บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวของ

2.1 แคมไพโลแบคเตอร์ (Campylobacter)

แคมไพโลแบคเตอร์เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างโค้งหรือเป็นเกลียว $piral shape) ขนาดกว้างประมาณ 0.2-0.9 ไมโครเมตรและยาวประมาณ 0.5-5.0 ไมโครเมตร แต่เมื่อแบคทีเรียมีอายุมากขึ้นหรือสัมผัสกับอออกซิเจนในอากาศเป็นเวลานานจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแบบทรงกลม (Coccus) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อการอยู่รอดหรือเซลล์มีการเสื่อมไป แคมไพโลแบคเตอร์ไม่สร้างสปอร์ มี รยางค์คล้ายขนยืนออกมานอกเซลล์ (Flagellum)ที่ปลายด้านหนึ่งหรือทั้ง 2 ด้านของเซลล์ทำให้มี ความสามารถ เคลื่อนไหวได้ (Motile) อุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดีอยู่ระหว่าง 37-42องศาเซลเซีย ส เนื่องจากแคม ไพโลแบคเตอร์เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Mesophilicหรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยMicroaerophilic)

การจัดจำแนก*Campylobacter*ตามหลักอนุกรมวิธานจัดจำแนกได้ดังนี้

Domain	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Epsilonproteobacteria
Order	Campylobacterales
Family	Campylobacteraceae
Genus	*Campylobacter*

แคมไพโลแบคเตอร์เป็นแบคทีเรียใน Family Campylobacteraceaeและชนิดที่สำคัญที่ก่อโรคในคนส่วนใหญ่คือ *C.jejuni*และ *C. coli*สร้างพลังงานโดยอาศัย tricarboxylic acid (TCA) cycle และ electron transpot system (ETS) แต่เนื่องจากไม่มี superoxide dismutase ที่ทำหน้าที่ใน superxide radical แต่มี catalase ในการทำลาย hydrogen peroxide (H_2O_2) ดังนั้นแคมไพโลแบคเตอร์ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ในคนจึงเป็นชนิดที่ทนต่อออกซิเจนได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ลักษณะโคโลนีของ*Campylobacter* spp. คือ โคโลนีกลมนูนสีขาวครีม ขอบเรียบ แวววาว มีขนาดเล็กมากจนถึงปานกลางส่วนอีกลักษณะหนึ่งที่พบคือโคโลนี จะมีลักษณะแบนสีเทาหรือไม่มีสี เนื้อละเอียด โปร่งแสง ขอบไม่เรียบ ไม่แยกเป็นโคโลนี (จริยา สินเดิมสุข และสุวณีสุภเวชย์ , 2543) เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นการเคลื่อนที่เร็วเป็นเกลียวสว่าน (corkscrew-like motion) ลักษณะเซลล์คล้ายปีกนก หรืออาจมีรูปร่างเป็นตัวเอสบางครั้งอาจต่อกันเป็นสายยาวและยังพบว่าเชื้ อมีความไวต่อความร้อนและถูกทำลายด้วยอุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 55-60องศาเซลเซียส เชื้อจะถูกทำลายภายใน 0.21-2.5 นาที (ประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช, 2554)

ระบาดวิทยา(Epidemiology)หรือการระบาด

การระบาดจากแคมไพโลแบคเตอร์สามารถติดต่อสู่คนได้โดยตรง คือ การสัมผัสกับสัตว์หรือซากสัตว์ที่มีเชื้ออยู่พบได้ทั่วไปในทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง เช่น วัว ควายแกะ แพะ หมู ไก่ เป็ด ห่าน นก แมว สุนัข และในสัตว์ป่า รวมถึงหนู และสัตว์น้ำเค็ม จะพบมากในระบบทางเดินอาหารของไก่และวัว โดยแบคทีเรียนี้จะอาศัยอยู่ในลำไส้ และถูกขับถ่ายออกมาพร้อมอุจจาระ และปนเปื้อนออกมา ในสิ่งแวดล้อมการติดต่อทางอ้อมคือ การบริโภคอาหารหรือน้ำที่มีเชื้ออยู่ การที่คนจะเกิดโรคจากเชื้อ *C.jajuni*จะเกิดขึ้นได้โดยการบริโภคเนื้อไก่หรือผลิตภัณฑ์จากไก่ในขณะที่เนื้อสุกรจะเกิดจาก *C.coli*ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากแคมไพโลแบคเตอร์ในประเทศไทยพบได้ในคนทุกอายุ แต่กลุ่มที่พบมากที่สุดคือ กลุ่มเด็กอายุไม่เกิน 5 ปี ในอดีตตรวจพบเชื้อในเด็กร้อยละ 10-15 แต่ในช่วงระยะหลังแนวโน้มของการตรวจพบแคมไพโลแบคเตอร์ในเด็กสูงมากขึ้นเป็น2 เท่าหรือประมาณร้อยละ30

อาการ(Clinical symptoms)

อาการของโรคแคมไพโลแบคเทอริโอซิส (Campylobacteriosis)หรือโรคลำไส้อักเสบคือมีอาการคล้ายกับกลุ่มแบคทีเรียลำไส้อื่นๆ โดยมีอาการปวดท้อง ถ่ายเหลวและมักมีมูกเลือดปน ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน โดยทั่วไปผู้ป่วยมักจะแสดงอาการหลังจากได้รับเชื้อภายในระยะเวลา 2-5 วันอาการป่วยที่เกิดขึ้นจะคงอยู่ประมาณ 2-3 วันและสามารถหายได้เองหากไม่รุนแรงหรือมีอาการป่วยนานหลายสัปดาห์ผู้ป่วยควรได้รับการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ โดยทั่วไปยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการรักษาโดยเฉพาะในรายที่มีอาการรุนแรงจะเป็นยาในกลุ่ม Macrolides เช่น Erythromycin และยาในกลุ่ม Fluoroquinolonesเช่น Ciprofloxacin(ศุภชัย เนื้อนวลสุวรรณ ,2549)

