บทที่ 4
ผลการวิจัย

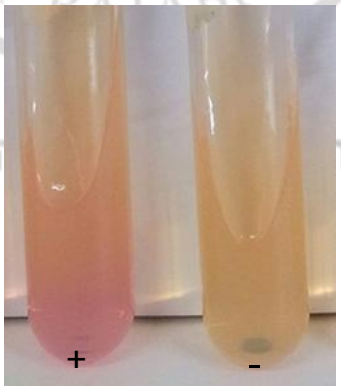
4.1 การคัดแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จากตัวอย่างเนื้อไก่

การคัดแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์จากตัวอย่างเนื้อไก่จำนวน 30 ตัวอย่าง จากตลาดสดในอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี ซึ่งสามารถคัดแยกได้โดยนำตัวอย่างเนื้อไก่มาเลี้ยงในอาหารPreston bothที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะ Microarophilicแล้วนำมาหยดลงบนกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงบนอาหารBSA นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ในสภาวะ Microarophilicจากการศึกษาการคัดแยกเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ในเนื้อไก่ พบการเจริญเติบโตของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ จำนวน 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารBSA จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ พบว่ามีลักษณะ รูปร่างเป็นเกลียวหรือโค้งงอ โคโลนีกลม นูน สีขาวครีม ขอบเรียบ มันวาว มีขนาดเล็กถึงปานกลาง

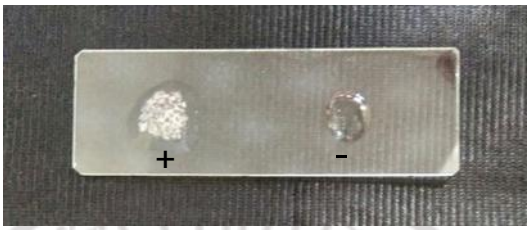
4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ พบว่า การทดสอบ Urease ให้ผลลบทั้งหมด 30 ตัวอย่าง เนื่องจากแบคทีเรียไม่สร้างเอนไซม์ Urease ที่สามารถย่อยยูเรียเป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีสภาวะเป็นด่างจึงไม่ทำให้ Phenol red เปลี่ยนเป็นสีชมพู (ดังภาพที่ 4.1) จากการทดสอบ Catalase test พบว่าเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 13 ตัวอย่าง ให้ผลบวก เนื่องจากแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalaseจึงทำให้เกิดฟองแก๊ส (ดังภาพที่ 4.2) การทดสอบ Nitrate test พบว่าเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 13 ตัวอย่าง ให้ผลบวกเนื่องจากแบคทีเรีย มีความสามารถในการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรท์ได้ (ดังภาพที่ 4.3) และการทดสอบ Hippurate test พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ จำนวน 13 ตัวอย่าง ให้ผลบวกเนื่องจากแบคทีเรียสามารถย่อย Hippurateได้จึงทำให้เกิดวงแหวนสีม่วงน้ำเงิน (ดังภาพที่ 4.4)

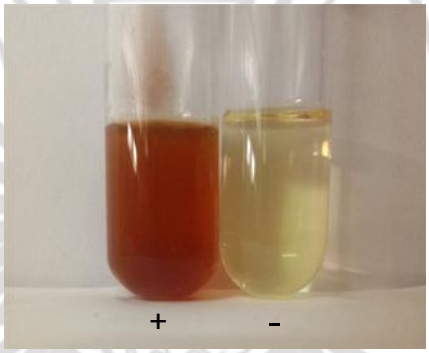
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



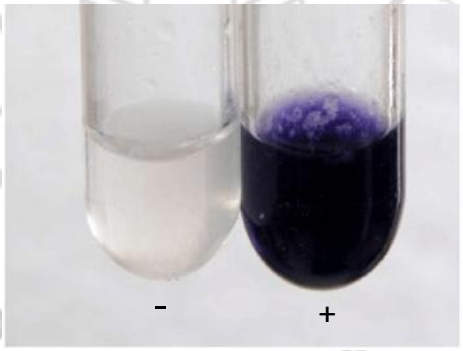
ภาพที่ 4.1 การทดสอบ Urease test



ภาพที่ 4.2 การทดสอบ Catalase test



ภาพที่ 4.3 การทดสอบ Nitrate Reduction test



ภาพที่ 4.4 การทดสอบ Hippurate test

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ พบ ว่าเป็น เชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไนที่สามารถแยกได้ 13 ตัวอย่าง และไม่พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ 17 ตัวอย่าง โดยแคมไพโลแบคเตอร์ เจจูไนให้ผลการทดสอบทางชีวเคมี คือ Catalase test, nitrate test และ

