บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเนื้อสุกรในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารมีความสำคัญต่อผู้บริโภคโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของมุสลิมและยิว การระบุส่วนประกอบของอาหารในฉลากของผลิตภัณฑ์จะทำให้ผู้บริโภคมั่นใจในการเลือกซื้ออาหารว่าจะไม่มีการปลอมปนส่วนประกอบอื่นใดนอกเหนือจากที่ระบุไว้ การรับรองมาตรฐานเป็นอีกกลไกหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพและกระบวนการผลิตให้มีความสะอาดและปลอดภัยรวมทั้งเป็นไปตามบทบัญญัติของศาสนาอิสลามที่มีกำหนดไว้อย่างชัดเจน เพื่อเป็นการปกป้องสิทธิและคุ้มครองผู้บริโภคให้บริโภคอาหารที่ฮาลาลเท่านั้น คือต้องไม่มีการปนเปื้อนของสิ่งต้องห้ามทางศาสนาโดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อสุกร การตรวจสอบการปนเปื้อนโดยใช้วิธีการทางวิทยาศาสตร์จึงมีความสำคัญอย่างมาก

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเนื้อสุกรให้ดีขึ้น โดยใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) โดยจะเริ่มต้นจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจาดเนื้อสัตว์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Wizard Genomic DNA Purification Kit ในการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสุกร เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่และเนื้อวัว และผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากสัตว์ พบว่ามีผลิตภัณฑ์ และเนื้อสัตว์บางชนิด ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาได้หรือได้ดีเอ็นเอในปริมาณที่น้อยมาก เนื่องจากในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจะต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน เช่น ต้ม ทอด นึ่ง ผัด อบ เผา ย่าง และการฆ่าเชื้อ เป็นต้น ซึ่งอาจทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพ (61, 62) อีกทั้งในการสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์อาหาร หรือเนื้อสัตว์ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายโปรตีนในขั้น Proteinase K ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานานอย่างน้อยถึง 3 ชั่วโมง (63, 64) ดังนั้นจึงอาจต้องมีวิธีการพัฒนาขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้น และลดระยะเวลาในการสกัดเพื่อให้มีความรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์มากยิ่งขึ้น

การตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค LAMP จะใช้ไพร์เมอร์ทั้งหมด 4 เส้น คือ FIP, BIP, F3 และ B3 โดยจะใช้ลำดับเบสของ Mitochondrial DNA บริเวณยีน *cytochome b* ของสุกร ซึ่งเป็น Consearve region มี High copy number และมีความทนทาน (65-67) ผลไพร์เมอร์ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer Explorer V3 ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 36 ชุด ซึ่งให้ค่าไดเมอร์ ที่ -2.49 ทั้งหมด ซึ่งไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรมีค่าไดเมอร์ (Dimer) ไม่น้อยกว่า -2.5 (33) ดังนั้นไพรเมอร์ทั้ง 36 ชุด อาจมีความเสี่ยงที่จะเกิดไดเมอร์ได้ อย่างไรก็ตามนอกจากเกณฑ์ของค่าไดเมอร์แล้วยังต้องพิจารณาถึงเกณฑ์อื่นๆประกอบด้วยดังนี้ ค่า Tm ในแต่ละบริเวณของไพรเมอร์คือ

บริเวณ F1c และ B1c ต้องมีค่าประมาณ 65 องศาเซลเซียส (64-66 องศาเซลเซียส), บริเวณ F2, B2, F3 และ B3 ประมาณ 60 องศาเซลเซียส (59-61 องศาเซลเซียส) ความเสถียรที่บริเวณปลาย 3' ของบริเวณ F2/B2, F3/B3, ปลาย 5' ของบริเวณ F1c/B1c ต้องมีค่าพลังงานอิสระ (ΔG) เท่ากับ -4 กิโลแคลอรี่/โมล หรือน้อยกว่า ค่า GC รวมจะประมาณ 40% ถึง65เปอร์เซนต์ โดยค่า GC ดีที่สุดควรอยู่ที่ 50เปอร์เซนต์ ถึง 60เปอร์เซนต์ ไพร์เมอร์จะต้องไม่สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิเพื่อป้องการการเกิดไดเมอร์ ความยาวและระยะห่างระหว่างปลาย F2 และปลาย B2 จะประมาณ 120-160 คู่เบส ระหว่างปลาย 5' ของ F2 ถึงปลาย 5' ของ F1 จะประมาณ 40 -60 คู่เบส และระหว่าง F2 ถึง ปลาย F3 ประมาณ 0-60 คู่เบส (33) ไพร์เมอร์ที่สังเคราะห์ควรมีความบริสุทธิ์ในระดับ HPLC โดยเฉพาะไพรเมอร์ FIP และ BIP ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความยาวประมาณ 40-45 คู่เบส พบว่าถ้าใช้ไพรเมอร์ที่เป็น Desalted grade ไพร์เมอร์จะเสื่อมสลายได้ง่าย หลังจากละลายไพรเมอร์ด้วยบัพเฟอร์ TE แล้วต้องเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจะต้องใช้ให้หมดภายใน 1 เดือน ไม่สามารถเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียสได้ เนื่องจากกระบวนการ freeze-thawing จะทำให้ไพรเมอร์เกิดการขาดและแตกหัก (63) ขณะที่ไพรเมอร์ที่มีความบริสุทธิ์ในระดับ HPLC สามารถเก็บได้นานกว่าและไม่เกิดปัญหาเมื่อนำไปแช่ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส ส่วนไพรเมอร์ F3 และ B3 นั้น สามารถใช้ระดับคุณภาพระดับใดก็ได้ ซึ่งพบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน เนื่องจากเป็นไพร์เมอร์ที่มีขนาดสั้น (51)