การป้องกัน

การป้องกันหรือลดการปนเปื้อนของตัวสัตว์ก่อนการฆ่าและการจัดการขั้นต้นควรมีการจัดการตั้งแต่ขั้นตอนการจัดส่ง การชำแหละรวมไปถึงการเก็บรักษาและการปรุงอาหารควรปรุงให้สุกก่อนรับประทานในส่วนของการจัดส่งเมื่อสัตว์ถูกขนส่งออกจากฟาร์มสัตว์ปีกมักจะถูกขนส่งและบรรจุในกรงซึ่งกรงที่ไม่ได้รับการทำความสะอาดจะเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญโดยสัตว์ปีกจะมีการกระพือปีก และมีมูลสัตว์ที่ตกค้างดังนั้นกรงและรถบรรทุกจึงเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคหลายชนิด เนื่องจากไม่ได้มีการทำความสะอาดและใช้ซ้ำ ดังนั้นจึงควรมีการทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอ โดยอาจใช้น้ำผสมสารทำความสะอาด (Cleaning agent) ชำระล้างสิ่งสกปรก เช่น ขนไก่หรือ ฝุ่นผงออกก่อนแล้วจึงแช่ใน สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้น 1 ,000 ppm ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาทีเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งรวมไปถึงการชำแหละที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน เนื่องจากการฆ่าสัตว์ที่ต้องมีการชำแหละเอาส่วนเครื่องในและลำไส้ออกจากสัตว์ กระบวนการนี้ทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในออกมาปนเปื้อนกับเนื้อสัตว์และสิ่งแวดล้อม การชำแหละแล้วเอาเครื่องในออกจัดเป็นขั้นตอนวิกฤตสำหรับการผลิตเนื้อทุกชนิด เนื่องจากเมื่อผ่าตัวสัตว์จะเป็นการเปิดช่องท้องและลำไส้ซึ่งมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ทำให้จุลินทรีย์ปะปนมากับเนื้อสัตว์วิธีการลนไฟเพื่อถอนขน (Singering) จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ได้อย่างมาก และยังมีวิธีการทำความสะอาดและลดการปนเปื้อนสำหรับเนื้อสัตว์หลังการฆ่าหลายวิธี เช่น การล้างด้วยน้ำเย็น น้ำร้อน

การใช้ไอน้ำ การใช้โอโซน หรือผสมน้ำล้างด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ เช่น กรดอินทรีย์ คลอรีน เป็นต้นหรืออาจใช้หลายวิธีร่วมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ เช่น การใช้คลอรีนผสมในน้ำทำเย็นสำห รับสัตว์ปีกและเนื้อสัตว์เพื่อทำลายจุลินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในหลายประเทศ ยกเว้น ประเทศในกลุ่ม สหภาพยุโรป(EU) ซึ่งปริมาณคลอรีนที่อนุญาตให้ใช้ห้ามเกิน 50ppm ซึ่งสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ได้ (เทวิน แสวงสินและคณะ, 2552)

2.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสPolymerase Chain Reaction (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสPolymerase Chain Reaction (PCR) คือปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่ม ปริมาณของดีเอ็นเอชนิดใดชนิดหนึ่งในหลอดทดลองซึ่งในปัจจุบันมีเครื่องสำหรับเทคนิค PCR เรียกว่า Thermal cycler ซึ่งมีความสะดวกและมีประสิทธิภาพสูงดังนั้น เทคนิคPCR จึงสามารถทำได้ในเวลาสั้นๆ และมีประโยชน์ในด้านการแพทย์คือการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นส าเหตุของโรค

ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่ง เทคนิค PCR มีหลากหลายรูปแบบ ดังนี้

Multiplex PCR

เป็นเทคนิคการทำ PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มขยายดีเอ็นเป้าหมายโดยใช้ Primer หลายคู่ พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันโดย Primer แต่ละคู่ควรออกแบบโดยไม่มี Complementaryกับ ดีเอ็นเออื่นๆ และเมื่อทำปฏิกิริยา PCR จะให้ผลผลิตที่มีขนาดความยาวที่แตกต่างกัน การทำ Multiplex PCRต้องปรับสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถขยายจำนวนดีเอ็นเอ จากทุก Primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากันเนื่องจากในปฏิกิริยามี Primerหลายคู่

Nested PCR

เป็นเทคนิค PCRที่ต้องการให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น เทคนิคนี้ทำได้โดยอาศัย PCR 2ขั้นตอนด้วย Primer 2 คู่ โดย Primer คู่แรกจะใช้ขั้นตอน PCR ขั้นตอนแรกและไพรเมอร์แรก จะอยู่รอบนอกของดีเอ็นเอเป้าหมายของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ดีเอ็นเอเป้าหมาย แต่มีดีเอ็นเอ เป้าหมายอยู่ภายในลำดับเบสของผลผลิตของดีเอ็นเอ หลังจากนั้นนำเอาผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำขั้นตอนที่สองโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่สองซึ่งออกแบบให้สำหรับเพิ่มขยายได้เฉพาะ ดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ถัดเข้าไปจากไพรเมอร์คู่แรก การทำ PCR ขั้นตอนที่สองนั้นอาจทำ ปฏิกิริยา 25-30 รอบ ได้ผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขยายจำนวนมากตามต้องการเทคนิคนี้ นิยมนำไปประยุกต์ใช้กับการชันสูตรโรค

QuantitativeRealtime PCR

เป็นการนำเทคโนโลยีฟลูออเรสเซนส์ผสมผสานกับการทำ Thermal cycling แบบ Rapid PCR ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมไปพร้อมกับการคำนวณและวิเคราะห์ผล ในเวลา เดียวกันภายในหลอดทดลองในระยะเวลาอันสั้นโดยจะตรวจผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดขึ้น ระหว่างการทำ PCR นอกจากนี้ยังสามารถทำ Malting curve analysis สำหรับการกลายพันธุ์และ

หาคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ PCR ได้ในเวลาอันรวดเร็ว(Zhihuicheng and Mansel W. Griffiths, 2003)

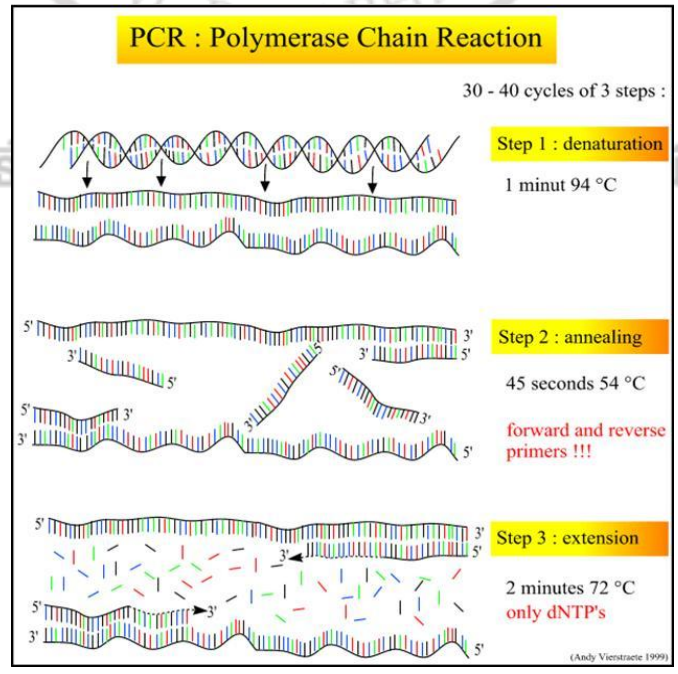
หลักการเทคนิค PCR

เทคนิคพีซีอาร์(PCR)เป็นเทคนิคที่เลียนแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในธรรมชาติเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของดำเอ็นเอช่วงใดช่วงหนึ่งซึ่งอยู่ระหว่างส่วนของดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสเรียกดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสว่า Primer เรียกดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอว่า DNA Template ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturing เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองสูงประมาณ 91-96 องศาเซลเซียสจะเกิดการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอต้นแบบที่พันกันเป็นเกลียวคู่(Double helix) กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งดีเอ็นเอสายเดี่ยวนี้จะเป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. Primer annealing เมื่อลดอุณหภูมิในหลอดทดลองให้ต่ำลงประมาณ50-55 องศาเซลเซียส ทำให้ primer จับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยเบสคู่สมกัน(Complementary) คือ Adenine(A) จับกับ Thymine(T) และ Guanine(G) จับกับ Cytosine(C)

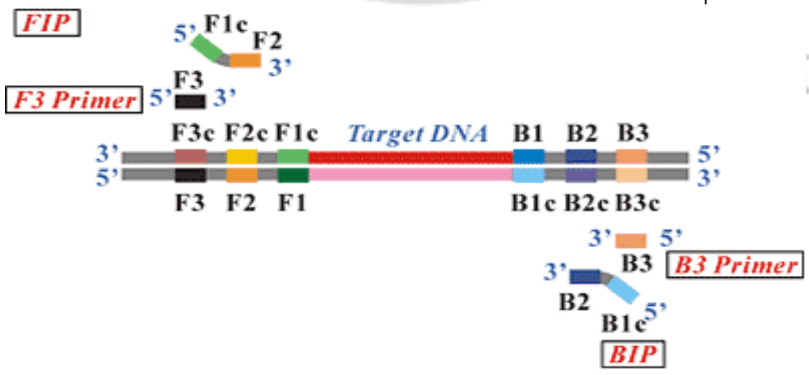
3. Primer extension เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยมีดีเอ็นสายเดี่ยวเป็นแม่แบบ โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม มีเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ทนความร้อนช่วยในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่และมีวัตถุดิบสำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ คือ deoxtnucleotide triphosphate(dNTP) ซึ่งประกอบด้วย dATP,dTTP,dGTPและdCTPอย่างละเท่าๆกันซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา primer extension คือ 70-75 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายใหม่จะถูกสร้างไปในทิศ 5’ ไป 3’และสายใหม่ที่สร้างขึ้นจะเป็นเบสคู่สมกับสายแม่แบบและขั้นตอนที่ 1 ถึงขั้นตอนที่ 3 นับเป็นหนึ่งรอบ PCR ซึ่งในแต่ละรอบดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ (อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์และธันยชัน สุระ, 2562)



ภาพที่ 2.1หลักการของปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
ที่มา : สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2543

2.3 เทคนิค Loop-mediated isothermalAmplification (LAMP)

เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิก ณ อุณหภูมิคงที่ และตรวจสอบได้ด้วยขั้นตอนเดียวกันด้วย เทคนิคนี้มีความจำเพาะสูงเพราะอาศัยไพรเมอร์ 2 คู่ จำนวน 4 เส้น ซึ่งสามารถตรวจสอบความจำเพาะกับเป้าหมายได้ถึง 6 ตำแหน่ง คือ F1, F2, F3, B1, B2, และ B3 ไพรเมอร์ forward inner primer (FIP)ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ F1c และ F2 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ F1 และ F2c ไพรเมอร์backward inner primer (BIP) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ B1c และ B2 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ B1 และ B2c ไพรเมอร์Forward outer (F3 Primer) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ F3 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ F3c และไพรเมอร์ backward outer (B3 Primer) ประกอบด้วยลำดับเบสบริเวณ B3 ซึ่งเป็นลำดับเบสคู่สมกับ B3c อาจมีไพรเมอร์เพิ่มขึ้นอีก 1 คู่ ได้แก่ loop forward (LF) และ loop backward (LB) ซึ่งสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาได้ ทำให้ปฏิกิริยามีความไวเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม ดัง ภาพที่ 2.2 ไพรเมอร์เหล่านี้ช่วยทำให้ปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่รวดเร็วโดยใช้เอ็นไซม์ช่วยในการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส โ ดยไม่ต้องอาศัยความร้อนช่วยคลายเกลียวจากสายคู่เป็นสายเดี่ยวก่อนเกิดปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนเหมือนกับเทคนิคพีซีอาร์ เพราะคุณสมบัติการทำงานแบบ strand displacement ของเอนไซม์*Bst* DNA polymerase ทำให้เทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนกรดนิวคลีอิคสูงถึง 10^{9}-10^{0} ครั้งในระยะเวลา 15-60 นาที และสามารถใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบได้ การเพิ่มจำนวนโดยใช้อาร์เอ็นเอเป็นต้นแบบสามารถทำตามขั้นตอนเดียวกับใช้ดีเอ็นเอต้นแบบได้ เพียงแต่ต้องเติมเอนไซม์ reverse transcriptase ลงในปฏิกิริยาด้วย



