รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยวิธี Polymerase Chain Reaction

Detection of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy Samples by Polymerase Chain Reaction

เสนอ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

โดย

ดร.สุกัญญา ลินพิศาล (หัวหน้าโครงการวิจัย) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ
ศ. แพทย์หญิง กรรณิการ์ พรพัฒน์กุล ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
Dr.Heinrich F. Steger (อาจารย์พิเศษ) ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
รศ. แพทย์หญิง นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์
นางสาวกุลรัญญา พรหมเมืองยอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มิถุนายน 2545

บทคัดย่อ

เป็นที่ยอมรับว่า เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคกระเพาะอาหาร อักเสบ และแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้นวิธีการวินิจฉัย เชื้อ *H.pylori* ควรจะต้องเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง คณะวิจัยได้นำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ HpaA ยีน ที่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 375 bp สภาวะที่เหมาะสมของ reaction mixture ประกอบด้วย 0.25 uM primer แต่ละตัว, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate แต่ละตัว (dATP, dGTP, dTTP และ dCTP), 0.25 unit Taq DNA polymerase (QIAGEN, ประเทศเยอรมัน) ในสารละลาย 20 mM Tris(pH8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01%BSA และ 0.05% tween จำนวนรอบที่ใช้เพิ่มผลิตภัณฑ์ PCR คือ 35 รอบ และในแต่ละรอบจะประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95 ^{o}C 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 56 ^{o}C 1 นาที และขั้นตอน extension ที่ 72 ^{o}C 1 นาที หลังจากครบ 35 รอบ จะทิ้งไว้ต่อไปอีกที่ 72 ^{o}C เป็นเวลา 7 นาที ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สามารถตรวจได้ต่ำสุด คือ 0.4 pg

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ส่วน antrum ได้มาจากผู้ป่วยที่มาตรวจโดยการส่องกล้องตรงระบบทางเดินอาหารส่วนต้น และได้รับการตรวจเชื้อ *H.pylori* ทั้ง 3 วิธี คือ วิธี urease test วิธีทางพยาธิวิทยา โดยย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี Giemsa และวิธี PCR เชื้อ *H.pylori* ตรวจพบโดยวิธีทางพยาธิวิทยา 58.3% วิธี urease test 44.4% และวิธี PCR 52.8% ความไวและความจำเพาะของวิธี PCR เมื่อเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยาจะได้ 73.8% และ 76.6% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม หากการวินิจฉัยเชื้อใช้การยืนยันความถูกต้อง ทั้งสองวิธีคือ วิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี วิธี PCR จะสามารถตรวจได้ถูกต้อง 92.6% ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ให้ผลลบทั้ง 2 วิธี วิธี PCR จะให้ผลลบ 23 ใน 25 ตัวอย่าง(92%)

ขั้นตอนที่สำคัญของเทคนิค PCR ก็คือการสกัด DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ในการศึกษานี้คณะวิจัยได้เปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธี คือวิธีที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit และใช้ Chelex-100 chelating resin ความไวและความจำเพาะของการตรวจเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธี PCR ที่ใช้ DNA แม่แบบ จากการสกัดด้วย Chelex-100 คือ 89 % และ 81% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัด โดยใช้ QIAamp® DNA Mini Kit

การศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าวิธี PCR ที่ได้สามารถนำมาใช้ยืนยันการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H.pylori* ร่วมกับวิธีอื่น ความไวและความจำเพาะของวิธี PCR อาจสามารถแก้ไขให้ดีขึ้นได้โดยการออกแบบ primers ที่ต่างกัน และใช้วิธี nested PCR การนำ Chelex-100 chelating resin มาสกัด DNA จากเชื้อ *H.pylori* สามารถนำมาใช้เป็น DNA แม่แบบในการทำ PCR ได้ การสกัดด้วย Chelex-100 มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว และมีราคาถูก

Abstract

Helicobacter pylori has been recognized as an important role in the pathogenesis of gastritis and peptic ulcer disease. Therefore the diagnostic methods for detecting *H.pylori* should have high in both sensitivity and specificity. We have eatablished a PCR assay for the detection of *H.pylori* in gastric biopsy specimens with primers specific to HpaA gene which yielded PCR product of 375 bp. The optimal PCR reaction mixture contained 0.25 uM each primer, 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate(dATP, dGTP, dTTP and dCTP), 0.25 unit Taq DNA polymerase(QIAGEN, Germany) in 20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% BSA and 0.05% tween. Thirty five cycles were employed and each cycle consisting of 30 second denaturation step at 95 ^{o}C , 1 minute annealing step at 56 ^{o}C and one minute extension step at 72 ^{o}C. After 35 cycles, the reaction mixture was further extended for 7 minutes at 72 ^{o}C . The minimum concentration of *H.pylori* DNA which could be detected was 0.4 pg.

Antral biopsy specimens were taken from 72 patients under going upper GI endoscopy and had completed 3 diagnostic tests for *H.pylori* (urease test, Giemsa staining of histological sections and PCR). *H.pylori* were found in 58.3%, 44.4% and 52.8% of patients according to the results of histology, urease test and PCR assay. The sensitivity and specificity of PCR assay compared to histology technique were 73.8% and 76.6% respectively. However, when the diagnosis of *H.pylori* was assessed by agreement with both histology and urease test, with positive samples, PCR detected correctly 92.6%. Whereas specimens had negative results of both tests, PCR gave negative results 23 in 25 specimens (92%).

The important step for PCR technique was the extraction of *H.pylori* DNA from gastric biopsy. In this study we compared two extraction methods namely, QIAamp® DNA Mini Kit and Chelex-100 chelating resin. The sensitivity and specificity of the detection of *H.pylori* by PCR using DNA template from Chelex-100 extraction were 89% and 81% respectively when compared to QIAamp® DNA Mini Kit.

Inconclusion, these findings indicate that the established PCR assay can be used to confirm with other diagnostic methods. The sensitivity and specificity of the PCR assay could be improved by designing different primers set and performing nested PCR. The use of

Chelex-100 chelating resin produced a suitable DNA template for *H.pylori* detection. The extraction method was simple, rapid and the cost of reagent was relatively cheap.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นรายงานฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยเรื่อง " การตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยวิธี Polymerase Chain Reaction" ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี 2544

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนเพื่อการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณผู้บริหาร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้สนับสนุนในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย และขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ต่อพงษ์ สงวนเสริมศรี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้สถานที่ และเครื่อง PCR ที่ห้องปฏิบัติการมนุษย์พันธุศาสตร์ ในระยะแรกของการทำ PCR จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จสมบูรณ์ ลุล่วงไปด้วยดี

คณะวิจัยได้รับเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) ที่เพาะเลี้ยงจากผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบและติดเชื้อ *H.pylori* ซึ่งรับความอนุเคราะห์จาก Dr.Carl J Mason สถาบันแพทย์ทหารบก (The Armed Force Research Institute of Medical Sciences(AFRIMS) กรุงเทพฯ) และได้รับเชื้อ *H.pylori* (Japanese strain) จาก Professor David Graham, Inflammatory Bowel Disease Laboratory, Veterans Affairs Medical Center, Houston, Texas USA. จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะนักวิจัย

มิถุนายน 2545

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ(ภาษาไทย)	I
บทคัดย่อ(ภาษาอังกฤษ)	II
กิตติกรรมประกาศ	IV
บทที่ 1. บทนำ	
1.1 ความสำคัญของปัญหาวิจัย	1
1.2 รูปร่างและคุณสมบัติของเชื้อ *H.pylori*	2
1.3 ระบาดวิทยาของเชื้อ *H.pylori* และการติดต่อ	2
1.4 การก่อโรค	3
1.5 วิธีการตรวจหาเชื้อ *H.pylori*	4
1.6 เทคนิค Polymerase Chain Reaction(PCR)	7
1.7 ผลงานที่เกี่ยวข้อง	7
1.8 วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
บทที่ 2.วิธีวิจัย	
2.1 วัสดุอุปกรณ์	10
2.2 สารเคมี	10
2.3 การดำเนินการวิจัย	11
บทที่ 3. ผลการวิจัย	
3.1 การตรวจหาเชื้อ *H.pylori* โดยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test	17
3.2 การตรวจหาเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR	20
3.3 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR	21
3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และลด non specificity band	22
3.5 การหา sensitivity ของวิธี PCR ที่ได้หาสภาวะเหมาะสมแล้ว	34
3.6 การตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR	35
3.7 การหา sensitivity และ specificity ของวิธี PCR และวิธี urease test เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา	38
3.8 เปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยวิธี PCR จาก DNA ที่ใช้วิธีสกัดต่างกัน	40

หน้า

บทที่ 4.วิจารณ์และสรุปผล 43

เอกสารอ้างอิง 48

ภาคผนวก 52

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย โดยวิธีทางพยาธิวิทยา และวิธี urease test	17
ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อ *H.pylori* ตำแหน่ง HpaA ยีน จากผู้ป่วยคนไทยเทียบกับลำดับเบส HpaA ยีน ของเชื้อ *H.pylori* จาก GenBank	23
ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย โดยวิธีทางพยาธิวิทยา วิธี urease test และวิธี PCR	35
ตารางที่ 3.4 Sensitivity,specificity, positive และ negative predictive value ของวิธี PCR เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา เพื่อตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร	38
ตารางที่ 3.5 Sensitivity,specificity, positive และ negative predictive value ของวิธี urease test กับวิธีทางพยาธิวิทยา เพื่อตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร	39
ตารางที่ 3.6 ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR จาก DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit และ จาก Chelex-100 chelating resin	40
ตารางที่ 3.7 Sensitivity,specificity, positive และ negative predictive value ของวิธี PCR จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดด้วย Chelex-100 chelating resin เทียบกับ DNA ที่สกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp®DNA Mini Kit	42
ตารางที่ 4.1 Sensitivity,specificity, positive และ negative predictive value ของวิธี PCR และวิธี urease test เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา เพื่อตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย	45

สารบัญรูป

รูป	หน้า
รูปที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร และจากเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) บน agarose gel ย้อมด้วย ehidium bromide	20
รูปที่ 3.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *H.pylori* เมื่อใช้ restriction enzyme Hinf I	21
รูปที่ 3.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ความเข้มข้นของ primer mixture ต่างกัน	25
รูปที่ 3.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ความเข้มข้นของ Taq DNA Polymerase ต่างกัน	27
รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้จำนวนรอบ(cycle) ต่างกัน	29
รูปที่ 3.6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ Hot Star Taq DNA Polymerase	32
รูปที่ 3.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ความเข้มข้นของ glycerol ต่างกัน	33
รูปที่ 3.8 ผลิตภัณฑ์ PCR จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) ที่ความเข้มข้นของ DNA ต่างกัน	34

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหาวิจัย

ในประเทศไทย โรคแผลในกระเพาะอาหารนับว่า เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญโรคหนึ่ง โดยมีข้อมูลระหว่างปี 1981 - 1988 รายงานว่าอัตราผู้ป่วยโรคนี้ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลทั่วประเทศ ค่อนข้างคงที่ คืออยู่ระหว่าง 110 - 120 ต่อจำนวนประชากรหนึ่งแสนคน(1) และจากการศึกษาปัญหาสุขภาพของผู้ป่วยนอก หน่วยเวชศาสตร์ทั่วไป โรงพยาบาลรามาธิบดี พบว่า ปัญหาที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ส่วนใหญ่จะมาด้วยปัญหา dyspepsia และ peptic ulcer(2) ในปัจจุบันนี้เป็นที่ยอมรับว่า เชื้อ *Helicobacter pylori (H.pylori)* เป็นสาเหตุโดยตรงที่ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหาร และทำให้เกิดแผลที่บริเวณกระเพาะอาหาร หรือเกิดเป็นแผลที่บริเวณลำไส้ส่วนต้นที่ติดกับกระเพาะอาหาร ซึ่ง 80% ของผู้ป่วยจะประสบกับปัญหาการเป็นๆ หายๆ คือหลังจากรักษาแผลให้หายแล้ว มักจะกลับมาเป็นแผลอีกอยู่เรื่อยๆ แบบเรื้อรัง ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ และนอกจากนี้แล้วเชื้อ *H.pylori* ยังเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร (3) องค์การอนามัยโลกได้ให้ความสำคัญกับเชื้อตัวนี้ว่าเป็น carcinogen(4) ในปัจจุบันการรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบ โดยการกำจัดเชื้อ *H.pylori* ได้เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีรายงานว่าหลังจากกำจัดเชื้อตัวนี้แล้ว ผู้ป่วยมีโอกาสที่จะกลับมาเป็นแผลในกระเพาะอาหารลดลงอย่างมาก ทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาลดลง และลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร(5) มีรายงานผลการวิจัยผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารทั่วประเทศ พบอัตราการติดเชื้อ 31 - 74% (6) ในจังหวัดเชียงใหม่ Peerakome และคณะ(7) ได้รายงานอัตราการติดเชื้อ *H.pylori* ในผู้ป่วยที่แสดงอาการโรคกระเพาะอาหารอักเสบ ที่เข้าตรวจด้วยการส่องกล้องที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มกราคม - ธันวาคม 2536 จำนวน 84 ราย พบเชื้อ *H.pylori* 60.7%

จากความสำคัญของเชื้อ *H.pylori* ที่กล่าวมาแล้ว ทำให้การตรวจวินิจฉัยเชื้อตัวนี้มีความสำคัญมาก ซึ่งวิธีตรวจที่ดีที่สุด ควรจะมีความถูกต้อง แม้นยำ มีความไว และความจำเพาะสูง สามารถรู้ผลได้รวดเร็ว และราคาไม่แพง ซึ่งจะเป็นแนวทางในการรักษาผู้ป่วยให้หายขาดจากโรคได้ วิธีอ้างอิงในปัจจุบัน คือวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่เชื้อตัวนี้จะเจริญเติบโตยาก อาจใช้เวลานานถึง 7 วัน และต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน วิธีทางพยาธิวิทยา มีข้อเสีย คือ ต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์สูงในการอ่านผล และอีกวิธีหนึ่ง คือวิธี urea breath test ซึ่งเป็นวิธีที่อ้างอิงที่ดีที่สุด แต่ต้องมีเครื่องมือเฉพาะซึ่งมีราคาแพงมาก

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิค PCR มาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ อย่างแพร่หลาย ดังนั้น คณะวิจัยได้นำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่เป็นโรค

กระเพาะอาหารอักเสบ ซึ่งคาดว่า จะได้ผลการตรวจที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจได้รวดเร็ว มีราคาถูกกว่าวิธีอื่น ที่ใช้กันอยู่ในขณะนี้

1.2 รูปร่างและคุณสมบัติของเชื้อ *H.pylori* (8,9)

H.pylori เป็นเชื้อที่อยู่ใน genus *Helicobacter* อยู่ในสกุล(family) *Helicobacter aceae* มีลักษณะรูปร่างเป็นเกลียวหรือโค้งงอ มีความหนาประมาณ 0.6 um ยาวประมาณ1.5- 5.0 um มี flagella ที่มีปลอกหุ้ม ประมาณ 4-7 อัน เชื้อจะเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมแบบ microaerophillic คือมีออกซิเจนต่ำ และสามารถเพาะเลี้ยงได้ในภาชนะที่มีส่วนผสมของอากาศ คือ 10%CO_2, 5%O_2 และ 85% N_2 หรือ เพาะเลี้ยงโดยใช้ CO_2 incubator ที่ 37 ^{o}C โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของเลือด เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ urease จำนวนมาก และยังสร้างเอนไซม์และสารตัวอื่นๆ เช่น mucinase, lipase, phospholipase A, cytotoxin, hemolysin และ adhesin เพื่อยึดติดกับเยื่อบุกระเพาะอาหาร

เชื้อ *H.pylori* พบได้ในเยื่อบุกระเพาะอาหาร และลำไส้ส่วนบนที่ติดกับกระเพาะอาหาร (duodenum) ซึ่งตัวเชื้อสามารถอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร เพราะ เอนไซม์ urease ที่ตัวเชื้อสามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากจะเปลี่ยนสาร urea ซึ่งมาจากน้ำลายและน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ไปเป็นแอมโมเนียและไบคาร์บอเนต ซึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นด่างแก่ ทำให้ความเป็นกรดจากน้ำย่อยที่อยู่รอบตัวเชื้อลดลง ดังนั้นตัวเชื้อจึงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในกระเพาะอาหาร และจากรูปร่างที่เป็นเกลียวและการเคลื่อนที่แบบควงสว่านรอบตัว ทำให้เชื้อสามารถต้านทานต่อการเคลื่อนที่ของลำไส้ (peristalsis) นอกจากนี้แล้ว ในเยื่อเมือกจะมีออกซิเจนต่ำ จึงเหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อ ถึงแม้ว่าร่างกายของคนเราสามารถผลิตภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *H.pylori* แต่ตัวเชื้อจะฝังในเยื่อบุกระเพาะอาหาร ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถกำจัดตัวเชื้อได้ และสามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้นเมือกได้อย่างรวดเร็ว

1.3 ระบาดวิทยาของเชื้อ *H.pylori* และการติดต่อ

ถึงแม้ว่าเชื้อ *H.pylori* จะพบในประชากรจำนวนมาก แต่กลไกในการติดต่อของเชื้อยังไม่ทราบชัดเจน ในประเทศที่กำลังพัฒนา โดยทั่วไปแล้วประชากรประมาณ 50-90% จะติดเชื้อตัวนี้ และสามารถพบเชื้อในเด็กหลังจากหย่านม ตัวอย่างเช่น ในประเทศแถบอัฟริกาตะวันตก 80% ของเด็กอาจติดเชื้อ *H.pylori* ตั้งแต่อายุ 5 ขวบ(8) การติดเชื้อนี้จะมีความสัมพันธ์กับประชากรที่มีฐานะยากจนมีความเป็นอยู่ที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น อยู่อย่างแออัด มีน้ำดื่มไม่สะอาด โดยทั่วไปแล้วอัตราการติดเชื้อในเด็กจะต่ำ และจะเพิ่มมากขึ้นถึง 50% ในผู้ใหญ่(10) อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจะต่างกันในแต่ละเชื้อชาติ(11)

ในประเทศไทย ได้มีรายงานการติดเชื้อ *H.pylori* ในประชากรภาคอีสาน พบ การติดเชื้อในเด็กอายุ 5-9 ปี 17.5% และจะเพิ่มขึ้นเป็น 55% ในกลุ่มอายุ 15-29 ปี และพบสูงถึง 75% ในกลุ่มอายุ 30-49 ปี ในเด็กที่อายุ 1-4 ปี ที่อยู่บ้านเด็กกำพร้า จะมีอัตราการติดเชื้อสูงถึง 74% (12) การศึกษาในเด็กชาย หญิง อายุตั้งแต่ 2 เดือน จนถึง 16 ปี ที่มีสุขภาพดี ในจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อปี 2544 พบอัตราชุกการติดเชื้อ *H.pylori* ในเด็กหญิง 51% และ 44% ในเด็กชาย และพบว่าอัตราการติดเชื้อจะสูงขึ้นตามอายุ คือพบ24% ในกลุ่มที่มีอายุ ต่ำกว่า 1 ปี และ 58% ในเด็กที่มีอายุมากกว่า 10 ปี (13) แสดงว่าการติดเชื้อยังเป็นปัญหาสำคัญของประเทศในปัจจุบันอยู่

การติดต่อ คาดว่าจะเป็นแบบ fecal-oral route โดยมีงานวิจัยในประเทศเปรู ที่พบเชื้อ *H.pylori* ปนเปื้อนในน้ำ (14) เชื้อจะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำย่อยอาหาร มีรายงานการพบเชื้อในปากและคราบฟัน(dental plaque) (15) ได้มีการสังเกตว่าผู้ที่ติดเชื้อมักจะมีการอาเจียรหรือท้องเสีย ซึ่งส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อได้ทางอากาศ การปนเปื้อนเชื้อจากสิ่งอาเจียน หรืออุจจาระ ดังนั้น ในประเทศที่กำลังพัฒนาจะมีโอกาสติดเชื้อในวัยเด็ก จากสิ่งแวดล้อมดังกล่าว (16)

1.4 การก่อโรค

เชื้อ *H.pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะอาหารของคน ซึ่งในปี ค.ศ 1983 ได้มีรายงานโดย นายแพทย์ชาวออสเตรเลียสองท่าน คือ Barry Marshall และ Robin Warren สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อ และแยกเชื้อ จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร และพบว่าเชื้อ *H.pylori* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบและแผลในกระเพาะอาหาร(17) สาเหตุการก่อโรคที่สำคัญ คือ การที่เชื้อผลิตเอนไซม์ urease เป็นจำนวนมาก ซึ่งเอนไซม์ตัวนี้สามารถย่อย urea ที่มีอยู่ในน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เกิด ไบคาร์บอเนตและแอมโมเนีย เกิด hydrogen ion ทำให้ลดความเป็นกรดของน้ำย่อยลง ดังนั้นตัวเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ และเนื่องจากตัวเชื้อประกอบด้วย adhesin รอบตัว ทำให้สามารถเกาะติดกับ receptor บน epithelium cell ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น และในการที่เชื้อสามารถผลิตแอมโมเนียอาจไปทำลาย epithelium cell โดยทำให้เกิด vacuolation และอาจผลิตสารพิษ คือ vacuolating cytotoxin A(vacA) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ เข้าไปอยู่ใน epithelium cell โดยวิธี endocytosis เกิดการรวมตัวกันระหว่าง endosome – lysosome เป็น vacuoles สารพิษที่เกิดขึ้นมีหลากหลาย ซึ่งบางตัวจะรุนแรง และทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร หรืออาจไม่รุนแรง ทำให้เกิดกระเพาะอาหารอักเสบแบบไม่มีอาการ หรือไม่เกิดแผลในกระเพาะอาหาร อีกตัวหนึ่ง คือ สารพิษที่สัมพันธ์กับ gene CagA ยีนตัวนี้จะสร้างสาร interleukin–8 ใน epithelium cell ซึ่งสาร interleukin นี้จะเป็นตัวล่อ neutrophils เข้ามาใน lamina propria แทรกอยู่ระหว่าง epithelium cell ซึ่งการเกิดแผลอาจเกิดจาก neutrophils ที่มีเป็นจำนวนมาก หลั่งสารที่มีคุณสมบัติย่อยเนื้อเยื่อ เช่น เอนไซม์ proteases ออกมา(8)