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเนื้อสุกรโดยใช้เทคนิค LAMP พบว่าความเข้มข้นไพรเมอร์ของ สภาวะที่ 1 คือไพรเมอร์ FIP และ BIP เข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ F3 และ B3 เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ สภาวะที่ 2 คือไพรเมอร์ FIP และ BIP เข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ F3 และ B3 0.2 โมลาร์ จะมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งจะเห็นลักษณะผลผลิตเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีหลายขนาดคล้ายขั้นบันไดในวุ้นอะกาโรส และพบว่าความเข้มข้นของไพร์เมอร์ที่สูงขึ้นจะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นด้วย (42, 68) อย่างไรก็ตามผลของปริมาณผลผลิตที่มากทำให้เกิดการปนเปื้อนในปฏิกิริยาครั้งต่อไปได้ง่าย และยังทำให้เกิดผลบวกปลอม ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณไพร์เมอร์ที่เหมาะสมในสภาวะที่ 2 คือ FIP และ BIP เข้มข้น 0.4 ไมโครโมลาร์ และ F3 และ B3 เข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ได้ตีพิมพ์ไว้ก่อนหน้า ซึ่งความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP จะอยู่ระหว่าง 0.8-2.4 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นไพรเมอร์ F3 และ B3 จะอยู่ที่ 0.2 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP จะมากกว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ F3 และ B3 ประมาณ 4-8 เท่า (35, 38, 39, 42, 43, 46-49, 52, 55-60, 68-79)

การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอีน (Betaine) (N,N,N-trimethylglycine) ที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นที่ 0.8 โมลาร์ และ 1 โมลาร์ พบการเพิ่มขึ้นของผลผลิต LAMPโดยที่ไม่เกิดผลบวกปลอม ในขณะที่ความเข้มข้นของเบตาอีนที่ 0-0.6 โมลาร์นั้นเกิดผลบวกปลอม ความเข้มข้นเบตาอีนที่ 1 โมลาร์ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุด เบตาอีนมีการใช้เป็นสารเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับ DMSO โดยพบว่าเบตาอีนจะมีความสามารถในการเพิ่มความจำเพาะ และเพิ่มปริมาณผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ได้ดีกว่า DMSO (80, 81) หน้าที่ของเบตาอีนคือมีส่วนช่วยให้ DNA polymerase เข้าไปทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอแม่แบบได้ง่ายขึ้น (82) และสามารถช่วยลดความเสถียรของลำดับเบสที่มีปริมาณ GC มาก (83) แต่ในการทดลองนั้นได้เลือกใช้เบตาอีนที่ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์เนื่องจากต้องการใช้ปริมาณเบตาอีนที่น้อยที่สุดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปฏิกิริยา ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกันกับหลายการศึกษาที่มีรายงานไว้ (38, 39, 42, 43, 46-49, 55, 56, 58, 59, 70-75, 79) แต่มีบางการศึกษาที่ใช้ในการการตรวจวิเคราะห์จุลชีพต่างๆ ที่ใช้ความเข้มข้นของเบตาอีนสูงกว่าคือ ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (30, 84-88) และที่น้อยกว่าคือ ที่ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ (35) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเนื่องมาจากลำดับเบสของยีนที่ศึกษามีความแตกต่างกัน (82) และไม่พบการรายงานการใช้ DMSO แทนเบตาอีนในปฏิกิริยา LAMP

ความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ พบการเพิ่มขึ้นของผลผลิต LAMP โดยที่ไม่เกิดผลบวกปลอม โดยที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดผลผลิต LAMP มากขึ้นด้วย ในขณะที่ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 0-0.2 มิลลิโมลาร์ ไม่ปรากฏผลผลิต LAMP และที่ความเข้มข้นที่ 1.0 และ 1.2 มิลลิโมลาร์ ทำให้เกิดผลบวกปลอม ดังนั้นความเข้มข้นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่เหมาะสมคือ 1.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาณดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตจะมีผลต่อความจำเพาะของเอมไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (89) ซึ่งใช้ในปริมาณเท่ากันกับที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย ไวรัส ปาราสิต และ อื่นๆ (35, 42, 43, 46-49, 52, 55-58, 60, 68-75, 77, 79) แต่มีรายงานที่ใช้ความเข้มข้นที่มากกว่าคือ ที่ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลาร์ (84, 88) และใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าคือ 0.4 มิลลิโมลาร์ (30, 86)

แมกนีเซียมซัลเฟตซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบและมีผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (90) จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ 8 และ 10 มิลลิโมลาร์ พบการเพิ่มขึ้นของผลผลิต โดยที่ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เกิดผลผลิตมากขึ้นด้วย ขณะที่แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0-6 มิลลิโมลาร์ ไม่ปรากฏผลผลิต LAMP ดังนั้นจึงใช้แมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ เนื่องจากเป็น

ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่งเท่ากับที่มีการรายงานไว้ที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ (35, 39, 42, 43, 49, 55, 56, 58-60, 70-76, 85, 91) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่น้อยกว่าด้วยคือในช่วง 2-6 มิลลิโมลาร์ (30, 37, 47, 79, 84, 86, 88)

เมื่อได้ความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสมในปฏิกิริยาแล้วจึงนำสภาวะที่ได้มาใช้ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 65 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามมีหลายการรายงานที่เอนไซม์สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตได้ที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส (35, 41, 52, 92, 93) ดังนั้นการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP ตั้งแต่ 60-65 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส จะเกิดผลผลิต LAMP ในปริมาณที่มากกว่า ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีแนวโน้มทำให้เกิดผลผลิตน้อยลง ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรโดยเทคนิค LAMP จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับที่มีการรายงานในการตรวจเชื้อไวรัส Varicella-zoster, Influenza A (88, 92, 94) มีรายงานที่ใช้อุณหภูมิที่มากกว่าคือที่ 62 องศาเซลเซียส (95), ที่ 63 องศาเซลเซียส (35, 41, 46, 47, 52, 60, 73, 76, 91, 96) ที่ 64 องศาเซลเซียส (53) และที่ 65 องศาเซลเซียส (38, 55, 68, 77, 79, 97)

การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ที่ระยะเวลา 60 นาที แต่มีการรายงานที่ใช้ระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์น้อยกว่า 60 นาที (41, 42, 55, 91, 98-101) ดังนั้นจึงทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสุกรด้วยวิธี LAMP ตั้งแต่เวลา 30-120 นาที พบว่าที่ 30 นาที และ 45 นาที ไม่ปรากฏผลผลิต LAMP หรือเกิดผลผลิตในปริมาณที่น้อยมาก ขณะที่เวลา 60 นาที ได้ผลผลิตมากที่สุดและไม่เกิดผลบวกปลอม นอกจากนั้นยังพบว่าที่เวลามากขึ้นจะมีผลทำให้เกิดผลบวกปลอม ระยะเวลาที่เหมาะสมที่ได้จะตรงกันกับการศึกษาก่อนหน้า คือที่ 60 นาที (30, 37, 38, 42, 50, 52-57, 60, 69-72, 74, 75, 85, 88, 91, 94, 98, 99, 102) และไม่พบการรายงานที่ใช้ระยะเวลามากกว่า 60 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มไพร์เมอร์อีก 2 เส้น ตรงบริเวณช่วง loop ของปฏิกิริยา เป็นทั้งหมด 6 เส้น จะทำให้เห็นผลผลิตเกิดขึ้นโดยใช้เวลาเพียงแค่ 30 นาที และเมื่อใช้ระยะเวลาเพิ่มมากขึ้นจนถึงขั้นสูงสุดที่ 60 นาที จะทำให้มีความไวสูงขึ้นที่ขีดจำกัดต่ำสุดที่ 10^{-6} เท่า เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่สูงที่สุดของปฏิกิริยาซึ่งเป็นช่วง plateau effects (84)

วัตถุประสงค์หนึ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรโดยใช้เทคนิค LAMP คือเพื่อที่จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารตั้งต้นปริมาณน้อยๆโดยไม่ต้องอาศัยเครื่องมือพิเศษเช่นในเทคนิค PCR เพื่อที่จะสามารถประยุกต์ในการนำไปใช้ในการตรวจ

วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก รวมทั้ง การนำไปใช้ในภาคสนามได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการทดสอบประสิทธิภาพและความแตกต่างของเครื่องมือที่ให้ความร้อนชนิดต่างๆในการทำปฏิกิริยา LAMP ผลที่ได้พบว่ากล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ(Heat block) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler) ให้ผลผลิต LAMP ไม่แตกต่างกัน ขณะที่ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) และ ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) ไม่สามารถใช้เป็นอุปกรณ์สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ได้เนื่องจากไม่ปรากฏผลผลิต LAMP ขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะใช้กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (30, 35, 46-48, 53, 59, 78, 85, 92, 103-110) ดังนั้นจึงเลือกใช้กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ เนื่องจากเป็นเครื่องมือทั่วไปที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง และมีประสิทธิภาพสูงในการทำปฏิกิริยา LAMP

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ คือ ความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP และ BIP 0.4 ไมโครโมลาร์ F3 และ B3 0.2 ไมโครโมลาร์, เบตาอีน ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, 1X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (pH8.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ และทวีนยี่สิบ ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์], เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase large fragment ความเข้มข้น 8 ยูนิต/ปฏิกิริยา บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในกล่องร้องควบคุมอุณหภูมิ(Heat block) เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที และทำการตรวจสอบผลผลิต ด้วยวิธีแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ซึ่งจะเห็นผลเป็นแถบคล้ายขั้นบันไดที่ความยาวต่ำที่สุดที่ 169 คู่เบส (ระยะไพร์เมอร์ F3-B3) จนถึงความยาวที่สูงที่สุดคือ สุดแถบของวุ้น แต่เนื่องจากปริมาณดีเอ็นที่เพิ่มขึ้นในปฏิกิริยา LAMP นั้นมีปริมาณมากทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของผลผลิตไปยังปฏิกิริยาถัดๆไป อย่างไรก็ตามข้อดีของปริมาณผลผลิตที่มากทำให้สามารถตรวจสอบผลผลิตด้วยตาเปล่าได้โดยการเติมสารที่สามารถจับกับดีเอ็นเอแล้วเห็นสีหรือการเรืองแสงลงไปในหลอดโดยตรง (30) ไซเบอร์กรีนวันเป็นสารเรืองแสงชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นได้ โดยไซเบอร์กรีนวันมีความสามารถจับกับดีเอ็นเอได้ดีมาก (111) นอกจากนั้นยังสามารถตรวจวัดความขุ่นด้วย Magnesium pyrophosphate ได้โดยการนำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ไปปั่นตกตะกอนจะเห็นการเกาะกลุ่มกันของ Magnesium pyrophosphate ที่ก้นหลอดทดลอง (38, 88) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไซเบอร์กรีนเท่ากับ 1000X ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง Positive และ Negative ภายใต้แสงไฟธรรมดา และภายใต้แสงยูวีได้ คือสามารถ

มองเห็นสีเขียวของผลผลิตที่เป็น Positive ทั้งที่อยู่ภายใต้แสงไฟธรรมดา และแสงยูวี และมองเห็นสีส้มของผลผลิตที่เป็น Negative ทั้งที่อยู่ภายใต้แสงไฟธรรมดา และแสงยูวี ซึ่งใช้ความเข้มข้นเดียวกันกับที่เคยมีการรายงาน (48, 52, 78, 109, 112) มีการรายงานที่ใช้ความเข้มข้นมากกว่าคือที่ 10000X (48, 52, 113) และที่ความเข้มข้นน้อยกว่าที่ 10X ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ด้วยวิธี LAMP (53)

เมื่อได้สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาLAMP ทั้งหมดแล้ว จึงทำการตรวจสอบยืนยันผลผลิตที่ได้ว่าเป็นดีเอ็นเอสุกรจริง โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดบริเวณห่วง (loop) ทั้งสองข้างของผลผลิต LAMP ผลการตัดด้วย *Bam*HI ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230 คู่เบส และ *Bam*HI และ *Taq*I จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100 คู่เบส ซึ่งเป็นไปตามขนาดที่คาดหวังไว้ตามที่วิเคราะห์จากข้อมูลลำดับเบสของยีน *cytochrome b* ของสุกร แต่ในผลผลิตของปฏิกิริยาเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI นั้นพบว่านอกจากจะพบแถบที่ 230 คู่เบส แล้วยังพบแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นด้วยเนื่องจากผลผลิต LAMP จะมีหลายขนาดและมีลักษณะเป็นห่วงต่อๆกันไปคล้ายกับดอกกะหล่ำ ในกรณีที่ผลการตัดเอนไซม์ไม่สมบูรณ์จึงทำให้เห็นดีเอ็นเอขนาดอื่นๆด้วย และจากการตรวจสอบยืนยันเพิ่มเติมด้วยวิธี Southern blot พบว่าผลผลิต LAMP และผลผลิต LAMP ที่ตัดด้วยเอนไซม์เป็นลำดับเบสคู่สมกันกับโพรบ *cytochrome b* ของสุกร

