Original Article *นิพนธ์ต้นฉบับ*

การตรวจวัณโรคแบบเร็วโดยใช้ LAMP test ตรวจเสมหะโดยตรงและตรวจจำแนกเชื้อที่เพาะขึ้น

จณิศรา ฤดีอเนกสิน* **สุปราณี บุญชู***
หทัยกาญจน์ ทันไชย* **ปฐม สวรรค์ปัญญาเลิศ***
อติภา กมลวัทน์† **เศวต ชำนาญกรม†**
พรทิพย์ ธนศรีภักดีกุล† **ธนิดา เหรียญทอง‡**
เบญจวรรณ เพชรสุขศิริ* **Yasuhiko Suzuki§**

**สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข*
†สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดนครราชสีมา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
‡สำนักวัณโรค กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข
§ศูนย์ความร่วมมือการวิจัยโรคติดต่ออุบัติใหม่และอุบัติซ้ำระหว่างประเทศไทยและประเทศญี่ปุ่น

บทคัดย่อ LAMP หรือ Loop-mediated isothermal amplification เป็นวิธีการใหม่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ DNA ที่สังเคราะห์ในหลอดทดสอบโดยใช้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิคงที่ (65°C) ไม่ต้องใช้เครื่อง PCR และตรวจสอบผลโดยการสังเกตสีด้วยตาเปล่า อ่านผลได้ภายใน 2 ชั่วโมง เนื่องจากเชื้อวัณโรคเจริญช้า การเพาะเชื้อจะใช้เวลา การพัฒนาและใช้ LAMP ในการตรวจวัณโรค จะช่วยวินิจฉัยวัณโรคได้รวดเร็วขึ้น งานวิจัยนี้ได้พัฒนา LAMP test ที่จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค มี DNA เป้าหมายในการตรวจสอบเป็นส่วนของ 16S rRNA ยีน จำนวนเชื้อต่ำสุดที่ตรวจวิเคราะห์ได้ประมาณ 9 เซลล์ ผลการประเมินประสิทธิภาพ LAMP test ในการตรวจวัณโรคแบบเร็วโดยตรวจเสมหะโดยตรง กลุ่มตัวอย่างเสมหะที่มีผลตรวจย้อมพบเชื้อติดสีทนกรดและผลเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรค (AFB+, TB culture+) จำนวน 73 ตัวอย่าง ทุกตัวอย่างให้ผลบวก LAMP กลุ่มตัวอย่างเสมหะที่ตรวจไม่พบเชื้อติดสีทนกรดแต่มีผลเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรค (AFB-, TB culture+) จำนวน 20 ตัวอย่างให้ผลบวก LAMP 15 ตัวอย่าง การใช้ LAMP test ในการจำแนกเชื้อวัณโรคอย่างเร็วจากเชื้อที่เพาะขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอาหารเหลว MGIT จำนวนเสมหะ 135 ตัวอย่าง เพาะเชื้อขึ้น 99 ตัวอย่างให้ผลบวก LAMP test จำนวน 96 ตัวอย่าง รู้ผลภายใน 2 ชั่วโมง บ่งชี้เป็นเชื้อวัณโรค สอดคล้องกับผลตรวจชีวเคมีโดยทดสอบ Niacin, Nitrate และ Catalase ซึ่งใช้เวลาในการจำแนกเชื้อหลายสัปดาห์ สามารถใช้จำแนกเชื้อที่เพาะขึ้นบนอาหารแข็งเป็นเชื้อวัณโรคเช่นเดียวกับเชื้อที่เพาะขึ้นในอาหารเหลววิธีการนี้ให้ผลตรวจรวดเร็วมากง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือซับซ้อน เพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยวัณโรค เหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คำสำคัญ: **วัณโรค, การตรวจวัณโรค, *Mycobacterium tuberculosis complex*, LAMP, MGIT**

บทนำ

วัณโรคเป็นโรคติดต่อเรื้อรังมีสาเหตุเกิดจากการติดเชื้อวัณโรค *(Mycobacterium tuberculosis)* ในปี 2550 ประเทศไทยมีรายงานพบผู้ป่วยวัณโรคประมาณ 91,000 คน และจัดอยู่ในกลุ่มประเทศที่มีจำนวนผู้ป่วยมากของโลกลำดับที่ 18[1,2]

การตรวจวินิจฉัยวัณโรคมีหลายวิธีได้แก่ การตรวจอาการทางคลินิก การทดสอบปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันทางผิวหนัง (tuberculin skin test) การตรวจวิเคราะห์ภาพถ่ายรังสีบริเวณทรวงอก การตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรดในเสมหะด้วยกล้องจุลทรรศน์ (sputum microscopy) และเพาะเชื้อ เป็นต้น อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์เชื้อด้วยวิธีการตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรด (acid-fast bacilli, AFB) และการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานมีข้อจำกัด การตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรดเป็นวิธีที่รู้ผลเร็ว ประหยัด สามารถดำเนินงานได้ในพื้นที่ แต่ต้องอาศัยผู้ชำนาญในการอ่านผล มีความไวในการตรวจวิเคราะห์ต่ำ และไม่สามารถจำแนกเชื้อวัณโรคได้ เป็นวิธีที่บอกได้เพียงการตรวจพบเชื้อติดสีทนกรด การตรวจวัณโรคด้วยวิธีการเพาะเชื้อเป็นวิธีมีความไวสูงแต่ต้องใช้เวลา 4 ถึง 8 สัปดาห์ และต้องใช้วิธีทางปฏิกิริยาชีวเคมีทดสอบต่อจึงจำแนกเชื้อวัณโรคได้[3] การตรวจพบวัณโรคที่ล่าช้าเป็นปัญหาต่อการควบคุมวัณโรค

ปัจจุบันมีเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยระบบ BACTEC MGIT 960 เป็นการเพาะเชื้อในหลอดอาหาร MGIT ที่สะดวก รวดเร็ว ภายในหลอดอาหาร MGIT ประกอบด้วย อาหารเพาะเชื้อชนิดเหลว modified Middlebrook 7H9 ที่เติมสาร OADC enrichment และยาปฏิชีวนะในหลอด 7 มิลลิลิตร ที่ก้นหลอดอาหารจะมี sensor ตรวจสอบสารเรืองแสงเพื่อใช้แสดงการเจริญของเชื้อมัยโคแบคทีเรียโดยระบบจะตรวจสอบการเรืองแสงอัตโนมัติเมื่อมีการเจริญเติบโตของเชื้อภายในหลอดเพาะเลี้ยงออกซิเจนในหลอดจะลดลง การเรืองแสงเพิ่มขึ้น การเพาะเลี้ยงเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยระบบนี้ให้ผลการเพาะเชื้อเจริญได้เร็วกว่าการเพาะเชื้อเจริญบนอาหารแข็ง[4,5] การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างติดเชื้อมัยโคแบคทีเรียด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อมัยโคแบคทีเรียในระบบ BACTEC MGIT 960 ยังมีข้อจำกัดตรงที่ไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อมัยโคแบคทีเรียที่เจริญได้ ต้องใช้วิธีการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อที่เพาะเจริญในระบบ MGIT ร่วมด้วย

การตรวจวัณโรคด้วยเทคนิค nucleic acid amplification assay สามารถตรวจรู้ผลเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง มีการใช้ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ[6] เทคนิคการวิเคราะห์นี้ได้แก่ วิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อวัณโรค แต่เนื่องจากเป็นวิธีการที่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน และมีต้นทุนสูง จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ วิธี Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่มีหลักการทำงานคล้ายกับของ PCR แต่มีวิธีการทำปฏิกิริยาที่ง่ายกว่า สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อวัณโรคในหลอดทดสอบที่อุณหภูมิ เพียงอุณหภูมิเดียวตลอดการทำปฏิกิริยา มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่า LAMP มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อชนิดต่าง ๆ[4,7-14] เนื่องจากการวิเคราะห์เชื้อวัณโรคที่ทราบผลเร็ว แม่นยำ และประหยัด เป็นที่ต้องการ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธี LAMP เพื่อใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อวัณโรคจากตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยวัณโรคโดยตรง โดยประเมินความไว ความจำเพาะของวิธีการและเพื่อใช้ตรวจยืนยันกลุ่มเชื้อวัณโรค *(Mycobacterium tuberculosis complex)* จากเชื้อที่เพาะขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างเสมหะและการตรวจวิเคราะห์ปรกติ

การศึกษาเชิงพรรณนานี้ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาคือ เสมหะ (sputum) จากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 จังหวัดนครราชสีมา ระยะเวลาศึกษา ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2549 ถึงตุลาคม 2551 โดยเริ่มตั้งแต่การพัฒนาวิธีการ LAMP จนถึงการศึกษาการตรวจตัวอย่างติดเชื้อวัณโรค โดยเก็บเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคเพื่อการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการตามปรกติได้แก่ การตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรดด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้วิธี Ziehl-Neelsen และการเพาะเชื้อจากตัวอย่างเสมหะที่ผ่านขั้นตอนกำจัดเชื้อปนเปื้อน

ด้วยวิธี N-acetyl-L-cystein-sodium hydroxide method (NACL-NaOH)[3] โดยเพาะเชื้อบนอาหารแข็ง Lowenstein Jensen medium และอาหารเหลว MGIT ซึ่งเพาะเชื้อได้ผลเร็ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4-8 สัปดาห์ สังเกตเชื้อเจริญและพิสูจน์ยืนยันเชื้อวัณโรคด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีได้แก่ การทดสอบปฏิกิริยา Niacin, Nitrate reduction และ Catalase ที่ pH 7 อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส และบันทึกผล การตรวจหาเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LAMP ใช้ส่วนที่เหลือของตัวอย่างจากการตรวจวิเคราะห์ปรกติ โดยตัวอย่างถูกส่งมายังห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ขณะส่งตัวอย่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเสมหะที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคเพื่อการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยตรงด้วยวิธี LAMP มี 93 ตัวอย่าง และกลุ่มตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคเพื่อการเพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรีย และยืนยันเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LAMP มี 135 ตัวอย่าง

การสกัด DNA

นำสารละลายตะกอนตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการกำจัดเชื้อปนเปื้อนตามวิธี NACL-NaOH ข้างต้น 400 ไมโครลิตร มาสกัด DNA โดยใช้ lysis buffer (Qiagen) ดัดแปลงวิธีการเพื่อนำไปใช้ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LAMP

การตรวจวิเคราะห์วัณโรคด้วยวิธี LAMP

ปฏิกิริยา LAMP ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ดัดแปลงจากวิธีการ Pandey และคณะ[15] อ่านผลของปฏิกิริยาโดยสังเกตการเปลี่ยนสีจากสีส้มเป็นสีเขียว หรือมีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตหรือตรวจสอบผลผลิต LAMP หลังเกิดปฏิกิริยาด้วย 2% agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ความไว และความจำเพาะ