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าเชื้อ *H.pylori* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหาร และเป็นแผลในกระเพาะอาหารหรือบริเวณลำไส้ส่วนต้น ซึ่งประมาณ 80-90% จะติดเชื้อ *H.pylori* และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H.pylori* จะประสบกับปัญหาการอักเสบเรื้อรัง คือ เป็นๆ หายๆ หลังจากรักษาโดยให้ยาลดกรด ก็มักจะกลับมาเป็นแผลอยู่เรื่อยๆ ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ นอกจากนี้แล้วเชื้อ *H.pylori* ยังเป็นปัจจัยเสี่ยงที่จะทำให้เกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร ซึ่งหมายความว่า ผู้ป่วยโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร มากกว่าครึ่งหนึ่งจะมีการติดเชื้อ *H.pylori* คือจะมากกว่าผู้ไม่ติดเชื้อ 4–5 เท่า (3) องค์การอนามัยโลกได้ให้ความสำคัญเชื้อตัวนี้ว่าเป็น carcinogen(4) ในปัจจุบันการรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบที่ติดเชื้อ *H.pylori* โดยการกำจัดเชื้อตัวนี้แล้ว พบว่าผู้ป่วยที่มีโอกาสกลับมาเป็นแผลในกระเพาะอาหารลดลงอย่างมาก(5)

ในประเทศไทย สิริวัฒน์ อนันตพันธ์พงษ์(6) ได้รายงานการติดเชื้อ ในกลุ่มผู้ป่วย dyspepsia ที่เข้าตรวจด้วยการส่องกล้องกระเพาะอาหาร และตรวจหาเชื้อด้วยวิธีตรวจเอนไซม์ urease วิธีย้อมสีเนื้อเยื่อ หรือวิธีเพาะเชื้อจากสถาบันต่างๆ ทั่วประเทศ พบอัตราการติดเชื้อ *H.pylori* 31 –74% ในจังหวัดเชียงใหม่ Peerakome และคณะ(7) ได้รายงานอัตราการติดเชื้อ *H.pylori* ในผู้ป่วยที่แสดงอาการโรคกระเพาะอาหารอักเสบ เข้าตรวจด้วยการส่องกล้องที่โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มกราคม – ธันวาคม 2536 จำนวน 84 ราย โดยการตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธีตรวจเอนไซม์ urease วิธีย้อมสีเนื้อเยื่อ พบเชื้อ *H.pylori* 60.7%

1.5 วิธีการตรวจหาเชื้อ *H.pylori*

ปัจจุบันการวินิจฉัยเชื้อ *H.pylori* ในห้องปฏิบัติการสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีการ คือ

1) วิธีทาง Serology โดยตรวจหาแอนติบอดี ต่อเชื้อ *H.pylori* ในซีรัมของผู้ป่วย หลังจากมีการติดเชื้อ *H.pylori* จะทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในรูปของ IgG, IgM และ IgA โดย IgM จะมีความจำเพาะต่อส่วนของ Lipopolysaccharide ของเชื้อ ซึ่งระดับความเข้มข้นของ IgM จะสูงเมื่อได้รับเชื้อในระยะแรก แต่จะอยู่ในกระแสเลือดไม่นาน ระดับแอนติบอดีชนิด IgM จะลดลงภายใน 2 เดือน หลังจากนั้น แอนติบอดีชนิด IgA และ IgG จะถูกสร้างขึ้น การตรวจสอบหาแอนติบอดี จะไม่สามารถแยกระหว่างการติดเชื้อในอดีตและปัจจุบัน นอกจากนี้ระดับของภูมิคุ้มกันก็ไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค(8) วิธีการตรวจทาง serology สามารถทำได้หลายวิธี เช่น Latex agglutination test, Immuno Blotting และ Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) ข้อดีของวิธีนี้คือ ราคาไม่แพงมากนัก และได้ผลรวดเร็ว และผู้ป่วยไม่ต้องส่องกล้อง เหมาะสำหรับการตรวจคัดกรอง (screening) แต่ก็มีข้อเสีย คือ จะไม่สามารถแยกระหว่างการติดเชื้อในอดีตและปัจจุบัน นอกจากนี้ระดับของ

ภูมิคุ้มกันจะไม่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค(18) ได้มีการตรวจหา IgG ในน้ำลาย แต่ความไวและความจำเพาะยังต่ำอยู่ คือ ความไวเท่ากับ 84% และความจำเพาะ 80% (19)

2) การตรวจโดยวิธี urea breath test โดยให้ผู้ป่วยรับประทานสารละลาย urea ที่ปิดฉลากด้วย ^{13}C หรือ ^{14}C หากผู้ป่วยมีการติดเชื้อ *H.pylori* เอนไซม์ urease ซึ่งสร้างจากตัวเชื้อ จะย่อยสลาย urea เป็น ไบคาร์บอเนตและแอมโมเนีย ซึ่ง ไบคาร์บอเนตนี้จะย่อยต่อไปเป็น CO_2 และถูกดูดซึมกลับเข้าสู่กระแสเลือดทาง gastric mucosa และถูกขับออกทางลมหายใจ สามารถตรวจหา ^{13}C หรือ ^{14}C โดยเครื่องมือ urea breath test (UBTS) วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสะดวกในการตรวจ สามารถเก็บตัวอย่างได้ง่าย และเป็นวิธี non-invasive นอกจากนี้แล้ว ความไว และความจำเพาะจะสูงมาก คือ 100% และสามารถตรวจเมื่อเชื้อยังมีชีวิตอยู่ ดังนั้นจึงสามารถใช้ติดตามผล หลังการรักษาได้ นอกจากนี้แล้วยังเป็นวิธีที่ไม่มี bias ในการเก็บ specimen เช่น การ biopsy กล่าวคือ เป็นการศึกษากระเพาะอาหารทั้งหมด(18) ในประเทศยุโรป และอเมริกาจึงใช้เป็นวิธี gold standard อีกวิธีหนึ่งแต่มีข้อเสียคือเครื่องมือจะมีราคาค่อนข้างแพง

3) การตรวจชิ้นเนื้อจากกระเพาะอาหารโดยการตัดเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหารจากบริเวณ antrum ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเชื้อ *H.pylori* จำนวนมาก นำชิ้นเนื้อมาตรวจเชื้อได้หลายวิธีดังนี้

   3.1) การตรวจทางพยาธิวิทยา โดยนำชิ้นเนื้อมาแช่ในฟอร์มาลินและตัดเป็นแผ่นบางๆ แล้วนำไปย้อมสี เช่น hematoxylin และ Eosin, Giemsa stain, Warthin-starry silver stain หรือใช้วิธีทาง Immuno histochemistry โดยติดฉลากแอนติบอดีต่อเชื้อ*H.pylori* ด้วยเอนไซม์หรือสารเรืองแสง(Fluorescein) สามารถตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ข้อดีของวิธีนี้คือ ค่าความไวและความจำเพาะค่อนข้างสูง คืออยู่ในช่วง 95% ถ้าผู้อ่านผลมีประสบการณ์สูง วิธีนี้สามารถใช้เป็นวิธีอ้างอิงได้(20)

   3.2) การเพาะเชื้อ โดยการนำชิ้นเนื้อใส่ใน transport media เช่น 0.85% NaCl หรือ Brucella broth มาบดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือด เช่น เลือดแกะเป็นส่วนประกอบ ห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐาน ค่าความไวและความจำเพาะจะสูงคือ 98.4%และ 100% ตามลำดับ สามารถใช้เป็นวิธีอ้างอิงได้ ข้อดีของวิธีนี้คือ สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อยังมีชีวิตอยู่ ส่วนข้อเสียคือการเลี้ยงเชื้อจะค่อนข้างยาก ทั้งนี้อาจเกี่ยวเนื่องจากผลของยาฆ่าเชื้อหรือสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ใช้ในการทำ endoscopy นอกจากนี้แล้วสิ่งส่งตรวจจะต้องส่งถึงห้องปฏิบัติการโดยเร็ว หากห้องปฏิบัติการอยู่ไกลจากห้องส่องกระเพาะอาหาร อาจเกิดปัญหาได้ ข้อเสียอีกข้อหนึ่งคือเชื้อจะใช้เวลาเจริญเติบโตนาน 3 - 7 วัน(21)

3.3) การตรวจหาเอนไซม์ urease เนื่องจากเชื้อ *H.pylori* สามารถสร้าง urease เอนไซม์ จำนวนมาก เมื่อนำชิ้นเนื้อใส่เข้าไปในน้ำยาที่มีส่วนประกอบของ urea เอนไซม์ urease จะสลาย urea เป็นแอมโมเนียและไบคาร์บอเนต ทำให้ความเป็นกรดลดลง สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ phenol red เป็น indicator โดยสีของ urea media จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง เมื่อมีเอนไซม์ urease อยู่ ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิตน้ำยาสำเร็จรูปออกจำหน่าย เช่น CLO test (Delta West Ltd,Australia) ข้อดีของวิธีนี้คือ มีราคาถูก ตรวจง่ายและรวดเร็ว สามารถแปรผลได้ภายใน 1 ชั่วโมง และยังสามารถยืนยันได้ว่า เชื้อยังมีชีวิตอยู่ ข้อเสียคือ ค่าความไว จะไม่สูงนักคือประมาณ 90% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ และวิธีตรวจทางพยาธิวิทยา(22)

3.4) การตรวจโดยวิธี DNA probe โดยการสกัด DNA จากเชื้อ *H.pylori* ที่เพาะเลี้ยงไว้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H.pylori* นำมาทำให้บริสุทธิ์และปิดฉลากด้วยสารรังสี ^{32}P นำมาเป็น probe สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี dot blot hybridization บน nylon membrane ซึ่ง sensitivity ของวิธีนี้สามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำสุดจำนวน 5×10^4 cell(21) ได้มีการพัฒนาโดยการเตรียม DNA probe ด้วยชิ้น DNA ขนาด 17 kb แทนการใช้ genomic DNA ทำให้ระยะที่ probe จับกับ DNA template จะเร็วขึ้น(23)

3.5) การตรวจโดยวิธี PCR ได้มีการนำเอาเทคนิค PCR มาตรวจหาเชื้อ *H.pylori* มาประมาณ 10 ปีแล้ว โดยเริ่มจาก Valentine และคณะ(24) ได้ตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยใช้ ตำแหน่งยีนส่วนของ DNA ที่มีขนาด 1.9 kb พบว่า sensitivity และ specificity 93% และ 100% ตามลำดับ ต่อมามีผู้สนใจทำการวิจัยอย่างต่อเนื่อง และได้นำตำแหน่งยีนเป้าหมายในการทำ PCR ตำแหน่งต่างๆ เช่น 16S rRNA, UreA, UreC และส่วนของ DNA ที่มีขนาด 860 bp มาใช้ พบว่า sensitivity และ specificity สูงมากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี urea breath test (25,26,27,28) และได้มีรายงานการใช้ตำแหน่งยีน HpaA ซึ่งสร้างโปรตีน adhesin subunit เป็นเป้าหมายในการทำ PCR โดยนำไปตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในน้ำดื่ม พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ต่ำถึง 1 cell (14)

1.6 เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) (29,30)

เป็นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ในหลอดทดลอง เพื่อเพิ่มจำนวน DNA เฉพาะส่วนอย่างจำเพาะ ในหลอดทดลอง(invitro) โดยมีหลักการพื้นฐานเลียนแบบขบวนการสังเคราะห์ DNA ในเซลล์ (DNA replication) ในการเพิ่มจำนวน DNA จะต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ DNA แม่พิมพ์ (DNA template), Thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate(dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP, oligonucleotide primer 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาสามารถดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง เป็นลูกโซ่ จะประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1) Denaturation เกิดที่อุณหภูมิสูง ประมาณ 90-95 oC ทำให้ DNA แม่พิมพ์(template) ที่เป็นเกลียวคู่(double strand DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยว 2 เส้น(two single strand) ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication
2) Primer annealing โดย primer 2 สายที่ถูกสังเคราะห์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นคู่สมกับปลาย 3' (3' end) ของ DNA แม่พิมพ์ ที่มีความยาว 17-30 nucleotides และแต่ละสายจะเข้าไปจับตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่เป็นคู่สมบนสาย DNA แม่พิมพ์(annealing sites) จะเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 40-60 oC
3) Primer extension หรือ amplification step เป็นขั้นตอนการต่อสายหรือสร้าง DNA โดยเอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งจะทำหน้าที่ต่อลำดับ nucleotide จากที่ปลาย 3' ของ primer ทั้งสองในทิศทาง 5' ➔ 3' สภาวะที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่เลือกใช้ ในกรณีของเอนไซม์ Taq DNA polymerase อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 72oC การสร้าง DNA หรือการต่อ primer จะดำเนินไปจนสุดปลาย template เมื่อสิ้นสุด 1 รอบ(1 cycle) จะได้ DNA 2 คู่ ซึ่งเมื่อจบรอบที่ 2 ก็จะได้ DNA 4 คู่ ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆ จะได้ DNA เพิ่มขึ้น เป็นแบบทวีคูณ (exponential) เช่น ทำ n รอบ ก็จะได้ จำนวน DNA 2^n คู่

เนื่องจากวิธี PCR สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ไม่จำกัดจำนวน ดังนั้น DNA แม่พิมพ์ที่ต้องการเพิ่มจำนวน อาจเริ่มจากปริมาณน้อยๆ และไม่จำเป็นต้องแยก DNA แม่พิมพ์ให้บริสุทธิ์ก่อน เพราะ primer ที่ใช้จะมีความจำเพาะต่อ DNA ของสารที่ต้องการเพิ่มจำนวน

1.7 ผลงานที่เกี่ยวข้อง

ในปี ค.ศ 1991 Valentine และคณะ(24) ได้ใช้เทคนิค PCR เพื่อใช้ตรวจสอบ เชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยได้สุ่มเลือกชิ้น DNA ขนาด 1.9 kb จาก cloned library เพื่อนำมาหาลำดับเบสและเลือกชิ้น DNA เป้าหมาย ในการทำ PCR ขนาด 203 bp ใช้ primer มีความยาว 20 bp และใช้ probe ที่มีลำดับเบสอยู่ระหว่าง primer 2 ตัว มีความยาว 20 bp นำมาปิดฉลาก

ด้วย ^{32}P ตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี Southern blot hybridization วิธีนี้สามารถวิเคราะห์เชื้อได้ต่ำสุด 100 cell และเมื่อนำวิธี PCR ที่พัฒนาได้มาตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อและวิธีทางพยาธิวิทยา พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ 13 ใน14 ตัวอย่าง(93%) และตรวจในตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อโดยวิธีอ้างอิง วิธี PCR ตรวจได้ถูกต้อง 100% ในตัวอย่างน้ำย่อยพบเชื้อ 11 ใน 13 ตัวอย่าง 85% แต่มี 1 ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อโดยวิธีอ้างอิง แต่พบโดยวิธี PCR

มีการนำเอาตำแหน่ง 16S rRNA มาเป็น DNA เป้าหมายในการเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR โดยใช้ primer 2 เส้นมีความยาว 20 bp ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 139 bp สามารถนำมาตรวจหาเชื้อในชิ้นเนื้อสด จากกระเพาะอาหารและชิ้นเนื้อที่อยู่ในพาราฟิน เปรียบเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา พบว่าวิธี PCR มี sensitivity 94% และ specificity 100% ซึ่งจะสูงกว่า วิธี urease test และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ (31)

Labigne และคณะ(32) ได้ค้นพบ urease ยีนที่ทำให้เกิด urease activity จากเชื้อ *H.pylori* ที่ได้จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย และมีการหาลำดับเบสของ urease ยีน ซึ่งจะประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ UreA(717 bp) UreB(710 bp) UreC(1338 bp) และ UreD (398 bp) ซึ่งยีนที่กล่าวมานี้ได้มีการนำมาเป็นเป้าหมายของ PCR เช่น Clayton และคณะ(25) ได้ใช้ UreA ยีน และใช้ส่วนของ DNAเป้าหมาย ในการทำ PCR ทีมีขนาด 411 bp ใช้ primer มีความยาว 18 bp ได้ specificity ของวิธี 100% และสามารถตรวจเชื้อ *H.pylori* ได้ต่ำถึง 10 cell และเมื่อนำไปตรวจหาเชื้อจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร พบเชื้อ 15 ใน 23 ตัวอย่าง ในขณะที่วิธีเพาะเชื้อและวิธีตรวจทางพยาธิวิทยา พบเชื้อ 7 ใน 23 ตัวอย่าง แสดงว่าวิธี PCR มี sensitivity ดีกว่าวิธีอื่นๆ การนำเอา UreC ยีน มาเป็นเป้าหมายในการทำ PCR ก็พบ sensitivity สูงกว่าวิธีอื่นๆ เช่นกัน(26)

Engstrand และคณะ(33) ได้ใช้เทคนิค Reverse Transcriptase PCR โดยสกัด RNA ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร แล้วใช้ RNA นี้เป็นแม่พิมพ์ สำหรับปฏิกิริยา reverse trancription ให้สังเคราะห์ cDNA (complementary DNA)จากนั้นจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็นแม่พิมพ์สำหรับปฏิกิริยา PCR ผลิตภัณฑ์ของ DNA มีขนาด 500 bp และเป็นส่วนหนึ่งของ 16S rRNA วิธีนี้พบว่า specificity 100% และ sensitivity จะเพิ่มขึ้น 25-50 เท่า สามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำถึง 2 cells

Weiss และคณะ(31) เปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ โดยเทียบวิธี PCR กับวิธีอื่นๆ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี urea breath test พบความถูกต้อง 14 ใน 15 ตัวอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเชื้อ วิธีทางพยาธิวิทยา วิธีตรวจหาเอนไซม์ urease วิธีตรวจทาง serology และวิธี Western blot พบว่ามี specificity 100% และ sensitivity 94% ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีทาง serology และ western blot

ได้มีการค้นพบ HpaA ยีน ซึ่งเป็นยีนที่สร้าง adhesin subunit protein มีการหาลำดับเบสของยีนตัวนี้ และมีการนำมาเป็น DNA เป้าหมายในการทำ PCR โดยใช้ primer ที่มีขนาด 20 bp ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 375 bp เมื่อนำไปตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในน้ำดื่ม พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำถึง 1 cell(14)

1.8 วัตถุประสงค์ของโครงการ

1) เพื่อนำเอาเทคนิค PCR มาหาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจหา เชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ
2) เพื่อนำเอาเทคนิค PCR ที่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมมาเปรียบเทียบกับวิธีที่มีอยู่เดิม คือ urease test และการตรวจทางพยาธิวิทยา โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบความไว(sensitivity) และความจำเพาะ(specificity)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
วิธีวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

- เครื่อง Thermocycle (Perkin Elmer Model 2400)
- Microcentrifuge (Eppendorf)
- ชุด Electrophoresis (LKB)
- Photodocumentation System Model : DR-001 FDC version10 (VILBER LOURMAT)
- Incubator
- Analytical balance
- Spectrophotometer Shimadzu UV 2101 PC
- Freezer - 20 ^{o}C
- ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 1-10, 5 - 50 และ 50 - 200 ul
- ห้อง Pre amplification ที่มี Laminar Flow Cabinets พร้อม UV Lamp สำหรับการเตรียม
- PCR reaction mixture
- Microcentrifuge tube ขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml
- Thin wall PCR tube ขนาด 0.2 ml (Micro Amp USA, PE Biosystems)
- ปิเปตทิปที่มีตัวกรอง ขนาดปริมาตร 10 ul 20 ul และ 100 ul
- ปิเปตทิป ขนาด 100 ul 200 ul

2.2 สารเคมี

จากบริษัท QIAGEN, Germany

- QIAamp® DNA Minikit
- QIAquick PCR Purification Kit
- Taq DNA polymerase (5 unit/ul)
- Hot Star Taq DNA polymerase (5 unit/ul)

จากบริษัท Sigma Chemical Co.,Ltd. USA

- Chelex 100 (C - 7901)
- Boric acid (B-7901)
- Trizma Base, Molecular Biology Grade (T - 6066)

- Ethidium bromide (E- 8751)
- Mineral oil
- KCl
- $MgCl_2$
- BSA
- Tween 20

จากบริษัท New England Biolabs USA

- 100 bp DNA ladder (N3231S)
- Deoxynucleotide triphosphate solution (N0446S)
- Restriction enzyme Hinf I 5,000 units
- Low EEO Agarose

จากบริษัท Ransom Hill Bioscience USA

- Oligonucleotide primers

- เชื้อ *H.pylori* (strainHMK 127) จากผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบและติดเชื้อ *H.pylori* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr.Carl J Mason สถาบันวิจัยแพทย์ทหารบก The Armed Force Research Institute of Medical Sciences(AFRIMS) กรุงเทพฯ

2.3 การดำเนินการวิจัย

2.3.1 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารตรงตำแหน่ง antrum จำนวน 4 ชิ้นจากผู้ป่วยที่มีอาการโรคกระเพาะอาหาร จำนวน 72 ราย โดยวิธี gastroduodenal endoscopy ที่หน่วยระบบทางเดินอาหาร โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ ชิ้นเนื้อ 1 ชิ้นนำไปตรวจหา เชื้อ *H. pylori* โดยวิธี urease test อีก 1 ชิ้นตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยา อีก 2 ชิ้น เก็บแยกใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml ปิดฝาให้สนิท ปิดฉลาก specimen number เก็บไว้ที่ - 20 ^{o}C เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR ต่อไป

2.3.2 การตรวจหาเชื้อ *Helicobacter pylori*

1) การตรวจ โดยวิธี urease test โดยนำชิ้นเนื้อ 1 ชิ้น ใส่ลงในน้ำยาสำเร็จรูป

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ

H.P test ทันที หากเนื้อเยื่อมีเชื้อ *H.pylori* จะเปลี่ยนสีน้ำยาจากสีเหลืองเป็นสีแดง ภายใน 2 ชั่วโมง(34)

2) การตรวจโดยวิธีทางพยาธิวิทยา นำเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร อีก 1 ชิ้น ไปใส่น้ำยา formalin ตรวจหาเชื้อ *H. pylori* โดยย้อมสีด้วย Giemsa stain อ่านผลโดย รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3) การตรวจโดยวิธี PCR

