IDENTIFICATION OF *VIBRIO CHOLERAE*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *VIBRIO VULNIFICUS* BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

AKARANONG RUJIWAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การตรวจแยกแบคทีเรีย *VIBRIO CHOLERAE*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* และ *VIBRIO VULNIFICUS* โดยวิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ (IDENTIFICATION OF *VIBRIO CHOLERAE*, *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *VIBRIO VULNIFICUS* BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION)

อัครนงค์ รุจิวัฒน์ 4536891 PYBS/M

วท.ม. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ปริ่มเฉนียน มุ่งการดี, Dr.rer.nat. (Immunology),
สมพร ศรีเฟื่องฟุ้ง, Ph.D. (Microbiology).

บทคัดย่อ

เชื้อ *Vibrio* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนโดยเฉพาะอาหารทะเล ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความสำคัญในการส่งออกอาหารทะเลไปยังประเทศต่างๆจึงต้องให้ความสำคัญกับความปลอดภัยและควบคุมป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ การศึกษานี้ได้ศึกษาการตรวจแยกเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็วโดยใช้วิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ เพื่อตรวจหายีนที่สำคัญในการก่อโรคของเชื้อ *Vibrio* โดยประกอบด้วยยีน *ctx*, *tl* และ *vvh* สำหรับ *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ตามลำดับ ยีนเหล่านี้มีความสำคัญในการก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ วิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์นี้ได้ถูกพัฒนาโดยเลือกใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะทั้งหมด 3 คู่ในการตรวจ เพื่อให้ได้ขนาดของลำดับเบสที่ให้ผลการตรวจสอบที่มีขนาด 302 คู่เบส (สำหรับ *V. cholerae*), 450 คู่เบส (สำหรับ *V. parahaemolyticus*) และ 704 คู่เบส (สำหรับ *V. vulnificus*) วิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์นี้เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและรวดเร็วในการตรวจ โดยสามารถตรวจได้ผลภายในเวลาเพียง 12-14 ชั่วโมงและยังสามารถตรวจพบเชื้อที่มีปริมาณเพียง 10^4-10^6 cfu/mlได้ ในขณะที่วิธีทางจุลชีววิทยาตามวิธีมาตรฐานการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในอาหารทะเลของ BAM ปี 2004 ใช้เวลา 3- 5 วัน ผลการศึกษาพบว่า การตรวจแยกโดยใช้วิธีมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ให้ผลการตรวจที่ไวกว่าการตรวจโดยใช้วิธีพื้นฐานทางจุลชีววิทยา ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อและสามารถใช้เป็นวิธีมาตรฐานเพื่อควบคุมความปลอดภัยของอาหารสำหรับผู้บริโภคและนอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการส่งออกอาหารทะเลและในอุตสาหกรรมอาหาร

การพัฒนาวิธีการตรวจโดยมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ในครั้งนี้ได้นำไปใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในตัวอย่างเนื้อกุ้งทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ซึ่งสุ่มตัวอย่างมาจากตลาดสดและห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพมหานคร ได้ใช้วิธีการตรวจโดยมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นและทำการตรวจสอบควบคู่ไปกับวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา จากการศึกษานี้พบว่าการรับประทานอาหารที่ปรุงไม่สุกหรืออาหารดิบ เป็นสาเหตุความเสี่ยงในการเกิดโรค โดยในการตรวจตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัวอย่างในครั้งนี้ พบว่ามีถึง 22 ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus*, 6 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* และ 1 ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* และในบางตัวอย่างตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งนับว่าเป็นอัตราที่ค่อนข้างสูง นอกจากนี้วิธีการตรวจโดยมัลติเพลกซ์พีซีอาร์ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อในอาหารประเภทต่างๆได้เพื่อให้มีมาตรฐานและความปลอดภัย

IDENTIFICATION OF *VIBRIO CHOLERAE, VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *VIBRIO VULNIFICUS* BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

AKARANONG RUJIWAT 4536891 PYBS/M

M.Sc. (BIOPHARMACEUTICAL SCIENCES)

THESIS ADVISORS: PRIMCHANIEN MOONGKARNDI, Dr.rer.nat. (Immunology), SOMPORN SRIFUENGFUNG, Ph.D. (Microbiology).

ABSTRACT

Vibrio spp. has been recognized as an important cause of foodborne illness. Consuming seafood is mostly associated with *Vibrio* spp. outbreaks. Thailand is one of the major countries exporting seafood worldwide and has to strictly control these organisms in seafood products promptly before transportation. In this study, a rapid multiplex PCR (m-PCR) method that allows the simultaneous detection, in a single tube, of *Vibrio* strains of common pathogens was developed. The identified target genes were: cholerae toxin (*ctx*) gene of *V. cholerae*, thermolabile (*tl*) gene of *V. parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* haemolysin (*vvh*) gene of *V. vulnificus*, which were reported to be associated with pathogenicity in humans. M-PCR was developed using three pairs of primers and produced specific amplicons of the expected sizes from mixed populations of reference of bacterial strains from pure cultures. The molecular sizes of amplicons from genes, *ctx*, *tl* and *vvh*, were approximately 302 bp (for *V. cholerae*), 450 (for *V. parahaemolyticus*) and 704 bp (for *V. vulnificus*), respectively. This m-PCR assay was specific and rapid, with a turnaround time of 12-14 h compared to the conventional microbiology method of 3-5 days. The detection limit of the assay for the bacterial target was estimated at 10^4-10^6 cfu/ml. The organism identification was confirmed following the standard protocol for *Vibrio* spp. detection in seafood recommended by the Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2004). The results showing that the m-PCR method gave a higher level of sensitivity and specificity than culturing methods, thereby improving the identification of *Vibrio* in seafood safety-control for industries and consumers.

Due to the occurance of pathogenic *Vibrio* spp., the potential risk of consumption of raw or undercooked shrimps was envisaged. Our developed m-PCR was applied to survey the contamination of the targeted organisms. Samples of shrimps collected from local fresh markets and supermarkets in Bangkok, Thailand were examined for the presence of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus.* M-PCR was used to identify the *ctx*, *tl* and *vvh* genes. A conventional microbiology method was performed, in parallel, to confirm the identification of the isolates. Twenty two *V. parahaemolyticus*, six *V. vulnificus* and one *V. cholerae* strains were detected from 60 shrimp samples. Mixed contaminations were found in some samples.

Our developed m-PCR is rapid, accurate, and less time-consuming than the conventional method and could be practically applied for seafood safety control.

KEY WORDS: *VIBRIO CHOLERAE* / *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* / *VIBRIO VULNIFICUS* / MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

99 pp.