เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) สำหรับตรวจเชื้อวัณโรค

ธงชัย แก้วพินิจ[1], สมชาย สันติวัฒนกุล[2], โกสุม จันทร์ศิริ[3]
[1] สำนักนวัตกรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2] ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[3] ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อทางอากาศ ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของไทยและเป็นสาเหตุการตายอันดับที่สองของการเสียชีวิตจากโรคติดเชื้อทั่วโลก การวินิจฉัยการติดเชื้อชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือนด้วยวิธีการเพาะเชื้อเป็นวิธีหลักในการตรวจ ซึ่งอาจส่งผลต่อการติดตามรักษาของผู้ป่วยได้ สำหรับตรวจด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรค ใช้เวลาในการตรวจนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงแต่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงและมีราคาแพง อย่างไรก็ตามการพัฒนาการวินิจฉัยที่รวดเร็วและทันท่วงทีจึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการวางแผนรักษา ควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของโรคนี้ เมื่อเร็วๆ นี้มีการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ถึง 10^9 เท่า ภายใต้อุณหภูมิคงที่ ในระยะเวลาน้อยกว่า 1 ชั่วโมง วิธีดังกล่าวนี้ใช้ primers 4 ชุดหรือ 6 ชุด ที่จำเพาะต่อกับสาย DNA ต้นแบบ 6 ตำแหน่ง จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการตรวจสูง การติดตามปฏิกิริยา LAMP ที่เกิดจากการสังเคราะห์เกิดจากการจับกันของ pyrophosphate ion กับ magnesium ion ได้สารประกอบเชิงซ้อน magnesium pyrophosphate ทำให้เกิดตะกอนสีขาวขุ่นไม่ละลายน้ำ ซึ่ง pyrophosphate เป็นสารที่ปล่อยออกมาระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ตะกอนดังกล่าวสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า หรือการยืนยันผลการตรวจเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometry แม้กระทั่งการติดตามด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ได้ ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลที่ประสบความสำเร็จในการตรวจเชื้อวัณโรคในสิ่งส่งตรวจ เทคนิคนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการ เช่น มีความไวและความจำเพาะสูง แม่นยำและง่ายต่อการใช้งาน วิธีดังกล่าวจึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจเชื้อที่ก่อให้เกิดวัณโรค ดังนั้นบทความนี้จะนำเสนอถึงเทคนิคและข้อมูลในการตรวจเชื้อดังกล่าวในสิ่งส่งตรวจ

คำสำคัญ: วัณโรค, การวัดความขุ่น, การวัดสีเปลี่ยนแปลง

ผู้นิพนธ์ประสานงาน
ธงชัย แก้วพินิจ
สำนักนวัตรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ถนนสุขุมวิท 23 เขตวัฒนา กรุงเทพ 10110
อีเมล์: thongchaika@swu.ac.th

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex

Thongchai Kaewphinit[1], Somchai Santiwatanakul[2], Kosum Chansiri[3]

[1] *Innovative Learning Center, Srinakharinwirot University*

[2] *Department of Pathology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University*

[3] *Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University*

Abstract

Tuberculosis is an airborne disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and is a public health problem of this country, ranking as the second leading cause of death from worldwide infectious diseases. The laboratory diagnosis takes about 1-2 months by culture as the gold standard method, which may affect the treatment of patients. Polymerase Chain Reaction (PCR) is another method, used for the detection of *M. tuberculosis,* but this amplification process requires 3-4 hours, high precision and expensive tools. However, the development of a rapid and timely diagnosis is essential for treatment planning, control and preventing the spread of this disease. Recently, a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique has been developed which can amplify DNA to 10^9 in less than 1 hour under a constant temperature. This technique uses 4 or 6 primers recognizing 6 distinct regions of the target DNA template, which is a high specific detection. In the LAMP reaction, the pyrophosphate ion, which was released during DNA synthesis, binds with the magnesium ion as a white precipitate of magnesium pyrophosphate formation. It can be seen with the naked eye, confirmed with spectrophotometry, or fluorescent compound. This technique is a molecular biology technique that has been successfully implemented in the detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens. This technique has several advantages, such as rapidity, high sensitivity, and ease of application. Therefore, this technique is expected to be widely used. This report will describe the LAMP technique and all of the available information on its implementation in the detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens.