ภาพที่ 2.2การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิคLoop-mediated isothermal Amplification (LAMP)

ที่มา :อมรรัตน รมพฤกษ์, 2554.

กลไกลการเกิดปฏิกิริยา LAMP

กลไกลการเกิดปฏิกิริยา LAMP ประกอบกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1. ขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วง (Starting struncture producing step) เพื่อสร้างโครงสร้างที่เป็นห่วง (Stem-loop) อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอเป้าหมาย มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายคู่จะอยู่ในสภาวะสมดุลไดนามิก(Dynamic equilibrium) คือมีการจับกันแบบสายคู่ (Double stranded DNA) ตลอดเวลา ทำให้ไพรเมอร์ FIP มีโอกาสเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary sequence) กันได้ดัง ภาพที่ 2.3(1) จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase จะเริ่มทำงานเกิดการแทนที่และแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว โดยไม่ต้องอาศัยอุณหภูมิในการคลายเกลียวดีเอ็นเอคู่ เหมือนกับเทคนิค PCR

ขั้นตอนที่ 2 มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น โดยเริ่มสร้างจากลำดับเบสตำแหน่ง ที่F2 ของไพรเมอร์FIP ดังภาพที่ 2.3(2)

ขั้นตอนที่ 3 ต่อมาไพรเมอร์ F3 (Outer primer) จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ลำดับเบสตำแหน่ง F3c ดังภาพ 2.3(3) ทำให้มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น เพื่อให้ดีเอ็นเอสายใหม่หลุดออกจากดีเอ็นเป้าหมาย

ขั้นตอนที่ 4 ดีเอ็นเอสายใหม่ ที่มีลำดับเบสต่อจากไพรเมอร์ F3 จะจับเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลักษณะเหมือนดีเอ็นเอสายคู่ต้นแบบ ดังภาพที่ 2.3 (4)

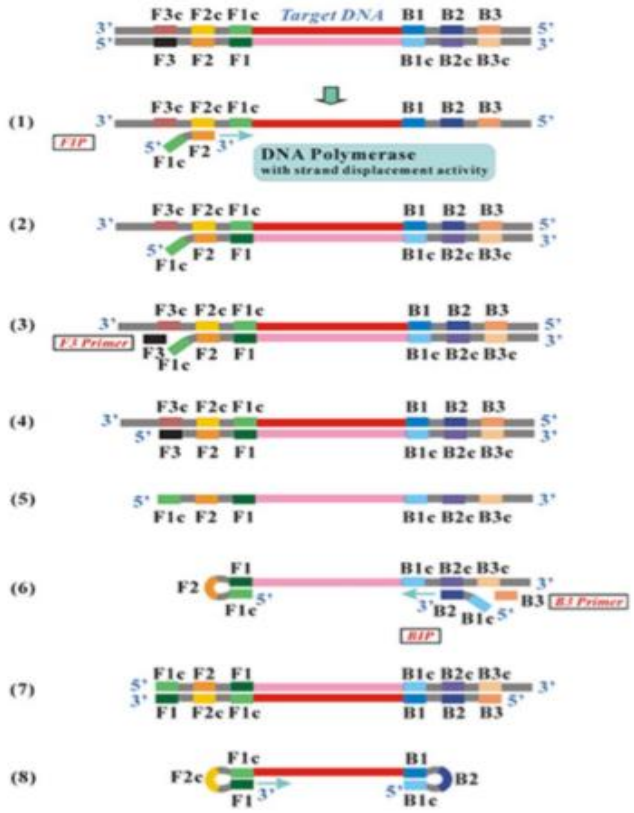
ขั้นตอนที่ 5 ขณะเดียวกันดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสต่อจา กไพรเมอร์FIP จะถูกแยกออกมาเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ดัง ภาพที่ 2.3(5) ทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 5’ เพราะมีลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง F1c กับ F1 ดังภาพที่ 2.3(6)

ขั้นตอนที่ 6ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มี โครงสร้างเป็นห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 5’ จะเป็นดีเอ็นเอต้นแบบให้ไพรเมอร์ BIP เข้าจับเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งจะเป็นสายที่โครงสร้างเป็นห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 3’ จากนั้นไพรเมอร์ B3 จะเข้ามาจับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณตำแหน่ง B3c ดังภาพที่ 2. 3(6) เพื่อแยกดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากไพรเมอร์ BIP ออกจากดีเอ็นเอต้นแบบ และสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นอีก

ขั้นตอนที่ 7 ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสต่อจากไพรเมอร์ B3 จะจับเข้าคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายเกิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่ ดังภาพที่ 2.3(7)

ขั้นตอนที่ 8 ขณะเดียวกันดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดจากไพรเมอร์ BIP จากขั้นตอนที่ 6 ที่หลุดแยกออกมาเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จะเกิดโครงสร้างห่วง (Stem-loop) ที่ปลายด้าน 5’ และ 3’ เนื่องจากที่ปลายด้าน 5’ มีลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง B1c กับ B1 เป็น F1 และที่ปลายด้าน 3’ มี

