การพัฒนาวิธีพีซีอาร์เพื่อตรวจหาเชื้อวิบริโอในอาหารทะเล

A Development of PCR Method for Detection of *Vibrio* species in Seafood

ควรศิริ ศีลภิญโญ [1] และวิมล จันทร์แจ่ม [2]

บทคัดย่อ

จากการศึกษาและพัฒนาวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ก่อโรค 6 ชนิด ในอาหารทะเล โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ ที่จำเพาะต่อ collagenase gene ของ *Vibrio alginolyticus* (737 bp), toxin gene ของ *V. cholerae* (563 bp), hemolysin/enterotoxin gene ของ *V. mimicus* (390 bp), hemolysin/cytolysin gene ของ *V. vulnificus* (276 bp), 16S rDNA ของ *V. fluvialis* (217 bp) และ 16S-23S rDNA ของ *V. parahaemolyticus* (170 bp) ผลการศึกษาพบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ มีความจำเพาะสูงโดยไม่เพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น รวมทั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และ *Escherichia coli* ในการศึกษาความไวของวิธี multiplex PCR พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิดได้ในระดับ 10^8 CFU/g ของตัวอย่างอาหารทะเล และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* จากตัวอย่างอาหารทะเล 30 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีมาตรฐาน (วิธีเพาะเชื้อ) เปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (α=0.05) ดังนั้นวิธี multiplex PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิดที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลได้ โดยมีความจำเพาะสูง ให้ผลที่รวดเร็ว และเชื่อถือได้

คำสำคัญ: พีซีอาร์ วิบริโอ อาหารทะเล

ABSTRACT

A multiplex PCR method was studied and developed for simultaneous detection of six *Vibrio* pathogens in seafood. Using the six primer pairs specific of the collagenase gene of *Vibrio alginolyticus* (737 bp), the toxin gene of *V. cholerae* (563 bp), the hemolysin/enterotoxin gene of *V. mimicus* (390 bp), the hemolysin/cytolysin gene of *V. vulnificus* (276 bp), species-specific region of the 16S rDNA of *V. fluvialis* (217 bp) and species-specific region of the 16S-23S rDNA of *V. parahaemolyticus* (170 bp). The six pairs of primers produced specific amplicon size for each of the six pathogens but not for *Aeromonas hydrophila* and *Escherichia coli.* The detection limit for the assay of six *Vibrio* was estimated at 10^8 CFU/g of seafood sample. The detection results of 30 samples by standard conventional method (culture method) and multiplex PCR method were not significantly different (α=0.05). The results from this study showed that multiplex PCR method was specific, rapid and reliable for detection of six *Vibrio* pathogens in seafood.

Keywords: PCR, *Vibrio,* seafood

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

บทนำ

การบริโภคอาหารทะเลส่วนใหญ่นิยมบริโภคแบบสุก ๆ ดิบ ๆ เป็นเหตุทำให้เกิดภาวะอาหารเป็นพิษ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในสกุล (genus) *Vibrio* ที่พบปนเปื้อนในอาหารทะเลเป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง (gastroenteritis) ในมนุษย์ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดโรคอหิวาต์ (cholera) และเกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต (septicemia) อาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ (Angela et al., 2005) โดยพบว่าส่วนใหญ่มาจากการบริโภคอาหารทะเลที่ไม่ปรุงให้สุกหรือผ่านกระบวนการปรุงที่ไม่สะอาด ดังนั้นจึงเกิดการติดเชื้อและเกิดโรคระบาดได้ง่าย ส่วนในประเทศไทยพบว่าเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษมากเป็นอันดับหนึ่ง ถึงร้อยละ 50 (อรษา และคณะ, 2544)

เชื้อ *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ (family) VIBRIONACEAE มีรูปร่างเป็นท่อนโค้ง (curved rod หรือ comma shape) เซลล์มีขนาดประมาณ 0.5-0.8 x 1.4-2.4 ไมโครเมตร (μm) ติดสีแกรมลบ (gram negative) เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา (flagella) ที่ขั้ว (polar) 1 เส้นหรือมากกว่า เจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน (facultative bacteria) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C ทนความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ได้สูงถึง 9.5 ส่วนใหญ่ให้ผลออกซิเดส (oxidase) เป็นบวก พบได้ในแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม สปีชีส์ (species) ที่ก่อโรคในคน มีสมบัติเป็น halophilic bacteria ซึ่งต้องการอาหารหรือสิ่งแวดล้อมที่มีส่วนประกอบของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ในการเจริญ ยกเว้นเฉพาะเชื้อ *V. cholerae* และ *V. mimicus* ที่สามารถเจริญได้แม้ไม่มีเกลือและพบได้ในบริเวณน้ำจืด เชื้อในสกุลนี้มีทั้งหมด 60 สปีชีส์ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษาชนิดที่พบว่าก่อโรคที่สำคัญในมนุษย์ ได้แก่ *V. cholerae*, *V. alginolyticus, V. fluvialis* , *V. vulnificus, V. mimicus* และ *V. parahaemolyticus*

