การเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร

Comparison of detection methods for *Helicobacter pylori* in gastric biopsied specimens

ศศิชัย กังสดาลอำไพ ปนัดดา โรจน์พิบูลสถิตย์ ตรีทิพย์ รัตนวรชัย

สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ประกิตพันธุ์ ทมทิตชงค์

สาขาศัลยศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ดุษฎี สกลยา

สาขาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

รายงานนี้ได้ทำการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธีการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร (*Helicobacter pylori*) ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบ 2 วิธีคือ การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยมีการตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากการย้อมชิ้นเนื้อด้วยสีโทลูอิดีน บลู (modified toluidine blue staining) เป็นวิธีมาตรฐาน ซึ่งการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสนั้นใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป CLO test ซึ่งนิยมใช้ตรวจหาเชื้อดังกล่าวในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาล ส่วนเทคนิค PCR ที่ใช้นี้เป็นการตรวจหาเชื้อโดยดูจากการพบหรือไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีนฟอสโฟกลูโคซามีน มิวเตส (*phosphoglucosamine mutase* gene; *glmM*) ของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร หลังจากผ่านกระบวนการเพิ่มจำนวนแล้ว พบว่าเมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานแล้ว ทั้งการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสและเทคนิค PCR มีความจำเพาะกับเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร มาก (98.8% และ 100% ตามลำดับ) แต่มีความไวต่อการตรวจหาเชื้อต่ำ (64.9% และ 31.5% ตามลำดับ) โดยทั่วไปแล้วเทคนิค PCR เป็นวิธีที่ไวมากต่อการตรวจหาเชื้อโรคต่างๆ แต่ในการศึกษานี้พบว่าในจำนวน 3 วิธีที่ใช้ตรวจสอบ เทคนิค PCR มีความไวต่ำที่สุดในการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร โดยตรงในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร โดยอาจเกิดจากหลายสาเหตุดังที่ได้กล่าวไว้ในรายงานนี้ ดังนั้นเทคนิค PCR ที่ใช้การเพิ่มจำนวนยีน *glmM* ของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร นี้ อาจไม่เหมาะสมในการตรวจกรองการติดเชื้อดังกล่าวในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร แต่เทคนิค PCR นี้สามารถใช้ได้ในการศึกษาระดับอณูของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจหลังจากทำการเพาะเชื้อแล้ว

คำสำคัญ: เชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร, ชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร, การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอส, ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

Abstract

To evaluate an appropriation of the rapid urease test and the polymerase chain reaction (PCR) in diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, we studied the accuracy, sensitivity and specificity of both tests for detection of *H. pylori* in gastric biopsied specimens from patients who presented with clinical dyspepsia. The modified toluidine blue staining of the gastric tissue section was used as a standard method. The bacterial urease activity was

determined by the commercial CLO test while the *phosphoglucosamine mutase* (*glmM*) gene of the bacteria was amplified by the PCR technique. Comparing to the standard histological staining method, it was clearly shown that both rapid urease tests and PCR have extremely high specificity (98.8% for the rapid urease test and 100% for the PCR) but poor sensitivity (64.9% for the rapid urease test and 31.5% for the PCR). Surprisingly, PCR method, which was reported to be a very sensitive diagnostic test for a number of microorganisms, had the lowest sensitivity for *H. pylori* detection in the biopsied samples among these three techniques. Some possibilities that might be responsible for this unexpected observation were discussed in the study. It is likely that the glmM PCR technique should not be used as a screening test for the *H. pylori* infection in the gastric biopsies but it would be applied for molecular studies of the bacterial isolates.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastric biopsy, urease test, polymerase chain reaction