ลิขสิทธิ์ของ พรรณี

Hippurate test เป็นบวกและผล การทดสอบ Urease test เป็นลบและ เชื้อ สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ดังตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์

ลำดับที่	รหัส	Growth 37°C	Biochemical test				Species
			Catalase test	Nitrate test	Urease test	Hippurate test	
1	KT	-	-	-	-	-	-
2	KG	-	-	-	-	-	-
3	KN	-	-	-	-	-	-
4	KP	-	-	-	-	-	-
5	KO	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
6	JT	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
7	JG	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
8	JN	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
9	JP	-	-	-	-	-	-
10	JO1	-	-	-	-	-	-
11	SO1	-	-	-	-	-	-
12	SO2	+	+	+	-	+	*C. jejuni*

ตารางที่ 4.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์(ต่อ)

	รหัส	Growth 37°C	Biochemical test				Species
			Catalase test	Nitrate test	Urease test	Hippurate test	
13	SO3	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
14	SO4	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
15	SO5	-	-	-	-	-	-
16	SO6	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
17	SO7	-	-	-	-	-	-
18	LO1	-	-	-	-	-	-
19	JO2	-	-	-	-	-	-
20	BO1	-	-	-	-	-	-
21	MO	-	-	-	-	-	-
22	KO2	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
23	KO3	-	-	-	-	-	-
24	PO1	+	+	+	-	+	*C. jejuni*

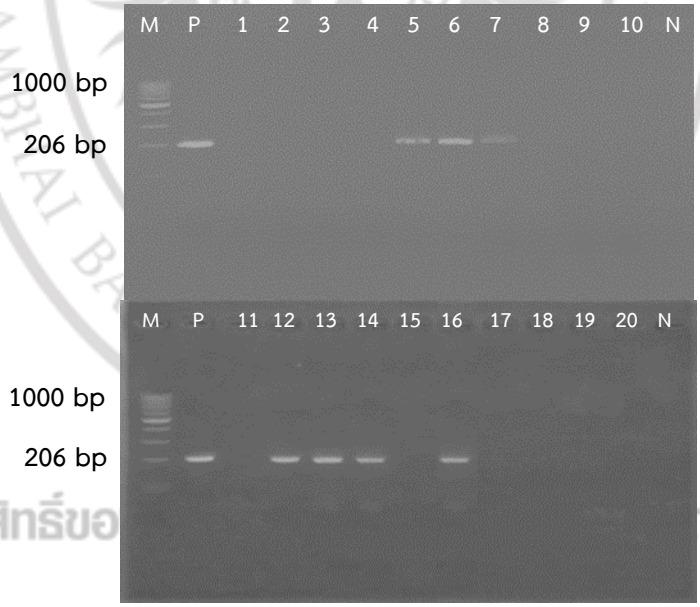
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

25	PO2	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
26	MS	-	-	-	-	-	-
27	KS2	-	-	-	-	-	-
28	KS3	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
29	PS1	+	+	+	-	+	*C. jejuni*
30	PS2	-	-	-	-	-	-

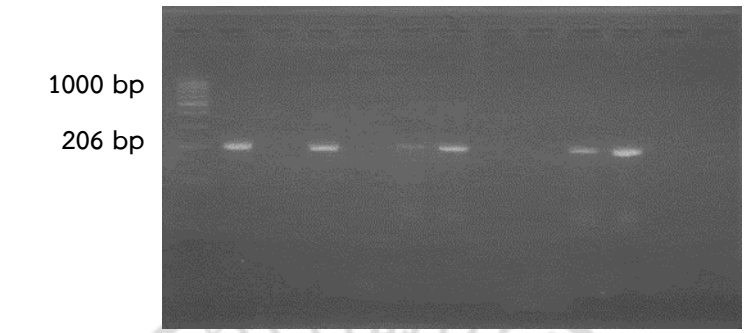
หมายเหตุ * (+) เชื้อเจริญเติบโต (-) เชื้อไม่เจริญเติบโต