วิเคราะห์ความไว ทดสอบหาจำนวนเชื้อวัณโรคที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหาได้ด้วยวิธี LAMP โดยเพาะเลี้ยงเชื้อวัณโรคในอาหารเหลว Sauton มีจำนวนเซลล์เทียบความขุ่น (Optical density) ประมาณ 0.6 ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร แล้วเจือจางเซลล์เป็นลำดับ 10 เท่า และนับจำนวนโคโลนีของเชื้อในแต่ละระดับเชื้อเจือจางที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยง ทำการสกัด DNA และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยา LAMP

วิเคราะห์ความจำเพาะ ทดสอบปฏิกิริยา LAMP กับ DNA ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียอ้างอิง 15 ชนิด และกับ DNA ของเชื้อแบคทีเรียอ้างอิง 13 ชนิด เปรียบเทียบการทดสอบกับ DNA ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์อ้างอิง $H_{37}Ra$

ประเมินวิธีการ LAMP ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยตรงจากตัวอย่างเสมหะ

วิธีการ LAMP จะถูกประเมินผลความไว ความจำเพาะของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเสมหะโดยตรง เปรียบเทียบกับความไว และความจำเพาะของวิธีการตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรด และวิธีการเพาะเลี้ยง

การพิสูจน์ยืนยันเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้นจากอาหารเลี้ยงเพาะเชื้อ

เชื้อที่เพาะขึ้นในอาหารเหลว MGIT

นำตะกอนเซลล์จากตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการกำจัดแบคทีเรียปนเปื้อนด้วย NACL-NaOH ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MGIT ในเครื่องอัตโนมัติ หลอดเพาะเลี้ยงที่มีเชื้อเจริญเติบโตจะถูกตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อเบื้องต้นด้วยวิธีการตรวจหาเชื้อย้อมติดสีทนกรดด้วยกล้องจุลทรรศน์เชื้อจากหลอดอาหารเหลว MGIT ที่ตรวจพบเชื้อย้อมติดสีทนกรดทุกหลอดจะถูกเก็บมา 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงความเร็ว 14,000 rpm 5 นาทีเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 ไมโครลิตรในหลอดมีฝาปิดสนิท สกัด DNA

โดยวิธีการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำสารละลาย DNA ที่ได้ไปทดสอบปฏิกิริยา LAMP เพื่อพิสูจน์เชื้อวัณโรค เชื้อที่เหลือในหลอดเพาะเชื้อถูกนำมาทดสอบยืนยันเชื้อวัณโรคทางปฏิกิริยาชีวเคมีได้แก่ Niacin, Nitrate reduction และ Catalase ที่ pH 7 ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ตามวิธีมาตรฐานในการจำแนกเชื้อวัณโรค[6] และทดสอบการเจริญบนอาหารเพาะเชื้อที่เติมสาร Paranitrobenzoic acid (PNB)[16]

เชื้อที่เพาะขึ้นบนอาหารแข็ง Lowenstein Jensen medium

เขี่ยเก็บโคโลนีเชื้อที่เพาะได้จากตัวอย่างเสมหะผู้ป่วยวัณโรคบนอาหารแข็ง ละลายโคโลนีด้วยน้ำปราศจากเชื้อ 100 ไมโครลิตรในหลอดที่มีฝาปิดสนิท สกัด DNA โดยวิธีการต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำสารละลาย DNA ที่ได้ไปทดสอบปฏิกิริยา LAMP เพื่อพิสูจน์เชื้อวัณโรค

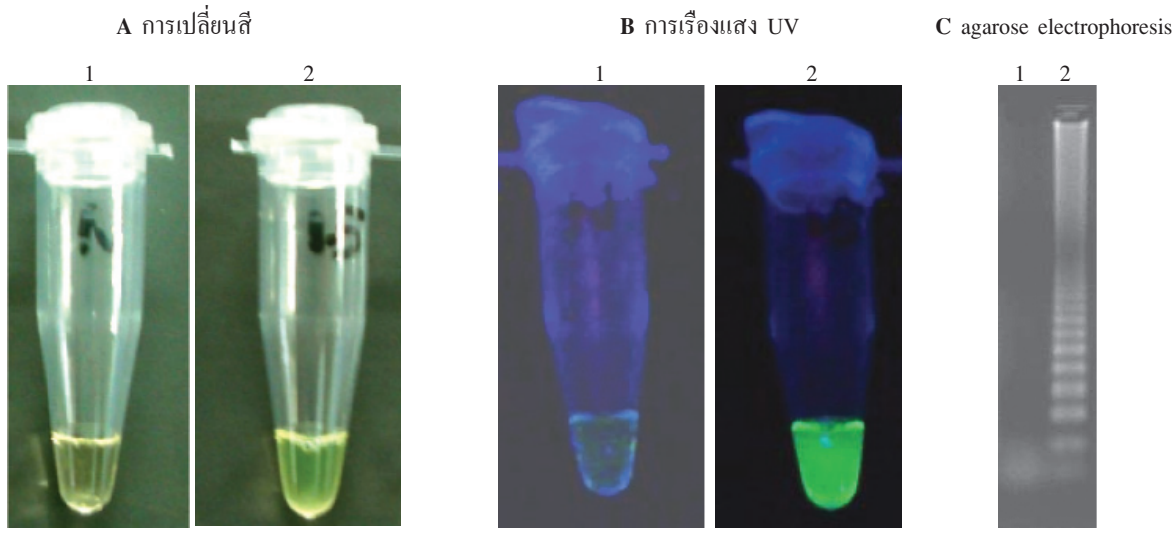
ประเมินผลการจำแนกเชื้อวัณโรคของวิธี LAMP จากเชื้อที่เพาะขึ้นในอาหารเหลว MGIT และอาหารแข็ง Lowenstein Jensen medium เปรียบเทียบกับผลการพิสูจน์จำแนกเชื้อโดยตรวจสอบคุณสมบัติทางปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อวัณโรค