- การสกัด DNA จากเชื้อ *H. pylori* (strain HMK 127) และการสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ จำนวน 72 ราย โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp®DNA Mini Kit ตามวิธีการในเอกสารวิธีสกัดจากบริษัท DNA ที่สกัดได้จะเก็บไว้ที่ - 20 oC จนกว่าจะวิเคราะห์หาเชื้อด้วยวิธี PCR
- การสกัด DNA เชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบโดยเลือกตัวอย่างที่มีการสกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit จำนวน 48 ราย ชิ้นเนื้ออีก 1 ชิ้น นำมาสกัด DNA โดยใช้ Chelex-100 chelating resin ขั้นตอนในการสกัดคือล้างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารด้วยน้ำ typel ดูดน้ำออก และเติม 500 ul สารละลาย Chelex-100 (20%w/v ในน้ำ sterile) โดยให้เนื้อเยื่ออยู่ในสภาวะที่ล้อมรอบด้วยสาร Chelex ทิ้งค้างคืน ไว้ที่ 56 oC ต้มในน้ำเดือด 5 นาที DNA ที่สกัดได้จะเก็บไว้ที่ - 20oC จนกว่าจะวิเคราะห์หาเชื้อด้วยวิธี PCR
- การเพิ่มประมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยวิธี PCR เป้าหมายยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ DNA คือ HpaA ยีน ที่ให้ adhesin subunit โดย primers ที่ใช้อ้างอิงจากงานของ Hulten และคณะ(14) ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จะมีขนาด 375 bp เหตุผลที่ใช้เป้าหมาย HpaA ยีน เพราะได้รับคำแนะนำจาก Professor David Graham จาก Inflammatory Bowel Discan Laboratory Veterans Affair Medical Center, Houston, Texas, USA ลำดับเบสของ primers มีดังนี้

  up stream primer 5' → 3' (Hpa- 1) มีความยาว 20 bp

  (5' -GA ATT ACC ATC CAG CTA GCG - 3')

  downstream primer 5' → 3' (Hpa- 2) มีความยาว 20 bp

  5' - GT AAC CTT GAC AAA ACC GGC - 3'

การขยาย DNA เป้าหมาย (PCR amplification) ทำในหลอด PCR ชนิด Thin wall ขนาด 0.2 ml ที่มีฝาปิดสนิท ใช้ปริมาตร 10 ul ซึ่งประกอบด้วย 2 ul DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร และ 8 ul reaction mixture (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% BSA, 0.05% Tween, 0.25 unit Taq DNA polymerase และ primer mixture Hpa-1/Hpa-2 0.25 mM/each primer นำ PCR mixture ใส่ในเครื่อง thermocycle โดยตั้งอุณหภูมิเริ่มแรก ที่ 95 °C เวลา 2.30 นาที และการทำ PCR จะทำ 30 รอบ ซึ่งในแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน denaturation ที่ 94 °C 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 56 °C 1 นาที และขั้นตอน extension ที่ 72 °C 1 นาที สุดท้ายขบวนการ extension ที่ 72 °C 7 นาที

- การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี agarose gel Electrophoresis โดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีอัตราส่วน PCR product:loading buffer 2:5 ปริมาณ 5 ul ส่วน 100 bp DNA ladder ใช้อัตราส่วน DNA ladder : loading buffer 2:3 ปริมาณ 5 ul หากตัวอย่างมีเชื้อ *H.pylori* จะเห็นแถบที่ตำแหน่ง 375 bp โดยดูภายใต้แสง UV

4) การตรวจเช็คยืนยันว่าผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้มาจากเชื้อ *H.pylori*

โดยทำ PCR ตำแหน่ง HpaA ยีน จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่พบเชื้ออยู่โดยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test ขนาดของผลิต ภัณฑ์ PCR คือ 375 bp นำมาตรวจยืนยันดังนี้

- เทียบกับ DNA molecular size
- เทียบกับผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก DNA ที่สกัดจากเชื้อ *H.pylori* strain HMK 127
- ใช้ restriction enzyme (Hinf I) ตัดผลิตภัณฑ์ ขนาด 375 bp ตรงตำแหน่ง ดังนี้

↓

5'.....GANTC.....3'

3'.....CTNAG.....5'

↑

จะได้ DNA 2 ท่อน คือ ขนาด 116 bp และ 259 bp ตำแหน่งที่ enzyme ตัดผลิตภัณฑ์ PCR นั้น ได้มาจาก restriction enzyme site map โดยใช้โปรแกรม DNASIS

- หาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้จาก DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่พบเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี ทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAquick PCR purification kit ตรวจดูผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำ cycle sequencing ใช้ Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (PE Biosystems, USA) จะได้ extension reaction ซึ่งจะนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนด้วย ethanol ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำไป run electrophoresis โดยใช้เครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA)

  ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างจากเชื้อ นำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเชื้อ *H.pylori* ตรงตำแหน่ง HpaA ยีน ที่ได้จาก GenBank accession X 61574 (35)

5) การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และลด non specific band

- การหาความเข้มข้นของ primer

  ทดสอบหาความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยการทดลองโดยใช้ primer mixture (Hpa-1/ Hpa-2) 5 uM/each primer โดยเพิ่มหรือลดปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ใน PCR reaction mixture ที่มีปริมาตรรวม 10 ul

  ปริมาณความเข้มข้นและปริมาตรของ primer mixture ที่ใช้มีดังนี้

ปริมาตร primer mixture (ul)	**ความเข้มข้นต่อหลอด**(uM)
0.25	0.125
0.50	0.250
1.0	0.500
1.5	0.750

  จำนวนรอบที่ใช้ คือ 35 รอบ

- การหาความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase

  ทดสอบความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR โดยทำการเปรียบ เทียบการใช้ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase ต่อ PCR reaction mixture ที่มีปริมาตรรวม 10 ul ดังนี้

  ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase = 0.5 U/ul

Volume (ul)	Final concentration (unit)
0.3	0.15
0.5	0.25
1.0	0.50
1.5	0.75

จำนวนรอบที่ใช้คือ 35 รอบ

- การหาจำนวนรอบ(cycle) ในการทำ PCR

  นำเอา DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่พบเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test มาทำ double dilution จะได้ความเข้มของ DNA อยู่ในช่วง 0.32 - 162 ng/ul นำ DNA ที่ได้ไปทำ PCR ที่ cycle ต่างๆ คือ 30, 35 และ 40 cycle

- การเปรียบเทียบระหว่าง Taq DNA polymerase และ Hot StarTaq DNA polymerase

  นำเอา DNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ที่พบเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test มีความเข้มข้นในช่วง 0.32 - 162 ng/ml จากการหาจำนวนรอบ มาทำ PCR โดยใช้จำนวนรอบ 35 รอบ และใช้ Hot StarTaq DNA polymerase แทน Taq DNA polymerase และตั้งโปรแกรม เครื่อง PCR ให้ใช้โปรแกรมที่ 1 denaturation step เป็นเวลา 15 นาที ที่ 95 ^{o}C

- การลด non specific band โดยใช้ glycerol ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0%, 5%, 10%, และ 15% เพิ่มใน PCR reaction mixture

6) การหา sensitivity ของวิธี PCR

นำเชื้อ *H.pylori* (strainHMK127) มาสกัด DNA โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit คำนวนหาความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ โดยใช้สูตรดังนี้

DNA concentration(ug/ml) = OD_{260} × 100 dilution factor × 50 ug/ml

An OD of 1 corresponds to approximately 50 ug/ml for double standard strand DNA

เตรียม DNA ของ *H.pylori* ให้มีความเข้มข้น 2 ng/ul นำมาเจือจาง 10 เท่า ไปเรื่อยๆ (ten fold dilution) ความเข้มข้นของ *H.pylori* DNA ที่สกัดได้ จะอยู่ในช่วง 2 ng/ ul - 0.2 fg/ul นำมาใช้เป็น DNA template ในการทำ PCR

2.3.3 **ตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย ที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ**

วิธี PCR ที่มีการหาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว นำมาตรวจหาเชื้อ *H.pylori* จาก DNA ที่สกัดโดยวิธีใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบ จำนวน 72 ราย และ DNA ที่สกัด โดยใช้ Chelex-100 chelating resin จำนวน 48 ราย

2.3.4 **เปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของวิธี PCR**

ผลของการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร โดยวิธี PCR และวิธี urease test นำมาหา sensitivity และ specificity เปรียบเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา ซึ่งใช้เป็นวิธี gold standard

2.3.5 **เปรียบเทียบวิธีสกัด DNA จากเชื้อ H.pylori ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร**

เปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของวิธี PCR ที่ได้จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร 2 วิธี คือ ใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit และการใช้ Chelex-100 chelating resin

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 การตรวจหาเชื้อ *H.pylori* โดยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test

การตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบที่มาตรวจโดยการส่องกล้อง จำนวน 72 ราย ตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางพยาธิวิทยา พบผู้ติดเชื้อจำนวน 42 ราย (58.3%) เมื่อตรวจเชื้อโดยวิธี urease test พบผู้ติดเชื้อจำนวน 32 ราย (44.4%) (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย โดยวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test

Specimen No.	*H.pylori* test	
	Histology	Urease test
3	neg	neg
4	1+	pos
5	1+	pos
6	neg	neg
7	3+	pos
8	neg	pos
9	1+	pos (mild)
10	scanty	neg
11	neg	neg
12	neg	neg
13	neg	neg
14	1+	pos
15	1+(mild)	neg
16	1+(scanty)	pos(mild)
17	Neg	neg
18	2+	pos(mild)
19	1+(scanty)	pos
20	1+(scanty)	neg
21	neg	pos(mild)
22	3+	pos

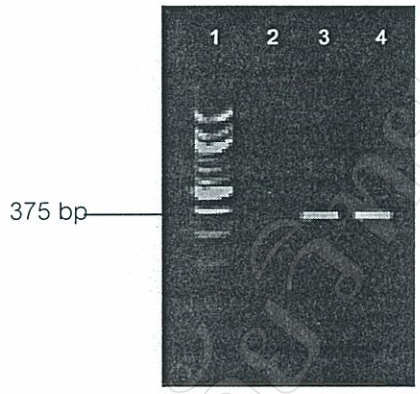
Specimen No.	*H.pylori* test	
	Histology	Urease test
23	neg	neg
24	2+	pos
25	1+(scanty)	neg
26	1+(scanty)	neg
27	neg	neg
28	2+	pos
29	1+	pos(mild)
30	1+	neg
31	neg	neg
32	neg	neg
33	1+(scanty)	neg
34	neg	pos(mild)
35	neg	neg
36	neg	neg
37	neg	neg
38	1+	pos
39	neg	neg
40	3+	pos
41	neg	neg
42	neg	neg
43	1+	neg
44	neg	neg
45	1+	neg
46	neg	neg
47	neg	neg
48	neg	neg
49	neg	neg
50	neg	neg
51	2+	pos
52	neg	neg
53	1+(scanty)	pos

Specimen No.	*H.pylori* test	
	Histology	Urease test
54	1+(scanty)	pos
55	1+	pos(mild)
56	1+(scanly)	pos
57	1+(scanly)	pos
58	1+	neg
59	3+	pos
60	2+	pos
61	2+	pos
62	neg	neg
63	1+	pos
64	neg	pos
65	neg	neg
66	2+	pos
67	neg	pos
68	pos	neg
69	3+	pos
71	1+	neg
72	1+	pos
73	pos	neg
74	pos	neg
75	pos	neg
Positive specimen	42	32
คิดเป็น %	58.3 (42/72)	44.4(32/72)

หมายเหตุ: 1+ มีเชื้อ *H.pylori* น้อย ; 2+ มีเชื้อ *H.pylori* ปานกลาง ; 3+ มีเชื้อ *H.pylori* มาก ; neg ไม่พบเชื้อ *H.pylori* ; pos พบเชื้อ *H.pylori*

3.2 การตรวจเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR

DNA ที่สกัดจากเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) และ DNA จากเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่ได้ตรวจพบเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา และวิธี urease test ได้นำมาเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง โดยมีตำแหน่งยีนเป้าหมายคือ HpaA ยีน ที่ให้ adhesin subunit ใช้ primer Hpa-1 และ Hpa-2 ผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จะมีขนาด คือ 375 bp ตรวจสอบโดยใช้วิธี agarose gel electrophoresis ย้อมสีด้วย ethidium bromide และ ดู band ภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับ molecular size ของ DNA และ DNA ที่สกัดจากเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) และ พบ band จากตัวอย่างผู้ป่วยและตัวอย่างจากเชื้อ *H.pylori* อยู่ที่ตำแหน่ง 375 bp (รูปที่ 3.1)



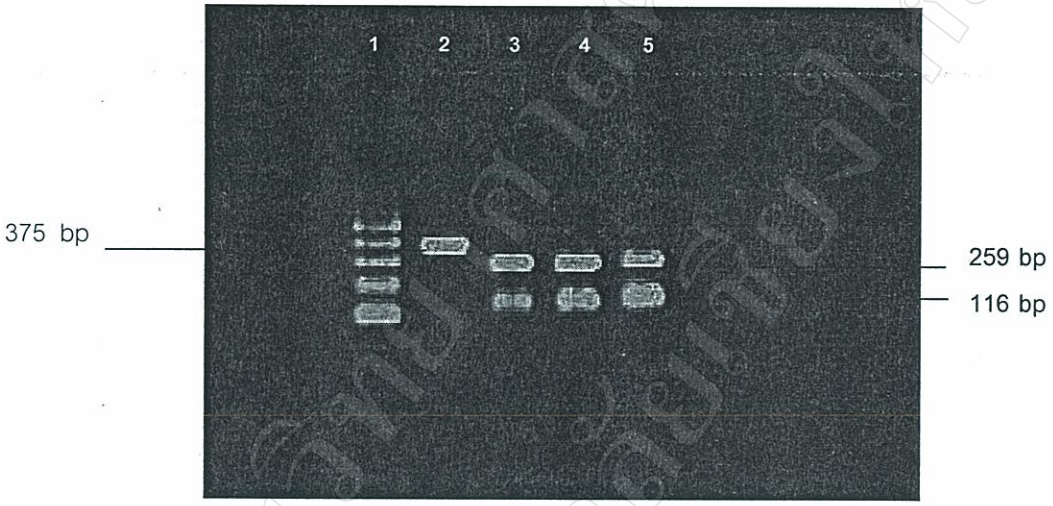
Lane 1 : 100 bp DNA ladder Lane 2 : Negative control Lane 3 : ตัวอย่าง *H.pylori* (strainHMK 127) Lane 4 : ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยตัวอย่าง เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร # 60 ที่พบเชื้อโดยวิธีพยาธิวิทยา และวิธี urease test

รูปที่ 3.1 ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร และจากเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) บน agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide

3.3 การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR

3.3.1 ยืนยันโดยใช้ restriction enzyme Hinf I

ผลิตภัณฑ์ PCR ก่อนตัดด้วย restriction enzyme Hinf I จะอยู่ตรงตำแหน่ง 375 bp เมื่อใส่ restriction enzyme Hinf I ที่ความเข้มข้น 20-40 unit ลงในผลิตภัณฑ์ PCR จะได้ผลิตภัณฑ์ DNA 2 สาย ขนาด 259 และ 116 bp ซึ่งจะตรงตาม restriction enzyme site map โดยใช้ โปรแกรม DNASIS (รูปที่ 3.2)



รูปที่ 3.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *H.pylori* เมื่อใช้ restriction enzyme Hinf I
Lane1:100 bp DNA ladder;Lane2:ผลิตภัณฑ์ PCR จากตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวก *H.Pylori* ทั้งวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test (ตัวอย่าง#7) Lane3: ผลิตภัณฑ์ PCR(ตัวอย่าง#7) ตัดโดยใช้ restriction enzyme Hinf I (20 unit);Lane4: ผลิตภัณฑ์ PCR(ตัวอย่าง#7) ตัดโดยใช้ restriction enzyme Hinf I (30 unit));Lane5: ผลิตภัณฑ์ PCR(ตัวอย่าง#7) ตัดโดยใช้ restriction enzyme Hinf I (40 unit)

3.3.2 การยืนยันผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้ โดยการหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย ที่พบเชื้อทั้งวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test จำนวน 3 ตัวอย่าง (ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารNo.# 38, #54 และ #66) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ HpaA ยีนจาก GenBank acession X 61574 พบว่าลำดับเบสที่หา จะเริ่มจากตำแหน่งที่ ประมาณ 41 ทั้งนี้เป็นเพราะ primer ที่ใช้ คือ Hpa-1 primer ซึ่งเป็น primer เดียวกับที่ใช้ในการทำ PCR พบว่า มีความเหมือนกันอยู่ประมาณ 94% มีอยู่ 6% หรือ 21 ตำแหน่ง ที่ต่างจากลำดับเบสที่ได้จาก GenBank ซึ่งในจำนวนนี้จะมีอยู่ 13 ตำแหน่ง ที่ทั้งสามตัวอย่างจากผู้ป่วยจะเหมือนกัน (ตารางที่ 3.2)

3.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR เพื่อเพิ่ม sensitivity และลด non specific band

3.4.1 การหาความเข้มข้นของ primer Hpa-1/Hpa-2

เปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.125, 0.25, 0.50 และ 0.75 uM ต่อหลอด โดยที่คงสภาวะอื่นๆ ไว้ และเปรียบเทียบผลโดยใช้ตัวอย่างการวิเคราะห์ดังนี้

positive control	Lane 2, 6, 10 และ 14
negative control	Lane 3, 7, 11 และ 15
ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร # 52	Lane 4, 8, 12 และ 16
ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร# 67	Lane 5, 9, 13 และ 17

รูปที่ 3.3 พบว่า positive control จะให้ band ที่ 375 bp และ band เข้มขึ้นตามความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ และ primer mixture ที่ความเข้มข้น 0.50 และ 0.75 uM จะเห็น non specific band อย่างชัดเจน(Lane 2,6,10 และ 14)

Lane negative control จะไม่พบ band เลย เมื่อใช้ primer mixture ที่ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.50 ส่วนความเข้มข้นที่ 0.75 uM จะเห็น non specific band 2 band (Lane 3,7,11 และ 15)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ # 52 ที่ให้ผลลบทั้งวิธี histology และวิธี urease test เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR พบว่า ความเข้มข้น primer mixture ที่ 0.125, 0.25 และ 0.50 uM จะให้ผลบวกโดยความเข้มข้นของ band จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ primer mixture ที่เพิ่มขึ้น แต่

ตารางที่ 3.2 ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ของ *H.pylori* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารตัวอย่าง #38, #54, #66 เทียบกับลำดับเบสของ *H.pylori* ตำแหน่ง HpaA ยีน จาก GenBank accession X 61574

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90        100
                .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
GenBank   GAATTACCATCCAGCTAGCGAGAAGGTTCAAGCGTTAGATGAAAAGATTTTGCTTTTAAAGCCAGCTTTCCAATACAGCGATAACATTGCTAAAGAGTATGAAAATAAAT

#38       ----------------------------------------------------A----------G-----T-----T--------T--------------------C----
#54       ----------------------------------------------------A----------------T-------------T--------------------C----
#66       ----------------------------------------------------A----------------T-------------T--------------------C----

                120       130       140       150       160       170       180       190       200       210
                .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
GenBank   TCAAGAATCAAACCACGCTTAAAGTTGAAGAGATCTTGCAAAATCAGGGCTACAAGGTTATCAATGTGGATAGCAGCGATAAAGACGATTTTTCTTTTGCGCAAAAAAAA

#38       --------------G----C--G------C----T----------------T--------T----A--------------------C------------------
#54       --------------G----C--G------C----T----------------T--------T-----A-----T-----------------------------------
#66       -T------------G-A--C--G------C----T----------------T--------T-----A--------------------C------------------

                230       240       250       260       270       280       290       300       310       320
                .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
GenBank   GAAGGGTATTTGGCGGTTGCTATGATTGGCGAAATTGTTTTACGCCCCGATCCTAAAAGAACCATACAGAAAAAATCAGAACCCGGGTTATTATTCTCCACTGGTTTGGA

#38       --------------C--C-------G-----------------------------------------------------------------------------------
#54       --------------C--C-------A-----------------------------------------------------------------------------------
#66       -------------------------G-----------------------------------------------------------------------------------

                340       350       360       370
                .         .         .         .
GenBank   TAAAATGGAAGGGGTCTTAATCCCGGCCGGTTTTGTCAAGGTTAC