โดยปกติแล้วการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารมักใช้วิธีมาตรฐาน (standard conventional method) ซึ่งประกอบด้วยการตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) การทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และการทดสอบทางวิทยาเซรุ่ม (serological test) วิธีมาตรฐานใช้เวลานานประมาณ 7-10 วัน และพบว่าเป็นการสิ้นเปลืองทั้งแรงงานคนเวลา และมีความยุ่งยากอย่างมาก นอกจากนี้ ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์นั้นเชื้ออาจถูกแรงปั่นและใบมีดของเครื่องปั่นทำลาย จึงทำให้สภาพของเชื้ออ่อนแอหรือไม่เจริญ ทำให้การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการอาจเกิดความผิดพลาด คืออาจตรวจไม่พบเชื้อทั้งที่เชื้อยังไม่ตาย ในกรณีของอาหารส่งออกจึงทำให้เกิดความล่าช้าและเป็นการเพิ่มต้นทุนให้กับผู้ส่งออก เนื่องจากหากพบว่าผู้บริโภคได้รับอันตรายจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร ถือเป็นความรับผิดชอบของผู้ผลิต (ศูนย์สารสนเทศการค้าระหว่างประเทศ, 2547)

ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นวิธีทางชีววิทยาในระดับโมเลกุลที่มีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูง ให้ผลที่แม่นยำ เชื่อถือได้และรวดเร็ว สามารถทราบผลได้ในเวลา 1-2 วัน (Kong et al., 2002) วิธีที่นิยมใช้กันมากคือ Polymerase Chain Reaction หรือ PCR (อรษา และคณะ, 2544) ซึ่งเป็นการเพิ่มขยายดีเอ็นเอ (DNA) ที่ต้องการโดยอาศัยไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะ โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นในหลอดทดลอง ในปัจจุบันได้มีการพัฒนา ดัดแปลง หรือปรับปรุงเทคนิค PCR ขั้นพื้นฐาน (basic PCR technique) จนเป็นเทคนิคที่เรียกว่า PCR ขั้นสูง (advanced PCR technique) จำนวนมาก ส่วนใหญ่เกิดจากการพยายามพัฒนาเทคนิคพื้นฐานให้มีศักยภาพในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมให้สูงขึ้น ไม่จำกัดชนิดของสารพันธุกรรมที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ ปรับปรุงและลดขั้นตอนปฏิบัติให้ง่ายและรวดเร็วขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกใช้วิธี multiplex PCR ซึ่งจัดเป็นวิธี PCR ขั้นสูงมาทำการศึกษา เนื่องจากวิธี multiplex PCR เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงจากเทคนิค PCR พื้นฐาน มีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอหลายเป้าหมายด้วยไพรเมอร์หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารทะเลโดยอาศัยเทคนิค multiplex PCR

2. เพื่อตรวจหาอัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในอาหารทะเล

3. เพื่อเปรียบเทียบวิธีมาตรฐานและวิธีรวดเร็วที่ใช้ตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ในอาหารทะเล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การพัฒนาวิธี PCR และ multiplex PCR

1.1 การคัดเลือกเชื้อและการเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำเชื้อ *Vibrio* จาก stock มาเพาะลงใน Alkaline Peptone Water ที่มีเกลือ sodium chloride 3% (APW+3%NaCl) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็ง Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อและเตรียมสกัดดีเอ็นเอ

1.2 สกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียตามวิธีมาตรฐาน (วัฒนาลัย และคณะ, 2536)

เลี้ยงเชื้อ *Vibrio* ใน APW+3%NaCl นำมาปั่นเก็บเซลล์ เติม lysozyme และ 10%SDS เพื่อย่อยผนังเซลล์ จากนั้นทำการสกัดโปรตีนออกโดยใช้สารละลาย phenol ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 3 M sodium acetate และ absolute ethanol เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70ºC ปั่นเก็บตะกอนดีเอ็นเอและนำไปทำให้แห้ง จากนั้นเติม TE buffer 30-50 µl และ RNaseA เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดความเข้มข้นโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ค่าการดูดกลืนแสง 1 OD ของดีเอ็นเอที่สกัดได้แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 50 µg/µl

1.3 ออกแบบไพรเมอร์

คัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ *Vibrio* ในระดับสปีชีส์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของเชื้อ *Vibrio* ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

1.4 หาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* แต่ละชนิดโดยวิธี PCR