Keywords: Tuberculosis, Turbidimetry, Colorimetry

Corresponding author

Thongchai Kaewphinit

Innovative learning center, Srinakharinwirot university

Sukhumvit 23 road, Wattana, Bangkok, 10110

บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis) เป็นโรคร้ายแรงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex ที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขในประเทศกำลังพัฒนาทั่วโลก และยังมีการระบาดในทั่วทุกภูมิภาคของโลก[1] รวมถึงประเทศไทยด้วย

ในปัจจุบันมีการแพร่ระบาดของโรคเอดส์ ยิ่งทำให้สถานการณ์ทวีความรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากทำให้มีจำนวนผู้ป่วยวัณโรคเพิ่มขึ้น การตรวจวินิจฉัยวัณโรคทางห้องปฏิบัติการยังคงยึดถือวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นวิธีหลักในการตรวจที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำ แต่อาจจำเป็นต้องรอเวลาหลายเดือนในการรายงานผล อาจจะส่งผลต่อการติดตามรักษาของผู้ป่วย และเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)[2] เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อวัณโรค โดยอาศัยกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองแต่วิธีการนี้จำเป็นต้องใช้เวลาในการทดสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงขึ้นไปและต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงที่มีราคาแพง อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังต้องใช้ความชำนาญของบุคคลด้วย อีกทั้งบางห้องปฏิบัติการไม่มีงบประมาณเพียงพอจึงทำให้ไม่สามารถนำเทคโนโลยีดังกล่าวไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กๆ หรือใช้ในภาคสนามได้ worldwide

ใน ค.ศ. 2000 มีนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะ[3] ได้มีรายงานการพัฒนาวิธีการเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification ให้ชื่อย่อของวิธีการนี้ว่า LAMP โดยวิธีการนี้สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (amplification) ของสิ่งมีชีวิตได้ถึง 10^9 เท่า ภายในระยะเวลาประมาณเพียง 1 ชั่วโมงหรืออาจน้อยกว่า วิธีการนี้ใช้การเพิ่มปริมาณ DNA ที่อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว (60-65˚C) โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงอย่างเครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำให้เทคนิคนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมในหลอดทดลองกลายเป็นที่ต้องการมากขึ้น เห็นได้จากการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารต่างๆ มากกว่า 180 เรื่อง ซึ่งรวมถึงวารสารนี้ด้วย

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของการเพิ่มขยายจำนวนของสารพันธุกรรม โดยใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าการทำด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มขยายได้ถึง 10^9 เท่าในเวลาที่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง[3,4] โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และการเพิ่มปริมาณ DNA ต้องใช้ primers 4 ชุดหรือ 6 ชุด ที่จำเพาะต่อกับสาย DNA ต้นแบบ (DNA template) 6 ตำแหน่ง จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบสูง

Primers ของวิธีการ LAMP ประกอบไปด้วย outer primers (F3 และ B3) มีความยาวประมาณ 17 - 21 base pairs (bp) และ inner primers (FIP = forward inner primer, BIP = backward inner primer) โดยที่ FIP ประกอบด้วย F1c กับ F2 และ BIP ประกอบด้วย B1c กับ B2 ปฏิกิริยาของ LAMP จะทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเอนไซม์ Bst DNA polymerase ดังรูปที่ 1a[5]