1. บทนำ

เชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร (*Helicobacter pylori*) เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งโค้ง (curved gram negative rod) ที่เป็นสาเหตุหลักของกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis) และแผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcer) [1,2] และยังถูกจัดเป็นปัจจัยก่อมะเร็ง (carcinogenic factor) ของมะเร็งกระเพาะอาหาร [3] เชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร นี้จะปรับตัวได้ดีในการอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารของมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ตลอดชั่วชีวิตของมนุษย์และสัตว์เหล่านี้ มีรายงานว่าประชากรจำนวนมากทั่วโลกมีการติดเชื้อดังกล่าวและมีการอักเสบของกระเพาะอาหาร แต่อย่างไรก็ตาม ผู้ที่ติดเชื้อส่วนมากจะไม่มีอาการผิดปกติของกระเพาะอาหาร จึงทำให้การวินิจฉัยเชื้อนี้ถูกมองข้ามไปในระยะแรกของการติดเชื้อ ปัจจุบันนี้มีวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร หลายวิธี ทั้งวิธีที่ต้องมีการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร ได้แก่ การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (histology) การเพาะเลี้ยงเชื้อจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร (culture) การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร (urease test) การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อที่มีอยู่ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) และวิธีที่ไม่ต้องทำให้ผู้ป่วยเจ็บตัวนักได้แก่ การตรวจหาแอมโมเนียในลมหายใจผู้ที่ติดเชื้อที่ได้มาจากการย่อยสลายยูเรียโดยเชื้อ (urea breath test) และการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อโดยวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (serology) อย่างไรก็ตาม การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีเหล่านี้ดูเหมือนว่าจะให้ผลที่ไม่ค่อยแน่นอน ที่เป็นเช่นนี้เพราะความแปรปรวนของความหนาแน่นเชื้อและการกระจายตัวของเชื้อในกระเพาะอาหาร ตลอดจนการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ ยิ่งไปกว่านั้น การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา ตลอดจนเทคนิคทางจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาล้วนต้องการทักษะจำเพาะของผู้ปฏิบัติการ รวมทั้งต้องใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์นาน อีกประการ การตรวจหาแอมโมเนียในลมหายใจของผู้ติดเชื้อนั้นต้องใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะมาก ดังนั้นเทคนิคที่ง่าย มีความไว และมีความจำเพาะสูงต่อการตรวจหาเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร เช่น การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสและการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประยุกต์เพื่อตรวจหาเชื้อในทางคลินิก

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร ระหว่างการหาเอนไซม์ยูรีเอสแบบรวดเร็วและเทคนิค PCR โดยใช้การตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นวิธีมาตรฐาน

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเก็บสิ่งส่งตรวจ

ทำการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยจำนวน 193 คน (เพศชาย 91 คน เพศหญิง 102 คน ซึ่งมีอายุระหว่าง 16-88 ปี โดยมีอายุเฉลี่ย 43.6 ปี) ซึ่งเข้ามาตรวจโดยการส่องกล้องตรวจดูทางเดินอาหารที่สาขาศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2543-2544 ผู้ป่วย

ทุกคนมาพบแพทย์ด้วยความผิดปกติของกระเพาะอาหาร หลังจากส่องกล้องตรวจดูสภาพของกระเพาะอาหารแล้ว แพทย์ทำการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารบริเวณตอนปลาย (antrum) ประมาณ 4-5 ชิ้น โดยชิ้นหนึ่งนำไปตรวจทางพยาธิวิทยา ชิ้นที่สองนำไปตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ อีกชิ้นหนึ่งนำไปตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR สำหรับชิ้นเนื้อที่เหลือจะเก็บไว้หากต้องมีการทำซ้ำในอนาคต การใช้ชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยเพื่องานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะอนุกรรมการจริยธรรมและระเบียบวิธีวิจัยของคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

2.2 การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสแบบรวดเร็ว

ทำการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป Campylobacter like organism (CLO) Test (Delta West Limited, Australia) โดยมีหลักการคือ ในชุดตรวจประกอบด้วยยูเรียเป็นสับสเตรทของเอนไซม์และสารฟีนอล เรด (phenol red) เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นกรดเบส (pH indicator) หากในตัวอย่างตรวจมีเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไรอยู่ เอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อจะทำการย่อยสลายยูเรียได้เป็นแอมโมเนียซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบส ทำให้สารฟีนอล เรด เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีม่วงแดง