ลำดับเบสคู่สมกันระหว่าง F1c กับ F1 ทำให้โครงสร้างห่วง (Stem-loop) ที่มีรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) ดังภาพที่ 2.3(8)(ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559)

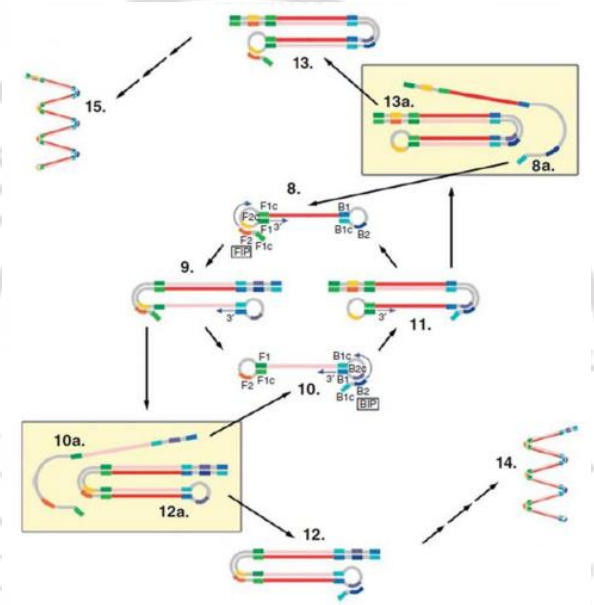


ภาพที่ 2.3กลไกการเกิดปฏิกิริยา Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP)
ที่มา : ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559.

2. ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจากโครงสร้างห่วง(Cycle amplification step)

ในขั้นตอน Cycle amplification จะใช้ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วงรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวน โดยจะเกิดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เองต่อจากบริเวณตำแหน่ง F1 ทางด้านปลาย 3 ’ ของดีเอ็นเอต้นแบบ (Self-primed strand displacement DNA synthesis) ในขณะเดียวกันไพรเมอร์ FIP จะเข้าจับกับตำแหน่ง F2c บริเวณโครงสร้างห่วงของดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่บนดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วงเป็นรูปคล้ายดัมเบล (Dumbbell like structure) ต่อไปเรื่อยๆจนถึงตำแหน่ง B1c ทำให้โครงสร้าง Stem-loop ทางด้านปลาย 5’ ของดีเอ็นเอต้นแบบหลุดออก เพราะการจับคู่กันของลำดับเบสคู่สมระหว่างตำแหน่ง B1 ของดีเอ็นเอสายใหม่กับตำแหน่ง B1c ของดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่สร้างขึ้นเอง (Self-primed strand displacement DNA) หลุดออกเป็นสายเดี่ยว แล้วเกิดโครงสร้างห่วงที่ด้าน Backward จากนั้นจะเกิดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่เองต่อจากบริเวณตำแหน่ง B1 ทางด้านปลาย 3’ ของดีเอ็นเอต้นแบบ (Self-primed strand displacement DNA synthesis) ตามในโครงสร้างที่ 9 และดีเอ็นเอสายนี้จะทำให้ดีเอ็นเอสายที่ต่อจากไพรเมอร์ FIP ในโครงสร้างที่ 9

หลุดออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวตามโครงสร้างที่ 10ขณะเดียวกันก็จะทำให้เกิดดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างห่วงคล้ายรูปดัมเบล (Dumbbell like structure) ตามโครงสร้างที่ 10 ซึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับโครงสร้างที่ 8 และโครงสร้างที่ 10 ก็จะทำให้เกิดดีเอ็นเอลักษณะแบบโครงสร้างที่ 8 เช่นกันวนเวียนต่อเนื่องกันไปเรื่อยๆ ทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ยาวขึ้นหลายๆ Copies ดังภาพที่ 2.4(ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559)



ภาพที่ 2.4การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายจากโครงสร้างห่วง (cycle amplification step)
ที่มา : ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559**.**

วิธีการตรวจวัดปฏิกิริยาจากเทคนิคLAMP

1. การตรวจวัดโดยอาศัยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส(Eletrophoresis)

การตรวจวัดกรดนิวคลีอิกที่เพิ่มขึ้นจากเทคนิค LAMP (LAMP product) ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟริซิส(Gel eletrophoresis) สามารถทำได้โดยเตรียมอะกาโรสเจล 2% แล้วนำ LAMP product ที่ได้มาผสมกับ Loading dye และนำไปใส่ลงในหลุมเจลที่เตรียมไว้จากนั้นรันเจลแล้วนำไป ตรวจดูดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตด้วยเครื่อง UV transilluminator จะให้แถบ (Band) หลายๆขนาดลักษณะรูปแบบคล้ายขั้นบันได (Ladder-like patterns) ซึ่งต่างจากปฏิกิริยา PCR product ทั่วไปมีเพียงแถบเดียว เนื่องจากในขั้นตอนCycle amplification ทำให้ได้ขนาดของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอที่แตกต่างกัน (ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559)

2.4 การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสีของตัวบ่งชี้ (Indicator)

ความไวการเกิดปฏิกิริยา LAMP ทำให้ปฏิกิริยานี้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ดังนั้นจึงมีความพยายามคิดค้นวิธีการตรวจวัดผลผลิต LAMP ที่ลดโอกาสเกิดการปนเปื้อนให้ได้มากที่สุด โดยการเติมสารที่สามารถตรวจวัดผลผลิต LAMP ลงในสารละลาย LAMP ก่อนนำไปบ่มให้เกิดปฏิกิริยาด้วยการอาศัยตัวบ่งชี้โลหะไอออน (Metal ion indicator) ตัวอื่นนอกเหนือจากสาร Calceinได้แก่ สาร Hydroxynaphthol blue (HNB) ซึ่งนำมาใช้ตรวจวัดสารแมกนีเซียมที่เปลี่ยนแปลงไปใน

