

Thesis Title Prevalence and Molecular Characteristics of *Vibrio* Species in Pre Harvested Shrimps in North Western Province of Sri Lanka

Author Ms. Gonsal Koralage Madura Sanjeevani

Degree Master of Veterinary Public Health

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Thomas Alter Advisor (FU-Berlin)

Asst. Prof. Dr. Duangporn Pichpol Advisor (CMU)

ABSTRACT

The purposes of this study were to investigate the prevalence and molecular characteristics of *Vibrio* spp. in shrimp farms in Sri Lanka and to assess the risk factors for the prevalence of vibrios. A total of 170 shrimp samples from individual ponds were collected one week prior to harvest from the North Western province of Sri Lanka during November 2010 to March 2011. A questionnaire was administered to identify the risk factors. In addition, the pH and salinity was measured at the time of sampling. Samples were analyzed for *Vibrio* spp. by conventional method and multiplex polymerase chain reaction (mPCR). Results revealed the predominance of *V. parahaemolyticus* (91.2%) followed by *V. alginolyticus* (18.8%), *V. cholerae* non O1/non O139 (4.1%) and *V. vulnificus* (4.1%) in ponds. More than one *Vibrio* spp. was detected in 20.5% (35/170) ponds and 48.6% (17/35) of the shrimp samples contained *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. However, none of the *V. parahaemolyticus* isolates (n=419) were positive for the virulence-associated *tdh* (thermo stable direct haemolysin) and *trh* (TDH-related haemolysin) genes.

was confirmed by the presence of *ompW* gene and all isolates of *V. cholerae* (n=8) were negative for the cholera toxin (*ctxA*) gene. In addition, *V. cholerae* isolates were identified serogroup by mPCR method and serum agglutination test. Primers for VCO1 and VCO139 used in the mPCR for detect the serogroups. All *V. cholerae* strains belonged to *V. cholerae* non O1/non O139 serogroups. Farm production factors did not show significant influence on the prevalence of vibrios except for the *V. alginolyticus*. A younger age of shrimp (<110 days) was identified as a protective factor for the prevalence of *V. alginolyticus* (Odds ratio: 0.14, CI: 0.05-0.32). *V. vulnificus* and *V. cholerae* were found only in salinity less than 10 ppt. Furthermore, 13 isolates of *V. parahaemolyticus* were analysed by the Multilocus sequence typing (MLST) technique and compared with the strains of Asian and European countries and Baltic Sea. Unfortunately, more isolates should be included in this analysis to get the complete picture of molecular epidemiology. The findings of this study revealed the ubiquitous nature of vibrios and the absence of virulence genes in the environment and shrimps strains of *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* non O1/non O139.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความชุกและลักษณะในระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสโอโนกึ่ง
ก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิตแถบจังหวัดทางตะวันตกเฉียงเหนือของศรีลังกา

ผู้เขียน นางสาว กอนซาล โคราลาก มาคูรา ซานจีวานี

ปริญญา สัตวแพทยศาสตรมหาบัณฑิต

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร. โทมัส อัลเธอร์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก (FU-Berlin)

ผศ.สพ.ญ.ดร. ดวงพร พิษผล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก (CMU)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการหาความชุกและลักษณะทางอนุชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัสโอจากฟาร์มกึ่งในประเทศศรีลังกา และการประเมินปัจจัยเสี่ยงที่มีผลต่อความชุกของเชื้อไวรัสโอจำนวนตัวอย่างกึ่งทั้งหมด 170 ตัวอย่าง โดยเก็บจากบ่อเลี้ยงกึ่งบริเวณจังหวัดทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศศรีลังกาในช่วงหนึ่งสัปดาห์ก่อนการจับกึ่งเพื่อจำหน่าย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2554 และทำแบบสอบถามเพื่อระบุปัจจัยเสี่ยง นอกจากนี้ยังทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างและความเค็มของน้ำ ณ เวลาที่สุ่มตัวอย่าง การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาเชื้อไวรัสโอด้วยวิธีการเพาะเชื้อแบบดั้งเดิมและวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่แบบมัลติเพล็กซ์ โดยผลการตรวจแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่พบมากที่สุดที่บ่อเลี้ยงกึ่ง คือ เชื้อ *V. parahaemolyticus* พบร้อยละ 91.2 ตามด้วย *V. alginolyticus* พบร้อยละ 18.8 *V. cholerae* non O1/non O139 พบร้อยละ 4.1 และ *V. vulnificus* พบร้อยละ 4.1 และตรวจพบเชื้อไวรัสโอมากกว่าหนึ่งสปีชีส์ในบ่อเลี้ยงกึ่งคิดเป็นร้อยละ 20.5 (35/170) และพบเชื้อไวรัสโอในตัวอย่างกึ่งร้อยละ 48.6 (17/35) โดยเชื้อไวรัสโอที่พบในตัวอย่างกึ่งประกอบด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* และเชื้อ *V. alginolyticus* อย่างไรก็ตามเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่แยกได้จากเชื้อไวรัสโอทั้งหมด (n=419) ไม่พบ virulence-associated tdh (thermo stable direct haemolysin) และ trh (TDH-related haemolysin) genes เลย การตรวจยืนยันสปีชีส์ของเชื้อ *V. cholerae* โดยใช้ยีน *ompW* และตรวจหา cholera toxin โดยการตรวจหา cholera toxin (*ctxA*) gene ปรากฏว่าให้ผลลบทั้งหมด (n=8) นอกจากนี้ยังทำการตรวจยืนยันซีโรกรุ๊ปของเชื้อ *V. cholerae* ด้วยวิธี serum agglutination และวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่

ซึ่งควบคุมการสร้าง O-antigen ผลปรากฏว่าเชื้อ *V. cholerae* ที่แยกได้จากตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในซีโรกรุ๊ป non O1/non O139 ปัจจัยในการผลิตของฟาร์มไม่ได้มีผลกระทบต่อ การพบเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ยกเว้นเชื้อ *V. alginolyticus* กุ้งที่มีอายุน้อย (น้อยกว่า 110 วัน) พบว่ามีปัจจัยการป้องกันต่อการพบเชื้อ *V. alginolyticus* (Odd ratio: 0.14, CI: 0.05-0.32) การตรวจพบเชื้อ *V. vulnificus* และ *V. cholerae* เฉพาะในฟาร์มเลี้ยงกุ้งที่มีค่าความเค็มต่ำกว่า 10 ส่วนในล้านส่วน นอกจากนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. parahaemolyticus* จำนวนทั้งหมด 4 isolates ด้วยวิธี Multilocus sequence typing (MLST) technique และเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้จากประเทศและภูมิภาคอื่นๆ แต่การที่จะได้ภาพทางระบาดวิทยา ด้านโมเลกุลที่สมบูรณ์นั้นจำเป็นต้องมีจำนวนของเชื้อที่มากพอในการวิเคราะห์ ดังนั้นโดยสรุปของการศึกษานี้พบเพียงเชื้อไวรัสที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและไม่พบ virulence genes จากทั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่ตรวจพบในตัวอย่างสิ่งแวดลอมและกุ้ง