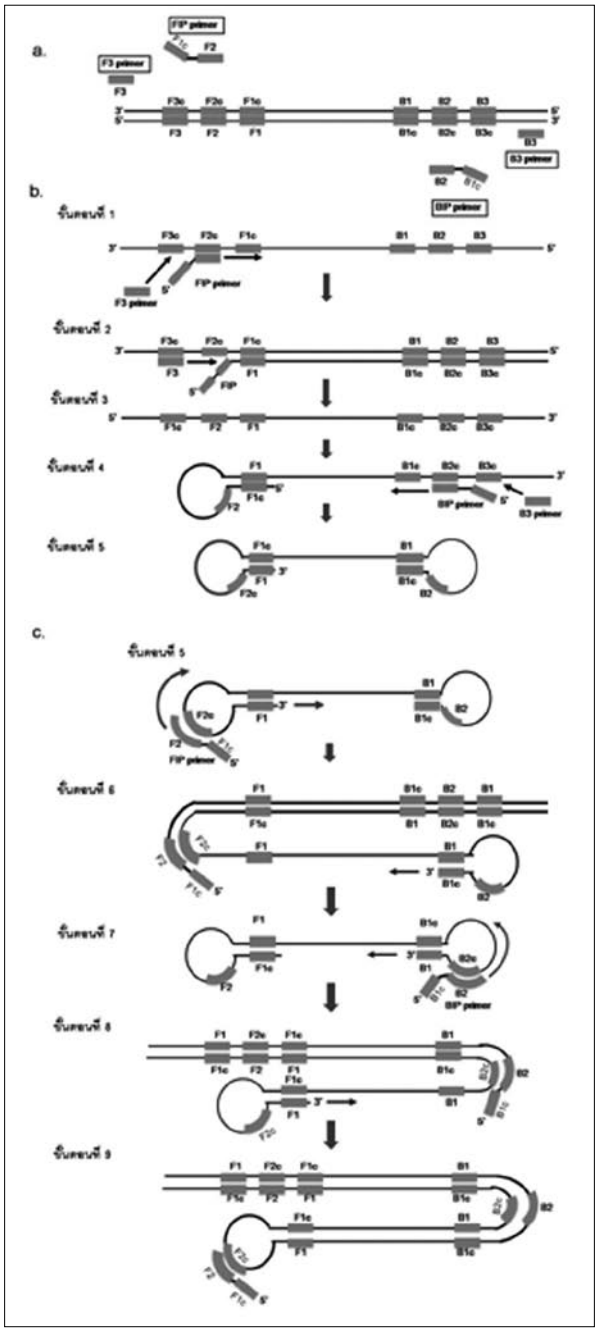
ปฏิกิริยาของ LAMP ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ 1) LAMP initial step, 2) LAMP cycling step, และ 3) elongation and recycling step[3,5] ดังรูปที่ 1b และ 1c

1) LAMP initial step ปฏิกิริยาของ LAMP ไม่จำเป็นต้อง denature จาก double strand DNA เป็น single strand DNA เหมือนเทคนิค PCR เนื่องจากเอนไซม์ Bst ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 60-65˚C และทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง กระบวนการสังเคราะห์เริ่มต้นการเพิ่มขยายที่อุณหภูมิ 60-65˚C inner FIP primer ด้าน F2 จะเข้าจับกับ F2c และทำการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' ของ primer F2 จากนั้น F3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง F3c แล้วทำการสังเคราะห์โดย DNA polymerase จะทำการแยกสาย FIP-link complementary strand ซึ่งสายนี้จะเกิดการ form เป็น loop ที่ปลาย 5' โดยเกิดจาก F1c จับกับ F1 (ในขั้นตอนที่ 1 - ขั้นตอนที่ 4 ดังรูปที่ 1b)

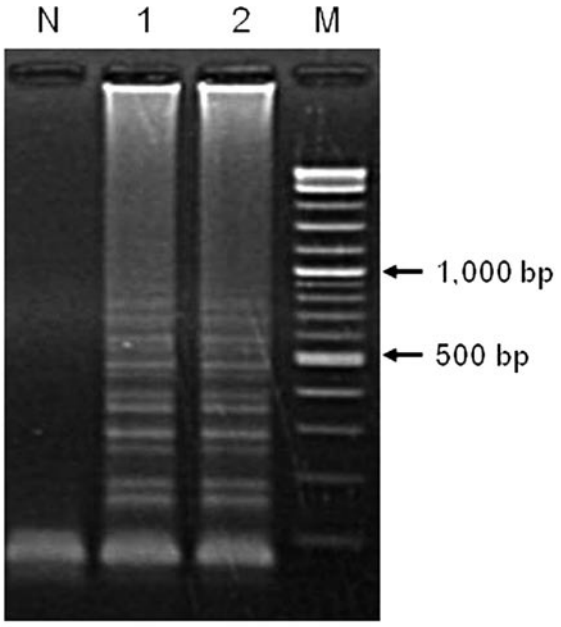
2) LAMP cycling step ในขั้นตอนที่ 4 (รูปที่ 1b) เริ่มจาก inner primer BIP ด้าน B2 จะเข้าจับกับ B2c และทำการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' ของ B2 primer จากนั้น B3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง B3c แล้วทำการสังเคราะห์โดย DNA polymerase ทำการแยกสาย BIP-link complementary strand ซึ่งสายนี้จะเกิดการ form เป็น loop ที่ปลาย 5' โดยเกิดจาก B1c จับกับ B1 ซึ่งการเกิด loop ของด้าน FIB และ BIP จะเรียกว่า dumb-bell (ขั้นตอนที่ 5)