ปฏิกิริยา LAMP เนื่องจากประจุลบของกรดซัลโฟนิกของสาร HNB สามารถจับได้กับประจุบวกของแมกนีเซียมในสารละลาย โดยสามารถเติมสารนี้ได้ตั้งแต่เริ่มต้นการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ดังภาพที่ 2.5โดยในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีสีม่วง แต่ในปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อเกิดการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ ทำให้แม็กนีเซียมถูกใช้ไปตามสมการปฏิกิริยาการเกิดตะกอนจากปฏิกิริยา LAMP ส่งผลให้ความเข้มข้นของแม็กนีเซียมในสารละลาย LAMP ลดลง สารแม็กนีเซียมที่จับได้กับสาร HNB ในปฏิกิริยาลดลงด้วย จึงเห็นในสารละลาย LAMP ของปฏิกิริยาผลบวก (มีดีเอ็นเอเป้าหมาย) เปลี่ยนเป็นสีฟ้า ซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงปกติ ดังภาพที่ 2.6 ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ดีที่ 650 นาโนเมตร ถือว่าเป็นสารที่มีความไวที่ดีในการตรวจสอบปฏิกิริยา LAMP ใกล้เคียงกับสาร SYBR Green I

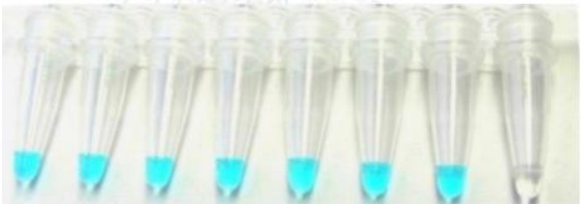
$$(DNA)_{n-1} + dNTP \longrightarrow (DNA)_n + P_2O_7^{4-}$$

$$P_2O_7^{4-} + 2Mg^{2+} \longrightarrow Mg_2P_2O_7$$

ภาพที่ 2.5สมการปฏิกิริยาการเกิดตะกอนจากปฏิกิริยา LAMP
ที่มา : ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559

ภาพที่ 2.6การใช้สาร HNB ตรวจวัดปฏิกิริยา LAMPโดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงเป็นสีฟ้าภายใต้แสงปกติ
ที่มา : ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559

ต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้สารอื่นในการตรวจวัดผลผลิต LAMP เช่น สาร Malachite green เป็นสารที่มีประจุบวกสามารถจับกรดนิวคลีอิกได้บริเวณหมู่ฟอสเฟต (Phosphate group) สามารถเติมลงในสารละลาย LAMP ก่อนนำไปบ่มให้เกิดปฏิกิริยาได้ และเมื่อเกิดผลผลิต LAMP ขึ้นจะสังเกตเห็นสารละลาย LAMP เปลี่ยนจากสารไม่มีสีเป็นสีฟ้าหรือสีเขียวอ่อนดัง ภาพที่ 2.7(ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559)



ภาพที่ 2.7 แสดงภาพการใช้สาร Malachite green ตรวจวัดผลผลิต LAMP

ที่มา :ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร, 2559

2.5 ประโยชน์ของLoop-mediatedIsothermalAmplification(LAMP)และการนำไปใช้

ในปัจจุบันเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ได้ถูกนำไปใช้อย่างกว้าง ขวางในงานทางด้ านการแพทย์เพื่อช่วยในการวิ นิจฉัยโรคที่เกิดจากแบคทีเรียไวรัส และปรสิต โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของเชื้อที่สงสัยเพื่อตรวจวินิจฉัย และหาแนวทางรักษาได้ทันท่วงทีและรวมไปถึงการนำ มาใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของมนุษย์ด้วยเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP)เนื่องจากเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีประสิทธิภาพสูง (Efficiency) มีความไว (Sensitivity) ความแม่นยำ (Precision) ความจำเพาะ (Specificity)ที่ดีและความประหยัดเวลาซึ่งLAMP ใช้อุณหภูมิเดียวตลอดทั้ งปฏิกิริยา (Isothermal)และการประยุกต์ใชงานของเทคนิคLAMPถูกนำไปใช้งานในด้านต่างๆ ใช้ในการตรวจหายีนของเชื้อเพื่อช่วยในการวินิจัยโรค ในระยะแรกใช้ตรวจหาเชื้อที่สามารถติดต่อได้ในทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella, Legionella, E. coli*เป็นต้น ต่อมาถูกใช้แพร่หลายมากในการตรวจจับไวรัส เนื่องจากการวินิจฉัยเชื้อไวรัสสามารถทำได้ยาก ปัจจุบันเทคนิค LAMP ถูกใช้งานในการตรวจหาการติดเชื้อที่ยังเป็นปัญหาทั่วไปในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น เชื้อวัณโรค เชื้อมาเลเรีย เชื้อHIVสำหรับประเทศไทยเทคนิค LAMP ถูกนำมาใช้งานทางด้านตรวจจับเชื้อไวรัสต่างๆที่ก่อโรคในสัตว์ เช่น โรคไวรัสในกุ้ง ไวรัสในหมู แล้วมีการนำมาใช้ตรวจหาปาราสิตในคนและตรวจหายีนอื่นๆ ส่วนในด้านเวชศาสตร์การบริการโลหิตนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้เป็นอย่างดีในการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับแอนติเจนของเม็ดเลือด (อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, 2554)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จริยา สินเดิมสุข และสุวนีสุภเวชย์ (2543) เก็บตัวอย่างเนื้อไก่สดแช่เย็นจากตลาดสดและซุปเปอร์มาเก็ต ในเขตกรุงเทพมหานคร ในช่วงฤดูร้อนตั้งแต่ เดือนมีนาคม 2540 ถึง มิถุนายน 2542 ทำการตรวจแยกเชื้อ*Campylobacter* spp. โดยวิธี Membrane filter และวิธี Streak plate โดยวิธี Membrane filter พบว่า*Campylobacter* spp. ในส่วนต่างๆ ของเนื้อไก่ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบในส่วนเครื่องในไก่ (ตับและหัวใจ) 34/46 (73.9%) ปีกไก่ 23/40 (57.5%) น่องไก่ 21/38 (55.3%) และอกไก่ 7/37 (18.9%)เมื่อใช้วิธีstreak plate เปรียบเทียบ พบ*Campylobacter* spp. ในส่วนเครื่องในไก่ 18/46 (39.1%) ปีกไก่ 11/40 (27.5%) น่องไก่ 12/38 (31.6%) และอกไก่ 3/37 (8.1%)โดยวิธี membrane filter technic จะให้ผลการหา*Campylobacter* spp. เป็นสองเท่าของวิธีstreak plate technic การวิเคราะห์หา Species ของเชื้อ *Campylobacter*ที่แยกได้ 15 สายพันธุ์ พ บ*Campylobacter coli*10/15 (66.6%) *Campylobacter jejuni*4/15 (26.6%) และพบ *Campylobacter fetus*1/15 (6.6%)