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

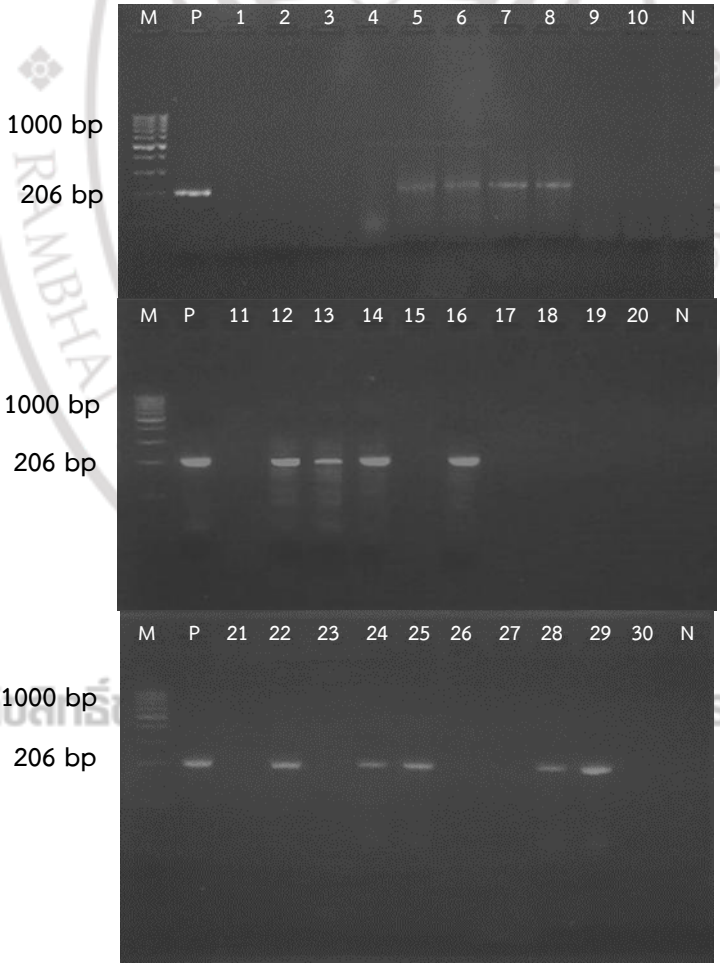
จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis พบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ Pre-test 12 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง และพบเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ Post-test 13 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งขนาดดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์บนแถบดีเอ็นเอใน 2% Aarose gel มีขนาด 206 bpดังภาพที่ 4.5 และ 4.6



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี



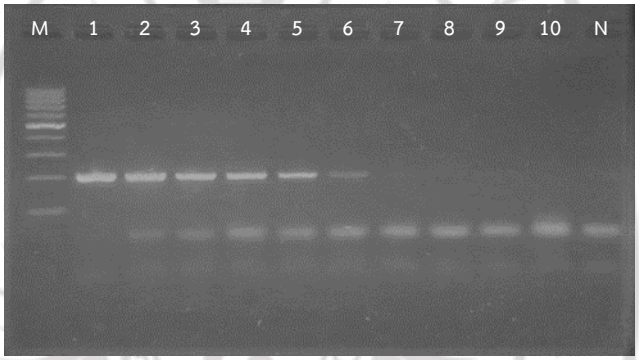
ภาพที่ 4.5การตรวจสอบดีเอ็นเอของตัวอย่าง pre-test ที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนี้ M: 100 bp DNA ladder, P: positive control, N: negative control และ 1-30 คือ ตัวอย่าง pre-test ที่ 1-30



ภาพที่ 4.6การตรวจสอบดีเอ็นเอของตัวอย่าง post-test ที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนี้M: 100 bp DNA ladder , P: positive control,N: negative control และ 1-30 คือ ตัวอย่าง post-test ที่ 1-30