3) Elongation and recycling step เป็นปฏิกิริยาที่เกิดซ้ำในขั้นตอนที่ 1 และ 2 ทำให้ได้ dumb-bell ที่ต่อกันหลายข้อ สามารถเกิด cycle amplification step (ขั้น

ตอนที่ 6 - ขั้นตอนที่ 9 ดังรูปที่ 1c) ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือสามารถมี self primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารถ hybridize กับ F2c ที่ loop forward ในขั้นตอนที่ 9 และสร้าง DNA สายใหม่ ได้จำนวน copies เพิ่มมากขึ้น และมี stem loop แบบ dumb-bell ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ การทำงานจะต่อเนื่องกันตลอดเวลา ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้มาก 109-1010 copies ภายในเวลา 15-60 นาที ดังนั้นจึงทำให้ปฏิกิริยาที่ได้จาก LAMP ได้ product ที่เกิดขึ้นมีได้หลายขนาด ในขั้นตอน gel electrophoresis (รูปที่ 2) วิธีการนี้จะให้ผลตรวจที่ดีควรจะเลือกขนาดของ DNA เป้าหมายน้อยกว่า 300 bp



รูปที่ 1 การเกิดปฏิกิริยาของ LAMP a) การออกแบบ LAMP primer b) LAMP initial step cycling step, กับ LAMP cycling step และ c) elongation and recycling step



รูปที่ 2 LAMP product ที่เกิดขึ้นถ้ามี DNA หรือ RNA เป้าหมาย แถบ M = Marker แถบ 1 และ 2 = LAMP product แถบ N = distill water

ในการติดตามปฏิกิริยาพบว่า product ที่เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการ LAMP แล้วจะเกิดจากการจับกันของ pyrophosphate ion กับ magnesium ion เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน magnesium pyrophosphate จะทำให้เกิดตะกอนสีขาวขุ่นไม่ละลายน้ำ ซึ่ง pyrophosphate เป็น product ที่ปล่อยออกมาระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ตะกอนดังกล่าวสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า[6,7] หรือการยืนยันผลการตรวจเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometry แม้กระทั่งการติดตามด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ได้[6,8]

นอกจากการพัฒนาดังที่กล่าวมาแล้วนั้น Nagamine และคณะ ได้แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยา LAMP ไม่จำเป็นต้องแยกสาย (denature) DNA แม่แบบก่อนทำการเพิ่มปริมาณ

DNA[9] และยังอธิบายถึงกรรมวิธีสำหรับการเพิ่มความเร็วในการตรวจสอบด้วยการเพิ่ม loop primer เข้าไปจับตรงบริเวณ stem loop ทั้งสองข้างของ dumb-bell โดยไม่ให้ซ้อนทับกับ inner primer ทำให้ปฏิกิริยานั้นเกิดได้เร็วยิ่งขึ้นกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ทำด้วยวิธีการ LAMP ปกติ เนื่องด้วยการเพิ่ม loop primers จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น[9]

การประยุกต์ใช้งานของวิธีการ LAMP สำหรับตรวจเชื้อวัณโรค

ด้วยวิธีการ LAMP มีข้อดีในด้านความรวดเร็ว ความไว ที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการตรวจเชื้อวัณโรค ชนิด *M. tuberculosis* ทางคลินิกเป็นครั้งแรก โดย Iwamoto และคณะ ได้ทดสอบปฏิกิริยา LAMP สำหรับการตรวจสอบสปีชีส์ต่างๆ ของ Mycobacteria กล่าวคือ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), *Mycobacterium avium* (MAV) และ *Mycobacterium intracellulare* (MIN) จากตัวอย่างเสมหะโดยตรงซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการเพาะเชื้อ[10]

มีข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้วิธีการ LAMP ดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถติดตามปฏิกิริยา LAMP product ที่เกิดขึ้นได้ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การใช้สารฟลูออเรสเซนต์ SYBR Green I เติมหลังจากเกิดปฏิกิริยา LAMP แล้ว เมื่อเกิดผลิตภัณฑ์สามารถดูภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียว วิธีการจำเป็นต้องเปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อเติมสารฟลูออเรสเซนต์ทำให้มีโอกาสฟุ้งกระจายของผลิตภัณฑ์สูง เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย หรือใช้สาร calcein สารนี้สามารถเติมได้ตั้งแต่เริ่มต้นจากสาร calcein จะจับกับ magnesium ซึ่ง calcein จะให้ฟลูออเรสเซนต์ที่ strong เมื่อจับกับ magnesium ดังนั้นเมื่อมี product เกิดขึ้น จะมีสาร pyrophosphate เกิดขึ้นตาม สาร pyrophosphate จะแย่งจับกับ magnesium ทำให้สาร calcein จะ quech การเรืองแสงนั้นไว้