ธงชัย แก้วพินิจ และคณะ (2013)การวินิจฉัยการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือนด้วยวิธีการเพาะเชื้อในการตรวจ ซึ่งอาจส่งผลต่อการติดตามรักษาของผู้ป่วยได้สำหรับ การตรวจด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้เวลาในการตรวจ วิเคราะห์นานประมาณ 3-4 ชั่วโมงแต่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงและมีราคาแพง ซึ่งการพัฒนาการวินิจฉัยที่รวดเร็วและทันท่วงทีจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวางแผนรักษา ควบคุมและ

ป้องกันการแพร่ ระบาดของโรคนี้เมื่อเร็วๆ นี้มีการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของ สิ่งมีชีวิตได้ถึง 109 เท่า ภายใต้อุณหภูมิคงที่ ในระยะเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง วิธีดังกล่าวนี้ใช้primers 4ชุดหรือ 6 ชุด ที่จำเพาะต่อกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ 6 ตำแหน่ง จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการตรวจสูง การติดตามปฏิกิริยาLAMP ที่เกิดจากการสังเคราะห์เกิดจากการจับกันของ Pyrophosphate ion กับ Magnesium ionได้สารประกอบ เชิงซ้อน Magnesium pyrophosphate ทำให้เกิดตะกอนสีขาวขุ่นไม่ละลายน้ำซึ่ง Pyrophosphate เป็นสารที่ปล่อยออกมาระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ตะกอนดังกล่าวสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือการยืนยันผลการตรวจเชื้อด้วยเครื่องspectrophotometry

ปริชาติ มากอิ่มและคณะ(2555)*Campylobacter* spp. เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคอุจจาระร่วงและเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและเสียชีวิตในเด็กเล็กที่พบได้มากในประเทศกำลังพัฒนา นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ได้ในเด็กสุขภาพดีที่ไม่มีอาการอุจจาระร่วง ซึ่งเด็กกลุ่มนี้ อาจเป็นพาหะทำให้การแพร่กระจายของเชื้อมากขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาความชุกของเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเด็กอายุไม่เกิน 12 ปีที่ไม่มีอาการอุจจาระร่วง ในเขตกรุงเทพมหานครด้วยวิธีการเพาะเชื้อจากตัวอย่างอุจจาระผลการศึกษา พบเชื้อ *Campylobacter* spp. ในเด็ก 12 ราย (ร้อยละ 3.5) จากตัวอย่างอุจจาระทั้งหมด 340 รายและเมื่อทำการตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer พบว่าเป็น *Campylobacter jejuni* 7 ราย (ร้อยละ 2.0) และ *Campylobacter coli* 5 ราย (ร้อยละ 1.5) แสดงให้เห็นว่าเด็กที่ไม่แสดงอาการอุจจาระร่วงอาจเป็นพาหะของเชื้อ *Campylobacter* spp. และอาจแพร่กระจายไปสู่ชุมชนได้

จิรายุทธ์ วังตา และคณะ (2555) ประสิทธิภ าพ และค วามไวของวิธี Loop mediated isothermal amplification (LAMP) สำหรับก ารตรวจระบุเพศจ ากตัวอย่างเลือดมนุษย์ปัจจุบั นเทคนิคทางอณูพั นธุศาสตร์ไ ด้เข้า มามีบทบาทในการทำประโยชน์กั บงานหลาย ๆ ด้ าน อาทิเช่น ด้านการแพทย์ เพื่อการวินิจฉัยโรค อุตสาหกรรม และสิ่งแวดล้ อมเพื่อการผลิต เกษตรกรรมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการตรวจ ดีเอ็นเอ ทางนิติวิทยาศาสตร์ และ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นสิ่งที่ใช้ บ่ง บอกลักษณะจำเพาะของแต่ละบุคคล พัฒนาขึ้น ใช้ครั้ง แรกโดยศาสตราจารย์ Alec Jeffreysในปี ค.ศ. 1985และพบว่ าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะเป็น เอกลักษณ์ของแต่ละบุคคลโอกาสที่คนสองคนจะมีดีเอ็น เอเหมือนกั นมีค่า เท่ากับ1 ใน 9,340 ล้านซึ่งมีค่าสูงกว่ าจำนวนประชากรในโลกนี้

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2548) งานนิติวิทยาศาสตร์ นำลายพิมพ์ ดีเอ็นเอมาใช้ ประโยชน์ในการตรวจหาความสัมพั นธ์ของบุคคลว่ าเป็นพ่อ แม่ลูกอีกทั้ งยังช่วยในการหาผู้กระทำความผิดจากวัตถุพยานทางชีวภาพที่คนร้ายได้ ทิ้งเอาไว้ในที่เกิดเหตุและเรามั กพบว่าวัตถุพยานชีวภาพที่คนร้ายได้ทิ้งที่เกิดเหตุนั้ นมีปริมาณที่น้ อยมากซึ่งอาจทำให้ยากต่อการตรวจพิสูจน์ด้ วยเหตุนี้จึงมีการนำเทคนิคทางอณูพั นธุศาสตร์เข้ ามาช่วยเพิ่มปริมาณสารพั นธุกรรมโดยเทคนิค พีซีอาร์ซึ่งเทคนิคนี้ได้พัฒนาขึ้นในปีค.ศ. 1986 โดย Kary Mullis สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้ องการ เป็นจำนวนมากภายในระยะเวลาอั นสั้นในหลอดแก้ ว (in vitro) ทำให้ได้ ชิ้นส่วนดีเอ็นจำนวนมากเพื่อง่ายต่อการตรวจสอบ

