

**APPLICATION OF PHAGE DISPLAY AND POLYMERASE  
CHAIN REACTION (PCR) - BASED TECHNIQUE FOR  
MIMOTOPE SEARCHING AND STRAIN IDENTIFICATION OF  
ENTERIC BACTERIA**

**KANCHANA USUWANTHIM**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (TROPICAL MEDICINE)  
FACULTY OF TROPICAL MEDICINE  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2003**

**ISBN 974-04-3098-8  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การประยุกต์ใช้เทคนิคฟาจดีสเพลย์และเทคนิคโพลีเมอเรสเชนรีแอคชันเพื่อค้นหาโมโตปและแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (APPLICATION OF PHAGE DISPLAY AND POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) - BASED TECHNIQUE FOR MIMOTOPE SEARCHING AND STRAIN IDENTIFICATION OF ENTERIC BACTERIA)

กาญจนา อุสุวรรณทิม 4437533 TMTM/M

วท.ม. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พงศ์ราม รามสูต D. V. M., Ph.D., วันเพ็ญ ชัยคำภา D. V. M. (Hons.), Ph.D., มนัส จงสงวน Ph.D., ผ่องศรี ทองทวี Ph.D., รุ่งรัศมี สร้อยสังวาลย์ Ph.D.,

#### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ชื่อว่าฟาจดีสเพลย์มาใช้เพื่อหาโมโตปของฟาจที่จับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซิงเกิลลาโซนีโอและซิกาที่ออกซินที่ผลิตโดยเชื้ออีโคไล นอกจากนี้ยังได้ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อตรวจหา virulence genes (*tdh* และ *trh*) ของเชื้อไวรัสโอพาราฮีโมลิตีคัส จากการศึกษพบว่าฟาจสามตัวอย่างที่จับกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อซิงเกิลลาโซนีโอมีการเรียงลำดับเบสที่เหมือนกันบางส่วน (partial consensus) ดังนี้คือ RxxxNSN นอกจากนี้จากการใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสที่ชื่อว่าทัชดาวน์ (TD-PCR) พบว่าเชื้อไวรัสโอพาราฮีโมลิตีคัส 13 สายพันธุ์จาก 22 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย (59.1%) มียีน *tdh* แต่ไม่มียีน *trh* และพบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์จาก 22 สายพันธุ์ที่มีทั้งยีน *tdh* และ *trh* จากการทดสอบความไวของเชื้อทั้ง 22 สายพันธุ์ต่อยาปฏิชีวนะพบว่าทุกสายพันธุ์ไวต่อยาคลอแรมเฟนิคอล เจนตามัยซิน นาริดีลิกแอซิด เตตราไซคลิน และ ไตรเมโทพริม/ซัลฟาเมทอกซาโซลและดีต่อยาเซฟฟาโรดินและแอมพิซิลิน จากการใช้เทคนิค ERIC-PCR เพื่อหาความแตกต่างของลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าสามารถจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสโอพาราฮีโมลิตีคัสทั้งหมด 22 สายพันธุ์ออกเป็น 3 รูปแบบซึ่งพบว่า 90.9% จัดอยู่ในรูปแบบที่ 1 คือมีแถบดีเอ็นเอ 200, 300, 500, 600, 1031 ส่วน 4.5% อยู่ในรูปแบบที่ 2 คือมีแถบดีเอ็นเอ 200, 250, 300, 480, 500, 650, 1031 และ 4.5% เช่นกันอยู่ในรูปแบบที่ 3 คือมีแถบดีเอ็นเอ 200, 250, 300, 500, 650, 700 ซึ่งสรุปได้ว่าเชื้อไวรัสโอพาราฮีโมลิตีคัสที่ศึกษาส่วนใหญ่คือ 90.9 % มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันอย่างใกล้ชิด

APPLICATION OF PHAGE DISPLAY AND POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) - BASED TECHNIQUE FOR MIMOTOPE SEARCHING AND STRAIN IDENTIFICATION OF ENTERIC BACTERIA.

KANCHANA USUWANTHIM 4437533 TMTM/M  
M.Sc. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORS: PONGRAMA RAMASOOTA, D. V. M., Ph. D., WANPEN CHAICUMPA, D. V. M.(Hons.), Ph. D., MANAS CHONGSA-NGUAN, Ph.D., PONGSRI TONGTAWA, Ph.D., ROONGRASAMEE SOISANGWAN, Ph.D.

ABSTRACT

A phage display technique was applied for the searching of the mimotopes *Shigella sonnei* and Shiga-toxin producing- *Escherichia coli*, using established specific monoclonal antibodies (MAbs). The PCR-based techniques, namely the touch-down (TD)-PCR and ERIC-PCR were applied for the study of the virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from patients with diarrhea (namely *tdh* and *trh*). By using the random peptide T7 phage display libraries, a partial consensus sequence of T7 phages which bound to *S. sonnei* MAb was RxxxNSN. Using TD-PCR, 13 of 22 (59.1 %) *V. parahaemolyticus* clinical isolates were *tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>-</sup>, 2 other isolates were *tdh*<sup>+</sup>, *trh*<sup>+</sup>. All of the 22 *V. parahaemolyticus* isolates were sensitive to trimethoprim/sulfamethoxazole, nalidixic acid, chloramphenicol, gentamycin and tetracycline but were resistant to cephalothin and ampicillin. O3:K6 was the most predominant serotype among the isolates. Using ERIC-PCR, the *V. parahaemolyticus* isolates could be classified into three different ERIC profiles, *i.e.* P1 (90.9%) which consisted of DNA bands 200, 300, 500, 600, 1031 bp, P2 (4.5%) which consisted of DNA bands 200, 250, 300, 480, 500, 650, 1031 bp and P3 (4.5%) which consisted of DNA bands 200, 250, 300, 500, 650, 700 bp. The conclusion that can be drawn from the study is the most (90.9%) of the *V. parahaemolyticus* clinical strains were closely related genetically.

KEY WORDS : PHAGE DISPLAY / TOUCH DOWN PCR / ERIC-PCR / SHIGA-TOXIN PRODUCING - *E. COLI* / *SHIGELLA SONNEI* / *V. PARAHAEMOLYTICUS*