ผลการศึกษา

การทดสอบปฏิกิริยา LAMP เบื้องต้น

หลอดทดสอบ LAMP ที่มี DNA ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์อ้างอิง $H_{37}Ra$ หลังจากบ่มปฏิกิริยา 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง มีการสังเคราะห์ DNA เป้าหมายในการตรวจสอบเป็นส่วนของ 16S rRNA ยีนของเชื้อวัณโรค ทำให้สีของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเขียวเรืองแสง UV และสามารถตรวจหาผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis แต่เมื่อเทียบกับหลอดที่ไม่มี DNA ของเชื้อวัณโรค ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (รูปที่ 1)

ความไวของวิธีการ LAMP จากการเตรียมเชื้อวัณโรคสายพันธุ์อ้างอิง $H_{37}Ra$ เจือจางที่จำนวนเชื้อต่าง ๆ โดยเจือจางเป็นลำดับ 10 เท่า นับจำนวนเชื้อโดยเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจหาเชื้อแต่ละระดับเจือจางด้วยปฏิกิริยา LAMP พบว่าปฏิกิริยาให้ผลบวกในหลอดที่มี DNA ซึ่งสกัดได้จากเซลล์เจือจาง



รูปที่ 1 การตรวจสอบผล LAMP หลังทำปฏิกิริยาด้วยการสังเกตการเปลี่ยนสี (A) สังเกตการเรืองแสง UV (B) และการตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วย gel electrophoresis (C) หลอด 1 หรือ lane 1 ไม่มี DNA ของเชื้อวัณโรค (negative) หลอด 2 หรือ lane 2 มี DNA ของเชื้อวัณโรค (positive)

ระดับตั้งแต่หนึ่งในสิบเท่าถึงหนึ่งในสิบล้านเท่า (10^{-1} ถึง 10^{-7} เท่า) พบว่าที่ระดับเซลล์เจือจาง 10^{-6} เท่า สามารถนับจำนวนเชื้อวัณโรคได้ 9 เซลล์ และที่ระดับเจือจาง 10^{-7} เท่าตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยา LAMP (รูปที่ 2)

การทดสอบความจำเพาะต่อการตรวจเชื้อวัณโรคของวิธี LAMP

เมื่อทดสอบปฏิกิริยา LAMP กับ DNA ของมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่น และ DNA ของเชื้อแบคทีเรียทั่วไป วิธีการ LAMP ให้ผลบวกเฉพาะกับหลอดที่มี DNA ของเชื้อ *M. tuberculosis* หรือ *M. tuberculosis complex (M. bovis, M. africanum, M. microtti)* แต่ให้ผลลบกับ DNA ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่น และ DNA ของเชื้อแบคทีเรียชนิดทั่วไปทุกรายการ (ตารางที่ 1)

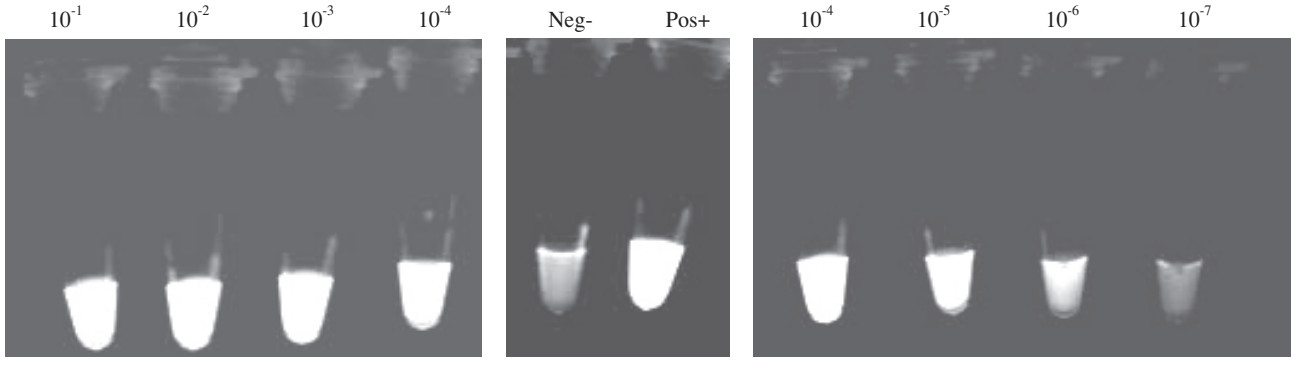
การใช้ LAMP ตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยตรงจากเสมหะ

ตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคที่มีผลการตรวจพบเชื้อย้อมติดสีทนกรดและเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรค (AFB+, TB culture+) 73 ตัวอย่าง LAMP ให้ผลบวกได้ทั้ง 73 ตัวอย่าง หรือคิดเป็นร้อยละ 100 ตัวอย่างเสมหะที่ไม่พบเชื้อย้อมติดสีทนกรดแต่ผลเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรค (AFB-, TB culture+) 20 รายให้ผลบวก TB-LAMP 15 ราย หรือคิดเป็นร้อยละ 75 (ตารางที่ 2)