4.4 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การทดสอบค่าความไวของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบน Agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ36.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) พบว่า ค่าความไวของเชื้อแคมไพโล แบคเตอร์ที่ตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์มีค่าความไวน้อยที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ364 เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร(fg/µl) ดังภาพที่ 4.7

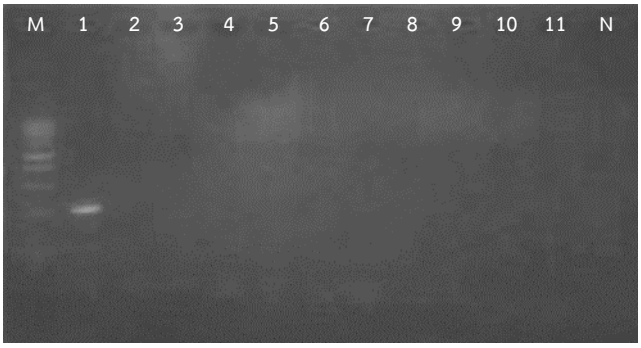


ภาพที่ 4.7การทดสอบความไวของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ บน2% agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังนี้ M: 100 bp DNA ladder,1: 36.4 ng/µl, 2: 3.64 ng/µl, 3: 364 pg/µl, 4: 36.4 pg/µl, 5: 3.64 pg/µl, 6: 364 fg/µl, 7: 36.4 fg/µl, 8: 3.64 fg/µl, a9: 364 ag/µl และ N: negative control

4.5 การทดสอบความจำเพาะ(Specificity) ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (ดังภาพที่ 4.8) ไพรเมอร์ที่ใช้มี ความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 206 bp และไม่พบ การจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอชนิดอื่นที่ใช้ทดสอบ

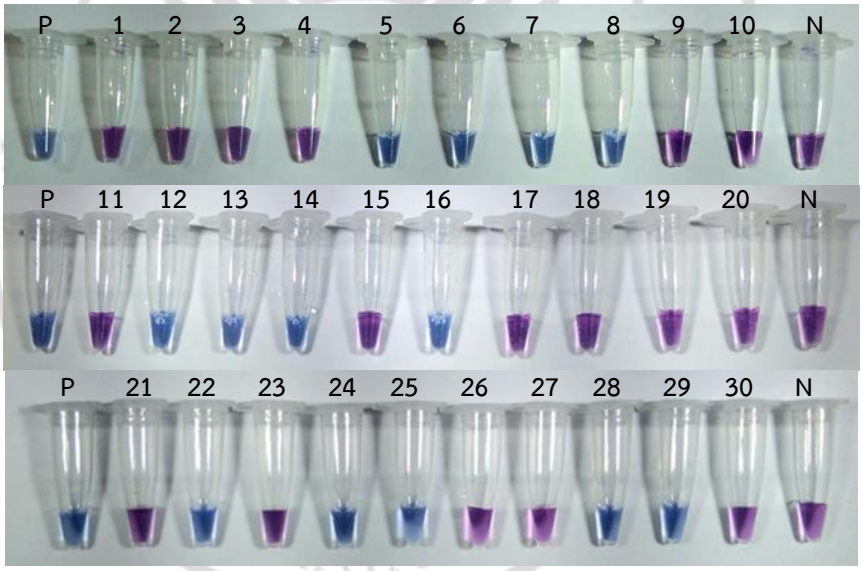
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง ไพรรณี