#38       ---------------T----------------------------
#54       ---------------T----------------------------
#66       ---------------T----------------------------
```

non specific band จะไม่ปรากฏที่ความเข้มข้นที่ 0.125 uM แต่จะเกิดขึ้นตั้งแต่ที่ความเข้มข้นที่ 0.25 uM เป็นต้นไป โดยที่ความเข้มข้นของ band จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ primer mixture ส่วนที่ความเข้มข้นที่ 0.75 uM ไม่พบ band ที่ 375 bp แต่จะเห็น non specific band (Lane 4,8,12 และ 16)

ตัวอย่าง เนื้อเยื่อ # 67 ซึ่งให้ผลบวกโดยวิธี urease test แต่ให้ผลลบโดยวิธี histology พบว่า เมื่อใช้ PCR จะให้ผลบวกอย่างชัดเจนที่ทุกความเข้มข้นของ primer mixture แต่ที่ความเข้มข้นสูงจะปรากฏ non specific band (Lane 5,9,13 และ 17)

สรุปความเข้มข้นของ primer mixture ที่ 0.25 uM จะเหมาะสมในปฏิกิริยา PCR (Lane 6 - 9) เพราะให้ band positive control ที่ชัดเจน และ negative control จะไม่มี band เกิดขึ้นเลย ถึงแม้ว่าในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร 2 ตัวอย่างจะให้ผลบวก และจะเห็น non specific band เกิดขึ้น แต่จะจางกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ primer mixture ที่สูงขึ้น(0.5 - 0.75 uM)

รูปที่ 3.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ความเข้มข้นของ primer mixture ต่างกัน

Lane 1 : 100 bp DNA ladder;Lane 2,6,10 และ 4 : DNA จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่พบเชื้อโดยวิธีพยาธิวิทยาและurease test โดยใช้ความเข้มข้นของ primer mixture 0.125, 0.25, 0.50 และ 0.75 uM ต่อหลอด ตามลำดับ;Lane 3,7,11 และ 15:Negative control ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template และใช้ความเข้มข้นของ primer mixture 0.125, 0.25, 0.50, และ 0.75 uM ต่อหลอด ตามลำดับ ; Lane 4,8,12 และ16:DNA จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ให้ผลลบ จากการตรวจโดยวิธีพยาธิวิทยา และ urease test(ตัวอย่าง# 52) โดยใช้ primer mixture 0.125, 0.25, 0.50 และ 0.75 uM ต่อหลอด ตามลำดับ;Lane 5,9,13 และ17:DNA จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ให้ผลลบโดยวิธีพยาธิวิทยา แต่ให้ ผลบวกโดยวิธี urease test(ตัวอย่าง# 67) โดยใช้ primer mixture 0.125, 0.25, 0.50 และ 0.75 uM ต่อหลอด ตามลำดับ

3.4.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Taq DNA Polymerase

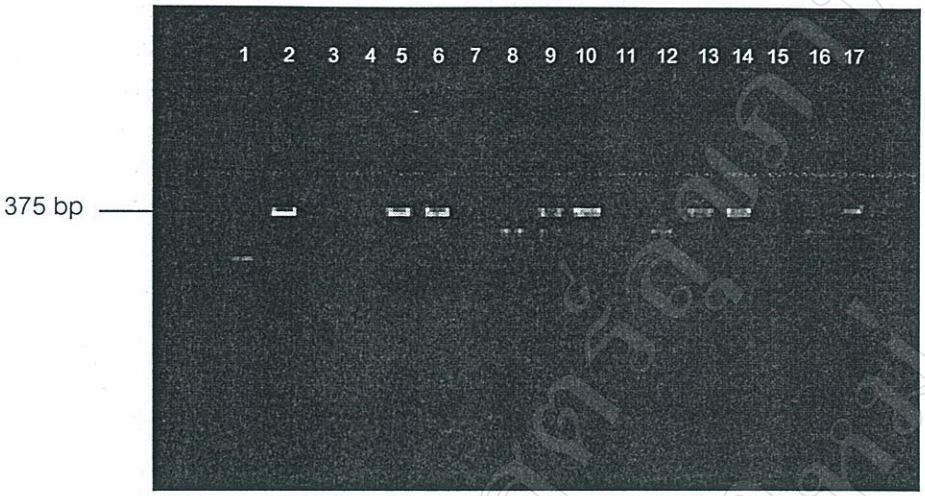
การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Tag DNA Polymerase โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นที่ 0.15, 0.25, 0.50, และ 0.75 unit ต่อหลอด ใช้ความเข้มข้นของ primer mixture ที่ 0.25 uM ต่อ primer ส่วนสภาวะอื่นๆ จะคงไว้ จากรูปที่3.4 พบว่า positive control (Lane 2, 6, 10 และ 14) จะให้ band ที่ 375 bp ทุกความเข้มข้นอย่างชัดเจน ซึ่งความเข้มของ band จะใกล้เคียงกัน ส่วน non specific band จะเห็นชัดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ enzyme สูงขึ้น

ตัวอย่าง negative control จะไม่พบ band ในทุกความเข้มข้นของ enzyme(Lane 3, 7,11, 15)

ตัวอย่างเนื้อเยื่อ # 52 ที่ให้ผลลบทั้งวิธี พยาธิวิทยาและวิธี urease test พบว่าที่ความเข้มข้นของ enzyme 0.15 และ 0.25 unit จะเห็น band ที่ 375 bp (Lane 4 และ 8) แต่จะมี non specific band ที่จาง ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 unit band ที่ 375 bp จะเห็นจางมาก แต่ non specific band จะเห็นชัดมากขึ้น(Land12) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ enzyme จนถึง 0.75 unit จะไม่เห็น band ที่ 375 bp แต่จะเห็น non specific band (Lane 16)

DNA จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร # 67 ซึ่งให้ผลบวกโดยวิธี urease test แต่ให้ผลลบโดยวิธีพยาธิวิทยา (Lane 5, 9, 13, 17) จะพบ band ที่ 375 bp และ non specific band ในทุกความเข้มข้น

สรุปที่ความเข้มข้นของ DNA tag polymerase enzyme ในช่วง 0.15 - 0.25 unit ต่อหลอดจะเหมาะสมที่สุด ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นที่ 0.25 unit เพราะสะดวกต่อการคำนวณ



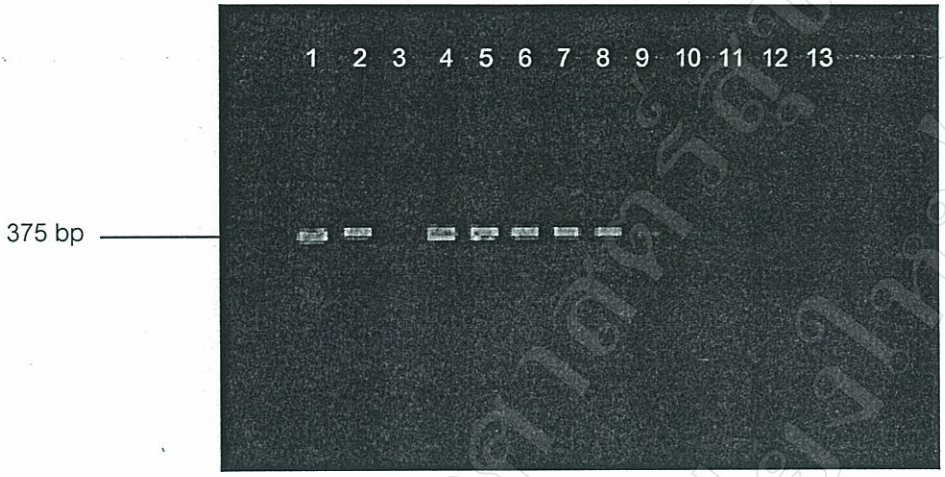
รูปที่ 3.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase ต่างกัน
Lane 1 : 100 bp DNA ladder; Lane 2,6,10 และ14 : DNA จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่พบเชื้อโดยวิธีพยาธิวิทยาและ urease test โดยใช้ Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 0.15 , 0.25, 0.50, 0.75 unitต่อหลอด ตามลำดับ ;Lane; 3,7,11 และ15:Negative control ใช้น้ำกลั่นแทน DNA template โดยใช้ Tag DNA polymerase ความเข้มข้น 0.15 , 0.25, 0.50, 0.75 unitต่อหลอด ตามลำดับ ; Lane 4,8,12 และ16 : DNA จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ให้ผลลบ จากการตรวจ โดยวิธี พยาธิวิทยา และ urease test(ตัวอย่าง# 52) โดยใช้ Tag DNA polymerase ความเข้มข้น 0.15 , 0.25, 0.50, .75 unit ต่อหลอด ตามลำดับ Lane5,9,13และ17:DNAจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ให้ผลลบโดยวิธีพยาธิวิทยา แต่ให้ ผลบวกโดยวิธี urease test(ตัวอย่าง # 67) โดยใช้ Tag DNA polymerase ความเข้มข้น 0.15 , 0.25, 0.50, 0.75 unit ตามลำดับ

3.4.3 **การหาจำนวนรอบ (cycle) ที่เหมาะสมในการทำ PCR**

ได้ใช้ความเข้มข้นของ primer mixture ที่ 0.25 uM ต่อ primer และ Taq DNA Polymerase ที่ 0.25 unit ต่อหลอด หาจำนวน cycle ที่เหมาะสมโดยตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธีพยาธิวิทยาและวิธี urease test นำมาเจือจางโดยวิธี double dilution ความเข้มข้นของ DNA อยู่ในช่วง 0.32 - 162 ng/ul พบว่า ที่ 30 cycle สามารถเห็น band ชัดที่ปริมาณ DNA ต่ำสุด 1.28 ng เมื่อเพิ่มจำนวน cycle เป็น 35 cycle จะเห็น band ที่ปริมาณ DNA ต่ำสุด 0.32 ng เมื่อเพิ่มจำนวนรอบขึ้นไปอีกเป็น 40 cycle จะเห็น band ที่ปริมาณ DNA ต่ำสุด 0.32 ng แต่มี non specificband เกิดขึ้นมาก สรุปว่าจำนวน cycle ที่เหมาะสม คือ 35 cycle (รูปที่3.5, ก - ค)

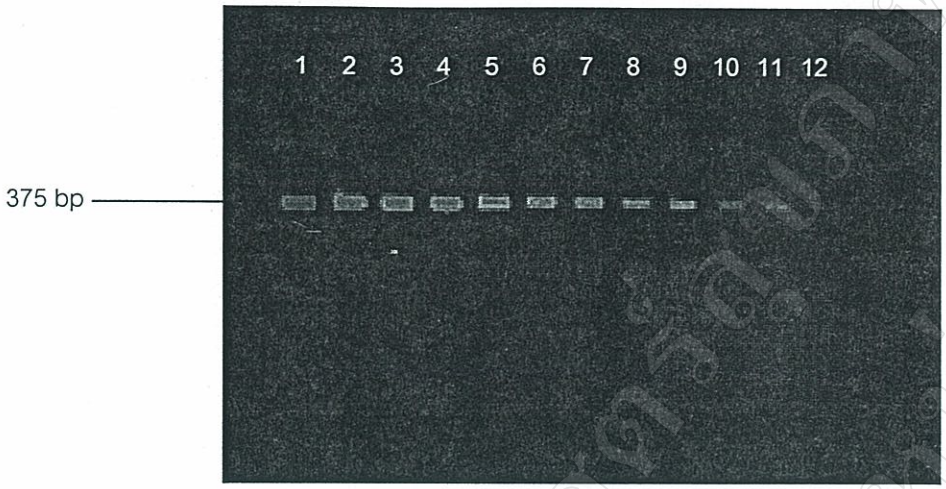
รูปที่ 3.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้จำนวนรอบ(cycle) ต่างกัน

(ก) จำนวน 30 รอบ (ข) จำนวน 35 รอบ และ (ค) จำนวน 40 รอบ



(ก) amplified product **จากการทำ** double dilution **ของตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร** # 60 **ที่** 30 cycle

Lane 1 : *H.pylori* (strain HMK 127)
Lane 2 : Positive control
Lane 3 : Negative control
Lane 4 : Specimen No. 60 dil. 1 = 162 ng/ul
Lane 5 : Specimen No. 60 dil. 1 : 2 = 81 ng/ul
Lane 6 : Specimen No. 60 dil. 1 : 4 = 40.5 ng/ul
Lane 7 : Specimen No. 60 dil. 1 : 8 = 20.25 ng/ul
Lane 8 : Specimen No. 60 dil. 1 : 16 = 10.12 ng/ul
Lane 9 : Specimen No. 60 dil. 1 : 32 = 5.06 ng/ul
Lane 10 : Specimen No. 60 dil. 1 : 64 = 2.53 ng/ul
Lane 11 : Specimen No. 60 dil. 1 : 128 = 1.26 ng/ul
Lane 12 : Specimen No. 60 dil. 1 : 256 = 0.63 ng/ul
Lane 13 : Specimen No. 60 dil. 1 : 512 = 0.32 ng/ul



(ข) amplified product จากการทำ double dilution ของตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร # 60 ที่ 35 cycle

Lane 1 : *H.pylori* (strain HMK 127)

Lane 2 : Positive control

Lane 3 : Specimen No. 60 dil. 1 = 162 ng/ul

Lane 4 : Specimen No. 60 dil. 1 : 2 = 81 ng/ul

Lane 5 : Specimen No. 60 dil. 1 : 4 = 40.5 ng/ul

Lane 6 : Specimen No. 60 dil. 1 : 8 = 20.25 ng/ul

Lane 7 : Specimen No. 60 dil. 1 : 16 = 10.12 ng/ul

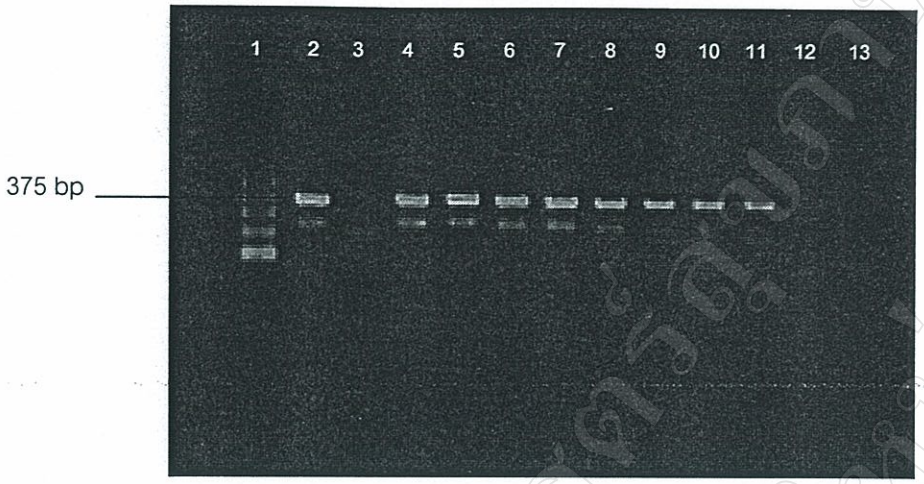
Lane 8 : Specimen No. 60 dil. 1 : 32 = 5.06 ng/ul

Lane 9 : Specimen No. 60 dil. 1 : 64 = 2.53 ng/ul

Lane10 : Specimen No. 60 dil. 1 : 128 = 1.26 ng/ul

Lane 11 : Specimen No. 60 dil. 1 : 256 = 0.63 ng/ul

Lane 12 : Specimen No. 60 dil. 1 : 512 = 0.32 ng/ul



(ค) แสดง amplified product จากการทำ double dilution ของตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร # 60 ที่ 40 cycle

Lane 1 : 100 bp DNA ladder
Lane 2 : Positive control
Lane 3 : Negative control
Lane 4 : Specimen No. 60 dil. 1 = 162 ng/ul
Lane 5 : Specimen No. 60 dil. 1 : 2 = 81 ng/ul
Lane 6 : Specimen No. 60 dil. 1 : 4 = 40.5 ng/ul
Lane 7 : Specimen No. 60 dil. 1 : 8 = 20.25 ng/ul
Lane 8 : Specimen No. 60 dil. 1 : 16 = 10.12 ng/ul
Lane 9 : Specimen No. 60 dil. 1 : 32 = 5.06 ng/ul
Lane 10 : Specimen No. 60 dil. 1 : 64 = 2.53 ng/ul
Lane 11 : Specimen No. 60 dil. 1 : 128 = 1.26 ng/ul
Lane 12 : Specimen No. 60 dil. 1 : 256 = 0.63 ng/ul
Lane 13 : Specimen No. 60 dil. 1 : 512 = 0.32 ng/ul

3.4.4 การใช้ Hot Star Taq DNA Polymerase

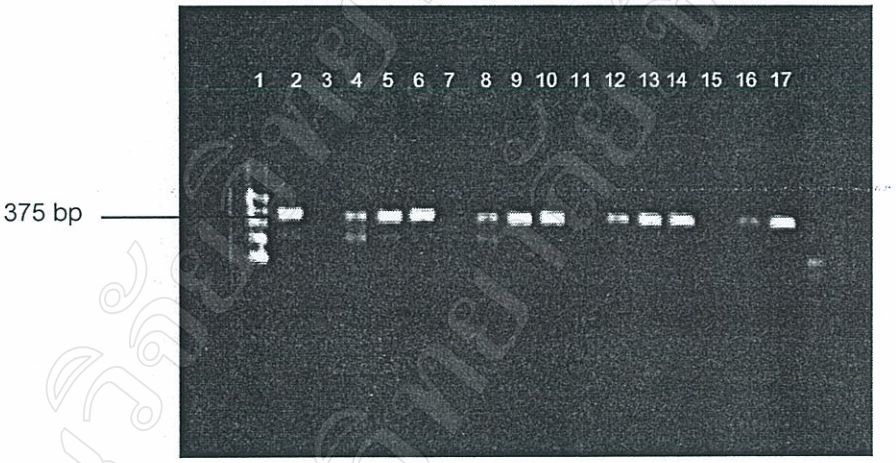
โดยการนำ Hot Star Taq DNA Polymerase มาใช้แทน Taq DNA Polymerase ความเข้มข้นที่ใช้คือ 0.25 U ต่อหลอด จำนวนรอบที่ใช้คือ 35 รอบ DNA template จากการศึกษาหาจำนวนรอบ ที่เหมาะสมในการทำ PCR พบว่า สามารถเห็น band ชัด ที่ปริมาณ DNA ต่ำสุด 0.32 ng และไม่พบ non specific band (รูปที่3.6)

รูปที่ 3.6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ Hot Star Taq DNA Polymerase

Lane 1 : 100 bp DNA ladder
Lane 2 : Negative control
Lane 3 : DNA template ที่ปริมาณ 162 ng
Lane 4 : DNA template ที่ปริมาณ 81 ng
Lane 5 : DNA template ที่ปริมาณ 40.5 ng
Lane 6 : DNA template ที่ปริมาณ 20.25 ng
Lane 7 : DNA template ที่ปริมาณ 10.12 ng
Lane 8 : DNA template ที่ปริมาณ 5.06 ng
Lane 9 : DNA template ที่ปริมาณ 2.53 ng
Lane 10 : DNA template ที่ปริมาณ 1.26 ng
Lane 11 : DNA template ที่ปริมาณ 0.63 ng
Lane 12 : DNA template ที่ปริมาณ 0.32 ng

3.4.5 การลด non specific band โดยใช้ glycerol

รูปที่ 3.7 พบว่า negative control จะไม่มี band เกิดขึ้น แสดงว่าการทำ PCR นี้ไม่มีการปนเปื้อนของ reaction mixture ที่ 0% และ 5% glycerol จะเห็น nonspecific band เกิดขึ้นที่ตำแหน่งประมาณ 250 bp ในตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตัวอย่าง# 52 ค่อนข้างชัดเจน แต่ตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตัวอย่าง# 67 และ positive control จะเห็น band แต่ลางๆ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ glycerol ขึ้นเป็น 10% non specific band ที่ 250 bp จะจางลงมากในตัวอย่าง เนื้อเยื่อ # 52 แต่จะไม่เห็น band เลยในตัวอย่างเนื้อเยื่อ # 67 และ positive control แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ glycerol ขึ้นเป็น 15% non specific band จะไม่เห็นในทุกตัวอย่าง แต่ตัวอย่าง # 52 band ที่ 375 bp จะจางลงมาก แสดงว่าความเข้มข้นของ glycerol จะไปลด non specific band และจะลด intensity ของ band ของผลิตภัณฑ์ DNA ที่ต้องการด้วย สรุปว่าความเข้มข้นของ glycerol ที่ 10% จะเหมาะสมที่สุด



รูปที่ 3.7 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ใช้ความเข้มข้น glycerol ต่างกัน

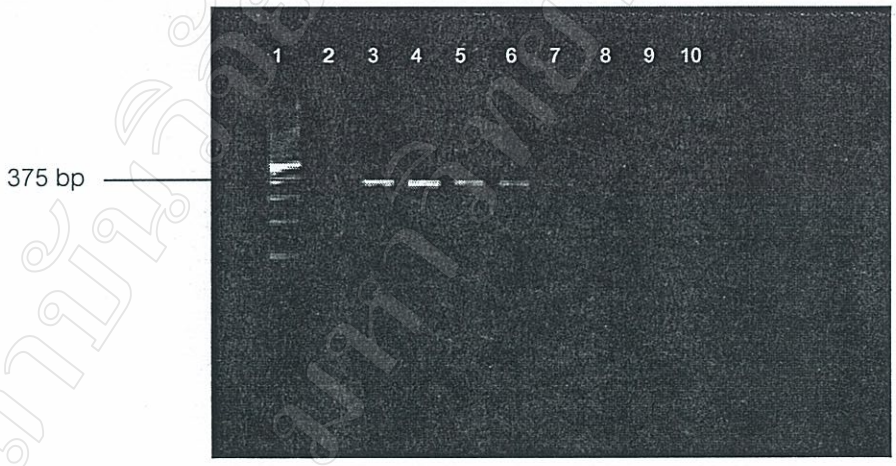
Lane 1: 100 bp DNA ladder ; Lane 2,3,4,5 Positive, negative control และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบเชื้อ *H.pylori* 2 ตัวอย่าง (# 52 และ # 67) ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้น glycerol 0% ; Lane 6,7,8,9 : Positive, negative control และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบเชื้อ *H.pylori* ตัวอย่าง (# 52 และ# 67) ตามลำดับ โดยความเข้มข้น glycerol 5 % ; Lane 10,11,12,13 : Positive, negative control และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบเชื้อ *H.pylori* 2 ตัวอย่าง (# 52 และ # 67) ตามลำดับ โดยความเข้มข้น glycerol 10 %; Lane 14,15,16,17: Positive, negative control และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบเชื้อ *H.pylori* 2 ตัวอย่าง (# 52 และ # 67) ตามลำดับ โดยความเข้มข้น glycerol 15 %

สรุป สภาวะที่เหมาะสมของการทำ PCR ที่ตำแหน่งยีน HpaA โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 375 bp มีดังนี้

- **ความเข้มข้นของ** primer Hpa-1/ Hpa-2 0.25 uM
- **ความเข้มข้นของ** Taq DNA polymerase 0.25 Unit
- **จำนวน** cycle 35 cycle
- glycerol 10 %
- dNTP 200 uM/each

3.5 การหา sensitivity ของวิธี PCR ที่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมแล้ว

ผลิตภัณฑ์ PCR จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* (strain HMK127) ที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าเมื่อ ย้อมด้วย ethidium bromide สามารถเห็น band ภายใต้แสง UV ต่ำสุดที่ความเข้มข้นของ DNA เชื้อ *H.pylori* ที่ 0.4 pg



รูปที่ 3.8 ผลิตภัณฑ์ DNA ของเชื้อ *H.pylori* (strain HMK127) ที่ความเข้มข้นของ DNA ต่างๆ กัน

Lane 1:100 bp DNA ladder;Lane 2: negative control ความเข้มข้นของ DNA *H.pylori* Lane 3 : 4 ng ;Lane 4 : 0. 4 ng ; Lane 5 : 40 pg ; Lane 6 : 4 pg ; Lane 7: 0.4 pg Lane 8: 40 fg

3.6 การตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของวิธี PCR

ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ของ DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Min Kit จำนวน 72 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา และวิธี urease test พบว่าวิธี PCR ตรวจพบเชื้อ จำนวน 38 ราย(52.7%) เมื่อเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา พบ 42 ราย (58.3%) และวิธี urease test พบ 32 ราย(44.4%)(ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา (histology) วิธี urease test และวิธี PCR

Specimen No.	*H.pylori* test		
	Histology	Urease test	PCR (QIAamp)
3	Neg	neg	pos
4	1+	pos	neg
5	1+	pos	neg
6	neg	neg	neg
7	3+	pos	pos
8	neg	pos	pos
9	1+	pos (mild)	pos
10	scanty	neg	neg
11	neg	neg	neg
12	neg	neg	neg
13	neg	neg	neg
14	1+	pos	pos
15	1+(mild)	neg	neg
16	1+(scanty)	pos(mild)	neg
17	neg	neg	Neg
18	2+	pos(mild)	Pos
19	1+(scanty)	pos	Pos
20	1+(scanty)	neg	Neg
21	neg	pos(mild)	Neg
22	3+	pos	Pos

Specimen No.	*H.pylori* test		
	Histology	Urease test	PCR (QIAamp)
23	neg	neg	Neg
24	2+	pos	Pos
25	1+(scanty)	neg	Pos
26	1+(scanty)	neg	Neg
27	neg	neg	Neg
28	2+	pos	Pos
29	1+	pos(mild)	Neg
30	1+	neg	pos(mild)
31	neg	neg	Neg
32	neg	neg	Neg
33	1+(scanty)	neg	Neg
34	neg	pos(mild)	Pos
35	neg	neg	Neg
36	neg	neg	Neg
37	neg	neg	Neg
38	1+	pos	Pos
39	neg	neg	Neg
40	3+	pos	Pos
41	neg	neg	Neg
42	neg	neg	pos(mild)
43	1+	neg	Pos
44	neg	neg	pos(mild)
45	1+	neg	Neg
46	neg	neg	Neg
47	neg	neg	pos(mild)
48	neg	neg	pos(mild)
49	neg	neg	pos(mild-)
50	neg	neg	Neg
51	2+	pos	Pos
52	neg	neg	Pos

Specimen No.	*H.pylori* test		
	Histology	Urease test	PCR (QIAamp)
53	1+(scanty)	pos	Pos
54	1+(scanty)	pos	Pos
55	1+	pos(mild)	Pos
56	1+(scanly)	pos	Pos
57	1+(scanly)	pos	Pos
58	1+	neg	Neg
59	3+	pos	Pos
60	2+	pos	Pos
61	2+	pos	pos(mild-)
62	neg	neg	Neg
63	1+	pos	pos(mild)
64	neg	pos	pos(mild)
65	neg	neg	Neg
66	2+	pos	Pos
67	neg	pos	Pos
68	pos	neg	pos(mild)
69	3+	pos	Pos
71	1+	neg	Neg
72	1+	pos	Pos
73	pos	neg	Neg
74	pos	neg	Neg
75	pos	neg	Pos
Positive specimen	42	32	38
คิดเป็น %	58.3 (42/72)	44.4(32/72)	52.78

หมายเหตุ : 1+ มีเชื้อ *H.pylori* น้อย ; 2+ มีเชื้อ *H.pylori* ปานกลาง ; 3+ มีเชื้อ *H.pylori* มาก ; neg ไม่พบเชื้อ *H.pylori* ; pos พบเชื้อ *H.pylori*

3.7 การหา sensitivity และ specificity ของวิธี PCR เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test

การหา sensitivity และ specificity ของวิธี PCR เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา โดยใช้วิธีทางพยาธิวิทยา เป็น gold standard พบว่า วิธี PCR ที่ได้หาสภาวะเหมาะสมแล้วมี sensitivity 73.8% specificity 76.6% และค่า positive และ negative predictive value คือ 81.6% และ 67.6% ตามลำดับ (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 Sensitivity และ specificity และ positive และ negative predictive value ของวิธี PCR เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหาร

		วิธีทางพยาธิวิทยา(Histology) วิธีอ้างอิง		
		Positive	negative	Total
วิธี PCR	Positive	31	7	38
	Negative	11	23	34
	Total	42	30	72

Sensitivity = 31/42 = 73.8%

Specificity = 23/30 = 76.6%

Positive predictive value = 31/38 = 81.6%

negative predictive value = 23/34 =67.6%

Test bias = 38/42 = 90.5%