2.3 การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

นำชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารมาแช่ใน 10 % ฟอร์มาลิน (formalin) และนำไปตัดชิ้นเนื้อให้เป็นแผ่นบางๆ แล้วย้อมสีชิ้นเนื้อที่ได้ด้วยสีโทลูอิดีน บลู (modified toluidine blue) (ดุษฎี สกลยา และคณะ, บทความกำลังจัดพิมพ์) การตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารหลังจากย้อมสีแล้วใต้กล้องจุลทรรศน์นั้นทำโดยนักพยาธิวิทยา 2 คนที่ไม่ทราบข้อมูลทางคลินิกและผลการตรวจเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ด้วยเทคนิค PCR เพื่อป้องกันมิให้เกิดความลำเอียงในการลงผลการตรวจชิ้นเนื้อ

2.4 การตรวจโดยเทคนิค PCR

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารซึ่งจะได้ปนกับดีเอ็นเอของผู้ป่วย โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAamp DNA extraction Kit (Qiagen, USA) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัท สำหรับตัวควบคุมบวก (positive control) จะใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร นั้น ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่จับอย่างจำเพาะกับยีนยูรีเอสซี (*ureaseC* gene; *ureC*) ของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร: 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3′ และ 5′-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3′ [4, 5] ซึ่งต่อมายีน *ureC* นี้ได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็นยีนฟอสโฟกลูโคซามีน มิวเตส (*phosphoglucosamine mutase* gene; *glmM*) [6] นอกจากนี้ ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนกลูตาไธโอน-เอส-ทรานสเฟอเรส ชนิดไพ (pi class *glutathion-S-transferase* gene) ของมนุษย์: 5′-CTCTATGGGAAGGACCAGCAGGAG-3′ และ 5′-CAAGCCACCTGAGGGGTAAGG-3′ [7] ยังถูกใส่เติมในปฏิกิริยา PCR ด้วยเพื่อเป็นตัวควบคุมภายใน การดำเนินปฏิกิริยา PCR จะใช้ขั้นตอนเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ [6] คือ 95 °C 40 วินาที, 55 °C 40 วินาที, 72 °C 40 วินาที จำนวน 40 รอบ การตรวจดูว่ามีเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารหรือไม่ ดูจากการพบหรือไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน *glmM* ของเชื้อ หลังจากนำดีเอ็นเอที่ได้ผลจากการทำ PCR มาทำอีเล็คโตรฟอเรซิสใน 1.5% วุ้นอะกาโรส

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการคำนวนความไว (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ค่าการทำนายผลบวก (positive-predictive value) และค่าการทำนายผลลบ (negative-predictive value) ตลอดจนความถูกต้อง (accuracy) ของการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้ออย่างรวดเร็วและการตรวจโดยเทคนิค PCR เพื่อประเมินความเหมาะสมของเทคนิคทั้งสอง โดยใช้การตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นวิธีมาตรฐาน

3. ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ ได้ทำการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร (*Helicobacter pylori*) ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารจำนวน 193 ตัวอย่างตรวจ โดยวิธีการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อโดยชุดตรวจสำเร็จรูป CLO Test การเพิ่มจำนวนยีน *glmM* ของเชื้อโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) และการตรวจทางพยาธิวิทยาโดยการย้อมชิ้นเนื้อและตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามี 114 ตัวอย่างตรวจที่ให้ผลตรงกันทั้ง 3 วิธี กล่าวคือ ผลบวก = 33 และผลลบ = 81 (ดังตารางที่

1) ชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร 111 ตัวอย่างตรวจที่ให้ผลบวกต่อการตรวจทางพยาธิวิทยานั้นจะให้ผลบวกเพียง 35 ตัวอย่างตรวจโดยเทคนิค PCR แต่ให้ผลบวกต่อการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสถึง 72 ตัวอย่างตรวจ แสดงว่าเทคนิค PCR ในที่นี้ มีความไวต่อการตรวจหาเชื้อต่ำกว่าอีก 2 วิธี อย่างไรก็ตาม ไม่มีชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารชิ้นใดเลยซึ่งให้ผลลบต่อการตรวจทางพยาธิวิทยาแล้วให้ผลบวกต่อการตรวจโดยเทคนิค PCR ซึ่งแสดงว่าเทคนิค PCR นี้มีความจำเพาะมากถึง 100 % การตรวจพบการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร โดยเทคนิคที่แตกต่างกัน 3 เทคนิคนี้ ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 สำหรับค่าความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก/ลบ และค่าความถูกต้องของการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสและเทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร โดยวิธีที่แตกต่างกัน

พยาธิวิทยา	เอนไซม์ยูรีเอส	PCR	จำนวนชิ้นเนื้อ
-	-	-	81
-	-	+	0
-	+	-	1
-	+	+	0
+	-	-	37
+	-	+	2
+	+	-	39
+	+	+	33

ตารางที่ 2 การตรวจพบการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร โดยวิธีทางพยาธิวิทยา การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสและเทคนิค PCR (n = 193)

วิธีการตรวจ	จำนวนชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ตรวจพบเชื้อ
การตรวจทางพยาธิวิทยา	111 (57.5%)
การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอส	73 (37.8 %)
เทคนิค PCR	35 (18.1%)

ตารางที่ 3 ความไว ความจำเพาะ ค่าการทำนายผลบวก/ลบ และความถูกต้องของวิธีการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสและเทคนิค PCR ในการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร

	ค่าการตรวจพบ (%)	
	การตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอส	เทคนิค PCR
ความไว	64.9	31.5
ความจำเพาะ	98.8	100
ค่าการทำนายผลบวก	98.6	100
ค่าการทำนายผลลบ	67.5	51.9
ความแม่นยำ	79.3	60.6

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

ได้มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจพบเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในกระเพาะอาหารกับการเป็นโรคกระเพาะอาหาร [8] ดังนั้นวิธีการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ที่ถูกต้องและแม่นยำ จึงมีความสำคัญสำหรับแพทย์ในการรักษาผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารให้หายขาด ในประเทศไทยนั้น ถึงแม้ว่าวิธีการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสอย่างรวดเร็วจะถูกใช้เป็นประจำในการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร มาเป็นเวลานานพอสมควรแล้วก็ตาม แต่ความถูกต้องของวิธีนี้เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ นั้น มีการศึกษาไว้เพียง 1 รายงานเท่านั้น [9] ในการทดสอบหาเอนไซม์ยูรีเอสบางครั้งอาจต้องใช้เวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แน่ใจถึงการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ เพื่อบ่งชี้ว่ามีเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อหรือไม่ นอกจากนี้ ชิ้นเนื้อที่ผ่านการทดสอบหาเอนไซม์ยูรีเอสแล้วอาจจะอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถนำไปทำการทดสอบอื่นต่อได้ เทคนิคการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (เทคนิค PCR) เป็นเทคนิคที่ในปัจจุบันนี้นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเพราะเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว มีความไวต่อการตรวจพบสูง ใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อย รวมทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้กับงานได้หลากหลาย ไพศาล พงศ์ชัยฤกษ์ และคณะ [10] ได้ทำการศึกษาร่วมกับนักวิจัยชาวญี่ปุ่นในการใช้เทคนิค PCR เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในผู้ป่วยไทยที่มีอาการผิดปกติของกระเพาะอาหาร แต่เทคนิค PCR นี้แทบไม่มีการนำมาใช้ตรวจหาเชื้อดังกล่าวในประเทศไทยเลย ดังนั้นจุดประสงค์ของการทำวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการประเมิน

ว่าเทคนิค PCR นี้มีความเหมาะสมเพียงใดที่จะนำมาใช้เป็นการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย

ในการศึกษานี้พบว่าเทคนิค PCR มีความไวต่อการตรวจพบเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ต่ำกว่าการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อ และการตรวจทางพยาธิวิทยา ซึ่งผลการศึกษานี้ต่างจากที่เคยมีผู้วิจัยหลายกลุ่มรายงานก่อนหน้านี้ว่า การใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *glmM* นั้น สามารถตรวจพบเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไรจำนวนน้อยๆ ได้ เช่น 2 เซลล์ [11] 50 เซลล์ [5] หรือ 10-100 เซลล์ [12] เป็นต้น การที่ความไวในรายงานนี้แตกต่างจากที่เคยมีการรายงานไว้อาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ ประการแรก ผลบวกจากการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อนั้นอาจเป็นเพียงผลบวกลวง เพราะว่าอาจมีการปนเปื้อนระหว่างการส่องกล้องโดยแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas* spp. เป็นต้น ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างเอนไซม์ยูรีเอสได้เช่นกัน ประการที่สอง การที่เทคนิค PCR มีความไวต่อการตรวจหาเชื้อต่ำ อาจเป็นผลจากการที่มีสารบางชนิดรวมทั้งกรด HCI ที่ปนเปื้อนมากับชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารซึ่งอาจยับยั้งกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จึงทำให้เกิดผลลบลวง ดังนั้นเพื่อที่จะตัดความเป็นไปได้ว่ามีสารยับยั้งอยู่ในปฏิกิริยา PCR ในการวิจัยนี้จึงได้มีการใส่ไพรเมอร์สำหรับยีนกลูตาไธโอน-เอส-ทรานสเฟอเรส ชนิดไพของมนุษย์ (human pi class *glutathione-S-transferase; hGSTP*) ลงไปในปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร เพื่อเป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ให้แน่ใจว่าปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป็นไปด้วยความเรียบร้อยไม่มีตัวยับยั้งที่อาจทำให้การแปรผลผิดพลาดไป ไพรเมอร์ *hGSTP* นี้จะจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอของชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารผู้ป่วยที่สกัดได้พร้อมกับดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย ผลจากการทดลองพบแถบดีเอ็นเอขนาด 192 คู่เบสของยีน *hGSTP* ในปฏิกิริยาของทั้ง 193 ตัวอย่างตรวจ (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ในการทดลองนี้ไม่มีสารยับยั้งการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่นำมาทดสอบ ซึ่ง Lage และคณะ เคยรายงานไว้ว่าไม่มีตัวยับยั้งปฏิกิริยา PCR ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร [11] อีกประการที่ทำให้เทคนิค PCR มีความไวต่ำอาจเกิดจากการที่บางตัวอย่างตรวจมีดีเอ็นเอของเชื้อเจือจาง กล่าวคือ ผลบวกที่ได้จากการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสและการตรวจทางพยาธิวิทยานั้นมาจากการตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร แต่ในกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอนี้จะใช้เพียงบางส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร ดังนั้นในกรณีที่มีจำนวนของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร เพียงเล็กน้อยในตัวอย่างตรวจ ปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนในหลอดทดลองนั้นอาจจะไม่มากพอที่จะสังเกตได้โดยตรงจากการย้อมดีเอ็นเอด้วยสีเอธิเดียม โบรไมด์ ซึ่งปัญหานี้แก้ได้โดยการใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น (DNA hybridization) ซึ่งก็มีการทำมาบ้างในแบคทีเรียชนิดอื่น ถึงแม้ว่าห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะใช้การตรวจทางพยาธิวิทยาเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร แต่ความคลาดเคลื่อนในการวินิจฉัยเชื้อโดยนักพยาธิวิทยา (ซึ่งเกิดขึ้นได้) ก็ควรนำมาพิจารณาด้วย อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบผลการตรวจทางพยาธิวิทยาซ้ำ โดยนำสไลด์ที่ทำการย้อมสีชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารและผ่านการอ่านผลทางพยาธิวิทยาส่งไปให้นักพยาธิวิทยาที่ต่างประเทศอ่านผลซ้ำ (ดร.โนบูทากะ ยามาดะ ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงเรียนแพทย์นิปปอน โตเกียว ประเทศญี่ปุ่น) ซึ่งผู้อ่านผลทางพยาธิวิทยาซ้ำนี้จะไม่ทราบผลการส่องกล้องตรวจและผลการตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร มาก่อนเลย ผลจากการตรวจทางพยาธิวิทยาซ้ำนี้สอดคล้องกับการตรวจในครั้งแรก ประการสุดท้าย ความไวของเทคนิค PCR ที่ต่ำกว่าที่เคยมีการรายงานนั้นอาจเกิดจากเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดย Lage และคณะ [11] ได้ใช้ไพรเมอร์ชุดเดียวกันกับในการศึกษาครั้งนี้ แต่เตรียมดีเอ็นเอของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร โดยการต้มชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารโดยตรงเพื่อให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติและดีเอ็นเอออกมาในสารละลาย ซึ่งผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้รายงานว่า ความไวของเทคนิค PCR ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร โดยวิธีนี้เทียบเท่ากับการวินิจฉัยเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร

จากการเปรียบเทียบกับการตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่าทั้งการตรวจหาเอนไซม์ยูรีเอสของเชื้อและเทคนิค PCR มิได้เป็นวิธีที่ให้ผลที่ถูกต้องเสมอไปเหมือนที่เคยมีการรายงานไว้ [5, 11] ดังนั้นการที่จะใช้เทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไรด้วยวิธีทั้ง 2 วิธีนี้ จำเป็นที่จะต้องมีการประเมินเสียใหม่

ก่อนที่จะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการในประเทศไทย นอกจากนี้การตรวจวินิจฉัยโดยวิธีเหล่านี้ไม่ควรที่จะใช้ในการติดตามโรคของผู้ป่วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจากการให้ยาเพื่อฆ่าเชื้อให้หมดสิ้นไป

การทดสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาอาจมีข้อดีกว่าในทางการปฏิบัติเมื่อเทียบกับการใช้วิธีที่ต้องมีการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารมาทดสอบในแง่ที่ว่าวิธีแรกนั้นเป็นการตรวจสอบทั้งหมด ในขณะที่วิธีที่สองเป็นการตรวจสอบเพียงบางส่วนเท่านั้น (entire/focal investigation) Perez-Perez และคณะ [13, 14] ได้เคยรายงานความชุกของการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไรในประเทศไทย โดยการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาว่าสูงถึง 80% ซึ่งตัวเลขนี้ต่างจากที่พบในงานวิจัยนี้ (28.7%) และงานวิจัยในคนไทยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้โดยเทคนิค PCR (62.3%) [10] เป็นไปได้ว่าการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยานั้นเป็นการตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในผู้ป่วยซึ่งได้ทำการรักษาหายจากการติดเชื้อแล้ว ดังนั้นจึงไม่สามารถที่จะแยกการติดเชื้อในปัจจุบันหรือในอดีตได้เมื่อผลของการตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยาให้ผลบวก

โดยสรุป การตรวจหาเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร โดยการเพิ่มจำนวนของยีน *glmM* ของเชื้อนั้น อาจไม่เหมาะสำหรับการใช้ตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร ในชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบ แต่อย่างไรก็ตาม เทคนิค PCR นี้ สามารถนำไปใช้ในการศึกษาระดับอณูของเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพลอไร หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารแล้ว

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ป่วยทุกท่านที่อนุญาตให้นำชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารมาใช้ในงานวิจัยนี้ ทีมงานในห้องผ่าตัดโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติที่อำนวยความสะดวกในการเก็บรักษาชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร ดร.โนบุทากะ ยามาดะ ที่ตรวจสอบผลทางพยาธิวิทยาซ้ำ และผู้ช่วยศาสตราจารย์สวณี เต็งรังสรรค์ ในการให้คำปรึกษาทางด้านสถิติ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนโดยทุนวิจัยเสริมหลักสูตรคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Marshall, B.J. and Warren, J.R., Unidentified Curved Bacilli in the Stomach of Patients with Gastritis and Peptic Ulceration, Lancet. Vol. 1; pp. 1311-1315, 1984.

