

การตรวจเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน จากเนื้อไก่ด้วยวิธี
ลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชันแบบวัดค่าสี
ในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี

DETECTION OF CAMPYLOBACTER JEJUNI USING COLORIMETRIC
OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION FOR CHICKEN
MEAT IN MUANG DISTRICT CHANTHABURI PROVINCE

เดือนเต็ม ทองเพือก^{1*} ปรัชญา เกลียวฉลาด¹ และ วัชรวิ วัชรชัยกุล²

Dueantem Thongphueak^{1*}, Pratya Chaliewchalad¹ and Watcharee Waratchareeyakul²

¹สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

²สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

¹Microbiology Program, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

²Chemistry Program, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

* corresponding author e-mail: dueantem.t@rbru.ac.th

(Received: 20 October 2020; Revised: 18 February 2021; Accepted: 17 March 2021)

บทคัดย่อ

การศึกษานานวิสัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ด้วยเทคนิค
ลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน (แลมป์) แบบวัดค่าสี เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดย
เก็บตัวอย่างเนื้อไก่จากตลาดสดในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย จำนวน 30 ตัวอย่าง
พบว่า ในตัวอย่างเนื้อไก่ 13 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน และตัวอย่าง
เนื้อไก่ 17 ตัวอย่าง ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน จากการตรวจสอบค่าความไว
ของปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ พบว่า ให้ผลการตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุดที่ 364 เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร
จากการตรวจสอบค่าความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ พบว่า มีความจำเพาะ
ต่อดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบไม่จับกับเชื้อแบคทีเรียก่อ
โรคในระบบทางเดินอาหารชนิดอื่น จากการเปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ
กับวิธีการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิคลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน
แบบวัดค่าสี พบว่า ทั้ง 2 วิธี มีค่าความไว ความจำเพาะและความแม่นยำ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์
ชุดทดสอบที่ได้รับการพัฒนาจึงสามารถใช้งานได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และแม่นยำในการตรวจ

วิเคราะห์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อในภาคสนามได้ ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก

คำสำคัญ: แคมไพโลแบคเตอร์ ลูปเมดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิเคชัน แบบวัดค่าสี

Abstract

The objectives of this research were detecting the *Campylobacter jejuni* using colorimetric of loop-mediated Isothermal amplification (LAMP) compared with the standard method. Thirty chicken samples were collected from markets in Muang district, Chanthaburi province, Thailand. The results showed 13 samples of chicken meat were contaminated with *C. jejuni*. However, 17 samples were not found the contamination of *C. jejuni* and the lowest sensitivity of DNA detection was 364 fg μL^{-1} . The detection of specificity for other bacteria was found that the primers did not show any cross-reactivity with other pathogenic bacteria. The standard method was compared with the LAMP DNA method, it was shown that both methods had the sensitivity, specificity and 100 percent accuracy. The detection kit has been developed for easy to use, comfortable, rapid and accuracy in the diagnosis of *C. jejuni*. Moreover, this test kit can be used for detection in the field for surveillance of *Campylobacter* spp. in poultry products.

Keywords: *Campylobacter* spp., Loop-mediated isothermal amplification, Colorimetric

บทนำ

เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ (*Campylobacter* spp.) เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ทั่วโลก (Hiroshi et al., 2014) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะเชื้อเป็นรูปท่อนหรือโค้งงอคล้ายปีกนก เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลา ลักษณะการเคลื่อนที่คล้ายเกลียวสว่าน (Friedrich et al., 2017) สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นของออกซิเจนประมาณ 5% ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 24–48 ชั่วโมง และเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Silva et al., 2011) การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ (*Campylobacter jejuni*) โดยการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) การทดสอบการลดออกซิเจนของไนเตรต (Nitrate reduction test) และการทดสอบฮิปพูเรตไฮโดรไลซิส (Hippurate hydrolysis