เนื่องจากวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์จะมีการผ่านกระบวนการความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ แตกต่างกันไป ซึ่งจะมีผลในการทำลายดีเอ็นเอของเนื้อสัตว์ได้ (8, 17) ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี LAMP และตรวจสอบผลผลิตด้วยการนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ด้วยไซเบอร์กรีนวันและสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และภายใต้แสง UV พบว่าสามารถตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอของเนื้อสุกรที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 0 ถึง 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีได้ จึงสามารถใช้เทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านความร้อนในช่วงดังกล่าวได้

ความจำเพาะในการตรวจดีเอ็นเอสุกรด้วยไพร์เมอร์ของปฏิกิริยา LAMP ที่ออกแบบ และตรวจสอบผลผลิตด้วยการนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส และด้วยไซเบอร์กรีนวันและสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และภายใต้แสง UV พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะกับสุกรสูงมาก ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกระจอกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อปลาซาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย

ความไวในการตรวจดีเอ็นเอสุกรด้วยเทคนิค LAMP พบว่ามีขีดจำกัดต่ำสุดที่ 1 นาโนกรัม เท่ากันกับวิธี PCR ตรงกันกับผลการรายงานก่อนหน้า (47-49) แต่ต่ำกว่าวิธี Real-Time

PCR 10 เท่า สำหรับการหาความไวในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสัตว์ผสม ได้แก่ เนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัว ที่ความเข้มข้น 75-0.001 เปอร์เซนต์ ด้วยวิธี LAMP พบว่ามีความไวในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวเท่ากันที่ 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งต่ำกว่าวิธี PCR และ Real-Time โดยวิธี PCR มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ 0.001 เปอร์เซนต์ ซึ่งมากกว่าวิธี LAMP 100 เท่า ส่วนวิธี Real-Time PCR มีขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่ และเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวที่ 0.01 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีความไวมากกว่าวิธี LAMP 1000 เท่า และมากกว่าวิธี PCR 100 เท่า อย่างไรก็ตามเทคนิค LAMP มีความไวสูงกว่า PCR และ Real-time PCR ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัส West Nile, เชื้อไวรัส *Haemophilus influenza* และเชื้อแบคทีเรียในปลาพบว่าวิธี LAMP มีความไวมากกว่าวิธี PCR 10 เท่า (35, 40, 58) การตรวจวิเคราะห์ *Bordetella pertussis* พบว่ามีความไวมากกว่าวิธี PCR 100 เท่า (57) ในการจำแนกเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* จาก *Streptococcus* อื่นๆ โดยเทคนิค LAMP พบว่ามีความไวมากกว่าวิธี PCR ถึง 1000 เท่า (56) นอกจากนี้ความไวของวิธี LAMP นั้นจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไพรเมอร์ (42) ถึงแม้ว่าในการศึกษาครั้งนี้วิธี LAMP จะมีความไวต่ำกว่าวิธี Real-Time PCR หรือมีความไวเทียบเท่ากับวิธี PCR แต่วิธี LAMPมีข้อดีกว่าวิธี PCR และ Real-Time PCR คือรวดเร็ว ประหยัด ใช้สภาวะที่อุณหภูมิเดียว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ สามารถนำไปใช้ภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้

เนื่องจากการตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าต้องใช้เครื่องแยกกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) ซึ่งจัดเป็นอุปกรณ์เฉพาะทางห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา อีกทั้งขั้นตอนการตรวจสอบผลค่อนข้างมีความยุ่งยากและเสียเวลา โดยต้องเตรียมวุ้นอะกาโรส มีขั้นตอนการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า มีการย้อมวุ้นอะกาโรสด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และ ต้องมีการดูผลการย้อมด้วยเครื่อง UV transilluminator ซึ่งจัดเป็นอุปกรณ์เฉพาะทางห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยาเช่นเดียวกัน ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ผลให้มีความง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น โดยนำเทคนิค Dot Blot Hybridization มาประยุกต์เข้ากับวิธี LAMP เป็นวิธี LAMP-Dot Blotting ทำให้สามารถตรวจสอบผลผลิต LAMP กับโพรบที่จำเพาะและเห็นการเกิดสีของผลผลิตบนเมมเบรนได้โดยตรง ซึ่งเป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่มีการประยุกต์ทั้งสองเทคนิคเข้าด้วยกัน จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP-Dot Blotting พบว่าการจุดผลผลิต LAMP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นเมมเบรน แล้วนำไป Hybridization เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย Washing solution II (0.5X SSC ผสมกับ 0.1% SDS) เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปล้างด้วย Washing buffer อีก 1 นาที เติม Blocking Solution 10 นาที