การใช้ LAMP ตรวจจำแนกเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เชื้อจากอาหารเหลว MGIT

จากการเพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรียในตัวอย่างเสมหะที่ผ่านการกำจัดสิ่งปนเปื้อนแล้วในอาหารเพาะเลี้ยง MGIT เวลา 3-48 วัน จำนวน 135 ตัวอย่างให้ผลเพาะเชื้อพบเชื้อเจริญมี 99 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อย้อมติดสีทนกรดทั้ง 99 ตัวอย่าง แต่เมื่อพิสูจน์ยืนยันเชื้อวัณโรคด้วยวิธี LAMP ให้ผลบวก 96 ตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อวัณโรคด้วยการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีทั้ง 96 ตัวอย่างบ่งชี้เป็นเชื้อวัณโรคโดยการทดสอบ Niacin ให้ผลบวก การทดสอบ Catalase อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียสให้ผลลบ การทดสอบ Nitrate reduction ให้ผลบวก และไม่พบการเจริญในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสาร Paranitrobenzoic acid ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อจาก MGIT 3 ตัวอย่างที่มีคุณสมบัติย้อมติดสีทนกรดเป็นเชื้อมัยโคแบคทีเรียอื่นที่ให้ผลทดสอบ LAMP เป็นลบ เมื่อทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางปฏิกิริยาเคมีให้ผลดังนี้ ทดสอบ Niacin ให้ผลลบ ทดสอบ Catalase อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียสให้ผลบวก การทดสอบ Nitrate reduction ให้



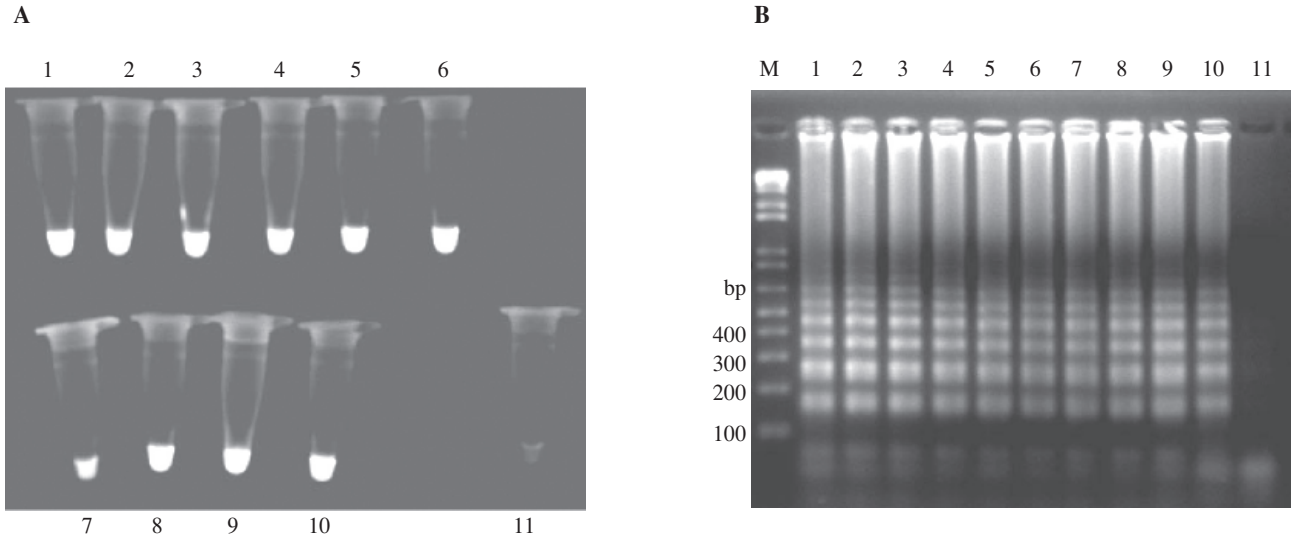
รูปที่ 2 การวิเคราะห์ความไวของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจหาเชื้อวัณโรคโดยเซลล์เจือจางระดับ ต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}(9 เซลล์) และ 10^{-7} เท่าตามลำดับ, หลอด Neg- คือ Negative control ไม่มี DNA ของเชื้อวัณโรค, หลอด Pos+ คือ หลอด Positive control มี DNA ของเชื้อวัณโรค

ตารางที่ 1 การทดสอบปฏิกิริยา LAMP กับ DNA เชื้อมัยโคแบคทีเรียและ DNA เชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ

Order	Mycobacteria / Bacteria	Order	Mycobacteria / Bacteria
1	*M. tuberculosis*	22	*M. intracellulare* ATCC15985
2	*M. bovis* Ravenel	23	*M. intracellulare* ATCC15987
3	*M. bovis* BCG Tokyo	24	*M. intracellulare* ATCC19075
4	*M. africanum* ATCC25420	25	*M. intracellulare* ATCC19076
5	*M. microtti* TC77	26	*M. intracellulare* ATCC19078
6	*M. kansasii* ATCC12476	27	*M. smegmatis* mc^2 155
7	*M. kansasii* Bostrum	28	*Achromobacter xylosoxidans* DMST 0803
8	*M. shimoidei* ATCC27962	29	*Acinetobacter haemolyticus* DMST 1826
9	*M. scrofulaceum* ATCC19981	30	*Bacillus brevis* DMST 3653
10	*M. nonchromogenicum* ATCC19530	31	*Klebsiella pneumoniae* DMST 2957
11	*M. gordonae* ATCC14470	32	*Legionella pnemophila* serogroup 1 DMST 0455
12	*M. xenopi* ATCC19250	33	*Pseudomonas aeruginosa* DMST 2960
13	*M. chelonae* ATCC19977	34	*Shigella boydii* type 10 DMST 3395
14	*M. fortuitum* ATCC6841	35	*Staphylococcus aureus* DMST 1339
15	*M. avium* ATCC17938	36	*Stenotrophomonas maltophilia* DMST 3322
16	*M. avium* N238	37	*Bacillus sphaericus* DMST 4315
17	*M. avium* N247	38	*Escherichia coli* DH5α
18	*M. avium* 01-16	39	*Haemophilus influenzae* serotype a DMST 8999
19	*M. avium* P50	40	*Haemophilus influenzae* serotype b DMST 16123
20	*M. avium* Kirchberg	41	*Haemophilus influenzae* serotype a DMST 9000
21	*M. intracellulare* ATCC15984	42	*Streptococcus pneumoniae* DMST 3264

ตารางที่ 2 การตรวจวัณโรคจากตัวอย่างเสมหะจากผู้ป่วยวัณโรคด้วยวิธี LAMP

กลุ่มตัวอย่างเสมหะ	จำนวนตัวอย่าง		ความไว (เปอร์เซ็นต์)
	ผล LAMP บวก	จำนวนทั้งหมด	
1. ตรวจพบเชื้อย้อมติดสีทนกรดและให้ผลเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรค (AFB+, TB culture+)	73	73	100
2. ตรวจไม่พบเชื้อย้อมติดสีทนกรด และให้ผลเพาะพบเชื้อวัณโรค (AFB-, TB culture+)	15	20	75



รูปที่ 3 การตรวจทดสอบ LAMP หลังจากทำปฏิกิริยากับ DNA จากโคโลนีของเชื้อวัณโรคที่เพาะแยกได้จากผู้ป่วย ตรวจสอบการเรืองแสง UV (รูป A) และตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วย 2% agarose gel electrophoresis (รูป B) หลอดหรือแถว 1-6 และ 8-10 คือ DNA จากโคโลนีของเชื้อ *M. tuberculosis* ที่แยกได้จากผู้ป่วยคนที่ 1-6 และคนที่ 7-9 ตามลำดับ หลอดที่หรือแถว 7 คือ DNA ของเชื้อวัณโรคสายพันธุ์อ้างอิง $H_{37}Ra$ (positive control) หลอดหรือแถว 11 ไม่มี DNA ของเชื้อวัณโรค (negative control) แถว M คือ DNA marker

ผลบวก และมีการเจริญของเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสาร Paranitrobenzoic acid

โคโลนีของเชื้อจากอาหารแข็ง Lowentein Jensen medium

การทดสอบปฏิกิริยา LAMP กับ DNA ของเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองอ่อน แห้ง ขรุขระ เป็นหยัก (คล้ายดอกกะหล่ำ) ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อวัณโรค 38 โคโลนีที่เจริญขึ้นจากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วย 38 ราย ให้ผลปฏิกิริยา LAMP เป็นบวกทุกโคโลนีบ่งชี้เป็นเชื้อวัณโรค ผลทดสอบ LAMP บางส่วนดังแสดงผลในรูปที่ 3

วิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์วัณโรคด้วยวิธี LAMP มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ตรวจทราบผลได้ภายใน 1-2 ชั่วโมง ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีการทำงานซับซ้อน และมีต้นทุนต่ำ (ประมาณ 200 บาท) ปฏิกิริยา LAMP ที่ใช้ตรวจหา DNA หรือ RNA มีข้อเด่นกว่าปฏิกิริยา PCR หลายข้อ ข้อแรกการเกิดปฏิกิริยา LAMP ทำได้ในสภาวะอุณหภูมิเดียว ข้อสองระยะเวลาการทำปฏิกิริยาของวิธี LAMP ใช้เวลาสั้น 1 ชั่วโมง ข้อสามการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา LAMP มีหลายแบบให้เลือกได้แก่ การตรวจสอบการเปลี่ยนสีปฏิกิริยา การตรวจสอบการเรืองแสง UV และการตรวจสอบผลผลิตบน agarose gel electrophoresis เป็นต้น[7-18, 20] Notomi และคณะ[11] ได้รายงานว่า LAMP จะสังเคราะห์ผลผลิต DNA เป้าหมายเพิ่มขึ้นในระดับพันล้านชุด (10^9 copies) หลังจากทำปฏิกิริยากับ DNA หรือ RNA ต้นแบบ ในระยะเวลาไม่ถึงชั่วโมง จากผลการศึกษาของงานวิจัยนี้ซึ่งได้พัฒนาปรับปรุงวิธี LAMP ขึ้นเพื่อนำมาใช้ตรวจหา DNA ของเชื้อวัณโรคเบื้องต้นพบว่าสามารถตรวจหาได้ในระดับ DNA ต่ำสุด (detection limit) จากจำนวนเชื้อวัณโรค 9 เซลล์หรือประมาณ 45 เฟมโตกรัม ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นซึ่งพบว่า LAMP ให้ผลทดสอบเป็นบวกกับ DNA ของเชื้อวัณโรคได้ในระดับต่ำ ๆ ตั้งแต่ 5-50 ชุด[7] และ100 เฟมโตกรัม[15]

