b10746225

RAPID DETECTION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* HEMOLYSIN GENES IN FROZEN SHRIMP BY USING DIGOXIGENIN LABELED DNA PROBES

PORNPICH KOWCACHAPORN

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

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITTY

TH
P836t
1997

1997

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การตรวจหายีนฮีโมไลซินของ *Vibrio parahaemolyticus* อย่างรวดเร็วในกุ้งแช่แข็งโดยใช้ตัวตรวจสอบที่ติดฉลากด้วย digoxigenin

ผู้วิจัย พรพิชญ์ โค้วคชาภรณ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์)
สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อรษา สุตเธียรกุล Ph.D. (Medical Science)
เนตรนภิส ธีระวัลย์ชัย Ph.D.(Biochem.)
กนกรัตน์ ศิริพานิชกร B.Sc.(PT), M.D., M.P.H.
บุญช่วย เอี่ยมโภคลาภ M.Sc. (Trop. Med.)

วันที่สำเร็จการศึกษา 5 พฤษภาคม พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

การใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบติดฉลาก digoxigenin ด้วยวิธี PCR ในการตรวจยีนซึ่งกำหนดการสร้างฮีโมไลซิน thermostable direct hemolysin (*tdh*) และ TDH-related hemolysin (*trh*)ของ *Vibrio parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งเพื่อการส่งออกจำนวน 111 ตัวอย่างซึ่งทำการศึกษาระหว่างเดือนพฤษภาคม 2538 ถึงเดือนกันยายน 2539 ผลการศึกษาความไวของดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *tdh* และ *trh* พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 125 พิโค-กรัม (50 นาโนกรัมต่อมล.) และ 10^6 colony forming unit ต่อมล. ที่เตรียมจากสายพันธุ์อ้างอิง *V. parahaemolyticus*AQ4613 (*tdh*$^+$) และ AQ4023 (*trh*$^+$) ความจำเพาะของดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งสองชนิดพบว่าให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่มี *tdh*$^+$ (49), สายพันธุ์ที่มี *trh*$^+$ (10) และสายพันธุ์ที่มี *tdh*$^+$*trh*$^+$ (27) ทุกสายพันธุ์ และให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับวิบริโอเชื้อสายอื่นๆ และเอนเทอริคแบคทีเรียจำนวน 248 สายพันธุ์ ความจำเพาะของดีเอ็นเอตรวจสอบทั้งสองคิดเป็นร้อยละ 100 เท่ากัน สำหรับการตรวจหา *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งโดยตรง (direct method) ด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยานั้นไม่พบ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งทุกตัวอย่าง แต่พบ *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 64 (71/111) จากตัวอย่างที่เพาะเชื้อในอาหารเสริม alkaline peptone water (APW) ที่ผสม 3%NaCl (indirect method) และพบเชื้อวิบริโอและเอนเทอริคแบคทีเรียอื่นๆ ร้อยละ 41.4 เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวน 364 สายพันธุ์และ