test) จะให้ผลบวก การทดสอบเอนไซม์ยูรีเอส (Urease test) จะให้ผลลบ เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน (*C. jejuni*) และแคมไพโลแบคเตอร์ คอไล (*Campylobacter coli*) พบได้ทั่วไปในสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และนก (Kaakoush et al., 2015; Silva et al., 2011) สายพันธุ์ที่ก่อโรคที่สำคัญ คือ แคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน และแคมไพโลแบคเตอร์ คอไล ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค Campylobacteriosis (Lawson et al., 1999) และโรคลำไส้อักเสบ (Gastrointestinal illness) ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ อาการของโรคส่วนใหญ่มีอาการคล้ายกับโรคท้องร่วงทั่วไป คือ อาการท้องเสีย ปวดท้อง มีไข้ คลื่นไส้ และอาเจียน เป็นต้น ความรุนแรงของโรคในคนไข้แต่ละคนอาจไม่เท่ากัน บางคนมีอาการเล็กน้อยสามารถหายได้เอง บางคนมีอาการรุนแรงของ Guillain-Barré syndrome หรืออาจมีอาการอัมพาตร่วมด้วย (Szczepanska et al., 2017) เชื้อแคมไพโรแบคเตอร์ เจจูไน ที่ตรวจพบส่วนใหญ่ คือ ต่อยาปฏิชีวนะ เช่น Fluoroquinolones ciprofloxacin และ Tetracycline (Szczepanska et al., 2017)

การตรวจวิเคราะห์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์สามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการและเทคนิคทางดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ (DNA biosensor) ซึ่งปัจจุบันเทคนิคนี้ได้รับความนิยมอย่างมาก การวิจัยและพัฒนาในด้านไบโอเซนเซอร์มีความสำคัญมากขึ้น (Hajjhosseini et al., 2016) เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบทางชีวภาพในการวิเคราะห์อาหาร สิ่งแวดล้อม และการวินิจฉัยโรคในมนุษย์ เป็นต้น (Romero et al., 2016) วิธีลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน หรือแลมพี (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP) เป็นเทคนิคทางดีเอ็นเอไบโอเซนเซอร์ที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อในปัจจุบัน (Sabike et al., 2016) เทคนิคลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายภายใต้อุณหภูมิคงที่ในช่วง 60–65 องศาเซลเซียส สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อได้อย่างรวดเร็ว ใช้งานได้ง่าย ด้วยเครื่องมือราคาไม่แพง มีความไวและความจำเพาะสูง (Quyen et al., 2019) สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยใช้เทคนิคการย้อมสีดีเอ็นเอ (Xie et al., 2014)

เนื่องจากเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เป็นเชื้อที่ต้องการสถานะในการเจริญเติบโตอย่างมีข้อจำกัด มีการเจริญเติบโตช้าและต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อและใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์เชื้อในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิธีลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี เพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ด้วยยีน 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน เทคนิคลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี อาศัยปฏิกิริยาของสี Hydroxynaphthol blue; HNB ที่เป็นตัวบ่งชี้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ในปฏิกิริยาของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยตาเปล่า (Kaygusuz

et al., 2019) วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ และราคาไม่แพง (Pham et al., 2015)

ดังนั้นในการศึกษางานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ที่ปนเปื้อนจากเนื้อไก่ ในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ด้วยเทคนิคลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน ที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อโดยใช้อุณหภูมิเดียวในการตรวจสอบเชื้อ ซึ่งสามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว แม้มีเชื้อในปริมาณน้อย เพื่อนำมาใช้ประโยชน์สำหรับเฝ้าระวัง และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ในผู้บริโภคเนื้อไก่ หรือใช้ในการตรวจสอบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาในด้านการระบาดของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ได้อีกแนวทางหนึ่ง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือและสารเคมี

เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ECLIPSE E 200 บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Centrifuge) รุ่น Legend Mach 1.6 R บริษัท Thermo Scientetific ประเทศสหรัฐอเมริกา ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท Bosstech เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler) รุ่น T100 Thermal Cycler บริษัท Bio RAD เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) รุ่น MINIE-135 บริษัท Miulab ประเทศจีน

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ Campylobacter Enrichment Broth Base บริษัท HiMedia Laboratories ประเทศอินเดีย Bovine Serum Albumin (BSA) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศอังกฤษ ไพโรเมอร์บริษัท Bio Basic Inc ประเทศแคนาดา Betaine บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา Bst2 DNA polymerase บริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา

2. การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2.1 สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อไก่จากตลาดสด 5 แห่งๆ ละ 6 ตัวอย่าง ในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง

2.2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างเนื้อไก่มาหั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก 25 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Campylobacter Enrichment Broth Base 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะ Microaerophilic จากนั้นนำสารละลายของเชื้อมาหยดบนกระดาษกรองบนอาหาร Bovine Serum Albumin (BSA) 4–8 หยด ตั้งทิ้งไว้ 20–30 นาที นำกระดาษกรองออกแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะ Microaerophilic แล้วตรวจยืนยันเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การย้อมสีแบบแกรม การทดสอบ Catalase test Nitrate reduction test Hippurate test และ Urease test

3. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการต้ม

นำเชื้อบริสุทธิ์ใส่ลงใน Sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.001% 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส จากนั้นเติม SDS 0.001% ลงไป 1 มิลลิลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Mohran et al., 1998)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชันแบบวัดค่าสี

4.1 ปฏิกริยาลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี (ปริมาตร 25 ไมโครลิตร) 10 pmol primer F3, B3, F, B, FIP และ BIF (Bio Basic Inc.) ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs ปริมาตร 4 ไมโครลิตร 5 M Betaine (Sigma–Aldrich) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร 10X ThermoPol reaction buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร $MgSO_4$ 0.6 ไมโครลิตร 5 U *Bst2* DNA polymerase (New England Biolabs) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Hydroxynaphthol blue (HNB) 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 9.4 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอแม่แบบ 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Dry block heating thermostat (Thermo block TDB–120. Biosan) ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

4.2 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี hydroxynaphthol blue (ผลของปฏิกริยาลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีม่วงเป็นสีน้ำเงินให้ผลเป็นบวก หากไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีให้ผลเป็นลบ

4.3 ตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยวิธี Gel electrophoresis ใน 2% agarose gel

5. การทดสอบความไว (Sensitivity)

ทดสอบความไวของปฏิกริยาลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน โดยนำดีเอ็นเอมาเจือจางแบบลำดับส่วน 10 เท่า (10 Fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^0 – 10^{-9} จากปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเท่ากับ 36.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue และนำไปตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis

6. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

ทดสอบความจำเพาะ เชื้อทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (ประสานมิตร) โดยสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทดสอบ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* *Salmonella typhi* *Listeria monocytogenes* *Pseudomonas aeruginosa* *Bacillus megaterium*

Staphylococcus aureus *Enterobacter aerogenes* *Klebsiella oxytoca* *Serratia marcescens* และ *Citrobacter diversus* จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีลูบมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue และตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

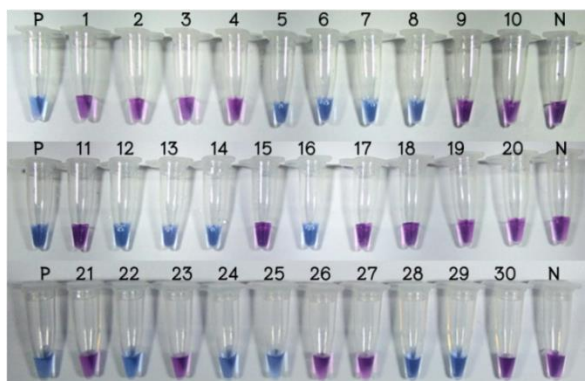
จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน จำนวน 13 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน ที่ตรวจพบสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การย้อมสีแบบแกรมพบว่าเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน การทดสอบทางชีวเคมี คือ Catalase test Nitrate test และ Hippurate test เป็นบวก และผลการทดสอบ Urease test เป็นลบ

2. การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการต้ม

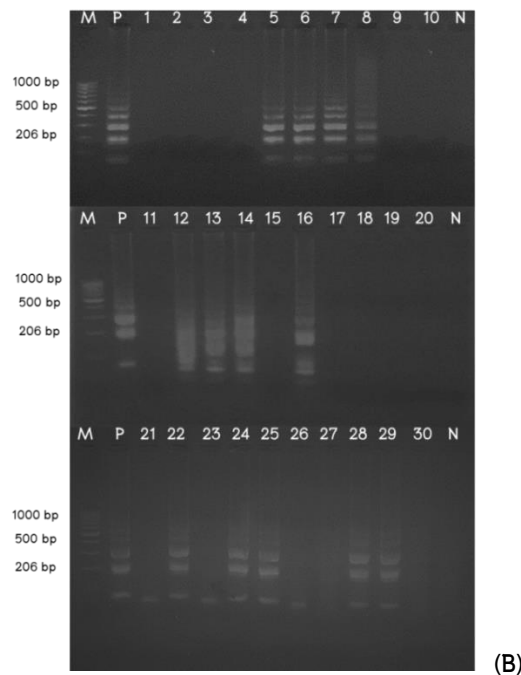
การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ได้ปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 36.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีลูบมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชันแบบวัดค่าสี

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ด้วยวิธีลูบมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี และตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis จากตัวอย่าง 30 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 13 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 17 ตัวอย่าง ดังภาพที่ 1