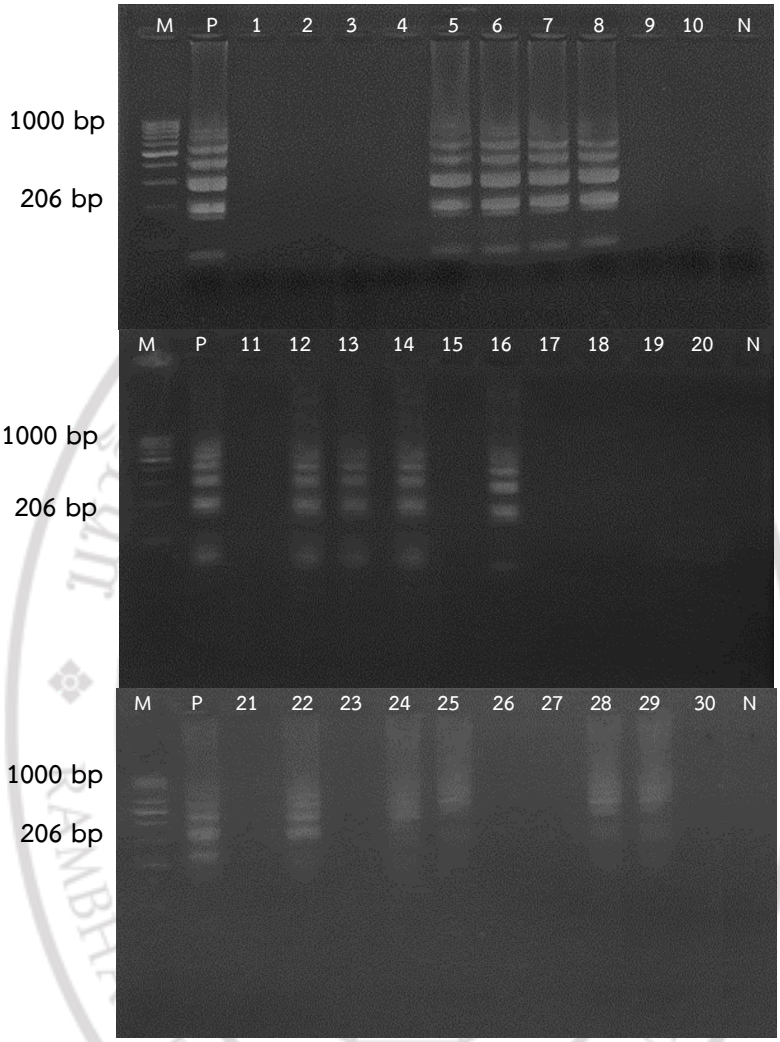
ภาพที่ 4.8 การทดสอบความจำเพาะของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยวิธีพีซีอาร์ บน 2% agarosegel electrophoresis ดังนี้ M: 100 bp DNA ladder, 1: *Campylobacter jejuni*,2: *Escherichia coli*, 3: *Salmonella typhi*, 4: *Listeria monocytogenes*,5: *Psedomonasaeruginosa*, 6: *Bacillus megaterium*, 7: *Staphylococcus aureus*,8: *Enterobacteraerogenes*, 9: *Klebsiellaoxytoca*, 10: Serratiamarcescens,11: *Citrobacterdiversus*และN: negative control

4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP)ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสีHNB

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียสของตัวอย่าง pre-test พบ 13 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง ที่เปลี่ยนสีHNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้า และจากการตรวจด้วย 2% agarose gel electrophoresis พบว่าสอดคล้องกับการตรวจด้วยสีHNBดังภาพที่ 4.9 และ 4.10



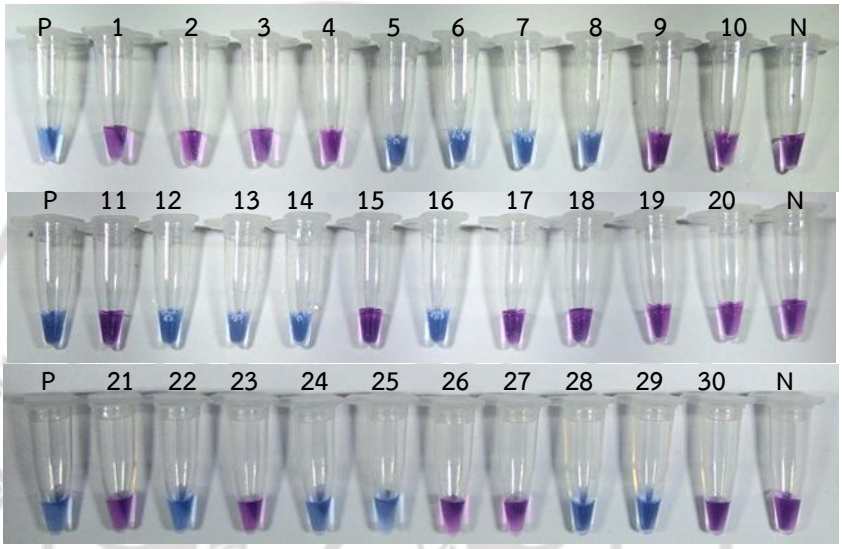
ภาพที่ 4.9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคLAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสีHNB ของตัวอย่างpre-test ดังนี้ P: positive control, 1-30: ตัวอย่างpre-test และN: negative control