Copyright by Mahidol University

เชื้อวิบริโออื่น ๆ จำนวน 119 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งแช่แข็งพบไม่มีการสร้างฮีโมไลซิน TDH เมื่อตรวจสอบด้วย modified Elek test นอกจากนี้ทุกสายพันธุ์ตรวจไม่พบยีน *tdh* และ/หรือ *trh* เมื่อทำการตรวจตัวอย่างกุ้งแช่แข็ง (direct method) และตัวอย่างกุ้งแช่แข็งในอาหารเสริม APW ที่ผสม 3%NaCl ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ พบว่าให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *tdh* ร้อยละ 13.5 และร้อยละ 31.5 ตามลำดับ และมีเพียง 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.9) ใน APW ที่ผสม 3%NaCl ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *trh* เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางจุลชีววิทยาพบว่าการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *tdh* สามารถตรวจยีน *tdh* ในตัวอย่างอาหารกุ้งแช่แข็งและในอาหารเสริม APW ที่ผสม 3%NaCl ได้ร้อยละ 13.5 (15/111) และร้อยละ 25 (10/40) ของตัวอย่างกุ้งที่ไม่สามารถเพาะเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ตามลำดับ ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *tdh* และ *trh* ที่ติดฉลาก digoxigenin มีความไวสูงในการตรวจตัวอย่างกุ้งแช่แข็งโดยตรง ส่วนวิธีการมาตรฐานทางจุลชีววิทยาของ FDA ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ *V. parahaemolyticus* ระหว่างสายพันธุ์ที่มียีนฮีโมไลซิน (*tdh* และ /หรือ *trh*) กับสายพันธุ์ที่ไม่มียีนฮีโมไลซิน การศึกษาครั้งนี้ได้พัฒนาวิธีการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลาก digoxigenin ด้วยวิธี PCR ในการวิเคราะห์หาเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มียีน *tdh*และ/หรือ *trh* ในตัวอย่างอาหารกุ้งแช่แข็งได้สำเร็จและเป็นวิธีตรวจสอบกับตัวอย่างกุ้งแช่แข็งได้โดยตรงและรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยมหิดล
Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Rapid Detection of *Vibrio parahaemolyticus* Hemolysin Genes in Frozen Shrimp by Using Digoxigenin Labeled DNA Probes
Name	Pornpich Kowcachaporn
Degree	Master of Science (Public Health) major in Infectious Diseases
Thesis Supervisory Commitee	Orasa Suthienkul, Ph.D. (Medical Science) Nednapis Tirawanchai, Ph.D. (Biochem.) Kanokrat Siripanichgon, B.Sc. (PT), M.D., M.P.H. Boonchuay Eampokalap, M.Sc. (Trop. Med.)
Date of Graduation	5 May B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

The study on rapid detection of thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) by using the digoxigenin-labeled PCR probes were carried out in 111 frozen shrimp samples prepared for export products from May 1995 to September 1996. The sensitivities of both probes were determined by dot blot hybridization with extracted genomic DNA of reference strains *V. parahaemolyticus* AQ4613 (tdh^+) and AQ4023 (trh^+). The minimal amount of extracted DNA detected by both probes was 125 pg (50ng/ml) and 10^6 colony forming unit (CFU)/ml each. The specificities of *tdh* and *trh* PCR probes were determined by colony hybridization assay. All known tdh^+ (49), trh^+ (10) and tdh^+trh^+(27) strains were hybridized with the digoxigenin-labeled *tdh* and *trh* PCR probes, while negative controls using 248 other strains of *Vibrio* spp. and enteric bacteria were not hybridized, thus giving 100% specificity. By the routine microbiological method, 64% (71/111) of

Copyright by Mahidol University

V. parahaemolyticus and 41.4% of other vibrios were isolated only from enrichment medium, alkaline peptone water (APW) with 3%NaCl (indirect method), but none of *V. parahaemolyticus* were detected directly in shrimp samples (direct method). In addition, a total of 364 isolates of *V. parahaemolyticus* and 119 isolates of other vibrios showed negative results for hemolytic activitives (TDH^-) with modified Elek test. Subsequently, all 483 isolates (including 364 *V. parahaemolyticus* isolates) also gave negative reactions for both *tdh* and/or *trh* genes. However, using the probes to detect the *tdh* and *trh* of *V. parahaemolyticus* directly from the samples and the enriched samples, we found positive results for *tdh* in 13.5% and 31.5%, respectively. Only one (0.9%) of the enriched samples was positive for *trh.* In comparison with the culture method, the *tdh* probe was able to detect the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus* in 13.5% (direct) and 25% (indirect) of nonculturable samples for *V. parahaemolyticus*. Thus, the digoxigenin-labeled *tdh* and *trh* PCR probes were very sensitive to detect the hemolysin genes directly in frozen shrimp samples. It was emphasized here that the standard culture method recommended by FDA was not able to differentiate *V. parahaemolyticus* isolates with hemolysin genes (*tdh* and/or *trh*) and those without hemolysin genes. However, the digoxigenin-labeled *tdh* and *trh* PCR probes were successfully developed for rapid diagnosis of *V. parahaemolyticus* isolates with hemolysin genes (tdh^+ and/or trh^+) in frozen shrimp samples.

Copyright by Mahidol University