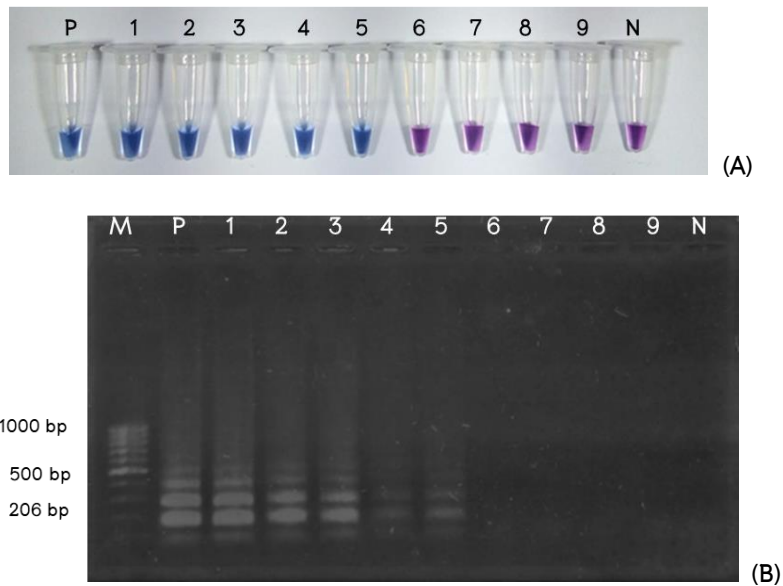
(A)



ภาพที่ 1 (A) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี 30 ตัวอย่าง (B) การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis P: positive control M: 100 bp DNA ladder 1-30 : ตัวอย่าง และ N: negative control

4. การทดสอบความไว (Sensitivity)

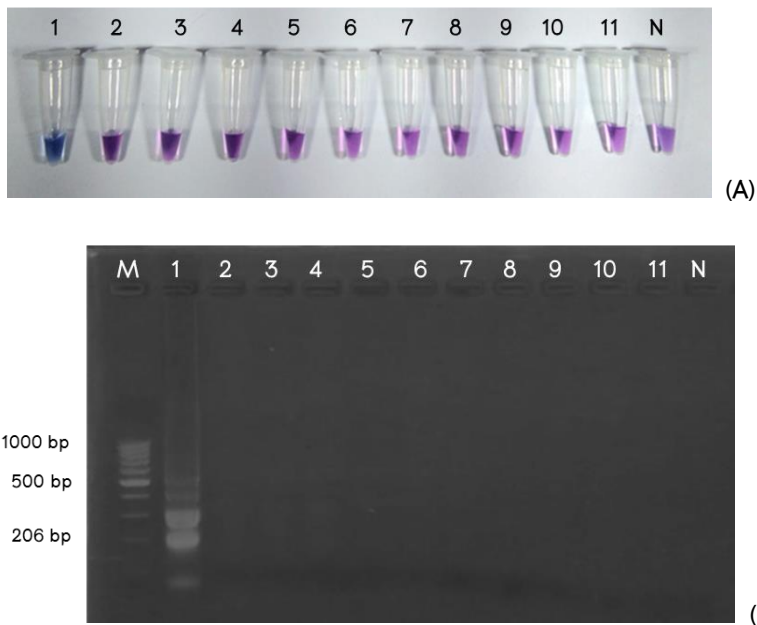
การทดสอบความไวของปฏิกิริยาลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี โดยวิธีการเจือจางแบบลำดับส่วน (10 fold serial dilution) $10^0 - 10^{-9}$ ใช้ปริมาณ ดีเอ็นเอตั้งต้นเท่ากับ 36.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าค่าความไวในการตรวจวิเคราะห์ คือ 364 เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 (A) การทดสอบค่าความไวด้วยเทคนิคลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิเคชันแบบวัดค่าสี (B) ตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis P: positive control M: 100 bp DNA ladder 1: 36.4 ng/ μ l 2: 3.64 ng/ μ l 3: 364 pg/ μ l 4: 36.4 pg/ μ l 5: 3.64 pg/ μ l, 6: 364 fg/ μ l, 7: 36.4 fg/ μ l, 8: 3.64 fg/ μ l, 9: 364 ag/ μ l และ N: negative control

5. การทดสอบความจำเพาะ (Specificity)

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ 10 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบด้วยเทคนิคลูปมีติเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิเคชันแบบวัดค่าสี และตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis พบว่า การทดสอบความจำเพาะเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ และไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอของเชื้อชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 (A) การทดสอบความจำเพาะด้วยเทคนิคลูปมีติเอเตด ไฮโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชันแบบวัดค่าสี (B) ตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis M: 100 bp DNA ladder 1: *Campylobacter jejuni* 2: *Escherichia coli* 3: *Salmonella typhi* 4: *Listeria monocytogenes* 5: *Pseudomonas aeruginosa* 6: *Bacillus megaterium* 7: *Staphylococcus aureus* 8: *Enterobacter aerogenes* 9: *Klebsiella oxytoca* 10: *Serratia marcescens* 11: *Citrobacter diversus* และ N: negative control

อภิปรายผล

เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียง 3 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเจริญ 24–48 ชั่วโมง จึงเพาะเลี้ยงได้ยากในห้องปฏิบัติการ การเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการใช้เวลานาน 3 ถึง 4 วัน จึงจะทราบผล การศึกษานี้เป็นการนำเทคนิคลูปมีติเอเตด ไฮโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชันแบบวัดค่าสี มาตรวจวิเคราะห์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ซึ่งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้ดีและรวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Yamazaki et al., 2009) โดยสามารถตรวจหาเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ได้จากปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อเพียงเล็กน้อย มีความแม่นยำสูง สะดวก รวดเร็ว สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์เพียง 1 ชั่วโมง 30 นาที (Yamazaki, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamazaki et al. (2009) ที่ศึกษาการเปรียบเทียบการตรวจเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ระหว่างเทคนิคลูปมีติเอเตด ไฮโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน

และวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบว่า การคัดแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในเนื้อไก่ ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ จากตัวอย่าง 144 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ 68 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 76 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์เชื้อโดยใช้เวลาไม่เกิน 90 นาที จากจุดเริ่มต้นของการสกัดดีเอ็นเอไปจนถึงขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งให้ผลในการตรวจได้อย่างรวดเร็ว (Yamazaki et al., 2009) การศึกษาเปรียบเทียบวิธีมาตรฐานกับเทคนิคลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี พบว่าทั้ง 2 วิธี มีความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yamazaki et al. (2009) ที่เปรียบเทียบการตรวจวิเคราะห์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน และแคมไพโลแบคเตอร์ คอไร ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการกับวิธีลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน พบว่า ความไวและความจำเพาะ เท่ากับ 98.5% และ 97.4% ตามลำดับ ทั้งนี้เทคนิคลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชันให้ผลในการตรวจเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน ได้รวดเร็วกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ความถูกต้องแม่นยำเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าความแม่นยำเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสามารถของเครื่องมือวัดว่าเครื่องมือที่ใช้มีความถูกต้องมีความเที่ยงตรงและให้ผลที่เป็นจริงอย่างดี ปฏิกริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อมีขั้นตอนการทำงานของปฏิกริยาเพียงอุณหภูมิเดียว คือ 63 องศาเซลเซียส โดยใช้ *Bst2* DNA polymerase ซึ่งเป็นองค์ประกอบในปฏิกริยาที่มีคุณสมบัติในการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวได้ (Strand displacement) ด้วยเครื่อง Dry block heating thermostat และใช้ไพรเมอร์ 6 ไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีนเป้าหมาย จึงสะดวกและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถดูผลของการตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยตาเปล่า โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี Hydroxynaphthol blue เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อในภาคสนามได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะและราคาแพง จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน จากเนื้อไก่ในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี เป็นการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน ในเนื้อไก่ เพื่อเฝ้าระวังและป้องกันการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารเพื่อสุขอนามัยที่ดีของผู้บริโภค

สรุปผลการวิจัย

จากการตรวจเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน จากเนื้อไก่ในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ด้วยวิธีลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี เปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบว่า ทั้งสองวิธีสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน ได้จำนวน 13 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูโน จำนวน 17 ตัวอย่าง จากจำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง แต่วิธีลูปมีดิเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อได้รวดเร็ว ภายในระยะเวลา 90 นาที การทดสอบความไว พบว่าปริมาณ

ดีเอ็นเอของเชื้อที่ตรวจวิเคราะห์ได้ต่ำสุด คือ 364 เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร การทดสอบความจำเพาะพบว่า โพรเมอร์ที่ใช้ตรวจวิเคราะห์มีความจำเพาะต่อเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน และไม่เกิดการจับกับดีเอ็นเอของเชื้อชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบ การคำนวณหาค่าความไว ความจำเพาะ และความถูกต้องแม่นยำ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการทดสอบ พบว่า ทั้ง 2 วิธี มีค่าความไว ความจำเพาะและความถูกต้องแม่นยำ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ ข้อดีของเทคนิคลูบมีดีเอเตด ไอโซเทอร์มอล แอมพลิฟิเคชัน แบบวัดค่าสี คือ เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจหาเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไน ได้อย่างรวดเร็วและใช้งานได้ง่ายซึ่งอาจช่วยในการเฝ้าระวังและควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในเนื้อไก่ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