Antibody solution 15 นาที Washing buffer 5 นาที Detection 1 นาที และ Color substrate solution อีก 30-60 นาที ดังในสภาวะที่ 5.3.2 เป็นสภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากมีขั้นตอนของวิธีการไม่ยุ่งยาก และใช้เวลาน้อยที่สุด โดยจะใช้เวลารวมทั้งสิ้น 90-120 นาที เทคนิค LAMP-Dot Blotting จึงสะดวกและรวดเร็วกว่าการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งใช้เวลารวมทั้งสิ้น 150 นาที ดังนั้น LAMP-Dot Blotting จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความรวดเร็ว มีความไว ความจำเพาะสูง สะดวกและง่าย เนื่องจากไม่ต้องใช้ทักษะความชำนาญเฉพาะทาง, ไม่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะทางห้องปฏิบัติการ, สามารถนำไปใช้ในภาคสนามหรือห้องห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

การทดสอบความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรด้วยวิธี LAMP-Dot Blotting กับเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความจำเพาะกับสุกรสูงมาก ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกลุ่มกับเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแพะ, เนื้อแกะ, เนื้อเป็ด, เนื้อนกกระจอกเทศ, เนื้อสุนัข, เนื้อปลาซาลมอน, เนื้อกบ, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, เนื้อกุ้ง, เนื้อหอยนางรม, เนื้อหอยเชลล์, เนื้อหอยลาย แต่อย่างไรก็ตามในการตรวจวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องทำ Positive control คือใช้ดีเอ็นเอสุกร และNegative control คือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ควบคู่ไปด้วย เนื่องจากเนื้อไก่, เนื้อวัว, เนื้อแกะ, เนื้อแพะ, เนื้อปลาซาลมอน, เนื้อปลาหมึก, เนื้อปู, และเนื้อหอยนางรม จะสามารถให้ผลบวกจางๆได้ ซึ่งอาจทำให้การแปลผลผิดพลาดเป็นผลบวกปลอมได้ การเปรียบเทียบความไวของปฏิกิริยา LAMP-Dot Blotting ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอสุกรพบว่ามีความไวที่ขีดจำกัดต่ำสุดที่ความเข้มข้น 1 นาโนกรัม เท่ากันกับวิธี PCR แต่ต่ำกว่าวิธี Real-Time PCR 10 เท่า เช่นเดียวกับความไวของเทคนิค LAMP และ พบว่าการตรวจหาดีเอ็นเอสุกรในเนื้อสุกรผสมเนื้อไก่มีความไวที่ขีดจำกัดต่ำสุดเท่ากับวิธี LAMP คือที่ 10 เปอร์เซนต์ ส่วนเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวมีขีดจำกัดต่ำสุดมากกว่าวิธี LAMP 5 เท่า คือที่ 5 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามวิธีของ LAMP-Dot Blotting จะมีความไวเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับการเพิ่มปริมาณผลผลิตด้วยวิธี LAMP มาก่อนแล้วจึงนำมาตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี Dot blot hybridization อีกครั้งหนึ่ง และจากความไวในการตรวจเนื้อสุกรผสมเนื้อวัวมีแนวโน้มว่า LAMP-Dot Blotting จะมีความไวมากกว่าวิธี LAMP สำหรับการเพิ่มปริมาตรผลผลิต LAMP ในการจุดลงบนแผ่นเมมเบรนจาก 1 ไมโครลิตรเป็น 2 ไมโครลิตรนั้น พบว่าไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นให้กับผลผลิต LAMP-Dot Blotting ที่เกิดขึ้นมากนัก เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาตร จะเกิดการแผ่กระจายของผลผลิต LAMP เป็นบริเวณกว้าง ไม่รวมอยู่ในที่เดียว จึงทำให้ผลผลิตของสีที่เกิดจากผลผลิต LAMP-Dot Blotting ไม่มีความแตกต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ด้วยวิธี LAMP และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธี 4 วิธี คือ การแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ไซเบอร์กรีนวันสังเกตผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา ภายใต้แสงยูวี และ LAMP-Dot Blotting