Iwamoto และคณะ ทำการประเมินความจำเพาะของ primers จากการตรวจเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), *M. avium* (MAV) และ *M. intracellulare* (MIN) จากการเพาะเชื้อ[10] เมื่อนำไปตรวจด้วยวิธีการ LAMP เพื่อศึกษาความจำเพาะของ primers พบว่ามีความจำเพาะร้อยละ 100 (5/5) MTBC, ร้อยละ 100 (5/5) MAV และร้อยละ 100 (5/5) MIN และแสดงให้เห็นว่าวิธีการ LAMP สามารถเข้ามาช่วยในการตรวจเชื้อจาก solid-medium culture ภายใน 35 นาที และจาก liquid-medium culture หรือจากเสมหะหลังจากขั้นตอนการเตรียม DNA ภายใน 60 นาที ซึ่งการใช้เวลาที่มากกว่าอันเนื่องมาจากปริมาณจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่าทำให้ต้องเพิ่มระยะเวลา ความไวในการตรวจวัดอยู่ที่ 5 copies ของ DNA เป้าหมาย ทำให้วิธีการ LAMP เป็นวิธีการตรวจเชื้อได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว[10] และบริษัท Eiken chemical ได้นำเทคนิคที่พัฒนาโดย Iwamoto และคณะ[10] มาพัฒนาระบบที่เป็นชุดตรวจทั้งหมดเพื่อให้ง่ายต่อการใช้ ซึ่งอาจไม่จำเป็นต้องอาศัยความชำนาญของบุคคลต่อการตรวจเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 1 การประยุกต์ใช้ปฏิกิริยา LAMP ในการทดสอบเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างทางคลินิก

ชนิด *Mycobacterium*	ชนิดตัวอย่าง	ดีเอ็นเอเป้าหมาย	DNA polymerase	T_m	วิธีการตรวจและติดตาม	ระยะเวลา	ความไวในการตรวจวัด	อ้างอิง
MT, MB, MV, MI, MG	SP, SC, LC	*gyrB;* 16SrDNA	*Bst*	63°C	SYBR Green I	SC:35 min, SP, LC: 1 h	5 copies of DNA	Iwamoto et al., 2003[10]
MT	SP	*gyrB*	*Bst*	67°C	Calcein/UV fluorescence	40 min	-	Boehme et al., 2007[11]
MT, MB, MA, MM	SP	16SrDNA	*Bst*	64°C	Real-time turbidimetry	60 min	10 copies of DNA	Pandey et al., 2008[14]
MT, MB	SP, SC, PF, BL	*rimM*	*Bst*	65°C	Calcein/ manganese chloride	60 min	1 pg DNA	Zhu et al., 2009[12]
MT	SP	16SRDNA	*Bst*	63°C	Colorimetry	60 min	$<10^{-9}$ ng of RNA	Lee et al., 2009[13]
MT, MB, MA, MM, MC, MR, MP, SC	SP, SC	IS*6110*	*Bst*	65°C	SYBR Green I	90 min	1 copy of DNA	Aryan et al., 2010[15]

จากผู้ป่วยโดยตรง โดยทำการต้มที่อุณหภูมิ 100˚C, 10 นาที แล้วดำเนินการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 67˚C เป็นเวลา 40 นาที และปฏิกิริยา LAMP จะถูกยับยั้งการทำงานของ Bst DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 80˚C เป็นเวลา 2 นาทีแล้วรายงานผล