ภาพที่ 4.10 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB ของตัวอย่าง pre-test ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนี้ M: 100 bp DNA ladder, P: positive control, 1-30: ตัวอย่าง pre-test ที่ 1-30 และ N: negative control

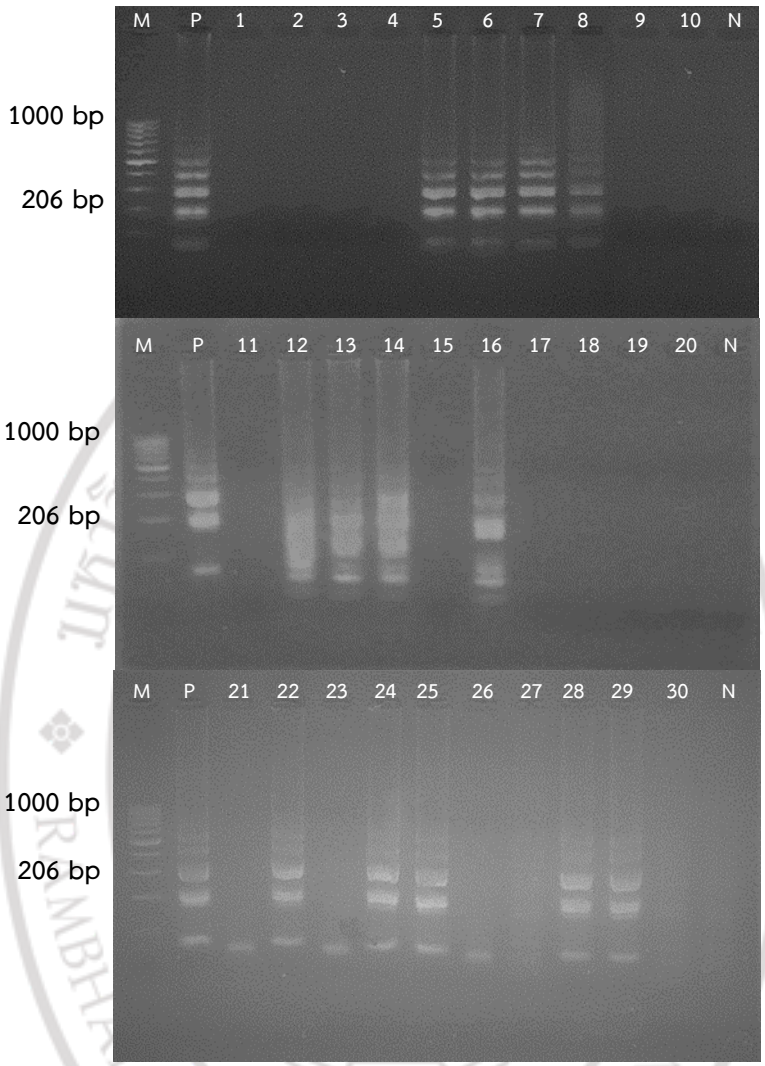
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ของตัวอย่าง post-test พบ 13 ตัวอย่าง จาก30 ตัวอย่าง ที่เปลี่ยนสีHNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้า และจากการตรวจด้วย2% agarose gel electrophoresis พบว่าสอดคล้องกับการตรวจด้วยสีHNB ดังภาพที่4.11และ4.12



ภาพที่ 4.11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคLAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสีHNB ของตัวอย่าง post-testดังนี้ P: positive control, 1-30: ตัวอย่างpost-test และ N: negative control

