E2, E/E3, E/E5, F/E6, F/E7, F/E9, F/E16, F/E22, G/E12, G/E23, H/E13, I/E9, J/E2, J/E5, J/E8, J/E9, J/E10, J/E14, K/E13, K/E5, L/E1, L/E10, L/E17, L/E20, N/E19, N/E24, O/E2, P/E23	1 (1.43)

จากผลการทดลองพบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธีศึกษาแบบแผนการดีเอ็นเอของเชื้อสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ 1 สายพันธุ์ ขณะที่วิธี AP-PCR, ERIC-PCR และวิธี AP-PCR ร่วมกับ ERIC-PCR พบว่าจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อได้ 16, 24 และ 48 สายพันธุ์ ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์

ของเชื้อในแต่ละวิธีพบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีการศึกษาแบบแผนการดีเอ็นเอเป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ต่ำที่สุด ขณะที่วิธี AP-PCR, ERIC-PCR และวิธี AP-PCR ร่วมกับ ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกสูง โดยมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.000, 0.901, 0.932 และ 0.986 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความสามารถในจำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี antibiotyping, AP-PCR, ERIC-PCR และวิธี AP-PCR ร่วมกับ ERIC-PCR

วิธีการจำแนกสายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์ (patterns) ที่จำแนกได้	ร้อยละของสายพันธุ์ (patterns) ที่พบได้มากที่สุด	Discriminatory index <sup>a</sup>
Antibiotyping	1	100.00	0.000
AP-PCR	16	17.14	0.901
ERIC-PCR	24	18.57	0.932
AP-PCR + ERIC-PCR	48	7.14	0.986

<sup>a</sup>Discriminatory index คำนวณโดยใช้วิธีของ Hunter and Gaston [15-16]

### สรุปและอภิปรายผล

*V. parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคอาหารทะเลเป็นพิษ (seafood poisoning) หรือลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศ การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประโยชน์ด้านการศึกษาาระบาดวิทยาของเชื้อ ค้นหาแหล่งแพร่กระจายการควบคุมเฝ้าระวังและป้องกันการติดเชื้อในการศึกษานี้ได้ศึกษาวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยศึกษาทางพีโนไทป์ คือการศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping) และการศึกษาทางจีโนไทป์ ได้แก่ วิธี arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) และ enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) พบว่าการศึกษาแบบแผนการดื้อยาสามารถจำแนกเชื้อได้เพียง 1 สายพันธุ์เท่านั้น โดยเชื้อทั้งหมดดื้อต่อยา ampicillin และไวต่อยา ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline, sufisoxazole, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole ซึ่งคล้ายกับผลการทดลองของ Serchantalergs และคณะ [17] ได้ศึกษาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกจากผู้ป่วยในเขตกรุงเทพมหานคร ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2545 พบว่าทุกไอโซเลทไวต่อยา

chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole และดื้อต่อยา ampicillin ร้อยละ 52 อย่างไรก็ตาม Wootipoon และคณะ [18] พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2548 ทุกไอโซเลทไวต่อยา chloramphenicol, norfloxacin และ tetracycline ดื้อต่อยา ampicillin, ciprofloxacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole ข้อมูลจากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติ (National antimicrobial Resistance Surveillance Center Thailand; NARST) ที่ได้รับรายงานจากโรงพยาบาลเครือข่าย 34 แห่ง ทั้งในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัด ในปี พ.ศ. 2551 พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลต่างๆ ดื้อต่อยา gentamicin, norfloxacin, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole [19] หากเปรียบเทียบแบบแผนการดื้อยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในประเทศแถบทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินโดนีเซียและมาเลเซีย พบว่ามีความแตกต่างจากประเทศไทยโดยสายพันธุ์ที่พบการระบาดในประเทศอินโดนีเซียส่วนใหญ่ไวต่อยา norfloxacin และ trimethoprim/sulfamethoxazole ดื้อต่อยา ampicillin, ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin และ tetracycline