ต่อมาใน ค.ศ. 2007, Boehme และคณะ[11] ได้ประเมินผลใช้วิธีการ LAMP สำหรับตรวจวัณโรคปอดที่ประเทศเปรู บังกลาเทศ และแทนซาเนีย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการประยุกต์ใช้วิธีการนี้ให้กับประเทศที่มีทรัพยากรในห้องปฏิบัติการจำกัด ใช้การติดตามปฏิกิริยา LAMP ด้วยสาร calcein ที่เป็นสารฟลูออเรสเซนต์ผสมกับ manganese จะเข้าจับกับ pyrophosphate เช่นเดียวกับ magnesium เมื่อเกิด LAMP product แล้ว manganese จะหลุดออก ทำให้สาร calcein ถูกปล่อยออกมาได้ เพราะไม่ถูก queched แล้วทำให้ magnesium เข้ามาจับกับ calcein ทำให้เรืองแสงมากขึ้นกว่าเดิม สามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยแสงยูวีฟลูออเรสเซนต์ (UV fluorescence) การประเมินในครั้งนี้ใช้การเปรียบเทียบกับวิธีการ Ziehl-Neelsen และวิธีการเพาะเชื้อด้วย Lowenstein-Jensen สำหรับเพาะเชื้อวัณโรค ผลการประเมินพบว่า

1) เมื่อผลการย้อมเสมหะให้ผลบวก การเพาะเชื้อให้ผลบวก ความไวเป็นร้อยละ 97.7 (173/177)

2) เมื่อผลเป็นการย้อมเสมหะให้ผลลบ การเพาะเชื้อให้ผลบวก ความไวเป็นร้อยละ 48.8 (21/43)

3) โดยรวมแล้วความไวของวิธีการ LAMP เป็น 88.2% จากผลการเพาะเชื้อให้ผลบวก (ร้อยละ 95)

4) ความจำเพาะของวิธีการ LAMP เมื่อตัวอย่างเปรียบเทียบให้ผลเป็นร้อยละ 99.0 (500/505) ความไวของวิธีการ LAMP ที่ให้ความไวสูง เป็นผลจากการที่คนส่วนใหญ่ย้อมเชื้อให้ผลบวก แสดงถึงการมีเชื้อในปริมาณมาก

สรุปผลการวิจัยค้นพบว่า 1) สามารถลดการใช้ N-acetyl-L-cysteine-NaOH ในขั้นตอนการละลายเสมหะ 2) ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนกับ LAMP amplicons และ 3) วิธีการ LAMP ให้ผลเทียบเท่ากับการเพาะเชื้อ แต่วิธีการ LAMP วิธีการที่ง่าย รู้ผลเร็วกว่าการเพาะเชื้อและการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการแปรผล ดังนั้นสรุปว่าวิธีการนี้มีจุดแข็งในเรื่องความง่ายในการตรวจ เหมาะสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนาที่อาศัยการยืนยันผลการอ้างอิงจากห้องปฏิบัติการอื่น[11]

นับตั้งแต่ ค.ศ. 2008 เป็นต้นมา มีการศึกษาการใช้วิธีการ LAMP สำหรับการตรวจเชื้อวัณโรค มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เห็นได้จากการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารต่างๆ 12-15 รวมถึง Pandey และคณะ เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ใช้วิธี LAMP ในการตรวจเชื้อวัณโรคตำแหน่งของยีน 16S rRNA ความจำเพาะของ LAMP primers ต่อเชื้อ *M. tuberculosis complex* ซึ่งประกอบด้วย *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* และ *M. microti* และ non-tuberculosis mycobacteria ใช้การติดตามการเกิดปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Loopamp real-time turbidimeter (LA-200; Teramecs) อาศัยการจับตะกอนความขุ่นของสารประกอบเชิงซ้อนของ magnesium pyrophosphate ที่ความยาวคลื่นที่จำเพาะ[14] ใช้วิธีการสกัด DNA ด้วยวิธีการต้มเชื้อจากตัวอย่างเสมหะ[16] ความไว (sensitivity) ของวิธีการ LAMP เป็นร้อยละ 100 (96/96) และความจำเพาะเป็นร้อยละ 94.2 สามารถตรวจพบได้ต่ำสุด 10 copies DNA ต่อมา Pandey และคณะ ได้ข้อสรุปว่าวิธีการ LAMP พิสูจน์ให้เห็นว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและมีประโยชน์สำหรับการวินิจฉัยเชื้อวัณโรค[14]

