# บทคัดย่อ

220726

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการที่อาศัยพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio vulnificus* จากหอยนางรม โดยในปฏิกิริยาสามารถตรวจแบคทีเรียทั้งสองชนิดได้พร้อมกันยีนเป้าหมายที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* ได้แก่ *tl* (thermolabile hemolysin gene) และ *tdh* (thermostable direct hemolysin gene) ส่วนการตรวจสอบ *V. vulnificus* ใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hemolysin/ cytolysin หรือ *vvh* เป็นยีนเป้าหมาย ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าวเท่านั้น สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดำเนินปฏิกิริยา PCR แบบมัลติเพล็กซ์ใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิสำหรับการลงเกาะของไพร์เมอร์บนดีเอ็นเอแม่แบบคือ 63 องศาเซลเซียส จากการศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมดีเอ็นเอแม่แบบจากเชื้อที่ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรม พบว่าการใช้ SDS-Proteinase K lysis solution ร่วมกับการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ให้ผลการดำเนินปฏิกิริยาค่อนข้างดี ความไวของเทคนิคในการตรวจ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* โดยตรงจากตัวอย่างหอยนางรมคือ 100 CFU ต่อกรัม และเมื่อเพิ่มขั้นตอนการเพิ่มปริมาณเชื้อในหอยนางรมก่อนการทำ PCR พบว่าเทคนิคนี้มีความไวของการตรวจสอบสูงได้สูงขึ้น (1 CFU ต่อกรัม) เทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ได้ผ่านการทดสอบความใช้ได้จริงโดยเปรียบเทียบกับวิธีตรวจสอบมาตรฐาน ซึ่งมีค่าความแม่นยำ ความจำเพาะและความไวของการตรวจสอบ 96-100 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถนำเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการตรวจสอบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* แทนวิธีดั้งเดิมได้ ซึ่งสามารถทำได้สะดวกและรวดเร็วกว่า ซึ่งมีประโยชน์ในการลดปัญหาการเจ็บป่วยหรือการตายที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้

## Abstract

220726

This study was aimed to develop PCR-based technique for the detection of two *Vibrio* species, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, in oyster. Multiplex reaction was optimized using several sets of primers and subsequently three primer pairs were selected including those targeting genes encoded thermolabile hemolysin (*tl*) and thermostable directed hemolysin (*tdh*) of *V. parahaemolyticus* as well as the one encoded hemolysin/ cytolysin (*vvh*) of *V. vulnificus*. No amplification of other *Vibrio* species or non-*Vibrio* bacteria was evident, suggesting a high specificity of detection by this method. According to the optimization of the simultaneous amplification reaction, the concentration of $MgCl_2$ component and annealing temperature of the PCR cycle were proved to be satisfied at 3.0 mM and 63 $^{o}$C, respectively. Protocol for bacterial DNA template preparation was a great of concern, especially from oyster samples. After trial analyses, crude extraction method using SDS-Proteinase K lysis solution followed by isopropanol DNA precipitation was adopted. This protocol guaranteed the success of amplification reaction and reproducibility as determined by yields of PCR products. The sensitivity of direct detection of both targeted organisms in spiked oyster samples was shown as 100 CFU/g. This sensitivity was improved to 1 CFU per gram of oyster tissue homogenate in 6-hour enriched culture. Validation analysis of the developed multiplex PCR revealed that this technique could be highly approved with the values of relative accuracy, specificity and sensitivity of greater than 95 % (96-100 %), and it is applicable. The rapid, sensitive, and specific detection of both clinically important bacteria in oyster would be beneficial in reducing illnesses and deaths caused by these pathogens.