เอกสารอ้างอิง

- Firdich, E., Biboy, J., Huynh, S., Parker, C.T., Vollmer, W., & Gaynor, E.C. (2017). Morphology heterogeneity within a *Campylobacter jejuni* helical population: the use of calcofluor white to generate rod-shaped *C. jejuni* 81–176 clones and the genetic determinants responsible for differences in morphology within 11168 strains. **Mol Microbiol**, 104(6), 948–971.
- Hajihosseini, S., Nasirizadeh, N., Hejazi, M.S., & Yaghmaei, P. (2016). A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles and graphene oxide on a glassy carbon electrode. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 61, 506–515.
- Hiroshi Ushijima, S.N., Thongprachum, A., Shimizu-Onda, Y., Tran, D.N., Pham, N.T.K., Takanashi, S., Dey, S.K., Okitsu S., Yamazaki, W., Mizuguchi, M., & Hayakawa, S. (2014). Sensitive and rapid detection of campylobacter species from stools of children with diarrhea in Japan by the loop-mediated isothermal amplification method. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, 67(5), 374–378.
- Kaakoush, N.O., Castano-Rodriguez, N., Mitchell, H.M., & Man, S.M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. **Clin Microbiol Rev**, 28(3), 687–720.
- Kaygusuz, D., Vural, S., Aytekin, A.O., Lucas, S.J., & Elitas, M. (2019). DaimonDNA: A portable, low-cost loop-mediated isothermal amplification platform for naked-eye detection of genetically modified organisms in resource-limited settings. **Biosens Bioelectron**, 141, 111409.
- Lawson, A.J., Logan, J.M., O'Neill G.L., Desai, M., & Stanley, J. (1999). Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol**, 37(12), 3860–3864.

- Mohran, Z.S., Arthur, R.R., Oyofo, B.A., Peruski, L.F., Wasfy, M.O., Ismail, T.F., & Murphy, J.R. (1998). Differentiation of *Campylobacter* isolates on the basis of sensitivity to boiling in water as measured by PCR-detectable DNA. **Appl Environ Microbiol**, **64**(1), 363–365.
- Pham, N.T., Trinh, Q.D., Khamrin, P., Ukarapol, N., Kongsricharoern, T., Yamazaki, W., Komine–Aizawa, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Hayakawa, S., & Ushijima, H. (2015). Loop–Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Thai Children with Diarrhea. **Jpn J Infect Dis**, **68**(5), 432–433.
- Quyen, T.L., Nordentoft, S., Vinayaka, A.C., Ngo, T.A., Engelsmenn, P., Sun, Y., Madsen, M., Bang, D.D., & Wolff, A. (2019). A Sensitive, Specific and Simple Loop Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of *Campylobacter* spp. in Broiler Production. **Front Microbiol**, **10**, 2443.
- Romero, M.R., D'Agostino, M., Arias, A.P., Robles, S., Casado, C.F., Iturbe, L.O., Lerma, O.G., Andreou, M., & Cook, N. (2016). An immunomagnetic separation/loop–mediated isothermal amplification method for rapid direct detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. during poultry production. **J Appl Microbiol**, **120**(2), 469–477.
- Sabike, Il., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, S., Okabayashi, T., Goto Y., & Yamazaki, W. (2016). Use of Direct LAMP Screening of Broiler Fecal Samples for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in the Positive Flock Identification Strategy. **Front Microbiol**, **7**, 1582.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A., & Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. **Front Microbiol**, **2**, 200.
- Szczepanska, B., Andrzejewska, M., Spica, D., & Klawe, J.J. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. **BMC Microbiol**, **17**(1), 80.
- Xie, L., Xie, Z., Zhao, G., Liu, J., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z., Fan, Q., & Luo, S. (2014). A loop–mediated isothermal amplification assay for the visual detection of duck circovirus. **Virology**, **11**, 76.
- Yamazaki, W. (2013). Sensitive and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using loop–mediated isothermal amplification. **Methods Mol Biol**, **943**, 267–277.
- Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., & Misawa, N. (2009). Comparison of loop–mediated isothermal amplification assay and conventional culture methods for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in naturally contaminated chicken meat samples. **Appl Environ Microbiol**, **75**(6), 1597–1603.