ใน ค.ศ. 2009, Zhu และคณะ, รายงานการประสบความสำเร็จจากการตรวจเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* และ *M. bovis* ด้วยวิธีการ LAMP จากตัวอย่างเสมหะ, น้ำจากเยื่อหุ้มปอด (pleural fluid) และเลือด[12] โดยจำเพาะต่อยีน rimM (encoding 16S rRNA-processing protein) ในการใช้กระบวนการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65˚C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่อุณหภูมิ 80˚C เป็นเวลา 4 นาที และอาศัยการติดตามการเปลี่ยนแปลงสีจากการผสมสาร calcein และ Manganese chloride ใช้ตัวอย่างเสมหะ decontaminate ด้วย NaOH แล้วจึงสกัด DNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (QIAamp DNA extraction mini kit, QIAGEN) ตามวิธีที่ผู้ผลิตแนะนำในคู่มือ[17] การศึกษาในครั้งนี้พบว่าความไวของปฏิกิริยา LAMP อยู่ในระดับที่ดีมาก สามารถตรวจวัดได้น้อยสุดที่ 1 pg ของ genomic DNA ให้ความไวมากกว่าวิธีการ PCR ธรรมดา Zhu และคณะ จึงสรุปได้ว่าการทดสอบด้วยวิธีการ LAMP เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดกว่าวิธีการ PCR จึงเป็นข้อได้เปรียบสำหรับการตรวจเชื้อวัณโรคในทางคลินิก[12]

นอกจากนี้ ใน ค.ศ. 2009, Lee และคณะ ยังรายงานวิธีการทดสอบแบบรู้ผลเร็ว สำหรับตรวจเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* จากตัวอย่างทางคลินิกในไต้หวัน ด้วยการผนวกกับวิธีการ reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification และ enzyme-linked immunosorbent-hybridisation (RT-LAMP-ELISA) เข้าด้วยกัน[13] จำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของ *M. tuberculosis* อาศัยการติดตามปฏิกิริยา LAMP ใช้ติดตามปฏิกิริยาด้วย colorimetry ด้วยวิธี ELISA

สำหรับการตรวจเชื้อวัณโรคในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเสมหะที่ decontaminate ด้วย NaOH และให้ผลการเพาะเชื้อเป็นบวก จำนวน 150 ราย พบว่ามีความไวและความจำเพาะเป็นร้อยละ 94.1 ร้อยละ 94 ตามลำดับ ใช้เวลาในการตรวจทั้งหมดประมาณ 5 ชั่วโมง[13]

เมื่อเร็วๆ นี้ Aryan และคณะ ใช้วิธีการ LAMP สำหรับการตรวจเชื้อ *M. tuberculosis complex* (MTBC) จากตัวอย่างเสมหะทางคลินิกในผู้ป่วยชาวอิหร่าน[15] การทดสอบใช้การเพิ่มปริมาณ DNA จากส่วนของ Insertion Sequence 6110 (IS6110) ที่จำเพาะต่อ MTBC ในการยืนยันผลการตรวจจะใช้เชื้อ 35 reference strains และ 10 non tuberculosis mycobacteria อาศัยการติดตามปฏิกิริยาด้วย SYBR Green I สามารถตรวจสอบความไวได้ถึง 5 fg จาก genomic DNA บริสุทธิ์ซึ่งเทียบเท่ากับ 1 copy ความไวในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP นี้อาจจะเพิ่มขึ้นได้ด้วยการ denature DNA แม่แบบในขั้นตอนเริ่มต้นของปฏิกิริยาก่อน แต่ถ้าไม่ได้ทำการ denature DNA แม่แบบก่อนนั้น จะสามารถทำความไวได้เพียง 200 copies ต่อ reaction เท่านั้น[18] แต่ความไวของ Aryan และคณะ ที่สามารถทำได้ด้วยวิธีการ IS*6110*-LAMP ก็ยังมีค่าสูงกว่าที่มีการรายงานการทดสอบด้วยวิธีการ LAMP กับเป้าหมายที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) อาจเนื่องด้วยมีการใช้เป้าหมาย IS*6110* ที่เป็น repetitive sequence มีจำนวนซ้ำมากถึง 20 copies ใน 1 sequence ซึ่งแตกต่างจากกรณีอื่นๆ ที่มีเป้าหมายเป็น single copy

วิธีการนี้มีใช้การตรวจกับตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคที่ได้รับการยืนยันผลการเพาะเชื้อเป็นบวก แล้วนำมาสกัด DNA ด้วยวิธีการต้ม[19] และสามารถตรวจพบเชื้อ *M. tuberculosis complex* ได้ร้อยละ 100 ดังนั้น สรุปได้ว่าการตรวจด้วยวิธี IS*6110*-LAMP ให้ผลการตรวจที่รู้ผลเร็ว มีความจำเพาะสูง สามารถลดต้นทุนได้ (ประมาณการค่าใช้จ่าย 1 ดอลลาร์ต่อตัวอย่าง) และวิธีการนี้ให้ผลการตรวจที่ถูกต้องสำหรับการตรวจ MTBC ในตัวอย่างทางคลินิก อย่างไรก็ตามผลการทดสอบนี้มาจากจำนวนตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบในปริมาณจำกัด จำเป็นต้องมีการศึกษาจากจำนวนตัวอย่างทางคลินิกในปริมาณมากขึ้น เพื่อยืนยันความถูกต้องของวิธีการ[15]