ความไวในการตรวจพบเชื้อวัณโรคจากตัวอย่างเสมหะโดยตรงในกลุ่มที่ตรวจพบเชื้อวัณโรคที่มีผล AFB+, Culture+ โดยวิธี LAMP ของงานวิจัยนี้ได้ผลร้อยละ 100 สอดคล้องกับความไวในการตรวจพบเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะที่มี AFB+, Culture+ โดยวิธี LAMP ของ Boehme และคณะ[17] และ Pandey และคณะ[15] ได้ผลร้อยละ 97.7 และร้อยละ 100 ตามลำดับ ความไวในการตรวจพบเชื้อวัณโรคในกลุ่มตัวอย่างเสมหะที่มีผล AFB-, culture+ ของงานวิจัยนี้ได้ผลร้อยละ 75 ซึ่งมีความไวสูงกว่ารายงานของ Boechme และคณะ[17] พบว่ามีความไวเพียงร้อยละ 48.8 อาจเนื่องจากการใช้วิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างเสมหะแตกต่างกัน ทำให้ได้ปริมาณ DNA แตกต่างกัน ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาดัดแปลงวิธีการสกัด DNA จากตัวอย่างเสมหะให้ได้ความเข้มข้น DNA เพิ่มสูงขึ้นเพื่อใช้ทดสอบหาวัณโรคได้มากที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ ในขณะเดียวกัน LAMP ที่ใช้ในงานนี้สามารถตรวจหา DNA ได้เฉพาะของเชื้อ *M. tuberculosis complex* ไม่มีผลปฏิกิริยาร่วมกับ DNA ของเชื้อมัยโคแบคทีเรียชนิดอื่น อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ควรจะได้มีการทดสอบตัวอย่างเสมหะของประชากรกลุ่มอื่นโดยละเอียดก่อนการนำไปใช้ได้จริงอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

การศึกษาครั้งนี้พบว่า วิธีการ LAMP มีประโยชน์ในงานตรวจยืนยันจำแนกเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งชนิดเหลวและชนิดแข็ง อาหารเหลว MGIT เป็นเทคโนโลยีที่มีใช้กันแพร่หลายในห้องปฏิบัติการเพาะเชื้อมัยโคแบคทีเรีย สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อมัยโคแบคทีเรียในเวลาเดียวกันได้ 960 ตัวอย่างในพื้นที่ที่มีจำกัด ให้ผลเพาะเชื้อที่ทราบผลการเจริญของวัณโรคได้ 6-14 วัน[4,5] อย่างไรก็ตามการตรวจวิเคราะห์เชื้อมัยโคแบคทีเรียภายหลังทราบผลการเจริญของเชื้อในหลอดอาหารเหลว MGIT มีความสำคัญมากต้องอาศัยวิธีการตรวจยืนยันการจำแนกเชื้อ การตรวจยืนยันเชื้อด้วยวิธีการทดสอบคุณสมบัติทางปฏิกิริยาชีวเคมีนั้นต้องใช้เวลานานโดยขยายเวลาเพาะบ่มเพื่อให้ได้เชื้อในปริมาณมาก หรือในบางครั้งอาจจะต้องผ่านขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จึงจะทดสอบได้ ดังนั้นการทดสอบจำแนกเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิมทำให้ทราบผลล่าช้า การใช้เทคโนโลยี nucleic acid amplification assay ช่วยตรวจยืนยันเชื้อที่เจริญขึ้นในระบบเพาะเลี้ยง MGIT โดยทำให้ทราบผลพิสูจน์เชื้อวัณโรคได้เร็วขึ้นน่าจะดี ผลการศึกษาวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าวิธีการ LAMP ให้ผลตรวจยืนยันเชื้อวัณโรคจากหลอดอาหารเหลว MGIT ได้อย่างแม่นยำสอดคล้องกับผลการทดสอบคุณสมบัติทางปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อวัณโรคได้ร้อยละ 100 เช่นเดียวกับผลตรวจยืนยันเชื้อวัณโรคที่เพาะเจริญขึ้นจากตัวอย่างเสมหะของผู้ป่วยวัณโรค 38 รายบนอาหารเพาะเชื้อชนิดแข็ง ที่สำคัญเวลาทราบผลการทดสอบยืนยันเชื้อวัณโรคทราบได้ภายในเวลา 2 ชั่วโมงภายหลังจากพบการเจริญของเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยง ในขณะที่วิธีการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีต้องขยายเวลาเพาะบ่มเชื้อมากกว่า 1 เดือน นับว่าการตรวจเชื้อวัณโรคที่เจริญในอาหารเหลว MGIT ด้วยวิธีการ LAMP นั้นเหมาะกับเทคโนโลยีเพาะเชื้อได้ผลเร็วด้วย MGIT โดยทำให้ทราบผลพิสูจน์เชื้อในเวลารวดเร็วมากหลังจากเพาะเชื้อขึ้น