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

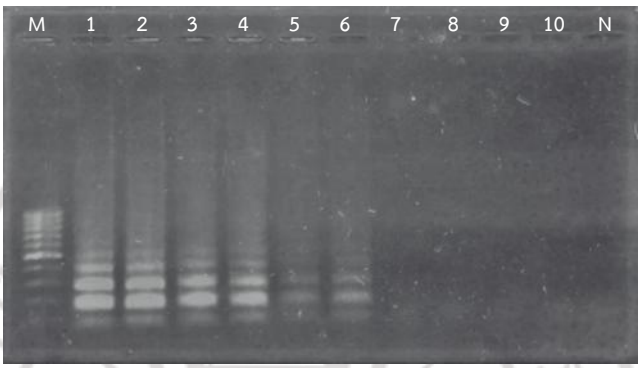


ภาพที่ 4.12 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB ของตัวอย่าง post-test ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนี้ M: 100 bp DNA ladder, P: positive control, 1-30: ตัวอย่าง post-test ที่ 1-30 และ N: negative control

4.7 การทดสอบความไว (Sensitivity) ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB

การทดสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่สกัดดีเอ็นเอได้มาวัดความเข้มข้น จากนั้นเจือจางแบบลำดับส่วน (10 fold serial dilution) ตั้งแต่ 10^{0} – 10^{-9} ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเท่ากับ 36.4 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) พบว่าค่าความไวของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ที่ตรวจด้วยวิธี LAMP มีค่าความไวน้อย ที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 36.4 เฟมโตกรัมต่อไมโครลิตร (fg/µl) ดังภาพที่ 4.13

(A)



(B)

ภาพที่ 4.13 (A) ค่าความไวของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB และ(B) ตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนี้ M: 100 bp DNA ladder,1: 36.4 ng/µl, 2: 3.64 ng/µl, 3: 364 pg/µl, 4: 36.4 pg/µl, 5: 3.64 pg/µl, 6: 364 fg/µl, 7: 36.4 fg/µl, 8: 3.64 fg/µl, 9: 364 ag/µl และ N: negative control

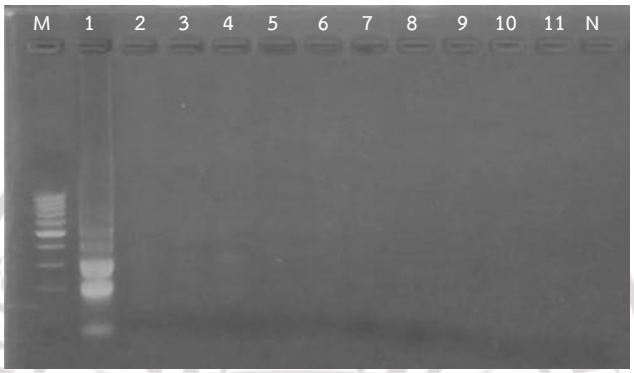
4.8 การทดสอบความจำเพาะ (Specificity) ของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ด้วยวิธี LAMP สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี HNB ภายในหลอดทดลองและนำไปตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ ดังภาพที่ 4.14

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 N

(A)



(B)

ภาพที่ 4.14 (A) การทดสอบความจำเพาะของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยวิธี LAMP ร่วมกับวิธีการแบบวัดค่าสี HNB และ (B) ตรวจสอบด้วยวิธี 2% agarose gel electrophoresis ดังนี้ M: 100 bp DNA ladder, 1: *Campylobacter jejuni*, 2: *Escherichia coli*, 3: *Salmonella typhi*, 4: *Listeria monocytogenes*, 5: *Psedomonasaeruginosa*, 6: *Bacillus megaterium*, 7: *Staphylococcus aureus*, 8: *Enterobacteraerogenes*, 9: *Klebsiellaoxytoca*, 10: *Serratiamarcescens*, 11: *Citrobacterdiversus* และ N: negative control

