



**RAPID DETECTION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN
SEAFOOD BY USING DNA HYBRIDIZATION ASSAY AND PCR**

SIRIWAN KACHORNCHAIYAKUL

With compliments
of
Faculty of Graduate Studies
MAHIDOL UNIVERSITY

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PUBLIC HEALTH)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1998

ISBN 974-589-791-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

S 6199

1998

3836697 PHPH/M : สาขาวิชาเอก : โรคติดเชื้อ : วท.ม. (สาธารณสุขศาสตร)

สิริวรรณ ขจรไชยกุล การตรวจวินิจฉัย *Vibrio parahaemolyticus* อย่างรวดเร็ว ในอาหารทะเลแช่แข็งด้วยวิธี DNA hybridization และ PCR (Polymerase Chain Reaction) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อรษา สุดธีธรกุล Ph.D., กนกรัตน์ สิริพานิชกร B.S.(PT), MD., M.P.H., เนตรนภิส วีระวัลย์ชัย Ph.D., 191 หน้า ISBN 974-589-791-4

การพัฒนาการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ด้วย *ldh* gene โดยตรงและอย่างรวดเร็วด้วยวิธีการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) และวิธี DNA hybridization ซึ่งมีตัวตรวจสอบเป็น PCR product และติดฉลากด้วย digoxigenin ได้ทำการศึกษาในกุ้งแช่แข็งจำนวน 111 ตัวอย่างจากโรงงานกุ้งแช่แข็งในจังหวัดสมุทรสาคร ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2536 ถึงเดือนกันยายน 2537 ผลการปรับสภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR โดยใช้ *ldh* ขึ้นซึ่งเป็นฮีโมกลัยซินที่พบได้ในทุกสายพันธุ์ของ *V. parahaemolyticus* เป็นไพรเมอร์ พบว่าการตรวจหา DNA ที่เตรียมจากเชื้อ มาตรฐาน *V. parahaemolyticus* BG 26 จำนวนที่น้อยที่สุดของวิธี PCR และ DNA hybridization คือ 122 เฟมโตกรัม (0.12 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร หรือประมาณ 175 เซลล์) และ 195 พิโคกรัม (หรือประมาณ 10^7 เซลล์) ตามลำดับ และทั้ง 2 วิธีมีความจำเพาะต่อยีน *ldh* ร้อยละ 100 เมื่อนำมาทดสอบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งแช่แข็ง จำนวน 364 สายพันธุ์ โดยวิธี PCR และ DNA hybridization พบว่า 360 (98.9 %) สายพันธุ์ ให้ผลบวกกับทั้งสองวิธี และเมื่อทดสอบกับเชื้อ vibrio อื่นๆ 67 สายพันธุ์ และเชื้อกรัมลบ อื่นๆ อีก 26 สายพันธุ์ ให้ผลลบทั้งหมด ยกเว้น *V. alginolyticus* ที่ให้ผลบวกกับวิธี DNA hybridization ร้อยละ 42.8 (15/35) และให้ผลบวกกับทั้ง 2 วิธี ร้อยละ 14.3 (5/35) เมื่อนำวิธี PCR มาตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างกุ้งแช่แข็ง โดยตรงจำนวน 111 ตัวอย่าง พบว่าให้ผลลบทั้งหมด และเมื่อตรวจในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งที่เลี้ยงในอาหารเสริม alkaline peptone water (APW) กับ 3% NaCl พบว่าให้ผลบวกร้อยละ 68.5 (76/111) ส่วนวิธี DNA hybridization ให้ผลบวกร้อยละ 18.0 (20/111) และ 47.7 (53/111) ตามลำดับ ผลการตรวจด้วยวิธี PCR เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อทางจุลชีววิทยา และ DNA hybridization พบว่ามีความจำเพาะ ความไว และประสิทธิภาพสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีความไวร้อยละ 94.5 ความจำเพาะร้อยละ 81.6 และประสิทธิภาพร้อยละ 90.1 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อทางจุลชีววิทยา ดังนั้นวิธี PCR จึงเป็นวิธีที่สามารถวินิจฉัย *V. parahaemolyticus* ได้รวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งอาจสามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังและควบคุมคุณภาพอาหารในกระบวนการผลิต (HACCP) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3836697 PPH/M : MAJOR INFECTIOUS DISEASES; M.Sc. (PUBLIC HEALTH)

KEY WORD: *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* / DNA HYBRIDIZATION / POLYMERASE CHAIN REACTION

SIRIWAN KACHORNCHAIYAKUL : RAPID DETECTION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN SEAFOOD BY USING DNA HYBRIDIZATION ASSAY AND PCR. THESIS ADVISORS : ORASA SUTHIENKUL, Ph.D., KANOKRAT SIRIPANI - CHAGON, BS.(PT), MD., M.P.H., NEDNAPIS TIRAWANCHAI, Ph.D., 191 p ISBN 974-589-791-4

Rapid detection of the lecithin dependent hemolysin (*ldh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp was investigated by using polymerase chain reaction (PCR) and DNA hybridization with digoxigenin labeled probes. One hundred and eleven frozen shrimp samples were obtained from Samutsakorn province from May 1995 to September 1996. Tests revealed that the lowest detection limits of PCR and DNA hybridization were 122 fg (0.12 ng/ml or approximately 175 cells) and 195 pg (approximately 10^7 cells), respectively. The specificity of PCR and DNA hybridization methods were carried out by examining with 116 strains of *Vibrio* species and 110 strains of other Gram negative bacteria resulting in 100% specificity. Of 364 strains of *V. parahaemolyticus* isolated in frozen shrimp samples, 360 (98.6%) gave positive for *ldh* by both methods, 67 strains of other *Vibrio* species and 26 strains of other Gram negative bacteria gave negative for *ldh*. But 14.3% (5/35) of *V. alginolyticus* were tested positively by both tests and 42.8 % (15/35) were positive by DNA hybridization. Upon detection of *V. parahaemolyticus* by PCR and DNA hybridization from 111 frozen shrimp samples, all direct samples gave negative results for *ldh*, however 68.5% (76/111) of enrichment samples were tested positively by PCR. Eighteen percent (20/111) of direct samples, and 47.7% (53/111) of enrichment samples were positive by DNA hybridization assay. PCR testing for *ldh* of *V. parahaemolyticus* directly from the enriched samples showed 94.5% sensitivity, 87.6% specificity and 90.1 % efficiency compared with conventional method ($p < 0.05$). Therefore, PCR could be an alternative method to identify *V. parahaemolyticus* in order to monitor for food safety in HACCP program.