Notomi, *et al*. (2000)ได้พัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพั นธุกรรมแบบใหม่ชื่อว่ า Loop mediated isothermal amplification (LAMP)และสำหรับงานวิ จัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ในการเพิ่มปริมาณสารพั นธุกรรมของมนุษย์ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพและความไวในการระบุเพศของมนุษย์ จากเลือดซึ่งเป็นสิ่งส่งตรวจที่พบได้ บ่อยโดยมุ่งประเด็นความสนใจไปที่ยีน Amelogenin Y ซึ่งผลของงานวิจัยจะสามารถนำไ ปใช้ประโยชน์ได้ดีในงานทางด้านนิติวิทยาศาสตร์

ไอรินทร์หงษ์วริทธิ์ธร (2559)วิธีการตรวจวัดดีเอ็นเอแบบกึ่งปริมาณจากเทคนิคลูปเมดิเอเตทไอโซเทอร์มอลแอมพลิฟิเคชัน (แลมป์) โดยอุปกรณ์ตรวจวิเคราะห์บนกระดาษ วัดระยะทางได้รับการพัฒนาขึ้น เพื่อตรวจวัดดีเอ็นเอตั้งต้นแบบกึ่งปริมาณจากปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ของเชื้อ *E.coli*ในช่วงยีน malBด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)โดยอาศัยการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสีฟ้าที่เกิดจากการจับกันระหว่างสาร Polyethylnimin(PEI) ซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ประจุบวกที่ตรึงบนชุดตรวจสาร Hydroxynapthol blue (HNB) ที่อยู่ในสารละลาย LAMP โดยสาร HNB นั้นเป็นตัวบ่งชี้โลหะไอออน(metal ion indicator) ที่ใช้เป็นตัวติดตามการเปลี่ยนแปลงของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่ถูกใช้ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในปฏิกิริยา LAMP

WataruYamazaki,*etal*.(2009)ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)สำหรับการตรวจจับตัวอย่างเนื้อไก่ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติด้วย *C.Jejuni*และ *C. coli*รวมเป็น 144ทำคัดแยกจากตัวอย่างเนื้อไก่ ที่เลี้ยงในอาหาร Preston enrichment brothโดยใช้เทคนิค LAMP และวิธีการเพาะเลี้ยงซึ่งประกอบด้วย Prestonenrichment brothและ Charcoal cefoperazonedeoxycholate agar เปรียบเทียบกับ *C. jejuni*และ*C.coli*ที่แยกโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยง ผลของเทคนิค LAMPของความไว และความจำเพาะ 98.5% (67/68) และ 97.4% (74/76)ตามลำดับและค่าPositive และNgativeคือ97.1% (67/69) และ 98.7% (74/75)ตามลำดับ วิธีการเพาะเลี้ยง นั้นใช้เวลามากกว่า 3 ถึง 4 วันใน การแยกและระบุ *C. jejuni*และ*C. Coli*ในทางตรงกันข้ามการทดสอบ LAMP นั้นเร็วกว่าอย่างเห็นได้ชัด 90 นาทีจากขั้นตอนของการสกัด ดีเอ็นเอไปจนถึงการตรวจหาขั้นสุดท้ายและการแยกความแตกต่างของ *C. jejuni*และ *C. coli*โดยรวมแล้วการทดสอบ LAMP ต้องการเวลา23.5 ถึง 25.5 ชั่วโมง ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการทดสอบ LAMP เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสำหรับการทำงานที่รวดเร็วไวและปฏิบัติได้จริง ซึ่งตรวจหา *C. jejuni*และ *C. coli*ซึ่งอาจช่วยในการเฝ้าระวังและควบคุม เชื้อ*C. Jejuni*และ*C.coli*ที่มีการปนเปื้อน จึงใช้เทคนิค LAMP ที่มี ความไวสูงและเฉพาะเจาะจงเพื่อตรวจจับและแยกความแตกต่า งของ *C. jejuni*และ *C. coli*ในตัวอย่างเนื้อไก่

YasuyoshiMori, (2004) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการขยายกรดนิวคลีอิกที่ช่วยให้การสังเคราะห์ ดีเอ็นเอ จำนวนมากในช่วงเวลาสั้น ๆ ที่มีความจำเพาะสูง เมื่อปฏิกิริยาของ LAMP ดำเนินไปปฏิกิริยาของพลอยไพโรฟอสเฟตจับกับไอออนของแมกนีเซียมและทำให้เกิดการตกตะกอนสีขาวของแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต โดยออกแบบเครื่องมือที่สามารถวัดความขุ่นของตัวอย่างหลายตัวพร้อมกันในขณะที่รักษาอุณหภูมิคงที่เพื่อทำการวัดแบบเรียลไทม์ของการเปลี่ยนแปลงความขุ่นของปฏิกิริยาที่จำเป็นสำหรับความ

ขุ่นของสารละลาย LAMP ที่เกินค่าที่กำหนดขึ้นอยู่กับปริมาณของ ดีเอ็นเอแม่ แบบ นั่นคือกราฟที่มีพล็อตของ Ttเทียบกับปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบนั้นเป็นเส้นตรงจาก 2×10^{3} (0.01 นาโนกรัม/หลอด) ถึง 2×10^{9} (100 นาโนกรัม/หลอด) ของแม่แบบ ผลลัพธ์เหล่านี้บ่งชี้ว่าการวัดความขุ่นแบบเรียลไทม์ของปฏิกิริยา LAMP ช่วยให้การวิเคราะห์เชิง ปริมาณของกรดนิวคลีอิกมีความแม่นยำสูง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี