D 10926962

RAPID DIAGNOSIS FOR DETECTION OF CHOLERA TOXIN GENE BY USING DIGOXIGENIN LABELED OLIGONUCLEOTIDE PROBE IN FROZEN SHRIMP SAMPLES

PIPOP MAUNGSIRI

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

With compliments
of
มหาวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1997

TH
P665ร
1997

Copyright by Mahidol University

ชื่อวิทยานิพนธ์ การวินิจฉัยอย่างรวดเร็วสำหรับการตรวจหายีนที่กำหนดการสร้าง cholera toxin โดยใช้ตัวตรวจสอบติดฉลากด้วย digoxigenin ในกุ้งแช่แข็ง

ผู้วิจัย พิภพ เมืองศิริ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาธารณสุขศาสตร์)

สาขาวิชาเอกโรคติดเชื้อ

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อรษา สุตเธียรกุล Ph.D. (Medical Science)

คล้ายอัปสร พงษ์รพีพร Ph.D. (Biochemistry)

กานดา วัฒโนภาส M.D., M.Sc. in Hygiene

แฉล้ม จันทรศรี B.Sc. (Med. Tech.)

วันที่สำเร็จการศึกษา 29 เมษายน พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เป็นการพัฒนาการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ(Oligonucleotide probe) ที่จำเพาะต่อยีน *ctx*A ซึ่งกำหนดการสร้าง cholera toxin(CT) ในเชื้อ *V. cholerae* O1 และ *V. cholerae* O139 ดีเอ็นเอตรวจสอบที่ได้ติดฉลากด้วย Digoxigenin และใช้เทคนิคไฮบริไดเซชั่นแบบด็อทบล็อท(dot blot hybridization) และเทคนิคไฮบริไดเซชั่นแบบโคโลนี(colony hybridization) ในการตรวจหาเชื้อดังกล่าว จากการศึกษาความไวของดีเอ็นเอตรวจสอบพบว่าให้ผลบวกกับปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด 1 นาโนกรัมหรือ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 10^6 colony forming unit(CFU)ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง *V. cholerae* O1 AQ 1034(CT+) ส่วนความจำเพาะของดีเอ็นเอตรวจสอบได้ทำการทดสอบกับโคโลนีของ *V. cholerae* O1, O139, วิบริโอเชื้อสายอื่นๆและเอนเทอริคแบคทีเรียด้วยวิธีไฮบริไดเซชั่นแบบโคโลนีพบว่า *V. cholerae* O1 จำนวน 101 สายพันธุ์และ *V. cholerae*

Copyright by Mahidol University

O139 จำนวน 48 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วย ให้ผลบวก ในขณะที่วิบริโอเชื้อสายอื่นๆและเอน-เทอริคแบคทีเรีย จำนวน 240 สายพันธุ์ ให้ผลลบ เมื่อนำดีเอ็นเอตรวจสอบนี้ไปตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างกุ้งแช่แข็งจำนวน 111 ตัวอย่างจากโรงงานอาหารทะเลแช่แข็ง จังหวัดสมุทรสาคร ระหว่างเดือน พฤษภาคม 2538 ถึงเดือน กรกฎาคม 2539 โดยที่ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งนั้นสกัดมาจากการเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline peptone water (APW)กับ 0.5% NaCl พบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างเหล่านี้ให้ผลลบกับดีเอ็นเอตรวจสอบนี้ และเมื่อใช้วิธีทางจุลชีววิทยากับตัวอย่างเหล่านี้ก็ไม่พบเชื้อ *V. cholerae* O1 เลยเช่นกัน เชื้อที่พบจากตัวอย่างกุ้งแช่แข็งได้แก่เชื้อกลุ่มวิบริโอและเอนเทอริคแบคทีเรียร้อยละ 62.2 และพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* มากที่สุดร้อยละ 39.6 รองลงมาพบเชื้อ *V. cholerae* non O1 ร้อยละ 14.4 และ *A. hydrophila* ร้อยละ 11.7 แบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างกุ้งแช่แข็งทั้งหมดจำนวน 368 สายพันธุ์ ให้ผลลบกับดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะต่อยีน *ctx*A ทั้งหมด จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าเทคนิคนี้เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาเชื้อ *V. cholerae* O1 ที่สร้างสารพิษ CT ในตัวอย่างอาหารกุ้งแช่แข็งได้โดยตรงและรวดเร็ว

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Rapid Diagnosis for Detection of Cholera Toxin Gene by Using Digoxigenin Labeled Oligonucleotide Probe in Frozen Shrimp Samples

Name Pipop Maungsiri

Degree Master of Science (Public Health)
major in Infectious Diseases

Thesis Supervisory Comittee
Orasa Suthienkul, Ph.D. (Medical Science)
Klai-upsorn Pongrapeeporn, Ph.D. (Biochemistry)
Kanda Vathanophas, M.D., M.Sc. in Hygiene
Chalam Chantrasri, B.Sc. (Med. Tech.)

Date of Graduation 29 April B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

The study on rapid diagnosis for detection of cholera toxin (CT) gene by using digoxigenin-labeled 23-base *ctx*A oligonucleotide probe was carried out in 111 frozen shrimp samples in Samutsakorn Province, during May 1995 to July 1996. The sensitivity of the oligonucleotide probe determined by dot blot hybridization with extracted genomic DNA of reference strain *V. cholerae* O1 AQ 1034 (CT^+) was 1 ng or 1 ug/ml and 10^6 colony forming unit (CFU)/ml. The specificity of *ctx*A oligonucleotide probe was determined by colony hybridization technique. All 149 strains of *V. cholerae* O1 and O139 were hybridized with the digoxigenin-labeled *ctx*A oligonucleotide probe, while a total of 240 strains of *V. cholerae* non O1 and other enteric bacteria were not hybridized. The *ctx*A oligonucleotide probe was then used for the

Copyright by Mahidol University

rapid detection of toxigenic *V. cholerae* in 111 frozen shrimp samples. All DNA samples gave negative results for *ctx*A by dot blot hybridization assay, and *V. cholerae* O1 organisms were also not detected in all samples with the microbiological method. In addition, the enteropathogens were isolated from 69 (62.2%) of 111 frozen shrimp samples. *V. parahaemolyticus* were detected in the highest frequency (39.6%), followed by *V. cholerae* non O1 (14.4%), and *Aeromonas hydrophila* (11.7%). All 368 strains of enteropathogens isolated in frozen shrimp samples were negative for *ctx*A. However, the dot blot hybridization method with digoxigenin labeled 23-base *ctx*A oligonucleotide probe was successfully developed for rapid detection of toxigenic *V. cholerae* O1 from frozen shrimp samples.

Copyright by Mahidol University