[20] ขณะที่เชื้อที่พบในประเทศมาเลเซีย ไวโตยยา norfloxacin และ chloramphenicol คือคือยา ampicillin, cephalothin, gentamicin และ tetracycline [21] ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างกันด้านภูมิศาสตร์ (geographical areas) และรูปแบบการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่แตกต่างกัน ดังนั้นแต่ละพื้นที่จึงควรมีมาตรการในการควบคุมและป้องกันไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพหลายชนิด (multidrug resistant strain) เพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยพบว่ายา ceftriaxone, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxytetracycline, sulfisoxazole, tetracycline และ trimethoprim/sulfamethoxazole ยังคงเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เข้ารับรักษาตัวที่โรงพยาบาลนครปฐม จังหวัดนครปฐม

จากการจำแนกเชื้อโดยวิธี AP-PCR จำแนกเชื้อได้ทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ (AP-A ถึง AP-P) โดยสายพันธุ์ที่พบส่วนใหญ่ คือ AP-O, AP-L, AP-D และ AP-F พบจำนวน 12, 11, 10 และ 10 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 17.14, 15.74, 14.29 และ 14.29 ตามลำดับ ขณะที่วิธี ERIC-PCR จำแนกเชื้อได้ 24 สายพันธุ์ (ERIC-1 ถึง ERIC-24) โดยสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ ERIC-3 จำนวน 13 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 18.57 และเมื่อทำการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ของเชื้อแต่ละไอโซเลท พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ได้หลากหลายมากยิ่งขึ้นคือจำแนกสายพันธุ์ได้ 48 สายพันธุ์ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีทางจีโนไทป์สามารถจำแนกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้หลากหลายมากกว่าวิธีทางพีโนไทป์ เนื่องจากเชื้อที่นำมาศึกษาทุกไอโซเลทมีแบบแผนการดื้อยาที่เหมือนกันทำให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง

สายพันธุ์ได้ ในการวิจัยนี้ได้ประเมินความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ (discriminatory power) แต่ละวิธีโดยการคำนวณค่าดัชนีของความหลากหลาย [15] พบว่าการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธี antibiotyping, AP-PCR, ERIC-PCR และวิธี AP-PCR ร่วมกับ ERIC-PCR มีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.000, 0.901, 0.932 และ 0.986 ตามลำดับ ซึ่งโดยทั่วไปค่านี้จะอยู่ระหว่าง 0 ถึง 1 และค่าที่สูงมักจะอยู่ระหว่าง 0.6 ถึง 1 ดังนั้นวิธี antibiotyping จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มประชากรของเชื้อที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามวิธีศึกษาแบบแผนการดื้อยาเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ไม่ต้องการอุปกรณ์ราคาแพงสามารถทำได้ในงานประจำ (routine) ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป จึงยังคงเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อดื้อยา และสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยได้ ดังนั้นหากต้องการนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้ออาจจำเป็นต้องแปลผลร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่น การทำ genotyping และการศึกษากลไกการดื้อยาในระดับโมเลกุลควบคู่กันไป

ในการจำแนกสายพันธุ์โดยวิธีทางจีโนไทป์ พบว่า AP-PCR มีค่า discriminatory index ต่ำกว่าวิธี ERIC-PCR เล็กน้อย (0.901 และ 0.932) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wong และ Lin [22] พบว่าวิธี ERIC-PCR เป็นวิธีที่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* สูงกว่าวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) หรือ AP-PCR อย่างไรก็ตามจากการทดลองที่ได้ วิธี AP-PCR ได้ PCR product จำนวน 1 ถึง 4 แถบ ซึ่งแต่ละแถบบมีขนาดที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนทำให้ง่ายต่อการแปลผล ขณะที่ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยวิธี ERIC-PCR มีจำนวน 1 ถึง 10 แถบ และบางแถบบมีขนาดที่ไม่ต่างกันมากนักทำให้ยากในการแปลผล ถึงแม้ว่าวิธี AP-PCR จะมีข้อจำกัด