เมื่อนำวิธี urease test มาเปรียบเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา จะพบว่า sensitivity จะต่ำกว่าวิธี PCR คือ 64.3% แต่ว่า specificity จะสูงกว่าเล็กน้อย คือ 83.3% โดยมีค่า positive และ negative predictive value ไม่ต่างกันมากนัก (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.5 Sensitivity และ specificity และ positive และ negative predictive value ของวิธี urease test เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหาร

		วิธีทางพยาธิวิทยา(Histology) วิธีอ้างอิง		
		Positive	negative	Total
วิธี urease	Positive	27	5	32
	Negative	15	25	40
	Total	42	30	72

Sensitivity = 27/42 = 64.3%

Specificity = 25/30 = 83.3%

Positive predictive value = 27/32 = 84.4%

Negative predictive value = 25/40 = 62.5%

Test bias = 32/42 = 76.2%

3.8 เปรียบเทียบการตรวจเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยวิธี PCR จาก DNA ที่ใช้วิธีสกัดต่างกัน

ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* โดยใช้วิธีสกัด DNA ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Minikit และใช้ Chelex-100 chelating resin แสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR จาก DNA ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Minikit และ Chelex -100 chelating resin

PCR for *H . Pylori*		
Specimen No.	DNA extraction	
	QI amp	Chelex
3	pos	Pos
4	neg	Po(mild)
5	neg	Pos
6	neg	Neg
7	pos	Pos
8	pos	Pos
9	pos	Pos
10	neg	Pos
12	neg	Neg
13	neg	Neg
14	pos	Pos
15	neg	Neg
16	neg	Neg
17	neg	Neg
18	pos	Pos
19	pos	Pos
20	neg	Neg
21	neg	Pos
22	pos	Pos
23	neg	Neg
24	pos	Pos

PCR for *H . Pylori*		
Specimen No.	DNA extraction	
	QIAamp	Chelex
25	pos	Neg
26	neg	Neg
27	neg	Pos(mild)
28	pos	Pos
32	neg	neg
33	neg	Pos(mild, inUV)
34	pos	pos
38	pos	pos
40	pos	pos
43	pos	neg
44	pos(mild)	neg
45	neg	neg
48	pos(mild)	neg
49	pos(mild)	Neg
50	neg	neg
51	pos	pos
52	pos	neg
53	pos	pos
54	pos	pos
55	pos	pos
56	pos	pos
64	pos	pos
65	neg	neg
66	pos	Pos
67	pos	Pos
68	pos	pos
101	neg	neg

หมายเหตุ : neg ไม่พบเชื้อ *H.pylori*; pos พบเชื้อ *H.pylori*

เปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของทั้ง 2 วิธี โดยใช้วิธี QIAamp® DNA Minikit เป็น gold standard พบว่า มีค่า 89% และ 81% ตามลำดับ (ตารางที่3.7)

ตารางที่ 3.7 Sensitivity และ specificity และ positive และ negative predictive value ของวิธี PCR จาก DNA ของเชื้อ H.pylori ที่สกัดด้วย Chelex-100 chelating resin เทียบกับ DNA ที่สกัดด้วยน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Minikit

		QIAamp Method		
		positive	Negative	Total
Chelex -100 method	Positive	24	4	28
	Negative	3	17	20
	Total	27	21	48

Sensitivity = 24/27 = 89%

Specificity = 17/21 = 81%

Positive predictive value = 24/28 = 85.7%

Negative predictive value = 17/20 = 85%

Test bias = 28/27 = 103.7%

บทที่ 4
วิจารณ์และสรุปผล

ในการทำ PCR คณะวิจัยได้มีการป้องกันการปนเปื้อนจากผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากครั้งก่อน และหรือการป้องกันการเกิดผล False positive โดยได้มีการแยกห้องปฏิบัติการเป็น 3 ห้อง คือ ห้อง pre-amplification สำหรับเตรียม reaction mixture และ DNA template ซึ่งประกอบด้วย Laminar Flow cabinet มีแสง UV เพื่อทำลาย DNA ที่ปนเปื้อน ห้อง amplification สำหรับทำ PCR และห้อง post-amplification ใช้สำหรับตรวจสอบผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้จากการทำ PCR นอกจากนี้แล้วยังได้จัดแบ่งปิเปตอัตโนมัติที่ใช้ให้ประจำแต่ละห้อง โดยไม่ปะปนกัน และการเตรียม reaction mixture ทุกครั้ง ปิเปตที่ใช้จะทิ้งไว้ภายใต้แสง UV ไม่น้อยกว่า 15 นาที เพื่อทำลาย DNA ซึ่งอาจปนเปื้อน และ ปิเปตทิปจะใช้แบบ filter tip

False positive อาจมีผลบวกมาจากการปนเปื้อนจากตัวอย่างหรือจากการ carry-over จากคนไข้ที่ให้ผลบวกโดย PCR และมีผลลบโดยวิธีอื่น ดังนั้น ในการทำ PCR ทุกครั้งจะมีการทำ negative control คือหลอดที่มีส่วนประกอบของ reaction mixture ที่มีน้ำบริสุทธิ์แทนตัวอย่าง DNA เพื่อเป็นการตรวจสอบการปนเปื้อนของน้ำยา นอกจากนี้จะมี positive control คือ การทำ PCR จากตัวอย่าง DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ ที่ให้ผลบวก คือพบเชื้อโดยการตรวจทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test ดังนั้นคณะวิจัยเห็นว่าการตรวจเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR ที่คณะวิจัยได้หาสภาวะที่เหมาะสม ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ผลบวกที่ได้ จะเป็นผลบวกจริงและไม่น่าจะเกิดจากการปนเปื้อน

การยืนยันผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ สามารถทำได้โดยการทำ Southern blot hybridization หรือ dot blot hybridization โดยใช้สารรังสีเป็น probe ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก คณะวิจัยได้ตั้งเป้าหมายที่จะนำวิธี PCR มาใช้สำหรับเป็นการวินิจฉัยเชื้อ *H.pylori* ในห้องปฏิบัติการ จะต้องเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และใช้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย การยืนยันอีกวิธีหนึ่ง สามารถใช้ restriction enzyme ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ซึ่งคณะนักวิจัยได้เลือกใช้ วิธีนี้ โดยเลือก enzyme ที่ตัดผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 375 bp ให้ได้ขนาดที่ต่างกัน เพื่อว่าเวลาตรวจผลิตภัณฑ์ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis จะเห็นแถบแยกจากกันชัดเจน จึงเลือก restriction enzyme Hinf I โดยหา restriction enzyme site map list ด้วยโปรแกรม DNASIS จะได้ DNA 2 ท่อน ขนาด 259 bp และ 116 bp(ภาคผนวก) ซึ่งจากการศึกษานี้ band ของผลิตภัณฑ์ PCR หลังจากใช้ Hinf I จะอยู่ที่ 259 bp และ 116 bp (รูปที่ 3.2) แสดงว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาจากส่วนหนึ่งของ HpaA ยีน นอกจากนี้แล้วคณะวิจัยยังได้ยืนยันโดยการนำผลิตภัณฑ์ PCR มาเปรียบเทียบกับ DNA molecular size และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR จากตัวอย่างเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) ซึ่งจะได้ band ที่ 375 bp ตามเป้าหมายของการขยาย DNA

ตำแหน่งยีน HpaA ที่ใช้ primer ที่ออกแบบไว้ คณะวิจัยยังได้มีการหาลำดับเบสของ PCR product จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ให้ผลบวก ทั้งวิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งลำดับเบสที่ได้เมื่อเทียบกับลำดับเบสของ HpaA ยีน ของเชื้อ *H.pylori* จาก GenBank พบว่ามีลำดับเบสที่เหมือนกันประมาณ 94 % มีตำแหน่งที่มี gene variation 21 ตำแหน่ง โดยจะมีเบสเหมือนกัน 13 ตำแหน่ง ในกลุ่มตัวอย่างจากผู้ป่วย 3 ตัวอย่าง(ตารางที่ 3.2) ซึ่งจากผลการศึกษานี้จะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kawamata และคณะ(27) ที่หาลำดับเบสของ ureaseA ยีน ในตัวอย่างเชื้อ *H.pylori* ซึ่งได้มาจากตัวอย่างทางคลินิกในผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น พบว่ามี gene variation ที่ต่างจากลำดับเบสของ DNA ที่ได้จาก GenBank โดยลำดับเบสบางตำแหน่งจะเหมือนกันในกลุ่มผู้ป่วยชาวญี่ปุ่น ดังนั้นในการศึกษานี้ ผลิตภัณฑ์ PCRที่ได้จากการขยาย DNA ตรงตำแหน่ง HpaA ยีน โดยใช้ primer Hpa-1 และ Hpa-2 ที่มีขนาด 375 bp มาจากเชื้อ *H.pylori*

sensitivity ของวิธี PCR ที่คณะวิจัยได้หาสภาวะที่เหมาะสมโดยการนำ DNA สกัดจากเชื้อ *H.pylori* (strain HMK 127) โดยเริ่มที่ความเข้มข้น 2 ng/ul นำมาเจือจางแบบ 10 เท่า (ten fold dilution) ตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมสีด้วย ethidium bromide และถ่ายรูปภายใต้แสง UV พบว่าสามารถตรวจหา ผลิตภัณฑ์ PCR ได้ต่ำสุด ที่ DNA มีความเข้มข้น 0.4 pg ซึ่งจะเท่ากับ 200 genome ของเชื้อ *H.pylori*(36) เมื่อเทียบกับรายงานของ Hulten และคณะ(14) ที่คณะวิจัยได้นำตำแหน่งยีน HpaA การออกแบบ primer มาใช้ ผลิตภัณฑ์ PCR จะตรวจโดยวิธี Southern blot hybridization สามารถตรวจหาเชื้อได้ต่ำถึง 1 เซลล์ Lageและคณะ(26)ใช้ยีนเป้าหมาย UreC โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 294 bp ตรวจหาผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อได้ต่ำถึง 3.6 fg ในการศึกษาครั้งนี้วิธี PCR ที่ได้จะมี sensitivity น้อยกว่าคณะวิจัยอื่นๆ ที่รายงานไว้(14,26) อาจเนื่องมาจาก หลายๆ ปัจจัย เช่น การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR คณะวิจัยใช้วิธี agarose gel electrophoresis ซึ่ง sensitivity จะน้อยกว่าการใช้วิธี southern blotted hybridization ตำแหน่งยีนที่ต่างกันในการทำ PCR อาจทำให้ sensitivity และ specificity ที่ได้ต่างกัน(28) การออกแบบ primer ที่เหมาะสม เช่น จากการหาลำดับเบสของยีนเป้าหมายจากเชื้อ *H.pylori* จากตัวอย่างทางคลินิกของคนไทยแทนการใช้ลำดับเบสจาก GenBank(27) และการใช้ Taq DNA polymerase ที่เหมาะสม ซึ่งปัญหาการใช้ Taq DNA polymerase ได้มีรายงานของ Westblom และคณะ(37) ได้ใช้ Amplitaq polymerase(Perkin Elmer) โดยทำการเพิ่มปริมาณ DNA ใช้จำนวน 30 รอบ พบผลบวก แค่ 20% ของตัวอย่าง ที่พบเชื้อ *H.pylori* และเมื่อเพิ่มจำนวนรอบเป็น 50 รอบ พบจำนวนตัวอย่างที่ให้ผลบวกเพิ่มขึ้นอีก 1 เท่า แต่ก็ยังพบว่าให้ผล Flase negative มากกว่า 50% แต่เมื่อเปลี่ยน Taq DNA polymerase เป็น Vent DNA polymerase สามารถให้ sensitivity และ specificity 96% และ 100% ตามลำดับ คณะวิจัยไม่ได้ทดลองทำ PCR จำนวน 50 รอบ เพราะเมื่อใช้ 40 รอบ จะเห็น non specific band เกิดขึ้นมาก จึงสรุป

ใช้ 35 รอบ และได้ทดลองใช้ Hot star Taq polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติสร้าง DNA ที่อุณหภูมิสูงๆ เท่านั้น ทำให้ลด non specific band ลง ซึ่งคณะวิจัยพบว่าที่ PCR 35 รอบ จะลด non specific band แต่จะไม่เพิ่ม sensitivity

โดยหลักการแล้วการตรวจหาเชื้อ *H.pylori* โดยวิธี PCR ควรจะมี sensitivity สูงกว่าวิธีอื่น เช่น วิธี urease test ทั้งนี้เพราะ DNA 1 คู่ สามารถขยาย DNA ได้ถึง 1 ล้านเท่า เมื่อทำ PCR เพียง 20 รอบ และคุณสมบัติของ primer ที่สามารถจับกับ nucleotide acid ที่ complementary อย่างจำเพาะที่อุณหภูมิเหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบ sensitivity, specificity positive และ negative predictive value ของการตรวจเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธี urease test วิธี PCR เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา จะเห็นว่า sensitivity ของ PCR จะสูงกว่าวิธี urease test ส่วน specificity จะน้อยกว่าแต่ไม่มากนัก(ตารางที่ 4.1) เมื่อดูรายละเอียดตัวอย่างที่ตรวจพบว่าผลการตรวจเชื้อ *H.pylori* ที่ใช้วิธีทางพยาธิวิทยาที่ให้ผลบวกน้อยมาก(scanty) พบว่า มีจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่ง 7 ตัวอย่างจะให้ผลบวกด้วยวิธี PCR อีก 5 ตัวอย่างให้ผลลบ ส่วนวิธี urease test จะให้ผลบวก 6 ตัวอย่าง อีก 6 ตัวอย่างให้ผลลบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *H.pylori* ในผู้ป่วยที่พบเชื้อจำนวนน้อยที่อยู่ตรงเยื่อบุกระเพาะอาหารมีการกระจายอย่างไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นในการตัดชิ้นเนื้อแต่ละครั้ง อาจได้ชิ้นเนื้อที่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ให้ผลลบ คือตรวจไม่พบเชื้อโดยทั้งวิธี urease test และวิธีทางพยาธิวิทยา จำนวน 25 ตัวอย่าง เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR ให้ผลลบคือไม่พบเชื้อ 23 ตัวอย่าง คิดเป็น 92% โดยใน 2 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR มีตัวอย่างหนึ่งที่ให้ band ชัดเจน แต่อีกตัวอย่างหนึ่งให้ band ที่อ่อนมาก ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่พบเชื้อ *H.pylori* โดยวิธีพยาธิวิทยาและวิธี urease test พบจำนวน 27 ตัวอย่าง เมื่อนำไปตรวจหาเชื้อโดยวิธี PCR จะพบเชื้อ *H.pylori* 25 ตัวอย่าง คิดเป็น 92.6%

ตารางที่ 4.1 Sensitivity, specificity, positive **และ** negative predictive value **ของการตรวจหาเชื้อ** *H.pylori* **โดยวิธี** PCR **วิธี** urease test **เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา**

Diagnosis test	Sensitivity(%)	Specificity(%)	PPV(%)	NPV(%)
Urease test	64.3	83.3	84.4	62.5
PCR	73.8	76.6	81.6	67.6

เมื่อเปรียบเทียบ sensitivity และ specificity ของวิธี PCR ที่คณะวิจัยได้หา สภาวะที่เหมาะสมแล้ว กับคณะวิจัยอื่นๆ ที่ได้รายงานไว้ เช่น Thijs และคณะ(22) ได้ใช้ยีนเป้าหมายในการทำ PCR ตรงตำแหน่งยีน UreA ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 411 bp พบ sensitivity และ specificity 96.7% และ 100% ตามลำดับ โดยที่วิธี gold standard ใช้ตัวอย่างที่พบเชื้อ *H.pylori* 2 วิธีขึ้นไปใน 6 วิธี Valentine

และคณะ(24) ใช้ยีนเป้าหมายที่ 16S rRNA ผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาด 203 bp ตรวจผลิตภัณฑ์ โดยใช้วิธี Southern blot ใช้ oligonucleotide probe ปิดฉลากด้วย ^{32}P พบว่า สามารถตรวจเชื้อได้ต่ำสุด 100 เซลล์ และได้ sensitivity 94% specificity 100% เมื่อใช้วิธีทางพยาธิวิทยา เป็น gold standard ซึ่งอาจเนื่องมาจากชิ้นเนื้อที่ตัดจากเยื่อบุกระเพาะอาหารแต่ละชิ้นจะมีการกระจายของเชื้อไม่เท่ากัน (heterogeneity) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีจำนวนเชื้อ *H.pylori* ต่ำ นอกจากนี้การใช้ตำแหน่งยีนเป้าหมายในการทำ PCR ที่ต่างกัน การออกแบบ primer โดยใช้ลำดับเบสที่ได้จาก GenBank ซึ่งเทียบกับประชากรไทยแล้ว จะมี genetic variation ซึ่งอาจทำให้การจับของ primer ไม่สมบูรณ์

ขั้นตอนที่สำคัญในการทำ PCR คือการสกัด DNA ของเชื้อจากเนื้อเยื่อ วิธีที่ใช้ทั่วไปคือ การสกัดด้วย phenol-chloroform แต่จะมีปัญหาเรื่องพิษจากสารเคมีที่ใช้ ซึ่งจะมีผลต่อสุขภาพ จึงได้มีผู้คิดหาวิธีที่ใช้สารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น การใช้เอนไซม์ proteinase K ย่อย เซลล์ และใช้ silica - gel column แยก DNA ซึ่งวิธีนี้ได้มีการทำเป็นน้ำยาสำเร็จรูป เช่น QIAamp® DNA Mini Kit ซึ่งได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากน้ำยาดังกล่าวมีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้น คณะวิจัยจึงได้หาสารที่สามารถย่อยเซลล์ได้ดี เพื่อนำมาใช้ในการสกัด DNA คือ Chelex-100 chelating resin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง เมื่อเนื้อเยื่ออยู่ระหว่างสาร Chelex-100 จะทำให้เซลล์แตก และ DNA จะออกมาอยู่ที่ supernate นำไปต้มเพื่อให้ DNA แยกออกเป็นสายเดี่ยว สามารถนำมาใช้ตรวจหาเชื้อได้ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี QIAamp® DNA Mini Kit พบว่า sensitivity จะได้ 89% และ specificity จะได้ 81% โดยมี test bias 3.7% (ตารางที่ 3.7) ความแตกต่างกันของผล PCR ที่ใช้ DNA สกัด จาก 2 วิธี ดังกล่าวอาจเนื่องมาจากปริมาตรของ DNA ที่สกัดไม่เท่ากัน คือ ปริมาตรเมื่อใช้ QIAamp® DNA Mini Kit จะได้ 200 ul ส่วนการใช้ Chelex จะได้ 500 ul ความแตกต่างอาจเนื่องมาจากความไม่สม่ำเสมอของเชื้อบนเยื่อบุกระเพาะอาหาร หากผู้ป่วยมีเชื้อน้อย การตัดชิ้นเนื้อแต่ละครั้งอาจมีความแตกต่างกัน (heterogeniety) จากผลการวิจัยนี้ Chelex-100 อาจสามารถนำมาใช้แทนน้ำยาสำเร็จรูปได้ และสามารถนำมาใช้ในการสกัด DNA เพื่อตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในห้องปฏิบัติการ เพราะเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว มีราคาถูก และสารที่ใช้ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

สรุปผลการวิจัยครั้งนี้ คณะวิจัยได้หาสภาวะที่เหมาะสม ในการทำ PCR มาตรฐาน(standard PCR) เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วย เป้าหมายของยีนที่ใช้คือ HpaA ยีน sensitivity ของวิธี PCR ที่ได้สามารถตรวจหา DNA ของเชื้อ *H.pylori* ได้ต่ำสุด คือ 0.4 pg และเมื่อนำผลการตรวจในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยด้วยวิธี PCR เทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยา พบว่า sensitivity และ specificity จะได้ 73.8% และ 76.6% ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างต่ำ อาจเป็นไปได้ว่าในผู้ป่วยที่มีเชื้อน้อย การกระจายของเชื้อไม่สม่ำเสมอ การตัดชิ้นเนื้อแต่ละชิ้นจะมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้แล้วการทำ PCR ที่เป้าหมายยีนต่างกัน ออกแบบ primer โดยใช้ลำดับเบสที่ไม่ใช่มาจากประชากรที่ศึกษา อาจไม่เหมาะสมเพราะอาจมี genetic variation ในส่วนของ primer ทำให้การ

anneal เป็นไปอย่างไม่มีประสิทธิภาพ อาจทำให้ sensitivity และ specificity ต่างกัน แต่เมื่อใช้ผลของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ตรวจ โดยทั้งสองวิธีคือ ทางพยาธิวิทยา และวิธีตรวจเอนไซม์ urease จะพบตัวอย่างที่ให้ผลบวก คือพบเชื้อ *H.pylori* ทั้ง 2 วิธี จำนวน 27 ตัวอย่าง ผลการตรวจด้วย PCR จะให้ผลบวก 25 ตัวอย่าง(92.6%) และ ในตัวอย่างที่ให้ผลลบทั้ง 2 วิธี วิธี PCR จะให้ผลถูกต้อง 23 ใน 25 ตัวอย่าง (92%) ในการศึกษาต่อไปผู้วิจัยมีแผนงานที่จะศึกษาการเพิ่ม sensitivity และ specificity โดยวิธี nested PCR และหาเป้าหมายยีนอื่นๆ ในการทำ PCR