บทสรุป

LAMP เป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาที่เข้ามามีบทบาทในการทดสอบเชื้อวัณโรค *M. tuberculosis* ในตัวอย่างทางคลินิก มีข้อดีต่างๆ สรุปได้ดังนี้ 1) มีความรวดเร็วและประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ DNA ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิคงที่ 2) มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ primers ถึง 4 ชุด หรือ 6 ชุดที่ จำเพาะต่อ 6 ตำแหน่ง จะช่วยลด background จากการเกิด non specific ได้ 3) เป็นวิธีการที่ง่ายในการทดสอบ สามารถใช้กับเครื่องมือพื้นฐานทั่วๆ ไปได้ เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block 4) เป็นวิธีการที่สามารถใช้ร่วมกับปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อเพิ่มขยายยีน RNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ 5) การตรวจวัดผลการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก สามารถติดตามปฏิกิริยาจากตะกอนสีขาวขุ่นของ magnesium pyrophosphateได้ 6) สามารถวิเคราะห์ความขุ่นตั้งแต่เริ่มต้นของปฏิกิริยา LAMP ได้แบบ real-time turbidity 7) สามารถลดความเสี่ยงของ contamination กับ LAMP amplicons ตลอดจนลดการใช้ N-acetyl-L-cysteine-NaOH ในขั้นตอนการละลายเสมหะที่มีราคาแพง เนื่องจากใช้การละลายเสหะด้วยวิธีการต้ม[3, 6, 10-15, 20, 21] ข้อได้เปรียบดังกล่าวข้างต้น คาดว่า LAMP น่าจะเป็นวิธีการทางอณูชีววิทยาที่จะเข้ามามีบทบาทและใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับการตรวจสอบเชื้อวัณโรคในตัวอย่างทางคลินิกแบบรู้ผลเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่มีทรัพยากรจำกัด

เอกสารอ้างอิง

1. Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002[J]. Tuberculosis 2003;83(1-3):4.
2. Haldar S, Chakravorty S, Bhalla M, et al. Simplified detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons. J Med Microbiol 2007;56:1356-62.
3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000;28:e63.
4. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnology 2006;6:3.

5. Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols** 2008;3:877-82.
6. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 2001;289:150-4.
7. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 1991;350:91-2.
8. Wills MR, Sunderman FW, Savory J. Methods for the estimation of serum magnesium in clinical laboratories. **Magnesium** 1986;5:317-27.
9. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-9.
10. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples. J Clin Microbiol 2003;41:2616-22.
11. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. J Clin Microbiol 2007;45:1936-40.
12. Zhu RY, Zhang KX, Zhao MQ, et al. Use of visual loop-mediated isotheral amplification of rimM sequence for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis. J Microbiol Methods 2009;78:339-43.
13. Lee MF, Chen YH, Peng CF. Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification in conjunction with ELISA-hybridization assay for molecular detection of Mycobacterium tuberculosis. J Microbiol Methods 2009;76:174-80.
14. Pandey BD, Poudel A, Yoda T, et al. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. J Med Microbiol 2008;57:439-43.
15. Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, et al. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of Mycobacterium tuberculosis complex. Microbiol Res 2010;165:211-20.
16. Woods SA, Cole ST. A rapid method for the detection of potentially viable Mycobacterium leprae in human biopsies: a novel application of PCR. FEMS Microbiol Lett 1989;53:305-9.
17. Aldous WK, Pounder JI, Cloud JL, et al. Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. J Clin Microbiol 2005;43:2471-3.
18. Geojith G, Dhanasekaran S, Chandran SP, et al. Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of Mycobacterium tuberculosis isolates in a resource limited setting. J Microbiol Methods 2010;84:71-3.
19. Afghani B, Stutman HR. Polymerase chain reaction for diagnosis of M. tuberculosis: comparison of simple boiling and a conventional method for DNA extraction. Biochem Mol Med 1996;57:14-8.
20. Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J Biochem Biophys Methods 2004;59:145–57.
21. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother 2009;15:62-9.