เตรียม PCR reaction mixture ใน microcentrifuge tube ให้มีปริมาตรสุทธิ 50 µl โดยปรับพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้ ปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของ primer ปริมาณของ *Taq* DNA polymerase โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 ng จากนั้นนำใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler ตั้งอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบให้เหมาะสมตามชนิดของเชื้อ การทำงานของเครื่องมี 3 ขั้นตอน ดังนี้

Denaturation ที่ 94°C

Primer annealing ที่อุณหภูมิต่างกันดังรายละเอียดในตารางที่ 1

Primer extension ที่ 74°C

1.5 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Mueen et al., 2003)

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์มี 2 วิธี คือ 1) ใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อหลายชนิดผสมกัน 2) ใช้ไพรเมอร์ผสม ต่อดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ชนิด ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียชนิดอื่นอีก 2 ชนิด คือ *A. hydrophila* และ *E. coli* จากนั้นนำมาทำ PCR ตามภาวะที่เหมาะสม

1.6 ทดสอบความไวของวิธี PCR (Mueen et al., 2003)

การทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* มีดังนี้ นำดีเอ็นเอของเชื้อมาเจือจางที่ความเข้มข้น 100 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 100 pg, 50 pg และ 10 pg จากนั้นนำมาทำ PCR ตามภาวะที่เหมาะสม

1.7 หาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละชนิดโดยวิธี multiplex PCR

หาภาวะที่เหมาะสม โดยการปรับความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ความเข้มข้นของ primer อุณหภูมิ annealing, extension time, ปริมาณของ *Taq* DNA polymerase และจำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยา

1.8 ทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR ในตัวอย่างอาหารทะเลสด (Kong et al., 2002)

เลี้ยงเชื้อ *Vibrio* แต่ละชนิดใน broth ให้ได้ความเข้มข้นชนิดละ 10^8-10^9cells/ml (3 ชั่วโมง) ทำการเจือจางเป็นอนุกรม 1:10 (ten-fold) ใน sterile saline (10-10^9cells/ml) จากนั้นนำแต่ละความเจือจางมา 1 ml ถ่ายเชื้อลงในตัวอย่างกุ้งที่บดละเอียด 1 g นำไปปั่นเก็บตะกอนที่ 6000 รอบต่อนาที 15 นาที เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี rapid boil method ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำตะกอนมาละลายด้วย Lysis buffer 300 µl ผสมให้เข้ากัน เติม 20% chelex-100 ปริมาตร 200 µl และ Protenase K (20 mg/ml) 4.5 µl ผสมให้

เข้ากันก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56ºC 30 นาที ต้มในน้ำเดือด 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเก็บส่วนใสเพื่อเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ

2. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio* ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารทะเลสด

2.1 การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธีมาตรฐาน (BAM, 2004)

ขั้นเพิ่มจำนวนเชื้อ ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 g บดให้ละเอียด ผสมลงใน APW+3%NaCl 225 ml (1:10) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง

ขั้นเพาะแยกเชื้อ ถ่ายเชื้อจาก APW+3%NaCl ลงในอาหารแข็ง TCBS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

ขั้นวิเคราะห์เชื้อ เลือกโคโลนีสีเขียวและโคโลนีสีเหลืองถ่ายลงในอาหาร Triple Sugar Iron agar (TSI agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูผลจาก TSI agar เชื้อที่คาดว่าจะเป็นเชื้อ *Vibrio* นำไปทดสอบออกซิเดส (oxidase test) และนำไปทดสอบทางชีวเคมี

2.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธี multiplex PCR (Kong et al., 2002)

นำตัวอย่างอาหาร 25 g มาบดให้ละเอียด ผสมลงใน APW+3%NaCl 225 ml (1:10) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 6-8 ชั่วโมง จากนั้นนำ 1 ml ของ APW+3%NaCl ที่มีเชื้อผสมอยู่มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธี rapid boil method และนำไปเพิ่มขยายดีเอ็นเอโดยใช้วิธี multiplex PCR ในภาวะที่เหมาะสม

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

หาอัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* แต่ละชนิดในตัวอย่างอาหารคิดเป็นร้อยละ และหาความแตกต่างของการตรวจพบเชื้อ *Vibrio* ระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธี multiplex PCR วิเคราะห์โดยใช้การทดสอบแบบ Chi-square ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05)