ในการนำมาใช้เนื่องจากเป็นวิธีที่มีการเพิ่มจำนวน DNA แบบสุ่ม ดังนั้น AP-PCR pattern ที่ได้จึงขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ทำให้วิธีนี้มี reproducibility ต่ำเมื่อเทียบกับการทำจีโนมไทป์วิธีอื่นๆ ดังนั้นหากจะนำมาประยุกต์ใช้จะต้องควบคุมสภาวะที่ใช้ในการทดสอบแต่ละครั้งให้ใกล้เคียงกันมากที่สุด โดยเฉพาะคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ตลอดจนสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เช่น อุณหภูมิและเวลา เป็นต้น และในขั้นตอนแต่ละขั้นตอนของการทดสอบควรทำโดยบุคคลเดียวกัน ในปัจจุบันวิธี AP-PCR เป็นวิธีที่นิยมใช้สากลสำหรับการศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในการจำแนกสายพันธุ์ pandemic strain ออกจาก nonpandemic strain [7, 11, 18, 23-25]

จากผลการทดลองพบว่า ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูง โดยมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.932 ใกล้เคียงกับวิธี Pulse field gel electrophoresis (PFGE) ซึ่งมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.960 [22] ถึงแม้ว่าวิธี PFGE จะเป็นวิธีที่มี reproducibility และ discriminatory power สูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อทางอณูชีววิทยาวิธีอื่นๆ แต่วิธี PFGE ก็เป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการอ่านผล [26] นอกจากนี้ยังคงประสบปัญหาที่ไม่สามารถจำแนกเชื้อบางสายพันธุ์ได้เนื่องจากเกิดการทำลาย (degradation) ของ genomic DNA ในขั้นตอนการเตรียมและการตัดด้วย restriction enzyme ซึ่ง Marshall และคณะ [27] พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่นำมาศึกษาร้อยละ 23 ของทั้งหมดไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้โดยวิธี PFGE แต่ถูกจำแนกได้โดยวิธี ERIC-PCR สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tanil และคณะ [21] พบว่าวิธี ERIC-PCR นำมาใช้จำแนกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* ที่ไม่สามารถจำแนกได้โดยวิธี PFGE ได้ และจากข้อมูลการวิจัยนี้พบว่าวิธีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยการ

แปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ทำให้ประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงขึ้น โดยมีค่า discriminatory index เท่ากับ 0.986 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ [28] ซึ่งพบว่าการจำแนกเชื้อโดยการแปลผลร่วมกัน 2 วิธี ระหว่างวิธี ERIC-PCR (discriminatory index = 0.942) และวิธีการหาลำดับเบสของยีน *gyrB* (discriminatory index = 0.702) ทำให้ประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงขึ้น (discriminatory index = 0.966)

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาด้านระบาดวิทยาเพื่อค้นหาแหล่งแพร่กระจายของเชื้อ เป็นการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโดยวิธีศึกษาแบบแผนการดื้อยา AP-PCR และ ERIC-PCR ผลการวิจัยสรุปว่า การจำแนกสายพันธุ์โดยการศึกษาแบบแผนการดื้อยา (antibiotyping) ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ ขณะที่การจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค PCR พื้นฐาน เช่น AP-PCR และ ERIC-PCR เป็นวิธีที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสามารถในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูง โดยเฉพาะเมื่อมีการแปลผลร่วมกันระหว่าง AP-PCR pattern และ ERIC-PCR pattern ทำให้ประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อสูงขึ้น นอกจากนี้วิธี AP-PCR และ ERIC-PCR ยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วในการทดสอบเชื้อคราวละหลายๆ ราคาไม่แพง ใช้เทคนิคที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนมากนัก เหมาะสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านระบาดวิทยาได้ดี

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Bag, P.K. et al. (1999). Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(7): 2354-2357.
- [2] DePaola, A. et al. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster after outbreaks in Washington, Texas, and New York, 1997 and 1998. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11): 4649-4654.
- [3] Fuenzalid, L. et al. (2007). *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile. *International Journal of Food Microbiology*. 117(3): 270-275.
- [4] Okuda, J. et al. (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio Parahaemolyticus* in Culcutta, 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.
- [5] อรษา สุตธีรกุล. (2544). *Vibrio parahaemolyticus*. ใน รายงานการประชุมปฏิบัติการโรคอุจจาระร่วง ครั้งที่ 12 การควบคุมโรคอุจจาระร่วง ปัญหาและแนวทางการแก้ไขในทศวรรษหน้า. หน้า 44-51. กรุงเทพฯ: กองควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข.
- [6] สุชาดา จันทสิริยากร. (2549). โรคอาหารเป็นพิษ. ใน สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค ปี 2549. หน้า 271-275. กรุงเทพฯ: สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข.
- [7] Matsumoto, C. et al. (2000). Pandemic spread of an O3K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidences by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*. 2(38): 578-585.
- [8] Suthienkul, O. et al. (1996). Restriction fragment Length Polymorphism of the *tdh* and *trh* Genes in Clinical *Vibrio parahaemolyticus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 34(5): 1293-1295.
- [9] Wong, C.H. (2003). Detecting and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11(2): 100-107.
- [10] Maluping, P.R. et al. (2005). Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* strain isolated from the Philippines by PCR-based methods. *Journal of Applied Microbiology*. 99(2): 383-391.
- [11] Okura, M. et al. (2003). Genotyping analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(10): 4676-4682.
- [12] Okura, M. et al. (2004). PCR-based identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* with a novel group-specific primer pair. *Microbiology and Immunology*. 48(10): 787-790.

- [13] Rodriguez, J.M. et al. (2006). Molecular fingerprinting PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Disease of Aquatic Organisms*. 6(2-3): 175-183.
- [14] CLSI. (2009). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement*. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [15] Hunter, P.R. & Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*. 26(11): 2465-2466.
- [16] Hunter, P. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(9): 1903-1905.
- [17] Serichantalerqs, O. et al. (2007). The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhea in Thailand, and a new emergent serovar (O3:K46) with pandemic traits. *Journal of Medical Microbiology*. 56(5): 608-613.
- [18] Wootipoom, N. et al. (2007). A decrease in the proportion of infections by pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in Hat Yai Hospital, Southern Thailand. *Journal of Medical Microbiology*. 56(2): 1630-1638.
- [19] ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2552). รายงานการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. สืบค้นเมื่อ 17 เมษายน 2552, จาก <http://narst.dmsc.moph.go.th>
- [20] Tjaniadi, P. et al. (2003). Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68(6): 666-667.
- [21] Tanil, G.B. et al. (2005). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from coastal seawater in peninsular Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 36(4): 940-945.
- [22] Wong, H.C. & Lin, C.H. (2001). Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific Primers. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(12): 4233-4240.
- [23] Vuddhakul, V. et al. (2000). Isolation of pandemic O3K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(6): 2685-2689.
- [24] Gil, A.I. et al. (2007). O3K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru. *International Journal of Infectious Diseases*. 11(4): 324-328.
- [25] Chao, G. et al. (2009). Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China. *Food Control*. 20(10): 907-912.



- [26] Wang, Y.W. et al. (2008). Evaluation of restriction enzymes for standardizing pulse-field gel electrophoresis for rapid typing of *Vibrio parahaemolyticus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 61(3): 251-255.
- [27] Marshall, S. et al. (1999). Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(8): 2473-2478.
- [28] Chen, W. et al. (2012). Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the middle-east coastline of China. *International Journal of Food Microbiology*. 153: 402-412.