16 JUL 1994

DEVELOPMENT OF SENSITIVE AND SPECIFIC DETECTION OF *SALMONELLA* BY POLYMERASE CHAIN REACTION

SARAWUT JITRAPAKDEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE
OF MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

26943

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีตรวจสอบที่ไว และจำเพาะของเชื้อซัลโมเนลล่า
โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
ผู้วิจัย ศราวุฒิ จิตรภักดี
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
วิชัย บุญแสง, Ph.D.
สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.
อัญชลี กมลนาวิน, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา 6 พฤษภาคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

ซัลโมเนลลา เป็นแบคทีเรียก่อโรคไทฟอยด์, พาราไทฟอยด์ และอุจจาระร่วงในคน และสัตว์เลือดอุ่น มักพบปนเปื้อนอยู่ในน้ำดื่ม และอาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จำพวกเป็ดไก่แช่แข็งส่งออก วิธีการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาที่ทำกันในปัจจุบันคือ การนำอาหารที่สงสัยว่าจะมีการปนเปื้อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ เพื่อแยกเชื้อที่บริสุทธิ์ซึ่งมีข้อเสียคือใช้เวลาอย่างน้อย 4-5 วันในการตรวจสอบ ใช้แรงงานมาก และขาดความไวในกรณีที่มีการปนเปื้อนของเชื้อจำนวนน้อย ๆ การขยายยีนในหลอดทดลองถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบ เนื่องจากมีความไว และความจำเพาะสูง

ในการศึกษานี้ ห้องสมุดยีนของเชื้อ Salmonella Weltevreden ถูกสร้างขึ้นในพลาสมิดพาหะ Bluescribe M13- และโคลนเข้าสู่ *E. coli* JM 107 ได้ทำการคัดเลือกโคลนลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 600 โคลนโดยวิธีไฮบริไดเซชั่นกับโครโมโซมของ S. Weltevreden ชิ้นส่วนขนาด 0.2 กิโลเบส จากโคลนหมายเลข 6 พบว่ามีความซ้ำซ้อน และกระจายอยู่ในยีโนมของซัลโมเนลลาซีโรวาร์อื่น ๆ จำนวนมาก ได้ทำการหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์เพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับขยายยีนของซัลโมเนลลาซึ่งมีขนาด 199 คู่เบส การตรวจสอบโดยวิธีนี้พบว่ามีความไว และความจำเพาะสูง กล่าวคือ สามารถตรวจ DNA ของซัลโมเนลลาในระดับ 0.1 เฟมโตกรัม และ 5 เซล เมื่อตรวจจาก pure culture นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบชิ้นส่วนขนาด 199 คู่เบสที่ได้จากการขยายยีนในหลอดทดลองจากซัลโมเนลลาซีโรวาร์ต่าง ๆ 52 อันดับแรกที่มักปนเปื้อนในอาหารส่งออก ในทางตรงกันข้าม ไม่พบชิ้น

Copyright by Mahidol University

ส่วนขนาดดังกล่าวจากแบคทีเรียกรัมลบชนิดอื่น ๆ อีก ชนิดที่มักปนเปื้อนในอาหารเหล่านี้

ได้ทำการเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในตัวอย่างอาหารส่งออกด้วยวิธีขยายยีนในหลอดทดลอง หลังทำการ enrichment ตัวอย่างอาหารใน selenite cystine broth เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง พบว่าแม้จะมีเชื้อปนเปื้อนในอาหารจำนวน 3 เซลในอาหาร 1 กรัม ก็สามารถตรวจสอบได้ชัดเจน การขยายยีนในหลอดทดลองได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาการปนเปื้อนของซัลโมเนลลาในอาหารส่งออกจำนวน 40 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการตรวจโดยทางจุลชีววิทยาพบว่าให้ความไว 100% ความจำเพาะ 81% ให้ผลขัดแย้ง 33%

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Development of Sensitive and Specific Detection of *Salmonella* by Polymerase Chain Reaction

Name Sarawut Jitrapakdee

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Vichai Boonsaeng, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Anchalee Kamolnavin, Ph.D.

Date of Graduation 6 May B.E. 2537 (1994)

Abstract

Salmonella, food-borne pathogenic bacteria of man and warm blooded animals is of increasing concern to many countries including Thailand which exported over a billion US dollar of food products since it is a causative agent of typhoid fever and diarrhea. The conventional culture method for *Salmonella* detection involving multiple subcultural steps are labour intensive, low sensitivity and time consuming, taking 4-5 days for complete detection assay for *Salmonella*.

In this study, genomic library of S. Weltevreden was constructed in Bluescribe M13- plasmid and cloned into *E. coli* JM107. The candidates were screened by hybridization with genomic DNA of S. Weltevreden. The 0.2 Kb inserted fragment from clone#6 was selected and sequenced because it conserved among other serovars.

A set of PCR primers was designed to amplify a 199 bp *Salmonella* -specific DNA fragment derived from a clone of Salmonella Weltevreden. The assay detected all 52 most prevalent serovars found in contaminated food in Thailand and no cross reaction was observed with other non-*Salmonella* organisms. The limit of detection was 0.1 fg of purified target DNA and 5

Copyright by Mahidol University

bacteria from pure culture. The detection of artificially contaminated food performed following12-16 h enrichment step was 3 bacteria g^{-1} and could be obtained within 4 h. Comparative study of PCR and microbiological method for detection of *Salmonella* in 182 frozen chicken samples was performed. The sensitivity and specificity of PCR based on microbiological method were 100% and 61% respectively. The disagreement of 2 method was 33%.

Copyright by Mahidol University