คณะวิจัยได้เปรียบเทียบวิธีสกัด DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยใช้ Chelex-100 chelating resin และน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit พบว่า sensitivity และ specificity ของการสกัด DNA จาก Chelex-100 คือ 89% และ 81% ตามลำดับ วิธีสกัดโดย Chelex-100 chelating resin เป็นวิธีที่ง่าย สารมีราคาถูก สามารถเตรียมสารขึ้นใช้เอง ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการวินิจฉัย

เอกสารอ้างอิง

1. Kullavanijava P, Tangkijvanich P and Poovorawan Y. Current status of infection related gastrointestinal and hepatobiliary diseases in Thailand. South East Asian J Trop Med Public Health 1999;30(1):96 -105.
2. กรทอง อัสวาณิชย์, สายสุนีย์ ทับทิมเทศ, พิริยะ บุษพงศ์ และสมจิต พฤกษะริตานนท์. ปัญหาสุขภาพของผู้ป่วยนอกหน่วยเวชศาสตร์ทั่วไป โรงพยาบาลรามาธิบดีRama Med J 1993;16 (2):156-162.
3. Goodwin CS, Mendall MM, Northfield TC. *Helicobacter pylori* infection. Lancet 1997;349:265 - 269.
4. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization : Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* . JARC Monogr Eval Carcino Risks Hum.1994;61:218-220.
5. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. NIH concensus statement. 1994;12(1): 1-23.
6. สิริวัฒน์ อนันตพันธ์พงษ์. Epidemiology of *H.pylori* in Thailand. เอกสารประกอบการประชุม Thailand consensus for the management of dyspepsia and *Helicobacter pylori*. 27-28 มกราคม 1999. ณ ศูนย์ฝึกอบรมธนาคารไทยพานิชย์ จังหวัดเชียงใหม่
7. Peerakome S, Vannareumol P, Linpisarn S, Lertprasertsuke N, Sanchaimoon N, Phornphutkul K. Comparison of diagnostic methods for *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer patients. Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 1996;26(2):53-62.
8. Marshall BJ. *Helicobacter pylori* in the year 2000. http://www.helicobacter.com
9. สุชาติ ปัณจัยสีห์ *Campylobacter, Helicobacter* and related organism เอกสารประกอบการสอน กระบวนวิชาจุลชีววิทยาและแบคทีเรียทางการแพทย์ทั่วไป (CMB 508202) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2542.
10. Perez-Perez GI, Dworkin GM, Chodos IE, Blazer MI. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. Ann Inter Med 1998;109:11-17.
11. Dwyer B, Nanziong S, Kaldor J, Tee W, Lambert I, Luppino M, Flannery G. Antibody response to *Campylobacter pylori* in an ethnic group lacking peptic ulceration.Scand J Infect Dis 1998;20(6):63-68.

12. Perez - Perez GI, Taylor DN, Bodhidatta L, Wongsrichanalai J, Baze WB Dunn BE, Echeverria PT and Blaser MJ. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infections in Thailand. J Infect Dis 1990;161:1237-1241.

13. Boonyaritichaikij S, Kuwabara K, Matsushisa T, Yamada N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Chiang Mai. Chiang Mai Medical Bulletin 2001;40(3) suppl:19

14. Hulten K, Han SW, Enroth H, Klein PD, Opekun AR, Gilman RH, Evans DG, Engstrand L, Graham DY and El-Zaatari FAK. *Helicobacter pylori* in drinking water in Peru. Gastroenterology. 1996;110:1031-1035.

15. Li C, HA T, Ferguson DA, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswamy G and Thomas E. A newly developed PCR assay of *H.pylori* in saliva supports oral tranmission. Dig Dis Sci 1996;41:2142-2149.

16. Parsonnet I, Shmuely H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. JAMA 1999;282:2240-2245.

17. Marshell BJ, Warrew IB. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.Lancet 1984;1:1311-1315.

18. ประกิตพันธ์ ทมทิตชงค์ Diagnosis of *H. pylori* infection. TMTL 2541 ปีที่ 9 (เมษายน - พฤษภาคม) : 23 - 30.

19. Reilly RG, Poxon V., Sanders DS, Elliott TS, Walt RP. Comparison of serum, salivary and rapid whole blood diagnostic tests for *Helicobacter pylori* and their validation against endoscopy based tests. Gut 1997; 40 : 454 - 480.

20. Cutler AF, Harstad S, Ma CK, Blaser MJ, Perez-Perez GI, Shubert TT Accuracy of invasive and non-invasive tests to diagnoses *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol 1995;109:136 - 141.

21. Wetherall BL, McDonald PJ And Johnson AM Detection of *Campylobacter pylori* DNA by hybridisation with non-radioactive probes in comparison with ^{32}P-labelled probe. J Med Microbiol 1988;26: 257 - 263.

22. Thijs JC, Zwet AA, Thijs WJ, Oey H, Karrenbeld A, Stellaard F, Luijt D, Meyes B and Kleibeuker J. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori* : A prospective evaluation of their accuracy, without selecting a single test as the gold standard. Am J Gastro 1996;91(10) : 2125 -2129.

23. Clayton CL, Wren BW, Mullany P, Topping A and Tabaqchai S. Molecular cloning and expression of *campylobacter pylori* species - specific antigens in *Escherichia Coli*. Infect Immun 1989;57: 623 - 629.

24. Valentine JL, Arthur RR, Mobley HL and Dick J. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29(4): 689 - 695.

25. Clayton CL, Kleanthous H, Coates PJ, Morgan DD and Tabaqchali S. Sensitive detection of *Helicobacter pylori* by using polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992;30(1):192-200.

26. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A , Burette A, Butzler JP, Bollen A and Glupczynski Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR :Comparison with other invasive techniques and detection of Cag A gene ingastric biopsy specimens.J Clin Microbiol 1995;33(10):2752-2756.

27. Kawamata O, Yoshida H, Hirota K, Yoshida A, Kawaguchi R, Shiratori Y and Omata M. Nested- polymerase chain reaction for the detection of *Helicobacter pylori* infection with novel primers designed by sequence analysis of urease A gene in clinically isolated bacterial strains. Biochem Biophys Res commun 1996;219: 266 -272.

28. Song Q, Haller B, Schmid RM, Alder G and Bode G. *Helicobacter pylori* in dental plaque. A comparison of different PCR primer sets. Dig Dis Sci 1999; 44: 479-484.

29. วัชรี อัตถทิพพหลคุณ เทคนิค PCR ขั้นสูง ในทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.บรรณาธิการ วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ (ปี พ.ศ 2536) จัดพิมพ์ที่ โรงพิมพ์เรือนแก้ว เชิงสะพานอรุณอมรินทร์ เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700 หน้า 81-108.

30. ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์ Polymerase Chain Reaction ใน อณูชีววิทยาทางการแพทย์ (Molecular Biology in Medicine) บรรณาธิการ นเรศร สุขเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรามาร และ ยง ภู่วรวรรณ(ปี พ.ศ. 2541) จัดพิมพ์ที่บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน จำกัด ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

31. Weiss J, Mecca J, Silva ED and Gassner D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. J Clin Microbiol ;1994;32(7) : 1663 - 1668.

32. Labigne A, Cussac V and Crurcoux P.(1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. J Bacteriol 1991;173(6) : 1920 - 1931.

33. Engstrand L, Ngugen A, Graham D. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *helicobacter* species. J Clin Microbiol 1992;30 (9) : 2295 - 2301.

34. Phornphutkul K., Linpisarn S., Thitiphuri S., Lertprasertsuk N. Locally made rapid urease test (H.P test) In :The Gastroenterlogic Association of Thailand. Thailand 42nd Annual Scientific Meeting 1998 Nov 19-20, Phitsanvloke, Thailand.

35. Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ, Jr., Graham DY and Lee CH. Cloning, nucleotide sequence and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of *Helicobacter pylori*. J Bacteriol 1993;175(3): 674-683.

36. Taylor DE, Eaton M and Chang N. Construction of *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level.J Bacteriol 1992;174:6800-6806.

37. Westblom Ulf T, Phadnis S and Yang P. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by means of a polymerase chain reaction assay for gastric juice aspirates. Clin Infect Dis 1993;16:367-371.

ภาคผนวก

1. **วิธีการสกัด DNA ของเชื้อ *H. pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยการใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit**
    1) นำเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด1.5 ซีซี เติม BufferATL 180 ul และ Proteinase K 20 ul
    2) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ปั่นเพื่อให้เนื้อเยื่อจมอยู่ใต้น้ำยา
    3) Incubate ที่ 56 °C overnight
    4) ปั่นที่ 7,000 rpm 30 sec.
    5) เติม Buffer AL 200 ul ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer ปั่นที่ 7,000 rpm 30 sec.
    6) Incubate ที่ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที
    7) เติม ethanol 200 ul ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ 7,000 rpm 30 sec.
    8) ดูดส่วนผสมจากข้อ 7. ใส่ลงไปใน QIAamp Spin Column ที่บรรจุลงใน collection tube ขนาด 2 ซีซี
    9) ปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วกำจัดสารละลายที่กรองได้ใน collection tube ออก
    10) นำ QIAamp Spin Column บรรจุลงใน collection tube อันเดิม
    11) เติม Buffer AW I 500 ul ปิดฝา
    12) ปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วกำจัดเอาสารละลายที่กรองได้ใน collection tube ออก
    13) นำ QIAamp Spin Column บรรจุลงใน collection tube อันเดิมอีกครั้ง
    14) เติม Buffer AW II 500 ul ปิดฝา
    15) ปั่นที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วกำจัดเอาสารละลายที่กรองได้ใน collection tube ออก
    16) นำ QIAamp Spin Column บรรจุลงใน microcentrifuge tube ใหม่ขนาด 1.5 ซีซี
    17) เติม Buffer AE 200 ul ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที
    18) ปั่นที่ 8,000 rpm นาน 1 นาที
    19) สารละลายที่กรองได้ คือ DNA ที่สกัดได้
    20) เก็บ DNA ที่สกัดได้ที่ 4 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี PCR ต่อไป

2. **วิธีสกัด DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร โดยใช้** Chelating resin (Chelex -100)
    1) นำเนื้อเยื่ออาหารใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 2 ml
    2) เติมน้ำ Type I ปริมาตร 500 ul แล้วทำการปั่นที่ 6000 rpm นาน 30 วินาที

3) กำจัดเอาส่วน supernate ทิ้ง ให้เหลือเฉพาะส่วนเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร
4) ทำซ้ำในข้อที่ 2 - 3 อีกครั้ง
5) เติม Chelex-100 solution (Chelating resin in type I water 20% w/v) 500 ul โดยให้สาร Chelex ล้อมรอบเนื้อเยื่อ
6) Incubate ไว้ค้างคืน ที่อุณหภูมิ 56 ^{o}C
7) นำมาต้มในน้ำเดือด 5 นาที
8) เก็บ DNA ที่สกัดได้ ที่ - 20 ^{o}C

3. การเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลองโดยวิธี PCR

3.1 สารเคมี สำหรับการทำ PCR

- 10 × Tag Buffer
  - 200 mM Tris (pH 8.4)
  - 500 mM KCl
  - 15 mM $MgCl_2$
  - 0.1 % BSA
  - 0.5 % Tween
- สารละลาย dNTPs ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ที่มีความเข้มข้นอย่างละ 1 mM
- primer mixture Hpa-1, Hpa-2 ที่มีความเข้มข้นอย่างละ 5 uM

  Hpa-1 (upstreme primer)

  5' GA ATT ACC ATC CAG CTA GCG 3'

  Hpa-2 (downstreme)

  5' GT AAC CTT GAC AAA ACC GGC 3'
- Tag DNA polymerase (0.5 U/ul)

การเตรียม PCR reaction mixture มีดังนี้

Component	Vol. (ul)	Final concentration
10 × Tag Buffer	1	1 × Tag Buffer
dNTPs	2	200 uM/each
primer mixture	0.5	0.25 uM/each
Tag DNA polymerase	0.5	0.25 U
Distilled water	4	
DNA template	2	
Total volume	10 ul	

3.2 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ Thermocycle โดยใช้ PCR condition ดังนี้

โปรแกรมที่ 1

denaturation	95 °C	2.30 นาที
	(1 รอบ)	

โปรแกรมที่2

denaturation	94 °C	0.30 นาที
annealing	56 °C	1.00 นาที
extension	72 °C	1.00 นาที
	(35 รอบ)	

โปรแกรมที่ 3

extension	72 °C	7.00 นาที
	(1 รอบ)	

4. การตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธี Electrophoresis

4.1 สารเคมีที่ใช้

- 0.5 × TBE

  89 mM Tris

  89 mM H_3BO_3

  2 mM EDTA

- 2 % agarose gel

  ชั่ง agarose gel 1.5 g ใน Elrenmayer flask

  เติม 0.5 × TBE 75 ml ต้มจนสารละลายเดือดและใส

  เทสารละลายลงบนแม่พิมพ์ ขนาด 10 × 10 cm^2

- Ethidium bromide solution

  Ethidium bromide 7 ul

  0.5 × TBE 150 ul

- Loading buffer

  0.25 % Xylene cyanol

  30 % glycerol

4.2 การทำ agarose gel electrophoresis

- แช่ 2% agarose gel ในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 30 นาที
- Load 7 ul PCR product with loading buffer (5 ul PCR product + 2 ul loading buffer)
- ทำ electrophoresis ใน 0.5 × TBE buffer ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 mAmp ประมาณ 40 นาที หรือจนกว่าสีของ xylene cyanol เคลื่อนที่ออกจาก well ประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร
- ตรวจดูแถบ DNA ภายใต้แสง ultraviolet ถ่ายรูปโดยใช้เครื่อง Photodocumentation system

5. การยืนยันผลิตภัณฑ์ DNA ที่ได้ ที่มีขนาด 375 bp โดยใช้ restriction enzyme (Hinf I) ตัดจะได้ DNA 2 ท่อน ขนาด 116 bp และ 259 bp

5.1 สารเคมีที่ใช้

- Hinf I 10,000 U / ml
- NE Buffer 2

  10 mM Tris HCl (pH 7.9)

  50 mM NaCl

  10 mM $MgCl_2$

  1 mM DTT

5.2 การตัดผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย restriction enzyme(Hinf I)

การเตรียม reagent mixture มีดังนี้

Component	Vol. (ul)
10 X NE buffer	1 ul
Hinf I	20 - 40 U (2 -4 ul)
H_2O	0 - 2 ul
DNA product	5 ul
Total volume	10 ul

Incubate overnight in water bath at 37 ^{o}C

ตรวจผลิตภัณฑ์ที่ได้ โดยวิธี agarose gel electrophoresis

6. การหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR

ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAquick® Spin(QIAGEN, Germany) ตามวิธีการที่แนบมาจากบริษัท DNA ที่ได้นำไปตรวจเช็คความบริสุทธิ์ โดย run บน electrophoresis ซึ่งหากบริสุทธิ์ ควรจะได้ band เดียว ที่ 375 bp เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจดู band ภายใต้แสง UV นำผลิตภัณฑ์ไปทำ Big Dye Terminator Cycle Sequencing โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป (Perkin-Elmer, USA) นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol แล้วนำไป run electrophoresis โดยใช้เครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

6.1 การทำให้ผลิตภัณฑ์ DNA บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR purification kit

- ผสม buffer PE 250 ul กับ 50 ul PCR reaction
- นำสารผสมเทลงบน QIAquick spin column
- ปั่นตกที่ 14,000 rpm 1 นาที และกำจัดสารละลายที่กรองได้ทิ้ง
- เติม buffer PE 750 ul ลงใน QIAquick spin column
- ปั่นตกที่ 14,000 rpm 1 นาที และกำจัดสารละลายที่กรองได้ทิ้ง
- นำ QIAquick spin column บรรจุลงใน tube ใหม่
- เติม buffer PE 50 ul ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที แล้วนำไปปั่นตกที่ 14,000 rpm 1 นาที เก็บสารละลายที่กรองได้

6.2 การทำ BigDye Terminator Cycle Sequencing

- ผสมสารดังต่อไปนี้ ในหลอดทำ PCR 0.2 ml

- Terminator ready reaction kit	8 ul
- Double stranded DNA (5-10 ng)	0.5 ul
- Primer (3.2 uM)	1 ul
- Deionized distilled water	10.5 ul
Total	20 ul

- ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ 7000 rpm 30 วินาที
- นำหลอดมาใส่ในเครื่อง GeneAmp 9700 และตั้งปริมาตรที่ 20 ul โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

  Rapid Thermal ramp to 96 ^{o}C 10 sec.

  Rapid Thermal ramp to 50 ^{o}C 5 sec.