เทียบกับวิธี Real-Time PCR ที่เป็น Gold Standard สำหรับการทดลองครั้งนี้ พบว่าการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อวัวทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ด้วยวิธี LAMP ที่ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยการแยกขนาดบนวุ้นอะกาโรส และวิธี LAMP-Dot Blotting มีความไวและความจำเพาะ เนื่องจากไม่เกิดผลลบปลอม และผลบวกปลอม ผลการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ทั้งหมด 57 ตัวอย่าง ด้วยการแยกขนาดบนวุ้นอะกาโรส ไซเบอร์กรีนวันสังเกตภายใต้แสงยูวี และ LAMP-Dot Blotting พบว่าเกิดผลลบปลอม และผลบวกปลอมดังนี้ 2, 6 ตัวอย่าง 2, 1 ตัวอย่าง และ 3, 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในขณะที่ไซเบอร์กรีนวันสังเกตภายใต้แสงไฟธรรมดา เกิดผลลบปลอม 4 ตัวอย่าง แต่ไม่เกิดผลบวกปลอม ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาทั้งหมด 18 ตัวอย่าง พบว่าไม่เกิดผลบวกปลอมแต่เกิดผลลบปลอม 2 ตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค LAMP ไซเบอร์กรีนวันสังเกตภายใต้แสงไฟธรรมดา แสงยูวี และ LAMP-Dot Blotting ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LAMP และตรวจสอบผลด้วยการแยกขนาดบนวุ้นอะกาโรสพบผลบวกปลอม 1 ตัวอย่าง แต่ไม่เกิดผลลบปลอม ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อกุ้งทั้งหมด 8 ตัวอย่าง จากสี่วิธีข้างต้นไม่พบผลบวกปลอม แต่เกิดผลลบปลอม 1 ตัวอย่าง ยกเว้น วิธี LAMP-Dot Blotting ไม่พบผลลบปลอม ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลทั้งหมด 8 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลด้วยการแยกขนาดบนวุ้นอะกาโรส และ LAMP-Dot Blotting เกิดผลลบปลอม และผลบวกปลอมอย่างละ 1 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธี LAMP ไซเบอร์กรีนวันสังเกตภายใต้แสงไฟธรรมดา และยูวี ไม่เกิดผลบวกปลอม แต่เกิดผลลบปลอม 2 ตัวอย่าง ดังนั้นวิธีการตรวจผลทั้ง 4 วิธีข้างต้นจึงมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกันในการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์แต่ละชนิด ซึ่งจากการเปรียบเทียบความไว ความจำเพาะ ค่าพยากรณ์ผลบวก(PPV) และค่าพยากรณ์ผลลบ(NPV) จากการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ด้วยวิธีทั้ง 4 วิธีพบว่ามีความไว 86.60, 73.33, 86.67 และ 80.00 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ มีความจำเพาะ 85.71, 100, 97.62 และ 88.10 เปอร์เซนต์ตามลำดับ มีค่าพยากรณ์ผลบวก (PPV) 68.42, 100, 92.86, และ 70.59 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีค่าพยากรณ์ผลลบ (NPV) 94.74, 91.30, 95.35 และ 92.50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจสอบผลผลิต LAMP ด้วยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส และไซเบอร์กรีนภายใต้แสงยูวี มีความไวสูงที่สุด รองลงมาคือวิธี LAMP-Dot Blotting ในขณะที่การตรวจสอบด้วยไซเบอร์กรีนภายใต้แสงไฟธรรมดามีความไวต่ำสุด ส่วนการเปรียบเทียบความจำเพาะ และค่าพยากรณ์ผลบวก (PPV) ในการตรวจวิเคราะห์ผลของทั้ง 4 วิธี พบว่าการวิเคราะห์ผล LAMP ด้วยไซเบอร์กรีนภายใต้แสงไฟธรรมดา และแสงยูวี มีความจำเพาะสูงสุด ส่วนค่าพยากรณ์ผลลบ (NPV) ของทั้ง 4 วิธีสูงใกล้เคียงกัน (แสดงดังตารางที่ 4.3) วิธีการตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรด้วยเทคนิค LAMP และสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใต้แสงยูวีจึงน่าเป็นวิธีที่

ดีที่สุด เนื่องจากมีความไวและความจำเพาะสูง อีกทั้งมีความสะดวก รวดเร็วในการวิเคราะห์ผล สามารถวิเคราะห์ผลผลิต LAMP ได้ภายใน 2 นาที แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต LAMP ภายใต้แสงยูวีต้องมีเครื่องกำเนิดแสงยูวี ซึ่งเป็นอุปกรณ์เฉพาะ ในขณะที่วิธี LAMP-Dot Blotting มีความไว และความจำเพาะไม่แตกต่างจากการวิเคราะห์ผลผลิต LAMP ภายใต้แสงยูวีมากนัก แต่มีความสะดวก และเหมาะกับการนำไปใช้ในภาคสนาม และห้องปฏิบัติการทั่วไป เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือที่จำเพาะ วิธีการไม่ยุ่งยาก ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่มีการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบผลผลิต LAMP ระหว่างการตรวจสอบด้วยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ไซเบอร์กรีนวันสังเกตผลด้วยตาเปล่าภายใต้แสงไฟธรรมดา และภายใต้แสง UV รวมทั้งการตรวจสอบด้วยเทคนิค Dot blot hybridization ซึ่งพัฒนาขึ้นในครั้งนี้ด้วย ผลจากการในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานที่สามารถประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์อื่นๆไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมทั้งการตรวจวิเคราะห์อื่นๆได้ต่อไปในอนาคต

สำหรับการทดลองในครั้งนี้ พบการเกิดผลลบปลอม และผลบวกปลอม เนื่องจากวิธีการตรวจสอบผลผลิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นการจะนำเทคนิค LAMP และวิธีการตรวจวิเคราะห์ไปใช้ตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์อาหารนั้นจะต้องแน่ใจว่าไม่มีการเกิดผลลบปลอม และผลบวกปลอม ซึ่งมีความสำคัญมากทั้งในแง่ของ ผู้บริโภค และผู้ประกอบการ สำหรับการเกิดผลลบปลอมนั้นจะมีผลต่อผู้บริโภคที่เป็นมุสลิม โดยจะได้รับประทานอาหารที่มีสิ่งต้องห้ามเจือปน สำหรับการเกิดผลบวกปลอมนั้นจะมีผลต่อผู้ประกอบการ โดยที่กระบวนการผลิตอาหารของผู้ประกอบการนั้นถูกต้องไม่มีสิ่งต้องห้ามเจือปน แต่ไม่สามารถขายสินค้านั้นได้เนื่องจาก ความผิดพลาดจากการตรวจวิเคราะห์อาจนำมาซึ่งการฟ้องร้อง และเกิดความเสียหายต่อไปได้

ดังนั้นสำหรับการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อที่จะนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์เนื้อสุกรปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเนื้อสัตว์ในอนาคตนั้น จึงต้องมีการพัฒนาวิธีการและควบคุมเพื่อที่จะไม่ให้เกิด ผลลบปลอม ผลบวกปลอม และขจัดปัญหาการเกิดการปนเปื้อนในปฏิกิริยาขั้นต่อไป โดยมีวิธีการดังต่อนี้ สำหรับการควบคุมการเกิดผลลบปลอมนั้น การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LAMP จะต้องมีการควบคุม และระวังในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ หากขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์นั้นไม่บริสุทธิ์จริง อาจมีอาร์เอ็นเอ เอทานอล โปรตีน หรือไขมันจากอาหารหลงเหลืออยู่ ซึ่งอาจมีผลรบกวนการเกิดปฏิกิริยา LAMP ทำให้เกิดผลลบปลอมได้ เพราะปฏิกิริยา LAMP ต้องการความบริสุทธิ์ของน้ำยา ไพรเมอร์ และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาอย่างมาก อีกทั้งในการทดลองนี้เป็นครั้งแรกที่มีการใช้เทคนิค LAMP กับเซลล์ยูคาริโอต ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งมีโครงสร้างทางดีเอ็นเอที่ซับซ้อนกว่าดีเอ็นเอของไวรัส และแบคทีเรีย ซึ่งเป็นเซลล์โปรคาริโอตที่เคย

มีการรายงานมาก่อนหน้า ดังนั้นถ้าการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ไม่ดีพอ จึงอาจมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของปฏิกิริยาได้ สำหรับการเกิดผลบวกปลอมนั้นอาจเนื่องมาจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทั้ง 4 เส้นมีระยะที่ใกล้กันมาก และมีความยาวของผลผลิตที่สั้นมากเพียง 169 คู่เบส และยังมีไดเมอร์อยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างสูงคือ ΔG=-2.49 จึงอาจเป็นผลที่ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ดังนั้นจึงอาจมีการปรับเปลี่ยนไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาบางเส้น เพื่อลดการเกิดไดเมอร์ให้มากที่สุด สำหรับการขจัดปัญหาการปนเปื้อนในปฏิกิริยานั้น จะต้องมีการควบคุมและเฝ้าระวังในทุกขั้นตอน ต้องแยกพื้นที่ออกจากกัน สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ การเตรียมน้ำยาสำหรับปฏิกิริยา และการตรวจสอบผลผลิต และต้องเป็นพื้นที่ที่สามารถขจัดดีเอ็นเอที่หลงเหลืออยู่โดยการใช้เอทานอล 70 เปอร์เซนต์ทำความสะอาด หรือการฉายแสงยูวีข้ามคืนได้ สำหรับวิธี LAMP-Dot Blotting อาจต้องมีการพัฒนาโดยลดขั้นตอนต่างๆ สำหรับการทำปฏิกิริยา Dot blot hybridization เพื่อให้มีความสะดวก และรวดเร็วในการนำไปใช้งาน อีกทั้งต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่ไม่ทำเกิดผลบวก และผลลบปลอมด้วย ซึ่งจะทำให้การแปลผลผิดพลาด