ตารางที่ 1 Primer sequences และขนาด PCR product

species	target gene	primers	sequences (5'→3')	size (bp)	Annealing temp (°C)	references
V. alginolyticus	collagenase	VA-F	cga gta cag tca ctt gaa agc c	737	57	Angela et al., 2006
		VA-R	cac aac aga act cgc gtt acc			
V. cholerae	toxin	VC-1	ggc aga ttc tag acc tcc t	563	50	Wang et al., 1997
		VC-2	tcg atg atc ttg gag cat tc			
V. mimicus	hemolysin/	VMH-2	ggt agc cat cag tct tat cac g	390	53	Zafar et al., 2007
	enterotoxin	VMH-3	atc gtg tcc caa tac ttc acc g			
V. vulnificus	hemolysin/	VVh-F	cgc tgt tta acg gcc agc ta	276	55	Wang & Lee, 2003
	cytolysin	VVh-R	ggt tgt cat tct cgt cgg tg			
V. fluvialis	16S rDNA	VF-*toxR*-F	gac cag ggc ttt gag gtg gac gac	217	65	Rupa et al., 2005
		VF-*toxR*-R	agg ata cgg cac ttg agt aag act			
V. parahaemolyticus	16S-23S rDNA	Vpara-F	gct gac aaa aca aca att tat tgt t	170	60	Kong et al., 2002
		Vpara-R	gga gtt tcg agt tga tga ac			

ผลการวิจัย

1. การพัฒนาวิธี PCR และ Multiplex PCR

การสกัดโครโมโซมัลดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Vibrio* ทุกสายพันธุ์โดยใช้วิธีมาตรฐาน จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นและนำไปวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่ามีคุณภาพดีพอที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการทดลองเพิ่มขยายดีเอ็นของเชื้อ *Vibrio* ทั้งหมด 6 คู่ สามารถเพิ่มขยาย ดีเอ็นเอได้ผลผลิตที่จำเพาะ ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความจำเพาะของไพรเมอร์และขนาด PCR product

species	primers						product size (bp)
	VA-F+R	VC-1+2	VMH-2+3	VVh-F+R	VF-*toxR*-F+R	Vpara-F+R	
V. alginolyticus DMST 14800	+	-	-	-	-	-	737
V. cholerae O1 DMST 9700	-	+	-	-	-	-	563
V. cholerae non O1 DMST 2873	-	+	-	-	-	-	563
V. mimicus DMST 21244	-	-	+	-	-	-	390
V. vulnificus DMST 21245	-	-	-	+	-	-	276
V. fluvialis DMST 14801	-	-	-	-	+	-	217
V. parahaemolyticus DMST 21243	-	-	-	-	-	+	170
A. hydrophila DMST 2798	-	-	-	-	-	-	-
E. coli DMST 20970	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations :+, positive; -, negative

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* โดยวิธี PCR

ภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* แต่ละชนิด มีดังนี้

$MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 mM

dNTPs ความเข้มข้น 250 µM

Taq DNA polymerase 2.5 U

Primer ความเข้มข้นคู่ละ 1 µM

การทดสอบความไวของวิธี PCR

การทดสอบความไวของวิธี PCR ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* แต่ละชนิด ศึกษาโดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* มาทำการเจือจางให้มีปริมาณดีเอ็นเอใน PCR reaction mixture 50 µl มีลำดับดังนี้ 100 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng, 100 pg, 50 pg และ10 pg ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* ตามความเข้มข้นต่าง ๆ ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความไวของวิธี PCR ในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 สปีชีส์

species	ปริมาณดีเอ็นเอใน PCR reaction mixture 50 µl						
	100 ng	10 ng	5 ng	2.5 ng	100 pg	50 pg	10 pg
V. alginolyticus	+	+	+	+	+	+	-
V. cholerae O1	+	+	+	+	-	-	-
V. cholerae non O1	+	+	+	+	+	-	-
V. mimicus	+	+	+	+	+	+	-
V. vulnificus	+	+	+	+	+	+	-
V. fluvialis	+	+	+	+	+	+	-
V. parahaemolyticus	+	+	+	+	+	+	-

Abbreviations :+, positive; -, negative

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิดโดยวิธี multiplex PCR

ภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิด มีดังนี้

$MgCl_2$ ความเข้มข้น 3.0 mM

dNTPs ความเข้มข้น 250 µM

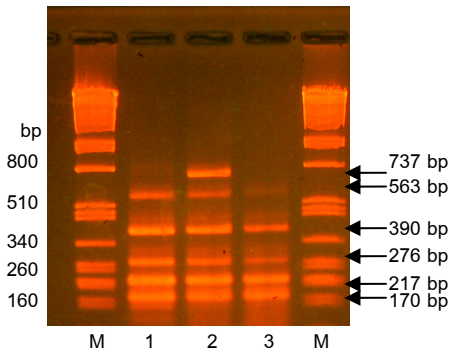
Taq DNA polymerase 1.5 U

ความเข้มข้นของ primer แต่ละคู่ดังนี้ VA-F+R 0.6 µM; VC-1+2 0.4 µM; VMH-2+3 0.4 µM; VVh-F+R 0.4 µM; VF-*toxR*-F+R 0.6 µM; Vpara-F+R 0.6 µM (รูปที่ 1)

อุณหภูมิ annealing คือ 50ºC (รูปที่ 2) โดยภาวะที่เหมาะสมนี้ให้ผลผลิตของ multiplex PCR มีผลที่ดี

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธี multiplex PCR โดยทำการทดลองในตัวอย่างอาหาร

พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิด ได้ในระดับ 10^8-10^9 CFU/g (รูปที่ 3)



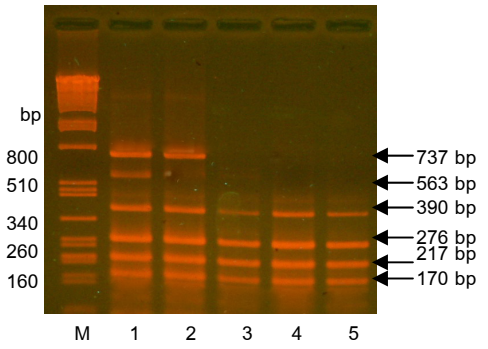
ภาพที่ 1 ผลผลิต multiplex PCR ของเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิดบน agarose gel 2% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide
ความเข้มข้นของ primers มีดังนี้

1) 0.4 µM ของแต่ละคู่

2) VA-F+R 0.6 µM; VC-1+2 0.4 µM; VMH-2+3 0.4 µM; VVh-F+R 0.4 µM; VF-*toxR*-F+R 0.6 µM; Vpara-F+R 0.6 µM

3) 1 µM ของแต่ละคู่

M) molecular mass markers λ DNA/*Pst*I



ภาพที่ 2 ผลผลิต multiplex PCR ของเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิดบน agarose gel 2% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide
โดยที่ 1) อุณหภูมิ annealing 50°C

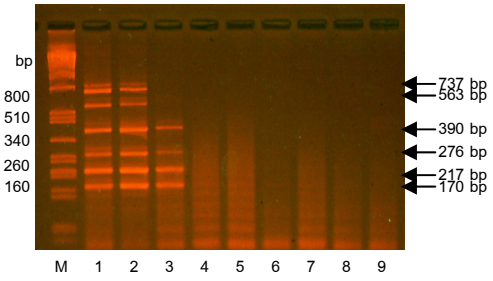
2) อุณหภูมิ annealing 55°C

3) อุณหภูมิ annealing 60°C

4) อุณหภูมิ annealing 62°C

5) อุณหภูมิ annealing 65°C

M) molecular mass markers λ DNA/*Pst*I



ภาพที่ 3 ความไวในการตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดของเชื้อ *Vibrio* แต่ละชนิด (6 ชนิด) ซึ่งเป็นผลผลิตของ multiplex PCR บน agarose gel 2% ที่ย้อมด้วย ethidium bromide
เจือจางดีเอ็นเอเป็นอนุกรมสิบเท่า โดยที่

1) 10^9 CFU/g 2) 10^8 CFU/g

3) 10^7 CFU/g 4) 10^6 CFU/g

5) 10^5 CFU/g 6) 10^4 CFU/g

7) 10^3 CFU/g 8) 10^2 CFU/g

9) 10 CFU/g M) molecular mass markers λ DNA/*Pst*I

2. การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Vibrio ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาหารทะเลสด

เก็บตัวอย่างอาหารทะเล 5 ชนิด ได้แก่ ปลาโอ ปลาจาระเม็ด หอยนางรม กุ้ง และหมึก จำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อทำการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ที่ก่อโรคใน

มนุษย์ ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis* และ *V. parahaemolyticus* โดยใช้วิธีมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR ผลการศึกษาพบว่า

การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธีมาตรฐาน (ตารางที่ 4, 5) มีดังนี้

ตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* 1 ตัวอย่าง

ตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* 1 ตัวอย่าง

ตรวจพบเชื้อ *V. fluvialis* 3 ตัวอย่าง

ตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* 10 ตัวอย่าง

ตรวจไม่พบเชื้อ *V. alginolyticus* และ *V. mimicus*

การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธี multiplex PCR (ตารางที่ 4, 5) มีดังนี้

ตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* 1 ตัวอย่าง

ตรวจพบเชื้อ *V. fluvialis* 4 ตัวอย่าง

ตรวจพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* 12 ตัวอย่าง

ตรวจไม่พบเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. mimicus* และ *V. cholerae*

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

อัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในอาหารตรวจโดยวิธีมาตรฐาน ผลการศึกษาพบเชื้อ *V. cholerae* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 เชื้อ *V. vulnificus* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 เชื้อ *V. fluvialis* 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 เชื้อ *V. parahaemolyticus* 10 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 33 ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 4

อัตราการปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในอาหารตรวจโดยวิธี multiplex PCR ผลการศึกษาพบเชื้อ *V. vulnificus* 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 เชื้อ *V. fluvialis* 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 13 เชื้อ *V. parahaemolyticus* 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 40 ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 4

ความแตกต่างของผลการตรวจพบเชื้อ *Vibrio* ระหว่างวิธีมาตรฐานกับวิธี multiplex PCR วิเคราะห์โดยใช้การทดสอบ Chi-square ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) พบว่าไม่แตกต่างกัน โดยค่าสถิติทดสอบ คือ χ^2 ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.881 df เท่ากับ 3 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า χ^2 จากตาราง (7.815)

ตารางที่ 4 จำนวนและร้อยละของเชื้อ *Vibrio* ที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหาร

species	วิธีมาตรฐาน		วิธี multiplex PCR	
	จำนวนตัวอย่างที่พบแบคทีเรีย	ร้อยละ	จำนวนตัวอย่างที่พบแบคทีเรีย	ร้อยละ
V. alginolyticus	-	-	-	-
V. cholerae	1	3	-	-
V. mimicus	-	-	-	-
V. vulnificus	1	3	1	3
V. fluvialis	3	10	4	13
V. parahaemolyticus	10	33	12	40

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างอาหารทะเล

ลำดับที่	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง/ตลาด	ชนิดอาหารทะเล	อุณหภูมิ (°C)	pH	จำนวนชนิดแบคทีเรียที่พบ		ชนิดแบคทีเรียที่พบ	
					วิธีมาตรฐาน	วิธี multiplex PCR	วิธีมาตรฐาน	วิธี multiplex PCR
1	ซูเปอร์มาร์เกต 1 กรุงเทพฯ	ปลาโอ	17	6.5	1	-	*V. cholerae*	-
2	ซูเปอร์มาร์เกต 1 กรุงเทพฯ	ปลาจาระเม็ด	16	7.0	-	-	-	-
3	ซูเปอร์มาร์เกต 1 กรุงเทพฯ	หอยนางรม	16	6.5	-	-	-	-
4	ซูเปอร์มาร์เกต 1 กรุงเทพฯ	กุ้ง	21	8	-	-	-	-
5	ซูเปอร์มาร์เกต 1 กรุงเทพฯ	หมึก	17	7	-	-	-	-
6	บางกะปิ	ปลาโอ	9	6.0	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
7	บางกะปิ	ปลาจาระเม็ด	8.5	7.5	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
8	บางกะปิ	หอยนางรม	9	6.5	1	1	*V. fluvialis*	*V. fluvialis*
9	บางกะปิ	กุ้ง	13	6.5	-	-	-	-
10	บางกะปิ	หมึก	12	7.0	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
11	อุทัยธานี	ปลาโอ	18	6.5	-	-	-	-
12	อุทัยธานี	ปลาจาระเม็ด	19	6.5	-	-	-	-
13	อุทัยธานี	หอยนางรม	16	6.5	-	-	-	-
14	อุทัยธานี	กุ้ง	18	7.5	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
15	อุทัยธานี	หมึก	17	7.0	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
16	ซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา	ปลาโอ	20	6.5	-	-	-	-
17	ซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา	ปลาจาระเม็ด	18	7.5	1	1	*V. fluvialis*	*V. fluvialis*
18	ซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา	หอยนางรม	16	6.0	-	-	-	-
19	ซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา	กุ้ง	16.5	8	2	2	*V. vulnificus* *V. parahaemolyticus*	*V. vulnificus* *V. parahaemolyticus*
20	ซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา	หมึก	19.5	7.5	-	-	-	-
21	ท่าน้ำนนท์	ปลาโอ	11	6.3	-	2	-	*V. fluvialis* *V. parahaemolyticus*
22	ท่าน้ำนนท์	ปลาจาระเม็ด	14	7.0	-	-	-	-
23	ท่าน้ำนนท์	หอยนางรม	8	6.0	-	-	-	-
24	ท่าน้ำนนท์	กุ้ง	17	8.0	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
25	ท่าน้ำนนท์	หมึก	15	7.0	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
26	ซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ	ปลาโอ	9.5	6.5	-	-	-	-
27	ซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ	ปลาจาระเม็ด	5.5	6.0	1	2	*V. fluvialis*	*V. fluvialis* *V. parahaemolyticus*
28	ซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ	หอยนางรม	6.5	6.0	-	-	-	-
29	ซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ	กุ้ง	15	8.0	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*
30	ซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ	หมึก	8.5	8.5	1	1	*V. parahaemolyticus*	*V. parahaemolyticus*

สรุปและวิจารณ์ผล

1. การพัฒนาวิธี PCR และ multiplex PCR

เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ทั้ง 2 แบบโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ต่อดีเอ็นเอต้นแบบผสม และใช้ไพรเมอร์ผสมต่อดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ชนิด ร่วมกับการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียชนิดอื่น 2 ชนิด คือ *A. hydrophila* DMST 2798 และ *E. coli* DMST 20970 พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ มีความจำเพาะสูง โดยไม่สามารถเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อชนิดอื่นได้

การหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขยายดีเอ็นเอของเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิด โดยใช้วิธี multiplex PCR โดยปรับพารามิเตอร์พบว่า ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 3 mM ปริมาณ *Taq* DNA polymerase 1.5 U ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้แต่ละคู่ VA-F+R 0.6 µM; VC-1+2 0.4 µM; VMH-2+3 0.4 µM; VVh-F+R 0.4 µM; VF-*tox*R-F+R 0.6 µM; Vpara-F+R 0.6 µM และอุณหภูมิ annealing 50 °C ทำให้ได้ผลผลิตของ multiplex PCR ที่ดี

การทดสอบความไวของวิธี multiplex PCR ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ทั้ง 6 ชนิด ในอาหาร พบว่าสามารถตรวจได้ในระดับ 10^8-10^9 CFU/g ซึ่งถือว่ายังมีความไวค่อนข้างต่ำ ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของ Pham et al. (2007) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ที่ก่อโรคในมนุษย์ 5 ชนิด จากตัวอย่างอุจจาระ ได้แก่ *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* โดยใช้วิธี multiplex PCR ในการศึกษาความไวพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อได้ในระดับ 10^5-10^6 CFU/ml หากเป็นเชื้อ *V. cholerae* จะสามารถตรวจได้ในระดับ 10^{10} CFU/ml ซึ่งถือว่ามีความไวค่อนข้างต่ำเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในตัวอย่างอาหารทะเลที่ใช้ทดสอบ มีสารเคมีบางอย่างปนเปื้อน ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase ในปฏิกิริยา หรืออาจเนื่องมาจากการสกัดดีเอ็นเอที่ยังมีข้อบกพร่อง จึงทำให้ได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอลดลง (Punkae et al., 2005) จึงควรมีการพัฒนาในด้านความไวของการตรวจต่อไป เพื่อให้เป็นวิธีที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

2. การตรวจหาเชื้อ Vibrio ในอาหารทะเล

จากการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลจำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ที่ก่อโรคในมนุษย์ 6 ชนิด ผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธีมาตรฐาน

ตรวจพบเชื้อ *Vibrio* 15 ไอโซเลต จากอาหาร 14 ตัวอย่าง โดยพบ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด 10 ไอโซเลต (ร้อยละ 33) ซึ่งพบจากปลาโอ ปลาจาระเม็ด และหมึกที่เก็บในตลาดบางกะปิ กุ้งและหมึกที่เก็บในตลาดอุทัยธานี กุ้งที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา กุ้งและหมึกที่เก็บในตลาดท่าน้ำนนท์ กุ้งและหมึกที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ รองลงมาคือ *V. fluvialis* 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 10) จากหอยนางรมที่เก็บในตลาดบางกะปิ ปลาจาระเม็ดที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา และปลาจาระเม็ดที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ *V. vulnificus* 1 ไอโซเลต(ร้อยละ 3) จากกุ้งที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา และ *V. cholerae* 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 3) จากปลาโอที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 1 กรุงเทพฯ ตรวจไม่พบ *V. alginolyticus* และ *V. mimicus*

การตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยวิธี multiplex PCR

ตรวจพบเชื้อ *Vibrio* จากอาหาร 14 ตัวอย่าง โดยพบ *V. parahaemolyticus* มากที่สุด 12 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40) ซึ่งพบจากปลาโอ ปลาจาระเม็ด และหมึกที่เก็บในตลาดบางกะปิ กุ้ง และหมึก ที่เก็บในตลาดอุทัยธานี กุ้งที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา ปลาโอ กุ้ง และหมึกที่เก็บในตลาดท่าน้ำนนท์ หอยนางรม กุ้งและหมึก ที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ รองลงมาคือ *V. fluvialis* พบใน 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ 13) จากหอยนางรม ที่เก็บในตลาดบางกะปิ ปลาจาระเม็ดที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา ปลาโอที่เก็บในตลาดท่าน้ำนนท์ และปลาจาระเม็ดที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 3 กรุงเทพฯ *V. vulnificus* ใน 1 ตัวอย่าง (ร้อยละ 3) จากกุ้งที่เก็บในซูเปอร์มาร์เกต 2 อยุธยา ตรวจไม่พบ *V. cholerae*, *V. alginolyticus* และ *V. mimicus* การปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio* ในตัวอย่างอาหารทะเล อาจมาจากคุณภาพน้ำที่สัตว์อาศัยอยู่ หรือเกิดจากขั้นตอนการขนส่ง วิธีการเก็บรักษา และสุขลักษณะที่ไม่ดีของผู้ขาย

ในการตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ในตัวอย่างอาหารทะเลโดยใช้วิธีมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธี multiplex PCR โดยวิธีมาตรฐานตรวจพบเชื้อ *V. cholerae* 1 ไอโซเลต *V. vulnificus* 1 ไอโซเลต *V. fluvialis* 3 ไอโซเลต และ *V. parahaemolyticus* 10 ไอโซเลต จากตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่าง ส่วนวิธี multiplex PCR ตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* 1 ตัวอย่าง *V. fluvialis* 4 ตัวอย่าง และ *V. parahaemolyticus* 12 ตัวอย่าง แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *V. cholerae* อาจเนื่องมาจากปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อมีปริมาณน้อยกว่า 10^8 cells ซึ่งเป็นปริมาณน้อยสุดที่วิธี multiplex PCR จะสามารถตรวจเชื้อ *V. cholerae* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในบางตัวอย่างวิธี multiplex PCR ยัง สามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่าวิธีมาตรฐาน อาจเนื่องจากในขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง การขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ และการเตรียมตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์อาจทำให้เชื้ออ่อนแอหรือตายได้ ดังนั้นเชื้อจึงไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (Wang et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับอรษา และคณะ (2544) ที่ได้ทำการทดลองตรวจหาเชื้อ *V. parahaemolyticus* จากตัวอย่างกุ้งแช่แข็งโดยวิธีเพาะเชื้อ เปรียบเทียบกับวิธี primary PCR พบว่าการใช้วิธี primary PCR ตรวจพบเชื้อมากกว่าวิธีเพาะเชื้อ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางสถิติ (α=0.05) พบว่า ทั้งสองวิธีให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นวิธี multiplex PCR สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาเชื้อ *Vibrio* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลซึ่งวิธีนี้ใช้เวลาน้อยกว่า (12-18 ชั่วโมง) มีความจำเพาะสูงและเชื่อถือได้

เอกสารอ้างอิง

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. คู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ “เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม” เล่มที่ 1. นครปฐม. โรงพิมพ์สาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา.

ศูนย์สารสนเทศการค้าระหว่างประเทศ. 2547. การส่งออกสินค้าอาหาร. กรมส่งเสริมการส่งออก. จาก http://www.depthai.go.th/th/dbcyber/dbimages/372 th.

อรษา สุตเธียรกุล, ศุภรวิทย์ พึ่งจิตต์ตน, คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร, กนกรัตน์ ศิริพานิชกร และเนตรนภิส ธีระวัลย์ชัย. 2544. การตรวจเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และยีนฮีโมไลซินอย่างรวดเร็วในตัวอย่างกุ้งแช่แข็งโดยวิธี nested PCR. กรุงเทพฯ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Angela, D. P., C. Giuseoooina, F. Maria, T. Valentina and T. Giuseppina. 2005. Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase-targeted multiplex PCR. J. Food Saf. 26: 150-159.

AOAC INTERNATIONAL. 2004. Bacteriological Analytical Manual Online (BAM) Chapter 9 *Vibrio*. Food and Drug Administration. Washington, D.C. Author.

Kong, R. Y. C., S. K. Y. Lee, T. W. F. Law, S. H. W. Law and R. S. S. Wu. 2002. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. Water Res. 36: 2802-2812

Mueen, A., H. Joseph and K. L. Smith. 2003. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin- producing *Escherichia coli, Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. Food Microbiol. 20: 345-350.

Pham, H. N., O. Kiyofumi, M. Jiro, S. S. Xiao and E. Takayuki. 2007. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 59: 271-275.

Punkae, M., A. Chaiprasert, J. Manonukol, S. Khemngern and N. Tingtoy. 2005. Detection and identification of *Mycobacterium* species by Polymerase Chain Reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections. J. Med. Assoc. Thai. 88(1): 108-113.

Rupa, C., C. Subhra, D. Keya, S. Sutapa, K. M. Asish and K. Jasmina. 2005. Cytotoxic and cell vacuolating activity of *Vibrio fluvialis* isolated from paediatric patients with diarrhea. J. Med. Microbiol. 54: 707-716.

Wang, H. Y. and G. H. Lee. 2003. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* in seawater by real-time quantitative TaqMan PCR. J. Microbiol. 41(4): 320-326

Wang, F. F., W. W. Cao and C. E. Cerniglia. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. J. Appl. Microbiol. 83: 727-736.

Zafar, S., M. Tamaki, S. Aki, T. Noriko, O. Keinosuke and M. Shinichi. 2007. Growth phase dependent activation of the precursor of *Vibrio mimicus* hemolysin (PRO-VMH). J. Health Sci. 53(4): 430-434.