สรุป

การตรวจเชื้อวัณโรคโดยวิธีการ LAMP ทำได้ง่าย วิธีการนี้มีความไวและความจำเพาะสูง ในการใช้วิธีการนี้ตรวจหาเชื้อวัณโรคในตัวอย่างเสมหะโดยตรง ให้ผลตรวจรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ในกลุ่มตัวอย่างเสมหะติดเชื้อที่ให้ผลพบเชื้อย้อมติดสีทนกรดและผลเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรคได้ร้อยละ 100 ในกลุ่มตัวอย่างเสมหะติดเชื้อที่ตรวจไม่พบเชื้อย้อมติดสีทนกรดแต่ให้ผลเพาะเชื้อพบเชื้อวัณโรคได้ร้อยละ 75 สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อวัณโรคที่เพาะขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผลตรวจรวดเร็วในห้องปฏิบัติการ เป็นวิธีการที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในพื้นที่ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผู้บริหาร และเจ้าหน้าที่สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 5 นครราชสีมาที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัย สำนักวัณโรคที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านวิชาการ ศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขหน่วยงานต้นสังกัดที่สนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณผู้ป่วยอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการวิจัยทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. Epidemiology: global report 2009 [online] [cited 2009 Jun 30]; Available from: URL: http: // www.who.int/tb/ publication/global-report/2009/en/index.html.
2. World Health Organization. Global tuberculosis control: Thailand country profile 2009. Geneva: WHO; 2009.
3. Kent BD, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta: US Department of health and human services, Centers for disease control; 1985.
4. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott B, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol 1999; 37:748-52.
5. Sun JR, Lee SY, Perng CL, Lu JJ. Detection *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC MGIT 960 cultures by inhouse IS6110-based PCR assay in routine clinical practice. J Formos Med Assoc 2009; 108:119-25.
6. Centers for Disease Control and Prevention. National action plan to combat multidrug-resistant tuberculosis: summary of conference; management of persons exposed to multidrug-resistant tuberculosis. Morbid Mortal Weekly Rep 1992; 41:5-48.
7. Iwamoto I, 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 Mirobiol 2003; 41:2616-22.
8. Kimura H, Ihira M, Enomoto Y, Kawada J, Ito J, Morishima T, et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. Med Microbiol Immunol 2005; 194:181-5.
9. Kuboki N, Inoue N, Sakurarai T, Die Cello F, Grab DJ, Suzuki H, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of *African trypanosomes.* J Clin Microbiol 2003; 41:5517-24.
10. Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, et al. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-Loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2006; 44:3268-73.
11. Notomi T, Okayma H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): e63.
12. Parida M, Posadas G, Inoue GPS, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. J Clin Microbiol 2004; 41:5517-24.
13. Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotype by a real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J Clin Microbiol 2005; 43:2895-903.
14. Yoda T, Suzuki Y, Yamazaki K, Sakon N, Kanki M, Aoyama I, et al. Evaluation and application of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of noroviruses. J Med Virol 2007; 79:326-34.
15. Pandey BD, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, 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.
16. Tsukamura M. Tsukamura S. Differntiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by ρ-nitrobenzoic acid susceptibility. Tubercle 1964; 45:64-5.
17. Behme CC, Nabeta P, Henostroza G, Rapib R, Rahim Z, Gerhardt M, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. J Clin Mirobiol 2007; 45:1936-40.
18. Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, et al. Use of loop-mediated iso-

thermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp: paratuberculosis. J Clin Microbiol 2003; 41:4359-65.

19. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenature template. Clin Chem 2001; 47:1742-43.
20. Saleh M, Soliman H, EI-Matbouli M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Renibacterium salmoninarum,* the causative agent of bacterial kidney disease. Dis Aquat Organ 2008; 81:143-51.

Abstract **Rapid Detection of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex in Sputum and in Culture Growth by LAMP Test**

Janisara Rudeeaneksin*, Supranee Bunchoo*, Hathaikan Tanchai*, Pathom Sawanpanyalert*, Sawet Chamnangrom†, Atipa Kamolwat†, Porntip Thansripakdeekul†, Dhanida Rienthong‡, Benjawan Phetsuksiri*, Yasuhiko Suzuki§

*National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand, †Disease Prevention and Control 5th Nakhon Ratchasima, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand, ‡Bureau of Tuberculosis, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Thailand, §Department of Global Epidemiology, Hokkaido University, Research Center for Zoonosis Control, Japan

Journal of Health Science **2010; 19:300-10.**

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a new nucleic acid amplification assay, which could be conducted under isothermal conditions (65ºC). The reaction could be completed within 2 hours without the need of PCR machine and the amplicons could be detected by naked eye visualization. Because of the time-consuming in culturing *Mycobacterium tuberculosis* due to its slow growth rate, the development and application of LAMP for rapid diagnosis of tuberculosis would be useful. In this study, an efficient LAMP which specifically detected members of *Mycobacterium tuberculosis* complex was developed. Species-specific primers were designed by targeting 16S rRNA gene of *M. tuberculosis*. The method was sensitive, as it could detect as low as nine bacilli in decontaminated sputum. When it was used in direct detection of *M. tuberculosis* in sputum, LAMP method showed positive results in 73 of 73 smear positive-culture positive tuberculosis specimens (100%) and in 15 of 20 smear negative-culture positive tuberculosis specimens (75%). In addition, LAMP was evaluated for rapid identification of culture isolates grown in a liquid medium (MGIT). Ninety nine sputum specimens from 135 patients with clinically diagnosed pulmonary tuberculosis were positive according to the Bactec MGIT 960 system. Among these, 96 were positive and 3 were negative according to the LAMP test. Compared to the convention identification methods by biochemical tests; Niacin, Nitrate reduction and Catalase tests (at 68ºC, pH 7), LAMP method correctly identified all 96 *M. tuberculosis* isolates and gave negative results for all non-tuberculous mycobacteria. LAMP method was also able to rapidly identify *M. tuberculosis* grown on solid media. In conclusion, the fast, easy, sensitive, and specific LAMP test established here might be useful for rapid detection and identification of *M. tuberculosis* in clinical specimens.

Key words: **tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis,* LAMP, MGIT**