  Rapid Thermal ramp to 60 ^{o}C 4 sec.

  Repeat 25 cycle

- Rapid Thermal to 4 ^{o}C เก็บไว้จนกว่าจะนำ extension reaction ไป purified โดยใช้วิธีตกตะกอนด้วย ethanol

6.3 **การทำให้ extension product บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนด้วย ethanol**

- ปิเปต extension reaction ทั้งหมด ลงใน 1.5 ml microcentrifuge tube
- เติม deionized water 16 ul และ ethanol(95%) 64 ul
- ปิดฝา ผสมสารละลาย โดยใช้ vortox
- ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้ DNA ตกตะกอน
- ปั่นตกที่ 14,000 rpm 2 นาที
- กำจัด supernatant ให้มากที่สุด
- เติม ethanol (70%) 250 ul vortex
- ปั่นตกตะกอนที่ 14,000 10 นาที
- กำจัด supernatant ทิ้ง
- นำตะกอนไป heat ที่ 95 ^{o}C นาน 1 นาที

6.4 **การ run electrophoresis โดยใช้เครื่อง** ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems)

- ปิเปต template Suppression Reagent (TSR) 25 ul
- vortex และปั่น
- heat ที่ 95 ^{o}C 2 นาที
- นำไปแช่น้ำแข็ง
- นำตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI Prism 310 Genetic Analyzer

7. ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารผู้ป่วยคนไทยที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบมา จำนวน 3 ราย

tracer ที่ได้จากการตรวจหาลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ PCR จาก DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สกัดจากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ตัวอย่าง# 38,# 54 และ # 66

8. Restriction enzyme site map list ของ HpaA ยีน ใช้ primer Hpa-1/Hpa-2 โดยการใช้ programm DNASIS
9. ลำดับเบสของ HpaA ยีน ของเชื้อ *H.pylori* จาก GenBank Accession X61574

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ABI PRISM

Model 310
Version 2.1.1

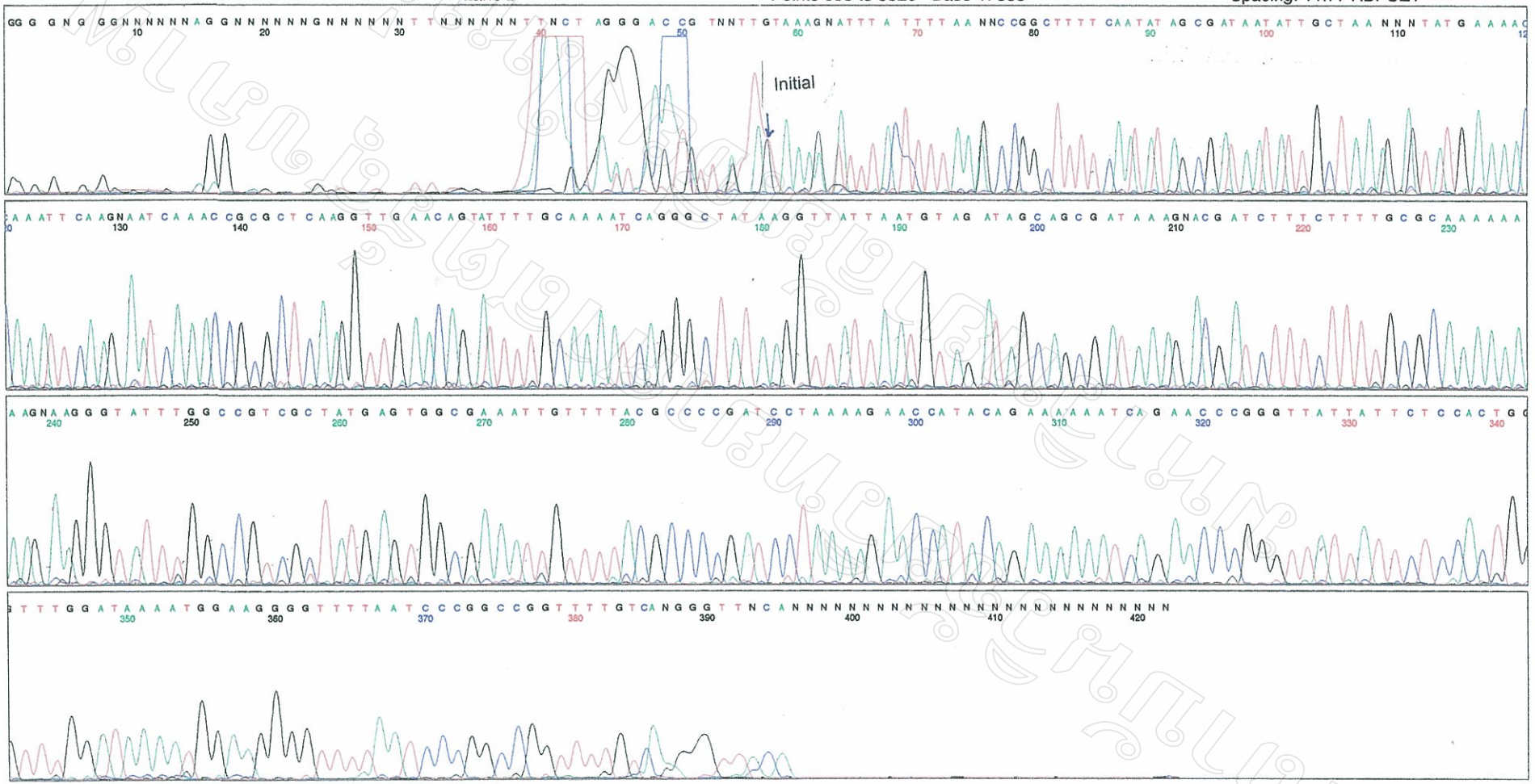
A3•No.1

No.1
Lane 2

Biopsy Specimen No. 38

Signal G:865 A:594 T:580 C:499
DT POP6{BD Set-AnyPrimer}
install seq Pop6 BDT E
Points 333 to 5520 Base 1: 333

Fri, Aug 10, 2001 17:47
Fri, Aug 10, 2001 15:48
Spacing: 11.77 ABI-CE1



ABI PRISM

Model 310
Version 2.1.1

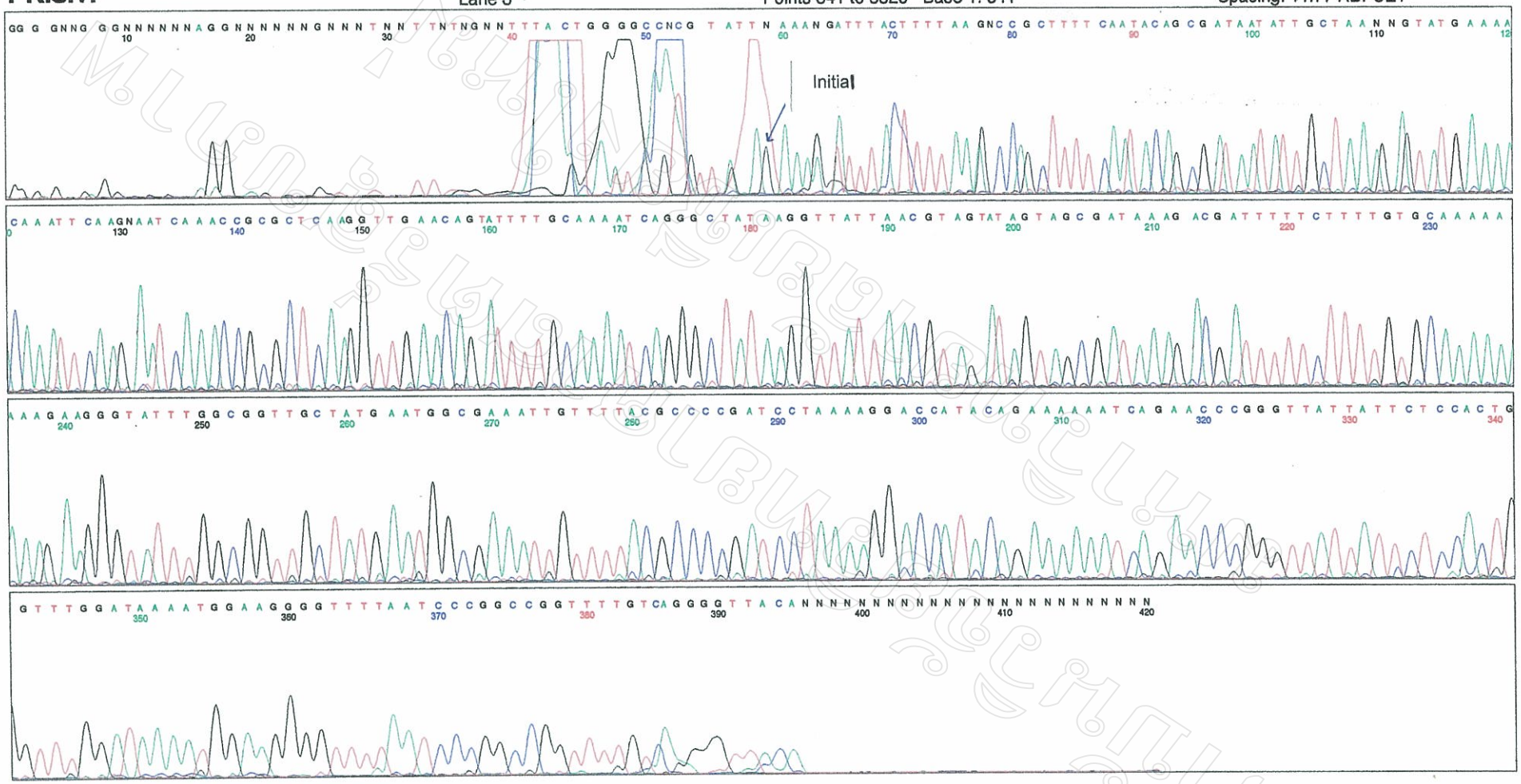
A5•No.2

No.2
Lane 3

Biopsy Specimen No. 54

Signal G:969 A:656 T:613 C:546
DT POP6{BD Set-AnyPrimer}
install seq Pop6 BDT E
Points 341 to 5520 Base 1: 341

Fri, Aug 10, 2001 19:37
Fri, Aug 10, 2001 17:47
Spacing: 11.77 ABI-CE1



ABI PRISM

Model 310
Version 2.1.1

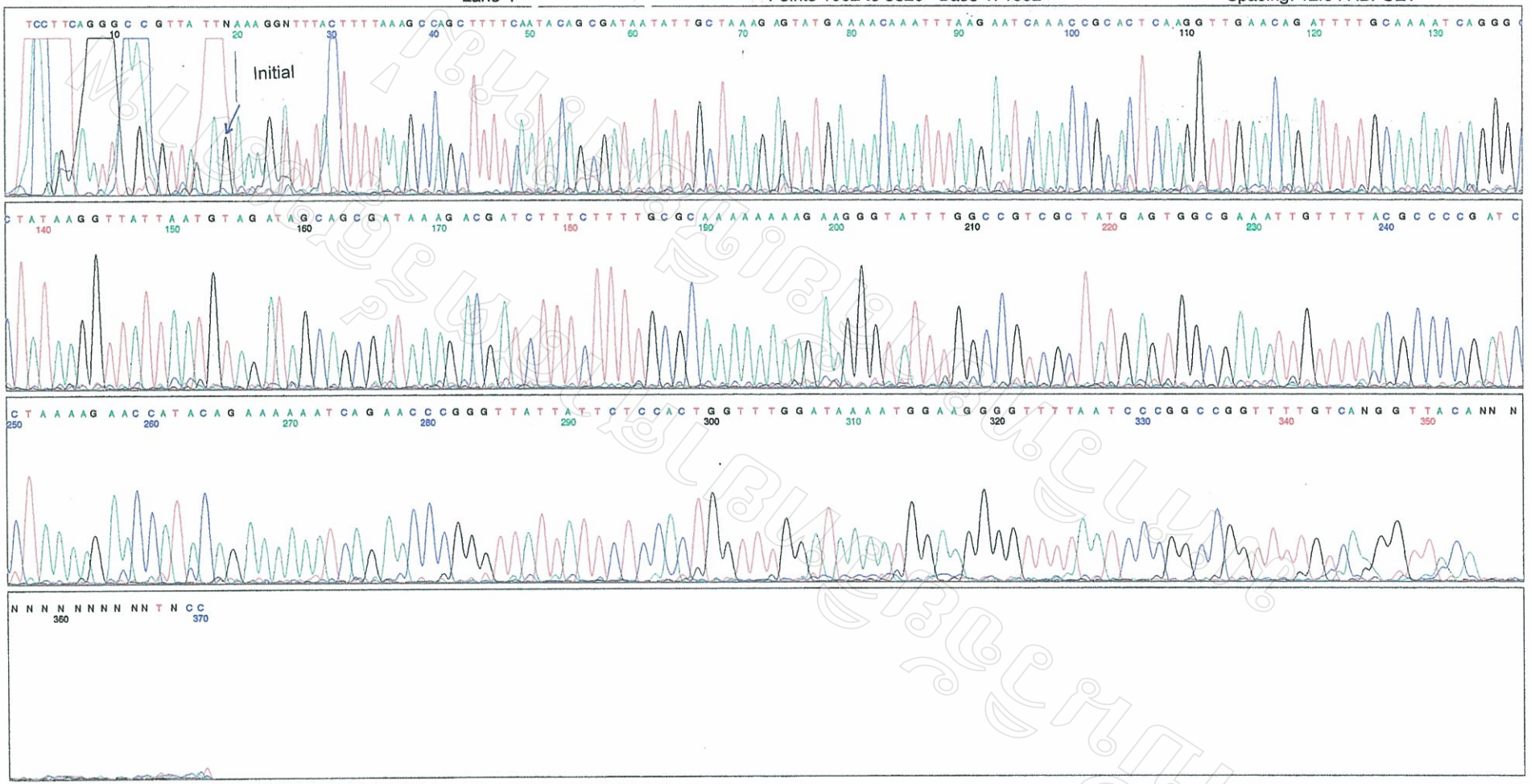
A7•No.3

No.3
Lane 4

Biopsy Specimen No. 66

Signal G:286 A:193 T:294 C:199
DT POP6{BD Set-AnyPrimer}
install seq Pop6 BDT E
Points 1002 to 5520 Base 1: 1002

Fri, Aug 10, 2001 21:27
Fri, Aug 10, 2001 19:37
Spacing: 12.04 ABI-CE1



Restriction enzyme site map list ของ HpaA ยีน ใช้ primer Hpa1/Hpa2 โดยการใช้ programm DNASIS

DNASIS ***** RESTRICTION ENZYME SITE MAP LIST ***** DATE 06-02-00

*** INPUT INFORMATION ***

FILE NAME : HPAA2.SEQ ENZYME FILE : DNASIS.CAT

STYLE : LINEAR INDICATION MODE : ACTUAL CUTTING SITE

*** RESTRICTION ENZYME SITE *** NORMAL 1 - 375

ENZYME NAME	SEQUENCE	CUTTING POSITION	TOTAL
AhaI	CC!SGG	304 305 354	3
AhaIII	TTT!AAA	58	1
AluI	AG!CT	15 66	2
AlwI	!NNNNNGATCC	264	1
AosI	TGC!GCA	211	1
AquI	C!YCGRG	303	1
AvaI	C!YCGRG	303	1
AvrI	CYCGRG	302	1
BbvI	GCAGCNNNNNNNN!	196	1
BcnI	CC!SGG	304 305 354	3
BglII	A!GATCT	142	1
BinI	!NNNNNGATCC	264	1
BsrI	ACTGGN!	326	1
BstXI	CCANNNNN!NTGG	326	1
BstYI	R!GATCY	142	1
CfoI	GCG!C	212	1
Cfr10I	R!CCGGY	357	1
CfrI	Y!GGCCR	355	1
CviJI	RG!CY	15 62 66 160 357	5
DpnI	GA!TC	144 271	2
DraI	TTT!AAA	58	1

EaeI	Y!GGCCR	355	1
EagI	C!GGCCG	355	1
EarI	GAAGAG	137	1
EclXI	C!GGCCG	355	1
Eco52I	C!GGCCG	355	1
Fnu4HI	GC!NGC	185	1
FspI	TGC!GCA	211	1
GdiII	!NNNNNYGGCCG	349	1
GdiII	CGGCCRN!	361	1
HaeIII	GG!CC	357	1
HapII	C!CGG	304 354 358	3
HhaI	GCG!C	212	1
HinP1I	G!CGC	210	1
HinfI	G!ANTC	116 +259	1
HpaII	C!CGG	304 354 358	3
Ksp632I	!NNNNGAAGAG	133	1
MaeI	C!TAG	16	1
MaeIII	!GTNAC	371	1
MboI	!GATC	142 269	2
MboII	GAAGANNNNNNNN!	150	1
MflI	R!GATCY	142	1
MseI	T!TAA	57 130 348	3
MspI	C!CGG	304 354 358	3
MstI	TGC!GCA	211	1
NciI	CC!SGG	304 305 354	3
NdeII	!GATC	142 269	2
NheI	G!CTAGC	15	1
NspIII	C!YCGRG	303	1
PalI	GG!CC	357	1
Sau3AI	!GATC	142 269	2

ScrFI	CC!NGG	304 305 354	3
SecI	C!CNNGG	303	1
SmaI	CCC!GGG	305	1
TspEI	AATT	2 108 253	3
XcyI	C!CCGGG	303	1
XhoII	R!GATCY	142	1
XmaI	C!CCGGG	303	1
XmaIII	C!GGCCG	355	1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลำดับเบสของ HpaA ยีน ของเชื้อ *H.pylori* จาก GenBank Accession X61574

DEFINITION H.pylori orf1, hpaA genes.

ACCESSION X61574

VERSION X61574.1 GI:732735

KEYWORDS HpaA; ORF1.

SOURCE Helicobacter pylori.

ORGANISM Helicobacter pylori

Bacteria; Proteobacteria; epsilon subdivision; Helicobacter group; Helicobacter.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1427)

AUTHORS Evans,D.G.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-SEP-1991) D.G. Evans, Veterans Affairs Medical Center, Dept of Digestive Diseases, 2002 Holcombe Blvd, Houston TX 77030, USA

REFERENCE 2 (bases 1 to 1428)

AUTHORS Evans,D.G., Karjalainen,T.K., Evans,D.J. Jr., Graham,D.Y. and Lee,C.H.

TITLE Cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding an adhesin subunit protein of Helicobacter pylori

JOURNAL J. Bacteriol. 175 (3), 674-683 (1993)

MEDLINE 93139035

REFERENCE 3 (bases 1 to 1428)

AUTHORS Evans,D.G.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-MAR-1995) D.G. Evans, Veterans Affairs Medical Center, Dept of Digestive Diseases, 2002 Holcombe Blvd, Houston TX 77030, USA

COMMENT On Mar 27, 1995 this sequence version replaced gi:48964.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1428

/organism="Helicobacter pylori"

/isolate="8826"

/db_xref="taxon:210"

/clone="pHPA26"

CDS <1..360

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="ORF1 protein"

/protein_id="CAA43772.1"

/db_xref="GI:48965"

/db_xref="SWISS-PROT:Q48260"

/translation="EENQPKMVDIGDKETTERIALASGRISMNKEAYDAIINHGVKKG

PVLQTAIIAGIMAAKKTSELIPMCHPIMLNGVDIDILEEKETCSFKLYARVKTQAKSG

VEMEGANECERRAFNHL"

-35_signal 500..505

-10_signal 538..542

CDS 576..1358

/codon_start=1

/transl_table=11

/product="HpaA"

/protein_id="CAA43773.1"

/db_xref="GI:732736"

/db_xref="SWISS-PROT:Q48264"

/translation="MKTNGHFKDFAWKKCLLGTSVVALLVGCSPHIIETNEVALKLNY

HPASEKVQALDEKILLLKPAFQYSDNIAKEYENKFKNQTTLKVEEILQNQGYKVINVD

SSDKDDFSFAQKKEGYLAVAMIGEIVLRPDPKRTIQKKSEPGLLFSTGLDKMEGVLIP

AGFVKVTILEPMSGESLDSFTMDLSELDIQEKFLKTTHSSHSGGLVSTMVKGTDNSND

AIKSALNKIFASIMQEMDKKLTQRNLESYQKDAKELKNKRNR"

BASE COUNT 507 a 219 c 330 g 372 t

ORIGIN

1 gaagaaaatc agcctaaaat ggtggatata ggggataaag aaaccactga aagaatcgct

61 ctagcaagcg gtcgtattag catgaataaa gaggcttatg acgctattat caatcatggc

121 gtcaaaaagg gtccggtgtt acaaactgct attattgctg ggatcatggc ggctaaaaag

181 acaagcgagc tcattcccat gtgccatcca atcatgctca atggggtgga tattgatatt

241 ttagaagaaa aagagacttg cagttttaaa ctctatgcca gagtcaaaac tcaagctaaa

301 agcggcgtag aaatggaagg cgctaatgag tgtgagcgta gggcttttaa ccatttatga

361 catggtgaaa gccattgata agagcatgac aattagcggt gtgatgttag aatataagag

421 tggaggcaaa agcggggatt ataacgctaa aaaatagaaa aaaactaata atctaaagat

481 gttagggtaa aataacattt tgacaacaaa agcgtgttgg ttgcttcggg tttgttgtta

541 tagaagtctg aaatattaca atcaaggata gaacgatgaa aacaaatggt cattttaagg

601 attttgcatg gaaaaaatgc cttttaggca cgagcgtggt ggctttatta gtggggtgca

661 gcccgcatat tattgaaacc aatgaggtcg ctttgaaatt gaattaccat ccagctagcg

721 agaaggttca agcgttagat gaaaagattt tgcttttaaa gccagctttc caatacagcg

781 ataacattgc taaagagtat gaaaataaat tcaagaatca aaccacgctt aaagttgaag

841 agatcttgca aaatcagggc tacaaggtta tcaatgtgga tagcagcgat aaagacgatt

901 tttcttttgc gcaaaaaaaa gaagggtatt tggcggttgc tatgattggc gaaattgttt

961 tacgccccga tcctaaaaga accatacaga aaaaatcaga acccgggtta ttattctcca

1021 ctggtttgga taaaatggaa ggggtcttaa tcccggccgg ttttgtcaag gttaccatac

1081 tagagcctat gagtggggaa tctttagatt cctttacgat ggatttgagt gagttagaca

1141 ttcaagaaaa attcttgaaa accacccatt caagccatag cggagggtta gttagcacta

1201 tggttaaggg aacggataat tctaatgatg cgatcaagag cgctttgaat aagatttttg

1261 caagtatcat gcaagaaatg gataagaaac tcactcaaag gaatttagaa tcttatcaaa

1321 aagacgccaa ggaattgaaa aacaagagaa accgataaag acaaataacg cataagataa

1381 agaacgcttg aacaaactgc ttaaagaggg gtttttagcg ttcttttt

//

Restrictions on Use | Write to the HelpDesk

NCBI | NLM | NIH

sparc-sun-solaris2.8 Oct 29 2001 17:

ประวัติผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการวิจัย

1. นางสุกัญญา ลินพิศาล

รหัสประจำนักวิจัยแห่งชาติ 38-02-0022

การศึกษา

- วท.บ.(เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Ph.D (Clinical Chemistry) University of Birmingham, United Kingdom.
- Postdoctoral fellowship(Biochemistry) Department of Biochemistry II, Nippon Medical School. Tohyo, Japan.

ตำแหน่งปัจจุบัน

- นักวิทยาศาสตร์ชำนาญการ ระดับ 8 สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

1. **S. Linpisarn**, L.J. Kricka, J.H. Kenedy and T.P.Whitehead. (1981). Sensitive Sandwich Enzyme Immunoassay for Serum Ferritin on Microtitre Plates. Ann. Clin. Biochem. 18, 48-53.
2. **S. Linpisarn**, P.M.S. Clark, L.J. Kricka and T.P. Whitehead (1981). Isotachophoretic Assessment of Enzyme Immunoglobulin Conjugates Used in Enzyme Immunoassay. In : Electrophoresis' 81 (1981) (Allen, Arnand Editors). Walter de Grayter & Co., Berlin, New York, page 767-780.
3. **S. Linpisarn**, O. Thanangkul, L.J. Kricka, R. Keovichit and T.P. Whiteh (1984). Iron Deficiency in a Northern Thai Population : The Effects of Iron Supplements StudiedMeans of Plasma Ferritin Estimations. Ann. Clin. Biochem. 21, 268-274.
4. B.S. Skikne, **S. Linpisarn** and J.D. Cook (1984). An Evaluation of Monoclonal Antibodies for Serum Ferritin Measurements. Am. J. Clin. Nutr. 40, 346-350.
5. **S. Linpisarn,** W. Kunachiwa, T. Laokuldilok, J. Laokuldilok, R. Keawvichhit and P. Kulapongs (1986). Iron Status and the Effect of Iron Supplementation in Thai Male Blood Donors in Northern Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 17 (2), 177-183.
6. Y. Yoshino, **S. Linpisarn**, L. Makonkawkeyoon, Y. Hirai, S. Hisayasu, H. Orimo, M. Kuga and T. Sanguansermsri. Serum Ferritin and it's Isoferritin Patterns in Homozygous B-Thalassemia. (1987) Acta Haematol. JPN. 50 (4), 766-776.
7. K. Amatayakul, B.A. Underwood, S. Ruckphaopunt, **S. Linpisarn**, P. Leelapat,

O. Thanangkul. Oral Contraceptives: Effect of Long-Term use on Liver Vitamin A Storage Assessed by the Relative Dose Response Test. (1989) Am. J. Clin. Nutr. 49, 845-848.

8. **S. Linpisarn**, S. Hisayasu, T. Mikami, S. Shinjo, H. Orimo and Y.Yoshino. Effect of Iron on Lipid Peroxidation.(1991) Int. J. Haematol. 54,181-188.
9. K. Leethanaporn, **S. Linpisarn**, M. Suttajit, K. Apiwatakakul, T. Chiewcharnwit. Development of ELISA Reagents Used for Assessment of Serum Ferritin in Cancer. (1991) Cancer Overview : Proceedings of the First Cancer Research Symposium.1, 96-105.
10. K. Leethanaporn, M. Suttajit, **S. Linpisarn** K. Apiwattakakul, K. Phornphutkul, K. Jiemsripong,V. Jitpakdi, T. Chiewcharnwit. Clinical Significance of Serum Ferritin and Isoferritin Levels in Lung and Liver Cancer Patients. (1991) Cancer Overview : Proceedings of the First Cancer Research Symposium. 1, 106-113.
11. K. Phornphutkul, T. Chiewchanwit, K. Leethanaporn, M. Suttajit, K.Apiwattakakul, **S. Linpisarn**, W. Jitpakdi, K. Jiemsripong. Serum Ferritin and Alpha-fetoprotein as Tumor Markers in Hepatocellular Carcinoma Patients. (1991) Cancer Overview : Proceedings of the First Cancer Research Symposium. 1, 114-118.
12. C. Beyrer, D. Celentano, **S. Linpisarn**, C. Natpratan, W. Feng, S. Eiumtrakul, C. Khamboonruang and K. Nelson. Hepatitis B Immunization : A Potential Incentive to HIV Vaccine Trial Participation in Thailand? (1996) I Acq Imm Def Synd. & Human Retrovirology 11 (4); 396-400.
13. G. Fuchs, P.Tienboon , **S. Linpisarn**, S. Nimsakul, P. Leelapat, S. Tovanabutra, V.Tubtong , M. Dewier, R.M. Suskind. Nutritional Factors and Thalassaemia Major (1996) Arch Dis Chil 74; 224-227
14. **S. Linpisarn** , P. Tienboon , N. Promtet , P. putsyainunt , S. Santawanpat , G Fuchs. Iron Deficiency and Anemia in Children with a High Prevalence of Hemo globinopathies : Implication for screening (1996) Inter J. Epid.25 (6), 1262-1265.
15. S. Peerakome, P Vannareumol, **S Linpisarn**, N Lertprasertsuke, N Sanchaimoon, K Phornphutkul. Comparison of Diagnostic Methods for Helicobacter Pylori Infection in Peptic Ulcer Patient. (1996) Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 29 (2); 53-62 .

ประวัติผู้ร่วมวิจัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย

2. แพทย์หญิง กรรณิการ์ พรพัฒน์กุล

การศึกษา

- พ.บ. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Diplomate American Board of Internal Medicine
- Clinical fellow in Gastro-enterology and hepatology, Veterans Administration Hospital, Boston University, Boston, Mass, U.S.A.

ตำแหน่งปัจจุบัน

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานที่ตีพิมพ์

1. Kannika S. Phornphutkul, Sinn Anuras, Raymond S. Koff, Leonard B. Seeff, H. Zimmerman. Causes of increased plasma creatinin kinase activity after surgery : Clin. Chem. 1974; 20 : 3 : 304-2
2. Kumpol Klunklin, Boonlong Sivasomboon, Kannika Phornphutkul. Nature of upper gastrointestinal hemorrhage in Chiang Mai University Hospital : Journal of the Medical Association of Thailand 1975; 58 : 5 : 242-8
3. Kannika Phornphutkul. Colitis : Problems in gastroenterology, Ed Bangkok Medical Publisher Thaiand 1975
4. Kannika Phornphutkul, Kumpol Klunklin, Boonlong Sivasomboon. Clinical trial of deproteinized extract of calf serum in the treatment of gastric ulcer : Journal of the Medical Association of Thailand 1977; 60: 2: 72-8
5. Kannika Phornphutkul, Boonlong Sivasomboon. Giant hypertrophic gastritis (Menetrier's Disease); Chiang Mai Medical Bulletin 1976; 16: 2: 53-5
6. Kannika Phornphutkul, Kitti Ratdilokapanich, Kumpol Klunklin, Boonlong Sivasomboon. A clinical study of 1-2 tetrahydrofuryl 5-flurouracil in the treatment of gastrointestinal carcinoma : Chiang Mai Medical Bulletin 1978; 17: 169-72
7. Kannika Phornphutkul. Viral hepatitis : Chiang Mai Medical Bulletin 1979; 18: 4: 187-91
8. Kannika Phornphutkul. Spontaneous peritonitis in cirrhosis : Chiang Mai Medical Bulletin 1980; 19: 4: 141-6
9. Kumpol Klunklin, Boonlong Sivasomboon, Kannika Phornphutkul, Chaliow Piyachon, Saree Seneratona. Endoscopy and retrograde cholangiopancreaiography in patients with cholestasig : Chiang Mai Medical Bulletin 1982; 20: 3: 241-65
10. Kannika Phornphutkul, Supatra Peerakome. The frequency of hepatitis B surface antigen in hepatocellular carcinoma patients in northern Thailand : Chiang Mai Bulletin 1982; 21: 4: 345-51

11. B. Sivasomboon, K. Klunklin, K. Phornphutkul. Diarrhea : Problems in Gastroenterology ed Bangkok Medical Publisher, Thailand 1980: 93-111
12. K. Phornphutkul. Medical management of peptic ulcer : Progress in Gastroenterology, ed Bangkok Medical Publisher, Thailand 1981; 1: 55-65
13. K. Phornphutkul. Medical management of portal hypertension : Progress in Gastroenterology, ed Bangkok Medical Publisher, Thailand 1983; 2: 192-204
14. Supatra Peerakome, Kannika Phornphutkul, Nisarath Suwansoporn : Comparison method of detecting hepatitis B surface antigen and antibody in northern population of Thailand. 1984, Bull Chiang Mai AMS, 17: 1: 19-21
15. K. Phornphutkul. Medical management of upper gastrointestinal hemorrhage : Progress in Gastroenterology, ed Bangkok Medical Publisher, Thailand. 1984; 3: 159-73
16. K. Klunklin, K. Phornphutkul. Antisecretory drugs : Medical treatment of peptic ulcer, current concepts. Bangkok Medical Publisher, Thailand. 1984: 45-80
17. Henry T. Lynch, Petcharin Srivatanakul, Kannika Phornphutkul, and J. Lynch. Familial hepatocellular carcinoma in an endemic area of Thailand. Cancer Genetics and Cytogenetics. 1984; 11: 11-8
18. K. Phornphutkul. Hepatitis B viral infection and hepatocellular carcinoma : Progress in Gastroenterology IV ed. Bangkok Medical Publisher, Thailand. 1986; 4: 169-74
19. K. Phornphutkul. Early detection of hepatocellular carcinoma : Progress in Gastroenterology IV ed. Bangkok Medical Publisher, Thailand 1986; 4: 175-82
20. K. Phornphutkul, S. Peerakome and C. Uthanmachai. Hepatitis B virus markers in patients with hepatocellular carcinoma in northern Thailand and thier family member in New Trends in Peptic ulcer and Chronic Hepatitis Proceedings of the International Symposia of the Japanese Society of Gastroenterology Experpta Medica 1987: 31-36
21. H. Nakamura, S. Sawada, K. Phornphutkul. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. Proceeding of the international symposium on hepatocellular carcinoma : Bangkok, Thailand, 1988.
22. C. Sirivanich, H. Nakamura, S. Sawada, P. Handagoon, K. Phornphutkul. Splenic embolization in the treatment of hyperspleenism, Thai J of Radiology 1988; 25: 2: 37-40
23. O. Praisontarangkul, K. Phornhputkul P. Gastric syphilis : a case report and review of literature : Internal Medicine, 1987; 3: 3: 83-6
24. Praisontarangkul O, Phornphutkul K. Endoscopic diagnosis of colonic tuberculess : Gastroenterology Endoscopy 1984; 26: 6: 903-8
25. Thongprasert S, Klunklin K, Phornphutkul K, Prisontarangkul O, Chaimongkol B, Sivasomboon B. Phase II study of Ifosfanide (Holoxan^{R}) in hepatoma. Eur J Cancer Clin Oncol 1988; 24: 11: 1795-6
26. Phornphutkul K. Singkamani R. Prapamontol T, Leelapat P. Amino acid derangement in hepatic encephalopathy. Internal Medicine, 1989; 5: 3: 71-80
27. Klunklin K, Praisontarangkul O, Sivasomboon B, Phornphutkul K, Upayokin S, Ruangarerat T. Assessement of Variceal hemorrhage by gastrointertinal endoscopy, Asian Journal of Clinical Sciences, 1989; 9: 1: 97-106
28. Klunklin K, Sivasomboon B, Praisontarangkul O, Phornphutkul K. Upper gastrointestinal hemorrhage in portal hypertension : Part I causes of hemorrhage and clinical correlation variceal rupture, Internal Medicine, 1989; 5: 2: 49-54
29. Phornphutkul K. Impact of Hepatitis B viral in Asia : Virus Diseases in Asia. Proceedings of the first International Conference on the Impact of Viral Diseases. Edited by Prasert Thongcharoen and Edouard Kurstale, 123-125, Bangkok, 1988
30. Boonyaprapa S, Lumlertgul D, Thanachaikun N, Phornphutkul K. Sympathomimetic Response of the heart : the Thai Journal of Radiology 1990; 27: 1: 27-30

31. Phornphutkul K. Early detection of hepatocellular carcinoma : Progress in Gastroenterology VI ed. Bangkok Medical Publisher, Thailand 1990; 6: 247-66
32. Phornphutkul K., Handagoon P., Sirinanich C, et al : Chemoembolization of hepatocellular carcinoma : Progress in Gastroenterology VI ed. Bangkok Medical Publisher, Thailand 1990; 6: 280-308
33. Phornphutkul K, Chiewchanwit T, et al : Serum ferritin and alpha fetoprotein as tumor markers in hepatocellular carcinoma patients : Cancer Overview. Proceeding of the first Cancer Research Symposium, Chiang Mai, Thailand 1991: 112-8.
34. Peerakome S, Phornphutkul K, Uthammachai C. Ca 199 and alphafetoprotein (AFP) levels in hepatocellular carcinoma (HCC) patients : Cancer Overview . Proceeding of the First Cancer Research Symposium. Chiang Mai, Thailand 1991: 119-24
35. Leethanaporn K, Suttajit M, Linpisarn S, Apiwattakakul K, Phornphutkul K, et al : Clinical significance of serum ferritin and isoferritin levels in lung and liver cancer patients : Cancer Overview. Proceeding of the First Cancer Research Symposium. Ching Mai, Thailand 1991: 106-12
36. Phornphutkul K, Huntgoon P, Sirivanichai C, Nakamura H, Sawada S, Peerakorm S. : Clinical response of transcatheter oily chemoembolization of HCC, Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma, Proceeding of the Second International Symposium on Viral hepatitis and Hepatocellulalr carcinoma : Edited by Sung JL. and Chen D.S. Excepta Mediea, T. Taipei, 1988: 618-22
37. Nakamura H, Suyama Y, Takayasu Y, Sawada S, and Phornphutkul K. Percutaneous intramoral ethanol injection treatment of hepatocellular carcinoma. Internal Medicine 1991; 7:1: 15-9
38. Handagoon P, Senaratana S, Phornphutkul P. Surgical resection following TOCE in hepatocellular carcinoma. Thai J of Radiology, 1992;29:3:41-45
39. Phornphutkul K, Handagoon P, Sirivanichai C, Senarat C, Nakamura H. Hepatocellular carcinoma and transcatheter oily chemoembolization in Thailand. Jp J Cancer Chemotherapy, 1992;19:8:1239-1246
40. Phornphutkul K., Handagoon P., Sirivanichai C. and Nakamura H. Hepatocellular Carcinoma and Trancatheter Oily Chemoembolization in Thailand. Japaness Journal of Cancer and chemotherapy. 1992 ; 19 : 8 ; 1239 - 1245.
41. Yousuk A., Toriyama K., Jiviriyawat Y., Phornphutkul K. A high prevalence of Hepatitis C virus infection Among HIV seropositive Blood donors in Chiang Mai, Thailand. Trop. Med. 1996 ; 38 : 1 ; 21 - 25.
42. Phornphutkul K. Hepatocellular Carcinoma : Progress in Gastroenterology VII ed Bangkok Medical Publisher, Thailand. 1997 ; 7 ; 194 - 231.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย

3. Heinrich F Steger

การศึกษา

- Ph.D.(Biochemistry) Ludwing - Maximilians University in Munich, Baravia, Germany

ตำแหน่งปัจจุบัน

อาจารย์พิเศษ ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานที่ตีพิมพ์

Holler E, Fischer H, Weber C, Stopper H, **Steger H**, Simek H. A DNA polymerase with unusual properties from the slime mold Physarum polycephalum. *Eur J. Biochem;* 1987; 163(2), 397-405.

Pfaller R, **Steger H F**, Rassow J, Pfanner N, Neupert W. Import pathways of precursor proteins into mitochondria: Multiple receptor sites are followed by a common membrane insertion site. *J Cell Biol* 1988; 107, 2483-2490

Steger H F, Söllner T, Kiebler M, Dietmeier K A, Pfaller R, Trülzsch K S, Tropschug M, Neupert W, Pfanner N. Import of ADP/ATP-carrier into mitochondria: Two receptors act in parallel. *J Cell Biol* 1990; 111, 2353-2363.

Moczko M, Dietmeier K, Söllner T, Segui B, **Steger H F**, Neupert W, Pfanner N. Identification of the mitochondrial receptor complex in Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Letters* 1992; 310, 265-268.

Steger H F, Eigel A, Flatz G, Horst J. Hemoglobin E and codon 17 nonsense: two β-globin gene mutations common in Southeast Asia detected by the use of ARMS. *Ann Hematol* 1993; 67, 119-120.

Steger H F, Sanguansermsri T. The detection of α-thalassemia-1 SEA-type by PCR and its potential application to prenatal diagnosis. *Chiang Mai Medical Bulletin* 1994; 33, 81.

Bhoopat T, **Steger H F**. *In vitro* amplification of the VNTR locus D1S80 by PCR for individual identification. *Chiang Mai Medical Bulletin* 1994; 33, 85.

Steger H F, Dumthanom P, Sanguansermsri T. Detection of the common β-thalassemia mutations in Chiang Mai and hemoglobin E by PCR and RFLP or PCR-primer introduced restriction sites. *Chiang Mai Medical Bulletin* 1994; 33, 86.

Steger H F, Dumthanom P, Sanguansermsri T. A simple 15-minute PCR-sample preparation from whole blood. *AsPac J Mol Biol Biotechnol* 1994; 2, 368-369.

Steger H F, Wanapirak C, Sanguansermsri T. Early prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis in Chiang Mai using polymerase chain reaction. *Chiang Mai Medical Bulletin* 1995; 34, 22-23.

Bhoopat T, **Steger H F.** Frequency distribution of D1S80 alleles in the northern Thai population analyzed by amplified fragment length polymorphism technique. *Forensic Science International* 1996; 81, 149-155.

Kitsirisakul B, **Steger H F**, Sanguansermsri T. Frequency of α-thalassemia-1 of the Southeast Asian-type among pregnant women in northern Thailand determined by PCR technique. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1996; 27, 362-363.

Bhoopat T, Sriduankaew S, **Steger H F.** An investigation of the TH01 locus in a population from northern Thailand. *International Journal of Legal Medicine* 1997; 110, 286-287.

Phumyu N, **Steger H F**, Vutyavanich T, Sanguansermsri T. Towards preimplantation diagnosis of homozygous α-thalassemia of the Southeast Asian type (hemoglobin Bart's hydrops fetalis. Chiang Mai Medical Bulletin 1997; 36, 71.

Steger H F, Phumyu N, Sanguansermsri T. The development of a PCR kit for the detection of α-thalassemia-1 of the Southeast Asian type (SEA). Chiang *Mai Medical Bulletin* 1997; 36, 72.

Steger H F, Phumyu N, Wanapirak C, Sanguansermsri T. Prevention and control of α-thalassemia (hemoglobin Bart's hydrops fetalis): routine screening for carriers among pregnant women and their husbands. Chiang *Mai Medical Bulletin* 1997; 36, 73.

Sanguansermsri T, **Steger H F**, Sirivatanapa P, Wanapirak C, Tongsong T. Prevention and control of severe thalassemia syndrome: Chiang Mai strategey. Thai J Hematol Transf Med 1998; 8, 207-214.

Sanguansermsri T, Sangkapreecha C, **Steger H F**. Hb E screening. Thai J Hematol Transf Med 1998; 8, 215-221.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย

4. แพทย์หญิง นิรัชร์ เลิศประเสริฐสุข

การศึกษา

- พ.บ. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- Research Fellow in General Pathology, Tokai University Hospital, Isehara, Japan.
- Ph.D(Pathology), Tokai University, Postgradnate College of Medicine, Isehara, Japan.
- Postdoctorate fellow in Experimental Pathology, Tokai University, Postgraduate College of Medical, Osehara, Japan.

ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ผลงานที่ตีพิมพ์

1. Lertprasertsuke N. and Tsutsumi Y. : Special type of gastric carcinoma, cancer with lymphocytic infiltration. Analysis using mucin histochemistry and immunohistochemistry. Digest organ Immunol 21: 230-233, 1988 (in Japanese).
2. Lertprasertsuke N. and Tsutsumi Y. : Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Analysis using mucin histochemistry and immunohistochemistry. Virchows Arch A Pathol Anat 414: 231-241, 1989.
3. Lertprasertsuke N., Kakudo K., Nakamura A et al.: C cell carcinoma of the thyroid. Follicular variant. Acta Pathol Jpn 39: 393-399, 1989.
4. Ohta Y., Shimamjra K., Lertparasertsuke N. et al.: An atuopsy case of so-called midline malignant reticuloisis followed by extensive dissemination with immunohistochemical evidence for its T cell malignancy. Acta Pathol Jpn 39: 446-450, 1989.
5. Watanabe K., Shinoda M. and Lertprasertsuke N.: Alterations of lipid peroxide scavenging enzymes during carcinogenesis. Positive and negative for markers. Pathol Clin Med 8: 148-157, 1990 (In Japanese).
6. Lertpradertsuke N., Kakudo K., Satoh S. et al.: Rectal carcinoid tumor metastasizing to the thyroid and pancreas. An autopsy case exploiting immuno-histochemistry for differentiation from tumors involving multiple endocrine organs. Acta Pathol Jpn 40: 352-360, 1990.

7. Lertprasertsuke N., Shinoda M., Takekoshi S., Yoshimura S. and Watanabe K.: Suppression of messenger ribonucleic acid for glutathione peroxidase in chemically induced rat hepatocellular carcinoma and its biologic significance. Tokai J Exp Clin Med 15: 1-8, 1990.

8. Lertprasertsuke N., Kakudo K., Osamura Y. et al.: Functional interpretation of kidney juxtaglomerular apparatus using renin immunohistochemistry in Barttle's, Pseudo-Barter's and Conn's syndromes. Tokai exp J Clin Med. 15: 26-34, 1990.

9. Lertprasertsuke N., and Tsutsumi Y. : An unusual form of chronic myeloproliferative disorder aleukemic basophilic leukemia. Acta Pathol Jpn. 41 : 73-81, 1991.

10. Lertprasertsuke N. and Tsutsumi Y. : Neuroendocrine carcinoma of the urinary bladder : Case report and review of the literature. Jpn J Clin Oncol.21:203-210, 1991.

11. Lertprasertsuke N. and Tsutsumi Y. : Alpha-fetoprotein-producing urachal adenocarcinoma. Acta Pathol Jpn. 41:318-326, 1991.

12. Lertprasertsuke N. and Tsutsumi Y. : Latent perianal paget's disease associated with mucin-producing rectal adenocarcinoma report of two cases. Acta Pathol Jpn. 41:386-393, 1991.

13. Lertprasertsuke N., Shinoda M., Takekoshi S., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Niki E. and Watanabe K. : Different effects of carbon tetrachloride on carcinogen induced hepatocellular carcinoma and normal liver of the rat : lowered lipid peroxidation and accelerated necrosis in cancer. Jpn J Cancer Res. 82,503-510, 1991.

14. Lertprasertsuke N., Tsutsumi Y. and Maruyama T. : B-cell lymphoma with vimentin-positive cytoplasmic inclusions. Acta Pathol Jpn. 42:473-479, 1991.

15. Lertprasutsuke N. : The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer Takagi K. and Okabe S. J Med Tech Assoc Thai. 19:5-6, 1991.

16. Sirinirundr C and Lertprasertsuke N. Pediatric pencillosis : Report of two cases. Chiang Mai Med Bull 33:43-50, 1994.

17. Siriuankgul S, Mahanuphap P, Thamprasert K and Lertprasertsuke N. Mammographic findings of the male breast carcinoma and gynecomastia. Thai J Radiol 31:63-67, 1994.

18. Muttarak M, Prakoonitivakorn H; Chalocykitti L and Lertprasertsuke N. Mammographic findings of the male breast carcinoma and gynecomastia. Thai J Radiol 31:63-67, 1994.

19. Vinitkekummen U, Puatanachokchai R, Kongtawelert P, Lertprasertsuke N. and Matsushima T. Antimutagenicity of lemon gross (Cymbopogon Citrus Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. Mut Res 341:71-75,1994.

ประวัติผู้วิจัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย

5. **นางสาวกุลรัญญา พรหมเมืองยอง**

การศึกษา

- วท.บ.(เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตำแหน่งปัจจุบัน

- พนักงานมหาวิทยาลัยประจำ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (นักวิทยาศาสตร์)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่