[2] Graham, D.Y., *Helicobacter pylori*: Its Epidemiology and Its Role in Duodenal Ulcer Disease, Gastroenterol. Hepatol. Vol. 6; pp. 105-113, 1991.

[3] International Agency for Research on Cancer, Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*, IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Vol. 61; pp. 1-241, 1994.

[4] Bickley, J., Owen, R.J., Fraser, A.G. and Pounder, R.E., Evaluation of the Polymerase Chain Reaction for Detecting the *urease C* Gene of *Helicobacter pylori* in Gastric Biopsy Samples and Dental Plaque, J. Med. Microbiol. Vol. 39; pp. 338-344, 1993.

[5] Lu, J.J., Perng, C.L., Shyu, R.Y., Chen, C.H., Lou, Q., Chong, S.K. and Lee, C.H., Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues, J. Clin. Microbiol. Vol. 37; pp. 772-774, 1999.

[6] De Reuse, H., Labigne, A. and Mengin-Lecreulx, D., The *Helicobacter pylori ureC* Gene Codes for a Phosphoglucosamine Mutase, J. Bacteriol. Vol. 179; pp.3488-3493, 1997.

[7] Menegon, A., Board, P.G., Blackburn, A.C., Mellick, G.D. and Le Couteur, D.G., Parkinson's Disease, Pesticides, and Glutathione Transferase Polymorphisms, Lancet. Vol. 352; pp. 1344-1346, 1998.

[8] Israel, D.A. and Peek, R.M., Review Article : Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Induced

Gastric Inflammation, Aliment. Pharmacol. Ther. Vol. 15; pp. 1271-1290, 2001.

[9] Suwanagool, P., Atisook, K., Pongpech, P., Dhiraputra, C., Luengrojanakul, P. and Kachintorn, U., *Helicobacter pylori*: a Comparison of CLO Test and Giemsa's Stain with Culture in Dyspeptic Patients, J. Med. Assoc. Thai. Vol. 76; pp. 185-189, 1993.

[10] Pongchairerks, P., Matsukura, N., Bhumisirikul, P., Traihattasap, S., Eurnorase, C., Kositchaiwat, S. and Tirapanich, W., The Occurrence of *Helicobacter pylori* and Its Virulence Factor in Thai People with Gastritis, Peptic Ulcers and Gastric Cancer : Prelimilary Results, Rama. Med. J. Vol. 20; pp. 103-107, 1997.

[11] Lage, A.P., Godfroid, E., Fauconnier, A., Burette, A., Butzler, J.P., Bollen, A. and Glupczynski, Y., Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of *cagA* Gene in Gastric Biopsy Specimens, J. Clin. Microbiol. Vol. 33; pp. 2752-2756, 1995.

[12] Ho, G.Y., Windsor, H.M., Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Polymerase chain reaction tests, Gastroenterol. Clin. North. Am. Vol. 29; pp. 903-915, 2000.

[13] Perez-Perez, G.I., Taylor, D.N., Bodhidatta, L., Wongsrichanalai, J., Baze, W.B., Dunn, B.E., Echeverria, P.D. and Blaser, M.J., Seroprevalence of *Helicobacter pylori* Infections in Thailand, J. Infect. Dis. Vol. 161; pp. 1237-1241, 1990.

[14] Perez-Perez, G.I., Bhat, N., Gaensbauer, J., Fraser, A., Taylor, D.N., Kuipers, E.J., Zhang, L., You, W.C. and Blaser, M.J., Country-Specific Constancy by Age in $CagA^+$ Proportion of *Helicobacter pylori* Infections, Int. J. Cancer. Vol. 72; pp. 453-456, 1997.