4.9 การเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification(LAMP) และ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จากการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับ วิธีการแบบวัดค่าสี HNB พบตัวอย่าง Pre-test และ Post-test 13 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่างที่เปลี่ยนสี HNB จากสีม่วงเป็นสีฟ้า จากการ ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis พบว่า Pre-test และ Post-test 13 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง และ post-test 13 ตัวอย่าง จาก 30 ตัวอย่าง บน 2% agarosegel electrophoresis ซึ่ง HNB กับ Agarose gel ให้ผลที่สอดคล้องกัน และการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของเชื้อแคมไพโลแบคเตอร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis พบตัวอย่าง Pre-test 12 ตัวอย่าง และ post-test 13 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 30 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การเปรียบเทียบเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP และ PCR

ลำดับที่	รหัส	Growth 37°C	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)				Polymerase chain reaction (PCR)	
			Pre-test		Post-test		Pre-test	Post-test
			HNB	Gel	HNB	Gel	Gel	Gel

1	KT	-	-	-	-	-	-	-
2	KG	-	-	-	-	-	-	-
3	KN	-	-	-	-	-	-	-
4	KP	-	-	-	-	-	-	-
5	KO1	+	+	+	+	+	+	+
6	JT	+	+	+	+	+	+	+
7	JG	+	+	+	+	+	+	+
8	JN	+	+	+	+	+	-	+
9	JP	-	-	-	-	-	-	-
10	JO1	-	-	-	-	-	-	-
11	SO1	-	-	-	-	-	-	-
12	SO2	+	+	+	+	+	+	+
13	SO3	+	+	+	+	+	+	+
14	SO4	+	+	+	+	+	+	+
15	SO5	-	-	-	-	-	-	-
16	SO6	+	+	+	+	+	+	+
17	SO7	-	-	-	-	-	-	-
18	LO1	-	-	-	-	-	-	-
19	JO2	-	-	-	-	-	-	-
20	BO1	-	-	-	-	-	-	-
21	MO	-	-	-	-	-	-	-
22	KO2	+	+	+	+	+	+	+

ตารางที่4.2การเปรียบเทียบเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP และ PCR(ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	Growth 37°C	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)				Polymerase chain reaction (PCR)	
			Pre-test		Post-test		Pre-test	Post-test
			HNB	Gel	HNB	Gel	Gel	Gel
23	KO3	-	-	-	-	-	-	-
24	PO1	+	+	+	+	+	+	+
25	PO2	+	+	+	+	+	+	+
26	MS	-	-	-	-	-	-	-
27	KS1	-	-	-	-	-	-	-

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

28	KS2	+	+	+	+	+	+	+
29	PS1	+	+	+	+	+	+	+
30	PS2	-	-	-	-	-	-	-

จากการคำนวณค่าความแม่นยำของเทคนิค PCR พบว่า pre-test มีค่าความไว , ความจำเพาะ และค่าความแม่นยำเท่ากับ 92.31 %, 100% และ 96.67 % ตามลำดับ และ post-testมีค่าความไว,ความจำเพาะ และค่าความแม่นยำ เท่ากับ100% ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3ค่าความแม่นยำ(ccuracy) ของเทคนิคPCR

	Standard culture	PCR	
		Pre-test	Post-test
True positive	13	12	13
True negative	17	17	17
False positive	0	0	0
False negative	0	1	0
Sensitivity %	100.00	92.31	100.00
Specificity %	100.00	100.00	100.00
Accuracy %	100.00	96.67	100.00

จากการคำนวณค่าความแม่นยำของเทคนิค LAMP พบว่า pre-test มีค่าความไว , ความจำเพาะ และค่าความแม่นยำเท่ากับ 100% และ post-test มีค่าความไว , ความจำเพาะ และ ค่าความแม่นยำ เท่ากับ100% ดังตารางที่4.4

ตารางที่ 4.4ค่าความแม่นยำ(ccuracy) ของเทคนิคLAMP

	Standard culture	LAMP	
		Pre-test	Post-test
True positive	13	13	13
True negative	17	17	17
False positive	0	0	0
False negative	0	0	0
Sensitivity %	100.00	100.00	100.00
Specificity %	100.00	100.00	100.00
Accuracy %	100.00	100.00	100.00

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี