บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Polymerase Chain Reaction

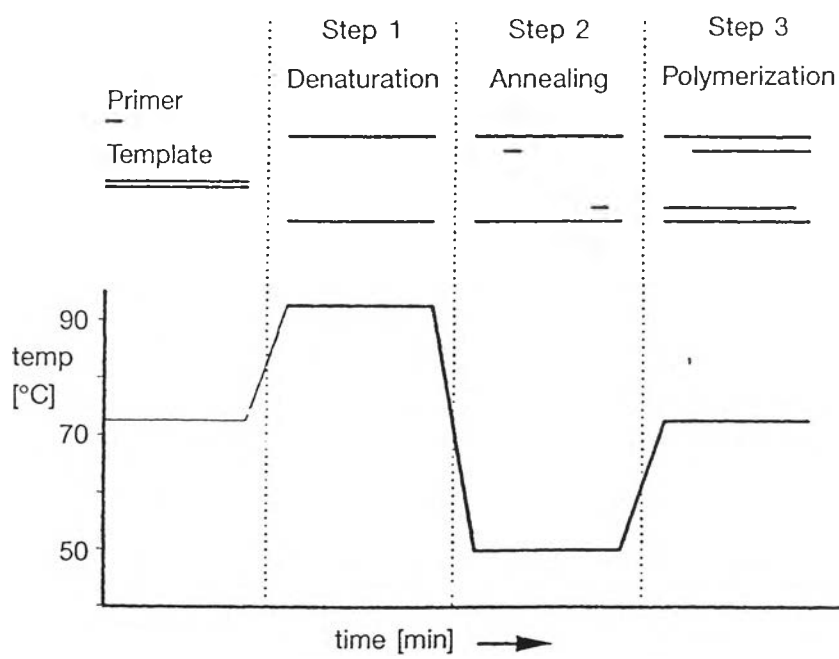
Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคใหม่ทางด้าน Molecular biology เช่นเดียวกับการค้นพบเทคนิคต่างๆ เช่น Southern blotting, molecular cloning ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากถึงวิธีการที่จะศึกษาถึงขบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตในระดับ molecules

PCR เป็นวิธีเพิ่มจำนวน DNA เฉพาะส่วนอย่างจำเพาะ (specific segment) ในหลอดทดลอง (in vitro) เป็นเทคนิคใหม่ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในการวิเคราะห์ หรือศึกษายีนต่างๆ เนื่องจากยีนแต่ละชนิดจะมีเป็นส่วนน้อยใน genome ดังนั้นถ้าจะศึกษายีนใดๆ จะต้องมีวิธีเพิ่มจำนวนของ DNA ชิ้นนั้นให้มากขึ้นเพื่อที่จะมองเห็นได้และนำมาทำการทดลองต่างๆ ได้ วิธีปกติที่ใช้เพิ่มจำนวน DNA ส่วนที่ต้องการคือ molecular cloning โดยการเพิ่มจำนวน DNA ส่วนที่ต้องการในแบคทีเรีย ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ยากมีหลายขั้นตอนใช้เวลาหลายอาทิตย์และยังต้องมีวิธีการที่จะพิสูจน์ว่า DNA ส่วนที่ clone ได้เป็น DNA ส่วนที่ต้องการหรือไม่ แต่วิธี PCR สามารถทำให้เราศึกษายีนต่างๆ ได้ง่ายขึ้นโดยการเพิ่มจำนวน DNA ส่วนที่ต้องการได้อย่างไม่จำกัดจำนวนโดยไม่ต้องใช้วิธี cloning

วิธีการ PCR คิดขึ้นโดย Kary B. Mullius โดยทางทฤษฎี PCR ก็คล้ายๆ กับ DNA replication ภายในเซลล์ กล่าวคือ เป็นวิธีการที่ DNA Polymerase สร้าง DNA จาก DNA ต้นแบบ โดยการต่อสาย oligonucleotide primer แต่ขบวนการ PCR อาศัย oligonucleotide primers 2 เส้น ซึ่งแต่ละเส้นจะ hybridize หรือ anneal กับ DNA เส้นตรงข้ามกัน เนื่องจาก complementary โดย primer จะหันปลายด้าน 3'-OH ของ primer เข้าหากัน ถ้ามี เอ็นซัยม์ DNA polymerase อยู่ด้วยก็จะเกิดการสร้าง DNA ขึ้น โดยการต่อปลายจาก primer ทั้ง 2 เส้นตาม DNA ต้นแบบจนกระทั่งสุดปลาย template โดยการสร้าง DNA จะทำได้ในทิศทางเดียวคือจาก 5' $\rightarrow$ 3' ผลที่ได้คือ DNA เส้นคู่ใหม่ที่เกิดจาก DNA เส้นที่สร้างใหม่ complementary กับ

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA เส้นที่เป็น templace การสร้าง DNA ทำซ้ำอีกได้โดยการนำปฏิกิริยามาทำให้ร้อน (90-95°C) ก็จะเป็นการแยก DNA เส้นคู่ที่ได้ใหม่ ให้เป็น DNA เส้นเดี่ยว ถ้าลดอุณหภูมิลงมาให้เหมาะสม คือ ที่อุณหภูมิ ซึ่ง primer จะเข้าไป hybridize กับ target DNA ทั้งเส้นเก่าและเส้นที่สร้างใหม่ จากนั้นก็จะเกิดการสร้าง DNA โดย DNA polymerase โดยอาศัยวิธีการเป็นรอบๆ ซ้ำๆ กันคือ ทำให้ DNA ต้นแบบกลายเป็นเส้นเดี่ยว (template denaturation) ให้ primer เข้าไป hybridize กับ target (primer annealing) และการต่อสายหรือสร้าง DNA โดย DNA polymerase (extension or polymerization) ในที่สุดก็จะได้ DNA เพิ่มเป็นแบบทวีคูณ ถ้าทำแบบนี้ 20 รอบก็จะได้ DNA จำนวนประมาณ 1 ล้านเท่า (2^{20}) นั่นคือ เราสามารถขยายเพิ่มจำนวน DNA ที่อยู่ระหว่าง primer ทั้ง 2 ข้าง (หรือมีปลายทั้ง 2 ข้างเป็น primer) ที่จำเพาะ (specific DNA sequence) เพิ่มขึ้น ถ้าทำขบวนการ PCR n รอบ ก็จะได้ผลผลิต 2^n ในระยะแรกๆ ของเทคนิค PCR เอ็นซัยม์ DNA polymerase คือ Klenow Fragment DNA polymerase



รูปที่ 1 PCR temperature cycling profile

Step ที่ 1 ใช้ความร้อนเพื่อทำให้เกิด DNA สายเดี่ยว ในปฏิกิริยาจะมี primer, dNTPs, PCR buffer และ Taq polymerase โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 93-95 °C

Step ที่ 2 Oligonucleotide จะเข้าไป anneal กับ DNA ต้นแบบ โดยการลดอุณหภูมิลงมาที่ 40-65°C แล้วแต่ primer ที่ใช้

Step ที่ 3 คือการต่อ primer ที่ 72 °C ด้วย Taq polymerase Step 1 ถึง 3 รวมกันเป็น 1 cycle หรือ heat block 3 เครื่อง โดยปกติอุณหภูมิที่ใช้ในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์จะขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของเบสบนสายไพรเมอร์ โดยสามารถคำนวณคร่าวๆ ได้จากสูตร

แต่เอ็นซัยม์นี้จะเสียสภาพเมื่อถูกทำให้ร้อนในช่วงของ tamplate de naturation ของ PCR cycle ดังนั้นเมื่อถึงรอบของ extension จะต้องเติมเอ็นซัยม์ลงไปใหม่ทุกๆ รอบ ต่อมาได้มีการนำเอา Taq polymerase ซึ่งเป็น DNA polymerase ที่แยกได้จาก Thermus aquaticus มาใช้ในปฏิกิริยาแทน Klenow enzyme[2] ทำให้ไม่ต้องเติมเอ็นซัยม์ลงไปใหม่ทุกๆ รอบ เพราะ Taq polymerase ทนความร้อนได้ดี (thermostable) และยังทำงานในการ polymerize DNA ได้ดีที่อุณหภูมิสูงอีกด้วย (75°C-80 °C) จึงทำให้ขบวนการ PCR ทำได้ง่ายขึ้นและยังทำแบบอัตโนมัติได้ด้วย โดยการใช้ thermal cycler ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถตั้งโปรแกรมการทำให้เป็นแบบ cycle ได้ เมื่อก่อนทำโดยใช้ waterbath

$$T_h = T_m - 5$$

และ $$T_m = 4(G+C)+2(A+T)$$

โดยที่ T_h คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับกันระหว่างไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (hybridization or annealing temperature)

T_m คือ อุณหภูมิที่สายดีเอ็นเอเส้นคู่ครึ่งหนึ่งเปลี่ยนเป็นเส้นเดี่ยว (melting temperature)

G, A, T, C คือจำนวนเบส กวานีน (G), อะดีนีน (A), ไธมีน (T) และไซโตซีน (C) ของไพรเมอร์

เช่นในการทำ PCR โดยใช้คู่ของไพรเมอร์ ซึ่งได้แก่ไพรเมอร์ที่จับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์เส้นบน (forward primer) และไพรเมอร์ที่จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์เส้นล่าง (reverse primer) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

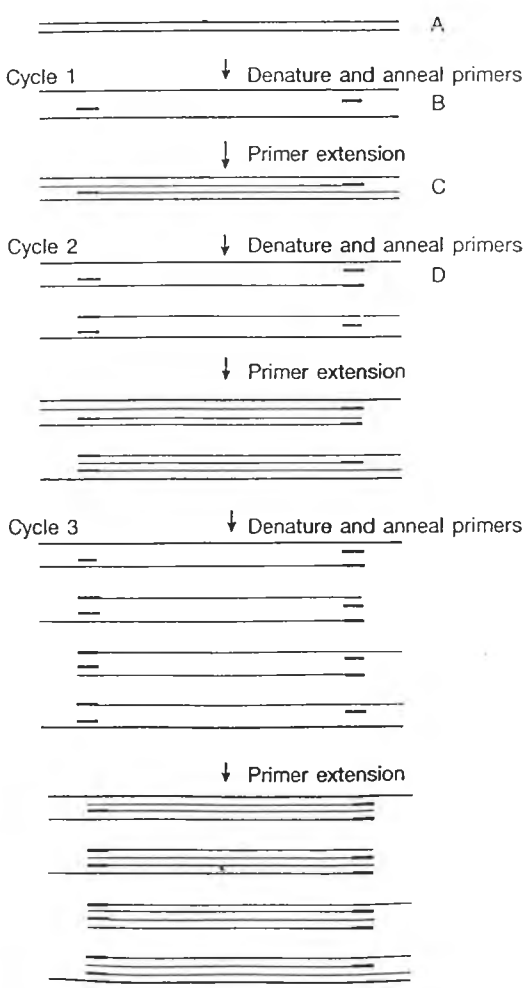
forward primer : 5′-TGGACAGAATTGGAGATGAC-3′ $T_m = 4(9) + 2(11) = 58^{\circ}C$

reverse primer : 5′-AAACAGCACTTTCCTCCAGC-3′ $T_m = 4(10) + 2(10) = 60^{\circ}C$

T_h หรืออุณหภูมิที่ใช้ในการจับกันของไพรเมอร์คู่นี้กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์มีค่า = 58-5 = 53 °C

การทำ PCR ทำได้โดยการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยา (reaction components) ซึ่งประกอบ DNA template, primers, dNTP, buffer และ Taq polymerase ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมไว้เป็น cycle ของ denature, annealing

extention โดยแต่ละ step สามารถตั้งเวลาและอุณหภูมิได้ เช่น denature ที่ 94 °C 30 วินาที เพื่อให้ DNA template เส้นคู่แยกออกเป็น DNA เส้นทางเดี่ยว annealing ที่ 60 °C 30 วินาที เพื่อให้ primer ทั้ง 2 เส้นไปจับ หรือ hybridize กับ target DNA ในตำแหน่งที่ primer complementary กับ target ในช่วงนี้โอกาสที่ template จะจับกันใหม่ก็เกิดขึ้นได้ แต่เนื่องจาก primer ที่ใส่ลงไปมีจำนวนมากกว่า target หลายเท่า ดังนั้น จึงมีแต่ primer เท่านั้นที่จะไปจับกับ target ต่อจากนั้นก็ primer เท่านั้นที่จะไปจับกับ target ต่อจากนั้นก็ extension ที่ 72°C อีก 30 วินาที ในช่วงนี้ taq polymerase จะทำหน้าที่ต่อสาย DNA จาก primer คือสร้าง DNA จากปลาย 3' ของ primer ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดได้เร็วมาก ประมาณ 100 nucleotide/วินาที การสร้าง DNA หรือการต่อ primer จะดำเนินไปจนสุดปลาย template จะเห็นว่า DNA ทั้ง 2 เส้นทำหน้าที่เป็น template จะเห็นว่า DNA ทั้ง 2 เส้นทำหน้าที่เป็น template ได้ เมื่อสิ้นสุด 1 รอบ (1 cycle) จะได้ DNA เพิ่มขึ้นมาเป็น 2 คู่ ซึ่งเมื่อนำมาเข้าสู่ cycle ที่สอง ก็จะได้ DNA template เป็น 4 เส้น ซึ่งจะมีบริเวณให้ primer ทั้ง 2 ข้าง เข้าไป hybridize ได้ และเกิดการต่อสาย DNA ใหม่ในช่วง extension ซึ่งเมื่อจบรอบที่ 2 ก็จะได้ DNA 4 คู่ ทำเช่นนี้ต่อไปเรื่อยๆ ก็จะได้ DNA เพิ่มขึ้นเป็นแบบทวีคูณ (exponential) เช่นถ้าทำ n รอบ ก็จะได้จำนวน DNA 2^n คู่ ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 หลักการ Polymerase Chain Reaction

A DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเป็น DNA เส้นคู่

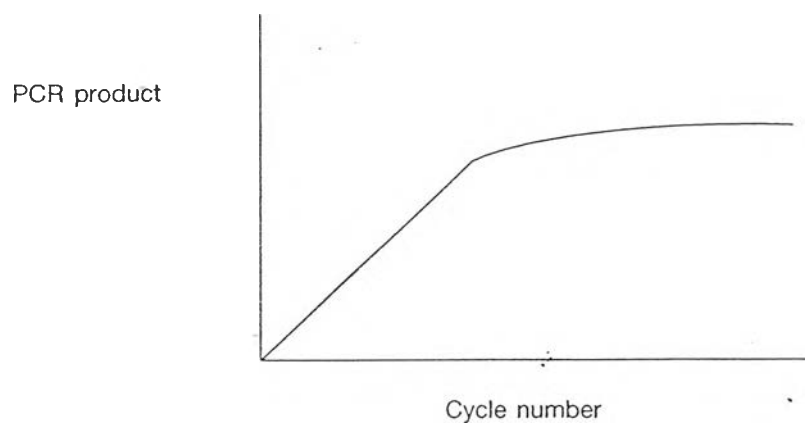
B แยก DNA ออกเป็นเส้นเดี่ยวด้วยความร้อนสูง และทำให้เย็นลงเพื่อที่จะให้ primer 1 และ 2 ไป anneal กับแต่ละเส้น DNA

C Taq polymerase จะสร้าง DNA ซึ่ง complementary กับ template

D เข้ารอบที่สองของ PCR reaction

จากภาพจะเห็นได้ว่า DNA เส้นที่สร้างขึ้นใหม่ในรอบถัดๆ ไปจะทำหน้าที่เป็น template ให้ primer เข้ามา anneal และเป็น substrate ของ Taq polmerase (product กลายเป็น target) ซึ่งมีลักษณะคล้ายปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Reaction) จึงเรียกปฏิกิริยาของการเพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองว่า "Polymerase Chain Reaction"[3]

เนื่องจากวิธีการ PCR สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ไม่จำกัดจำนวน ดังนั้น DNA ตั้งต้น หรือ DNA ที่ต้องการเพิ่มจำนวน จึงเริ่มจากจำนวนน้อยๆ ได้ และไม่จำเป็นต้องแยก DNA ต้นแบบให้บริสุทธิ์ก่อนเพราะว่า primer ที่ใช้มีความจำเพาะกับ DNA เส้นที่ต้องการจะเพิ่มจำนวน ในปัจจุบันมีผู้ใช้ PCR ในการเพิ่มจำนวน DNA จากเซลล์เพียง 1 เซลล์ได้ แต่การเพิ่มจำนวนของ DNA ก็มีขอบเขตจำกัดคือ ถ้าทำปฏิกิริยา PCR ไปหลายๆ รอบ พบว่า product ในรอบท้ายๆ ไม่ได้เพิ่มแบบทวีคูณ (exponential) ในระยะนี้เรียกว่า amplification plateau ดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 Amplification plateau

สาเหตุใหญ่ของการเกิด amplification plateau ก็คือ DNA ที่สร้างขึ้นมาใหม่ มีจำนวนมากจนกระทั่งมากกว่า primer และ Taq polymerase ที่มีอยู่ในปฏิกิริยา และในช่วง PCR cycle ที่ให้ primer anneal กับ target จะทำให้ PCR product มา anneal กันเอง มากกว่า primer กับ target นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นเช่น dNTP และ primers หมดไปจากปฏิกิริยา Taq polymerase ถูก inactivate (half life ของเอ็นซัยม์ที่ 94°C ประมาณ 40 นาที)[4] เป็นต้น

PCR มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูงมาก เพราะ

1. เป็นคุณสมบัติของ oligodeoxynucle-otide (primer) ที่สามารถจะจับกับ nucleic acid ที่ complementary อย่าง specific ถ้าอุณหภูมิเหมาะสม (annealing temperature) oligodeoxy-nucleotide จะจับกับ nucleic acid sequence ที่มีการเรียงตัวของเบส complementary กัน 100% เท่านั้น (perfect match) oligonucleotide จะสามารถแยกจับกับ target DNA ได้ดีทั้งๆ ที่ target DNA ก็มีลักษณะคล้ายกันกับ DNA sequence อื่นๆ ที่มีอยู่ใน DNA ทั้งหมด และการ bind เกิดขึ้นได้รวดเร็วมากใช้เวลาประมาณ 1/1000 วินาที[5]

2. เป็น Compound action โดย primer ทั้ง 2 เส้น เข้าไปจับกับ DNA 2 เส้น และหันปลายด้าน 3' เข้าหากันเพื่อให้เกิดการต่อสายทั้ง 2 เส้นของ primer แล้วทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ product โดยที่เอ็นซัยม์ Taq polymerase ทำงานได้รวดเร็วมาก คือสามารถสร้าง DNA ด้วยอัตราเร็ว 100-140 nucleotides ต่อ 1 วินาที

3. คุณสมบัติของปฏิกิริยาลูกโซ่ (Chain Reaction) DNA เส้นที่สร้างใหม่จะทำหน้าที่เป็น target ในรอบต่อๆ ไปของ PCR จึงทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณของ product เทียบได้กับปฏิกิริยาลูกโซ่ของระเบิดนิวเคลียร์

ดังนั้นเราสามารถเพิ่มจำนวน DNA จากที่มีอยู่ไม่กี่ copy ให้เป็นล้านๆ copy ได้ภายใน 2-3 ชั่วโมง

Component of PCR amplification

ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

1. DNA Sample (จากสิ่งตัวอย่าง เช่น DNA จากเซลล์, serum เป็นต้น)
2. Oligonucleotide primer (ต้องสร้างด้วยเครื่อง oligonucleotide synthesizer)
3. Deoxynucleotide triphosphate (มีจำหน่ายเป็น dNTP สำเร็จรูป)
4. Buffer ที่เหมาะสม (supply มาพร้อมกับเอ็นซัยม์) และ cation เช่น Mg^{2+}
5. Taq DNA polymerase

จากนั้นนำไปผ่าน cycle ของ heating และ cooling จนกระทั่งปริมาณ DNA เพิ่มจำนวนได้ตามที่ต้องการ แต่ในทางปฏิบัติแล้วจะพบว่าค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อน ต้องใช้ผู้มีประสบการณ์และมีความชำนาญพอสมควร ทั้งนี้เนื่องจากมีส่วนประกอบหลายอย่าง (factors) เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งถ้าจะทำ PCR ให้ได้ผลดีควรคำนึงถึง factors ที่เกี่ยวข้องกับ efficiency และ specificity ของ PCR ด้วย

Optimization of PCR

1. **Standard reaction** โดยทั่วไปปริมาตรของ PCR reaction นิยมทำกันที่ 50 ul หรือ 100 ul แต่อาจจะน้อยกว่านี้ก็ได้ (10-25 ul) นอกจากต้องมี sample DNA แล้ว จะต้องมี 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4 ที่อุณหภูมิห้อง), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 uM ของ primer แต่ละตัว, 200 uM ของ deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) และ 1-2.5 unit ของ Taq polymerase สำหรับ standard reaction อาจปรับเปลี่ยนได้ตามความเหมาะสมกับการนำไปใช้งาน

2. **การเลือก primer primer** จะเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่จะเป็นตัวกำหนดว่าการเพิ่มจำนวน DNA จะประสบผลสำเร็จหรือล้มเหลว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือก primer โดยมีหลักการดังนี้

2.1 เลือก primer ที่มีการกระจายตัวของ base ต่างๆ เหมือนกันกับ sequence ที่เราจะเพิ่มจำนวนหลีกเลี่ยง primer ที่มี polypurines หรือ polyrimidine และควรมี GC content ประมาณ 50% ขึ้นไป

2.2 หลีกเลี่ยง primer ที่จะเกิด secondary structure เช่น hairpin และความยาว primer ควรมีขนาดยาว 17-30 nucleotides

2.3 หลีกเลี่ยง primer ที่จะทำให้เกิด primer dimer โดย primer ทั้ง 2 เส้น จะต้องไม่มีปลายด้าน 3' complementary กัน

ในปัจจุบันมี program computer สำหรับใช้เลือก primer หลาย program เช่น Oligo® หรือเลือก primer ผ่านทาง Internet เช่น โปรแกรม primer 3 (http://www-genome-wi.mit.edu) เราสามารถตั้ง parameter ต่างๆ แล้วให้ program กำหนด primer ให้ แต่อย่างไรก็ดี primer ที่ได้มาจะต้องลองใช้ในปฏิกิริยา PCR ดูก่อน จึงจะบอกได้ว่าเป็น primer ที่เหมาะสม

3. **PCR buffer** ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มีผลต่อปฏิกิริยา PCR มาก ทั้งในแง่ความจำเพาะของปฏิกิริยา และผลที่ได้ (yield) โดยทั่วไปความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 1.5 mM (เปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่ 1-4 mM) พบว่า ถ้า Mg^{2+} น้อยเกินไปจะทำให้ได้ผลผลิต (yield) น้อยลง นอกจากนี้ยังอาจเติม co-factors อื่นๆ ลงไป เช่น DMSO, glycerol, formamide ซึ่งบางครั้งพบว่าช่วยทำให้ yield หรือ specificity ของ PCR ดีขึ้น[7]

4. **Present of Inhibitor** บางครั้งพบว่า PCR แล้วไม่ได้ product ตามต้องการ คือไม่พบ PCR แล้วไม่ได้ product ตามต้องการ คือไม่พบ product เลย อาจเนื่องจากมี inhibitor ปนมาใน DNA sample inhibitor พวกนี้จะขัดขวางการทำงานของ Taq polymerase เท่าที่ทราบก็คือ heparin, SDS, porphyrin นอกจากนี้ยังมี inhibitor อื่นๆ ที่ยังไม่ทราบแน่นอนอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งส่วนมากจะเป็นโปรตีนที่ติดมากับ DNA target[8]

5. **PCR Thermal profile** การทำ PCR ทำได้โดยการอุ่น PCR reaction ในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมไว้ให้มีการ denaturation, annealing และ extension โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ทำให้ DNA เส้นคู่แยกสายออกเป็นเส้นเดี่ยวจะอยู่ที่ 90-95°C และอุณหภูมิที่จะให้ primer เข้าไป anneal อยู่ที่ 40-60 °C (ถ้าน้อยเกินไปจะเกิด non specific binding ถ้าสูงเกินไป primer จะไม่ anneal) และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับ extension คือ 70-75 °C สำหรับเวลาในแต่ละขั้นตอนขึ้นอยู่กับความยาวของ DNA target โดยทั่วไป 1 นาที สำหรับ 1 kilobase ถ้าเป็นเครื่อง DNA thermal cycler ในปัจจุบัน (ค.ศ.1997) ประกอบกับการใช้หลอดทดลองที่บางมาก ทำให้สามารถลดเวลาของการ incubate ในแต่ละขั้นตอนลงได้ นิยมใช้ที่ 20-30 วินาที

6. **แหล่งที่มาของ DNA ที่ใช้ PCR**

DNA ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์ คือไม่จำเป็นต้องแยกให้บริสุทธิ์จากสิ่งอื่นๆ คงเป็น DNA ที่ได้จากการทำให้เซลล์และนิวเคลียสแตกออก และมีจำนวนเพียงเล็กน้อยก็ได้ DNA จากเซลล์เดี่ยว (single cell)[9], DNA จากรากผม (hair)[10] หรือ DNA จากหยดเลือดเพียงเล็กน้อย[11] DNA เป็น macromolecule ที่มีความคงทนมากถ้าไม่ถูกย่อยโดย nuclease แม้จะต้มให้ร้อนก็ไม่เสียสภาพและคงสภาพอยู่ได้หลายๆ ปี ถ้าอยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ได้มีผู้ใช้ DNA จากแหล่งต่างๆ ที่ไม่น่าจะเป็นไปได้ เช่น DNA จาก tissue ที่อยู่ใน paraffin block[12] DNA จากหนังสัตว์ที่สูญพันธ์ไปนานแล้ว แต่เก็บหนังไว้ในพิพิธภัณฑ์[13], DNA ของ mammoth ที่ได้จากซากในน้ำแข็งอายุหลายหมื่นปี[14], DNA ของมัมมี่ที่มีอายุหลายพันปี[15] เป็นต้น สามารถนำมาขยายเพิ่มจำนวนได้โดยวิธี PCR

7. **การเพิ่มความจำเพาะ (specificity) ให้ปฏิกิริยา PCR**

การเพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยานอกจากจะทำได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิของ annealing เพื่อให้ primer จับได้กับ target ที่ match กันจริงๆ, การลดจำนวน Mg^{2+}, ปริมาณ

ของเอ็นซัยม์, เวลาที่ให้ primer เข้าไป anneal (annealing time) และจำนวนรอบ (cycle) ยังช่วยให้ปฏิกิริยา PCR มีความจำเพาะมากขึ้น คือเพิ่มจำนวนเฉพาะ target DNA ไม่เพิ่มจำนวน DNA ส่วนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ ได้มีวิธีการใหม่ๆ ที่ช่วยเพิ่มความจำเพาะคือ

7.1 Hot Start PCR

ความหมายของวิธีการก็คือให้ปฏิกิริยา PCR เริ่มทำงานที่อุณหภูมิสูงๆ ทั้งนี้เนื่องจาก Taq polymerase สามารถทำงานสร้าง DNA ที่อุณหภูมิต่ำๆ ได้ด้วย เช่น ที่อุณหภูมิห้อง แต่จะทำงานได้ช้าลง ดังนั้นในช่วงที่ผสม reaction ซึ่งโดยมากทำที่อุณหภูมิห้องหรือในช่วงต้นๆ ที่อุณหภูมิของเครื่อง thermal cycler กำลังขึ้นไปที่ denature temperature ช่วงนี้ primer อาจจะเข้าไป anneal กับ DNA อย่างไม่จำเพาะ (non specific binding) ซึ่งเอ็นซัยม์ก็จะต่อปลาย primer ไปแล้วและถ้าบังเอิญการเข้าไป anneal เกิดขึ้นทั้งสองสายของ DNA และ primer หันปลายด้าน 3' เข้าหากัน ก็จะเกิดการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ก่อนที่จะเกิด specific product ซึ่งในรอบต่อๆ ไปของ PCR non specific product จะเพิ่มแบบทวีคูณ เพราะหัวและท้ายของ non specific product จะมีส่วนที่ complementary กับ primer ดังนั้น จึงเป็น target ที่ดีในรอบต่อๆ ไปของปฏิกิริยา PCR วิธีป้องกันไม่ให้ Taq polymerase ทำงานในขณะที่อุณหภูมิของปฏิกิริยายังไม่เหมาะสมก็คือ ยังไม่เติมสิ่งที่จำเป็นตัวใดตัวหนึ่งในปฏิกิริยา (เอ็นซัยม์, dNTP, target DNA, Mg^{2+}) ลงไปก่อนที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาจะสูงตามที่กำหนดเช่น 70°C วิธีการนอกจากจะเปิดฝาหลอดเพื่อเติมสิ่งที่ขาดลงไปแล้ว ยังทำได้โดยใช้ wax เป็นตัวกันระหว่างเอ็นซัยม์และปฏิกิริยา ซึ่ง wax จะละลายเมื่ออุณหภูมิสูงประมาณ 70 °C ทำให้เอ็นซัยม์สามารถลงไปผสมกับปฏิกิริยาที่เหลือได้หรืออาจจะใช้ antibody ต่อ Taq polymerase โดยใส่ทุกอย่างที่ปฏิกิริยา PCR ต้องมีลงในหลอดทดลองพร้อมกับใส่ antibody ต่อ Taq polymerase antibody จะไปจับกับเอ็นซัยม์ไว้ เมื่ออุณหภูมิสูง ซึ่ง antibody จะเสียสภาพไป เอ็นซัยม์ Taq polymerase ซึ่งไม่เสียสภาพในอุณหภูมิสูงๆ ก็จะทำงานได้ตามปกติ [16]

7.2 Secondary PCR with nested primer or Nested PCR

เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะเพิ่มความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR โดยการทำ PCR ซ้ำอีกครั้งแต่ใช้ primer อีกคู่ซึ่งไม่ใช่คู่เดิม แต่มีตำแหน่งของการ anneal บน Target DNA อยู่ถัดเข้ามาจากตำแหน่งของ primer คู่นอก[17] ดังนั้น ถ้า primer คู่นอกขยายเพิ่มจำนวน DNA มาแบบ non specific ซึ่งไม่ใช่ target DNA จริง เมื่อเอา product มาทำ PCR ซ้ำโดยใช้ primer คู่ในก็จะไม่มี specific sequence ให้ primer คู่ในเข้าไป anneal วิธีการนี้แม้ว่าการทำ PCR ในครั้งแรกจะมี non specific amplification ด้วยแต่ primer คู่ในจะเพิ่มจำนวนเฉพาะ specific sequence วิธี Nested PCR นอกจากจะเพิ่มความจำเพาะคล้ายๆ กับ วิธีการวิเคราะห์

PCR product ด้วย probe hybridization แล้วยังเพิ่มความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา PCR อีก ประมาณ 10^3 เท่า เพราะบางครั้งถ้า target DNA มีน้อยมากเช่น single cell ทำ PCR ครั้งเดียว อาจไม่เห็น product ด้วยวิธี gel electrophoresis และ ethidium bromide staining ต้องทำ product ข้อเสียของการทำ nested PCR คือจะต้องเปิดหลอดเพื่อเอา product จาก PCR ครั้งแรกมาเป็น target ของ nested PCR การเปิดฝาหลอดจะเสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วย DNA อื่นๆ หรือ PCR product เอง ซึ่งเคยขยายเพิ่มจำนวนไว้ครั้งก่อนๆ จึงได้มีวิธีการ nested โดยไม่ต้องเปิดฝาหลอดโดยการใส่ primer ทั้งคู่นอกและคู่ในลงไปในหลอดพร้อมๆ กัน แต่ primer ทั้งสองคู่จะออกแบบให้มี annealing temperature ต่างกัน ให้ primer คู่นอกมี annealing temperature สูงกว่า primer คู่ใน ในการทำ PCR ครั้งแรกจะตั้ง annealing temperature ไว้สูง primer คู่ในจะไม่สามารถไปจับกับ target ได้เมื่อทำไปได้ 20-30 รอบ ก็ลด annealing temperature ลงเพื่อให้ primer คู่ในเข้าไปจับกับ target ทำต่ออีก 20-30 รอบพร้อมกับลด denature temperature ลงเพื่อไม่ให้ product จาก PCR ครั้งแรกแยกเป็นสายเดี่ยว เพื่อเป็น target ของ primer คู่นอก วิธีการนี้เรียก "drop-in, drop-out nested priming"[16]

Detection and analysis of PCR product

ผลผลิตจาก PCR หรือเรียกว่า amplicon ก็คือ DNA fragment ที่มีความยาวที่ถูกกำหนดโดยระยะห่างของ primers วิธีที่จะตรวจสอบว่ามี PCR product เกิดขึ้นหรือไม่ทำได้หลายวิธี ในตารางที่ 1) วิธีที่ง่ายที่สุดและนิยมใช้มากที่สุดคือ agarose gel electrophoresis หรือ polyacrylamide gel electrophoresis จากนั้นย้อมสีด้วยสารเรืองแสง ethidium bromide ซึ่งมีคุณสมบัติที่สามารถแทรกตัวอยู่ใน DNA strand ซึ่งถ้าเอา agarose gel ไปส่งด้วยแสง UV จากเครื่อง ultraviolet transilluminator ก็ทำให้สามารถมองเห็นแถบของ DNA ใน gel ได้ หรืออาจย้อมสี silver stain ก็ได้ และสามารถบันทึกผลด้วยการถ่ายภาพเก็บไว้ ขนาดของ PCR product จะทราบได้จากการที่ใส่ DNA size marker ลงไปในหลุมของวุ้นข้างๆ กับ PCR product และทำ electrophoresis พร้อมๆ กัน

ตารางที่ 2.1 วิธีการตรวจสอบ PCR product

Detection method	Visualization
Agarose gel and/or polyacrylamide gel electrophoresis	Ethidium bromide Stainning (UV transilluminator, image analyzer) Southern blotting (hybridization with labeled probe) Silver staining
Restriction endonuclease	Agarose or polyacrylamide gel
Dot blots	Hybridization with labeled prbe (e.g.ASOs)
High-pressure liquid chromatography	UV detection
ELISA	Labeled probe and enzymatic detection
Direct sequencing	Radioactive or fluorescent-based DNA sequencing

การยืนยันผลของ PCR product ทำได้โดยการทำ Southern blot hybridization หรือ dot blot hybridization แล้วใช้ radioactive หรือ non radioactive probe ก็ได้ นอกจากนี้ การใช้ restriction enzyme ตัด PCR product ก็สามารถนำมาใช้ confirm product ได้ ถ้าทราบ restriction map ของ DNA fragment นั้น วิธีนี้เรียก Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

PCR contamination และการป้องกัน[18]

เนื่องจาก PCR เป็นวิธีการที่มี sensitivity สูงมาก ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะเกิดผลบวกปลอมได้ (false positive) แหล่งที่มาของสิ่งปนเปื้อนที่สำคัญที่สุดคือ PCR product เอง ซึ่งถ้ามีปนอยู่ใน PCR reaction ก็จะถูกขยายเพิ่มจำนวนขึ้น โดยที่ไม่มี target DNA อยู่ เพราะปลายทั้ง 2 ข้างของ PCR product จะเป็นส่วนที่ primer เข้าไป anneal ได้ ที่มาของสิ่งปนเปื้อนอาจจะมาจากเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่เกิดการปนเปื้อน PCR product โดยมากจะเป็น automatic pipette ที่ใช้ในการ extract DNA sample หรือใช้ผสม PCR reaction หรือแม้แต่ผู้ปฏิบัติงานเองอาจจะเป็นแหล่งของสิ่งปนเปื้อนได้ การป้องกันการทำได้หลายวิธี อาจใช้เพียงวิจารณญาณของผู้ปฏิบัติงานก็สามารถป้องกันได้เช่นการป้องกัน PCR product ที่เราขยายเพิ่ม

จำนวนขึ้นมามากๆ ไม่ให้ไปปนเปื้อนอยู่ตามที่ต่างๆ ได้ โดยการเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ แยกบริเวณการ detect PCR product และป้องกันไม่ให้ PCR product จากบริเวณนี้ไปปนเปื้อนอยู่ตามที่ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ วิธีการป้องกันบางวิธีมีการดำเนินเป็นขั้นตอน มีแบบ Polymerase Chain Reaction แผนการปฏิบัติที่แน่ชัด

การป้องกัน PCR contamination

1. ใช้ Uracil N-glycosylase (UNG) เป็นเอ็นซัยม์ที่ใช้ทำลาย PCR product ก่อนที่จะเริ่ม PCR cycling โดยที่ในช่วง amplify DNA ใช้ dUTP ใน PCR reaction แทน dTTP[19]

2. UV irradiation ใช้แสง UV กับ PCR reaction mixture เพื่อเป็นการทำลาย amplicon ก่อนที่จะเติม DNA target นอกจากนี้ยังใช้ UV ทำลาย DNA ที่ปนเปื้อนอยู่ทั่วไปตามที่ต่างๆ โดยใช้หลักที่ว่า DNA จะถูกทำลายได้โดยแสง UV จนไม่สามารถเป็น target DNA ได้

3. การแยกบริเวณของการทำ PCR ออกเป็นส่วนๆ ได้แก่

   - Pre-amplification area ใช้สำหรับการเตรียม PCR reaction mixture
   - Amplification area ใช้บริเวณนี้สำหรับ extract DNA และทำ PCR
   - Post-amplification area ใช้สำหรับการ detect PCR product ด้วยวิธีการต่างๆ
   - เครื่องมือ เช่น pipette จะต้องแยกชุดกัน

4. PCR reagents ต่างๆ ควรแบ่งไว้เป็นหลอดเล็กๆ และใช้แล้วทิ้ง อุปกรณ์สิ้นเปลืองต่างๆ เช่น microtube, pipette tip ต้อง steriled หรือ autoclaved ถ้าเป็นไปได้ควรใช้ positive displacement pipette หรือใช้ filtered pipette tip

5. แหล่งที่มาที่สำคัญที่สุดคือ PCR product ที่เกิดจากการขยายเพิ่มจำนวนไว้ก่อน ในการทำ PCR ครั้งก่อน หรือ DNA จาก positive control ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานจะต้องใช้ความระมัดระวังในการป้องกันไม่ให้ PCR product กลับมาปนเปื้อนใน PCR reaction ครั้งใหม่ได้ การใช้ positive control ควรใช้ที่มีปริมาณ DNA น้อยๆ

6. ต้องทำ positive control และ negative control ไปด้วยเสมอเป็นการ validate PCR reaction และเป็นการทดสอบการปนเปื้อนของ PCR reagent ไปด้วย

PCR Strategies

วิธีการ PCR สามารถนำมาใช้ในงานวิจัยและทางการแพทย์ได้มาก โดยที่จะต้องมีการปรับเปลี่ยนวิธีการ PCR ปกติเล็กน้อยเพื่อประโยชน์ในการนำมาใช้งานของแต่ละด้าน ตัวอย่างของยุทธวิธี ในการปรับเปลี่ยน PCR และนำไปประยุกต์ใช้

Reverse-Transcriptase PCR

ตามปกติ PCR เป็นวิธีการขยายเพิ่มจำนวนของ DNA แต่ถ้า nucleic acid ที่ต้องการเพิ่มจำนวนเป็น RNA เช่น viral RNA หรือ messenger RNA ก็สามารถเพิ่มจำนวนได้โดยวิธี PCR โดยการเปลี่ยน target RNA ให้เปลี่ยน cDNA ก่อนด้วยเอ็นซัยม์ reverse transcriptase และใช้ primer ที่ anneal กับ 3'-end ของ RNA หรือใช้ oligo dT เป็น primer สำหรับ messenger RNA หลังจากได้ cDNA จึงทำ PCR ตามปกติ วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาหรือวินิจฉัย RNA virus และศึกษา messenger RNA ในเซลล์ได้[20]

Inverse or Inside-out PCR

ตามปกติถ้าจะขยายเพิ่มจำนวน DNA fragment จะต้องทราบการเรียงตัวของเบสเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการสร้าง primer แต่ด้วยวิธีการ PCR เราอาจเพิ่มจำนวน DNA ชิ้นที่ยังไม่ทราบลำดับการเรียงตัวของเบสก็ได้ โดยสร้าง primer ให้ complementary กันแล้วต่อเข้ากับ ชิ้น DNA จากนั้น DNA ชิ้นนั้นให้เป็นวง (circularized) แล้วใช้ primer ที่หัน ปลายด้าน 3' ออจากกันไปเพิ่มจำนวน DNA ที่ไม่ทราบ sequence ได้ใช้ประโยชน์ในการศึกษาชิ้น DNA ที่เคลื่อนย้ายได้ภายใน genome (transposable element) หรือศึกษาการ integrate ของ retrovirus เข้าไปใน genome ของ host[21]

การตรวจหาเชื้อก่อโรค

ในปัจจุบันนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนใหญ่ในเชื้อก่อโรคไม่ว่าจะเป็นโปรโตซัว หนอนพยาธิ แบคทีเรีย ไวรัส มิได้เป็นความลับอีกต่อไป จึงนำไปสู่การที่เราสามารถจะเลือกหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่จะใช้ในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดนั้นได้ เทคนิค PCR นอกจากจะใช้ในการบ่งบอกถึงการพบหรือไม่พบเชื้อก่อโรคที่สงสัยในสิ่งส่งตรวจแล้ว ยังสามารถใช้ในการศึกษาถึงสายพันธุ์ของเชื้อที่ดื้อต่อยาที่ใช้ในการรักษาและสายพันธุ์ของเชื้อที่มีความรุนแรงมากตลอดจนการบอกได้ถึงการติดเชื้อสายพันธุ์เดิมอีกครั้ง เนื่องจากการรักษาครั้งที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จ เป็นต้น สิ่งส่งตรวจอาจได้มาจากคน

ไข้ ซึ่งเป็นได้ทั้งเลือด ปัสสาวะ อุจจาระ หนอง เสมหะ และชิ้นเนื้อที่ตัดมาจากคนไข้ โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและตำแหน่งของการติดเชื้อ นอกจากนี้แล้ว สิ่งส่งตรวจอาจเป็นอาหารและเครื่องดื่ม ตลอดจนน้ำตามแหล่งน้ำธรรมชาติในบริเวณที่สงสัยว่าเป็นแหล่งที่มีเชื้อก่อโรค ยิ่งไปกว่านั้นเทคนิค PCR ยังมีบทบาทในการหาสาเหตุที่เชื้อก่อโรคบางชนิดไม่สามารถทการป้องกันได้โดยการใช้วัคซีน ตัวอย่างเช่น พบว่า เชื้อมาเลเรียส่วนใหญ่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนของโรดีนที่เป็นเป้าหมายของการทำวัคซีนตลอดเวลา โดยเกิดจากการมีมิวเตชั่นที่เบสใดเบสหนึ่งในยีนของโปรตีนนั้น ส่งผลให้กรดอะมิโนบางชนิดเปลี่ยนแปลงไป การตรวจวิเคราะห์เชื้อมาเลเรียสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของขีนดังกล่าว สามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของขีนที่สร้างโปรตีนเป้าหมายและนำมาทำไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอติดตามที่มีความจำเพาะกับสายพันธุ์ที่เปลี่ยนไป

ใช้ PCR ในการ engineer DNA

PCR สามารถนำมาใช้ดกแต่งหรือเพิ่ม sequence ให้กับ DNA fragment เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หรือวิจัยต่างๆ ได้เป็นอย่างดีและทำได้รวดเร็วเช่นถ้าต้องการใส่ restriction site sequence เข้าไปใน DNA fragment ก็ทำได้โดยการใส่ restriction site เข้าไปใน primer โดยมีหลักว่า ปลายด้าน 5' ของ primer ไม่มีความสำคัญมากในปฏิกิริยา PCR เท่ากับปลายด้าน 3' ซึ่งเป็นด้านที่จะเกิดการต่อสาย DNA ขึ้น ดังนั้นถ้าเอา restriction sequence ไปใส่ไว้ที่ปลายด้าน 5' ของ primer แม้จะเข้ากันไม่ได้กับ target sequence ก็จะมีผลต่อปฏิกิริยา PCR เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ทำปฏิกิริยา PCR restriction sequence ก็จะถกสร้างขึ้นพร้อมกับ PCR product วิธีการนี้มีประโยชน์มากในการใส่ sequence ที่ไม่เคยมีใน target DNA ลงไปอยู่ใน DNA ได้ [22] นอกจากนี้ยังใช้ในการดิดฉลาก (label) DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ โดยการใส่ Biotin, สีเรืองแสง, nucleotide ที่ดิดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีลงใน PCR product นอกจากนี้ยังใช้ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์บนเส้น DNA ได้ด้วย (site-directed mutagenesis)[23]

การใช้ PCR ในการหาลำดับการเรียงตัวของเบส

วิธีการ PCR สามารถนำมาใช้ในการเตรียม DNA template ให้ได้จำนวนมากและบริสุทธิ์โดยไม่มี DNA sequence อื่นๆ ปะปน ทำให้นำมาเป็นต้นแบบในการ sequence ด้วยวิธีปกติได้ง่าย นอกจากนี้อาจใช้ PCR ร่วมกับวิธี Chain termination dideoxy sequencing ทำให้สามารถหาลำดับการเรียงตัวของเบสของ PCR product ได้โดยตรง และรวดเร็ว[24] ใน

ปัจจุบันมีเครื่องสำหรับหาลำดับการเรียงตัวของเบสโดยอัตโนมัติ และใช้หลักการของ PCR ทำให้การหาลำดับการเรียงตัวของเบสไม่ใช่เรื่องยุ่งยากอีกต่อไป

การใช้ PCR ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ (mutation)

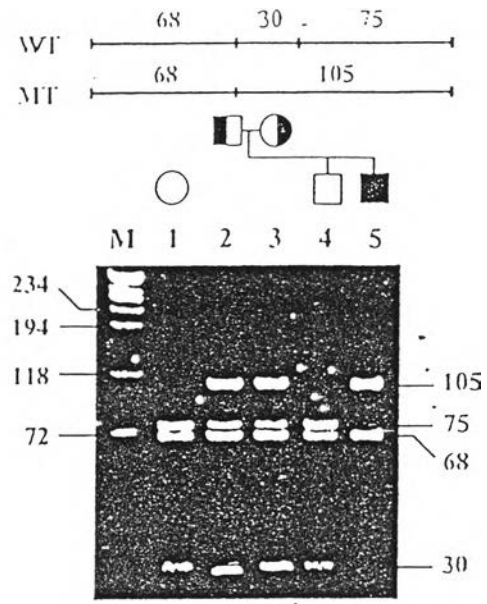
ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ หรือความแตกต่างของ nucleotide บริเวณหนึ่งๆ บนเส้น DNA ทำได้ง่ายโดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งวิธีการจะทำได้หลายวิธี เช่น ออกแบบ primer ให้ปลายด้าน 3' match กับ wild type ดังนั้น primer wild type จะไม่สามารถ amplified mutant sequence ได้[25] แต่ในขณะเดียวกัน primer ที่ match กับ mutant จะสามารถ amplified mutant sequence ได้ หรืออาจใช้วิธี Amplification created restriction site โดยการออกแบบ primer ให้เป็น recognition sequence ของ restriction enzyme ซึ่งจะยังไม่สมบูรณ์ primer ให้เป็น recognition sequence ของ restriction enzyme ซึ่งจะยังไม่สมบูรณ์ primer ใน amplify wild type หรือ mutant จะทำให้ restriction site สมบูรณ์ และถูกตัดได้ด้วยเอ็นซัยม์ ที่กล่าวมาจะเป็นวิธีการหา mutation ที่ทราบแน่นอนว่าเปลี่ยนแปลงอย่างไร[26] ถ้ายังไม่ทราบว่ามี mutation เกิดหรือไม่ก็ใช้ PCR ตรวจสอบได้ โดยวิธีใช้ PCR ร่วมกับการ sequencing หรือการใช้ PCR ร่วมกับ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [27] ซึ่งอาศัยหลักของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของ DNA ที่มีความแตกต่างกันเพียง 1 base ก็จะเคลื่อนไปในตำแหน่งต่างกัน

การตรวจวิเคราะห์หามิวเตชั่นซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพันธุกรรม

การตรวจหามิวเตชั่นนี้สามารถทำได้ทั้งในผู้ป่วยผู้ที่เป็นพาหะ ทารกในครรภ์ และตัวอ่อนเอ็มบริโอ โดยสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยและผู้ที่เป็นพาหะเป็นได้ทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือชิ้นเนื้อที่ทำการตัดออกมา ในกรณีที่วิเคราะห์ทารกในครรภ์ หากอายุครรภ์ไม่มากนัก นิยมวิธีการตรวจจากเซลล์คอริโอนิก วิลลัส (chorionic villus) ของตัวอ่อนเอ็มบริโอซึ่งพบในน้ำคร่ำ แต่หากอายุครรภ์มาก นิยมทำการตรวจเลือดจากสายสะดือของทารกในครรภ์ วิธีการตรวจหาขึ้นอยู่กับว่ามิวเตชั่นนั้นเป็นชนิดที่เคยค้นพบมาก่อนแล้วในสมาชิกของครอบครัว หรือเป็นมิวเตชั่นใหม่ที่ยังไม่ทราบชนิดมาก่อน

ในกรณีที่มิวเตชั่นนั้นได้เคยมีการตรวจวิเคราะห์ชนิดมาแล้ว การตรวจหามิวเตชั่นในสมาชิกรายอื่นของครอบครัวหรือทารกในครรภ์ก็ทำได้ง่าย โดยการใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอในช่วงของยีนที่คาดว่ามีมิวเตชั่นเกิดขึ้น แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาชนิดของมิวเตชั่น

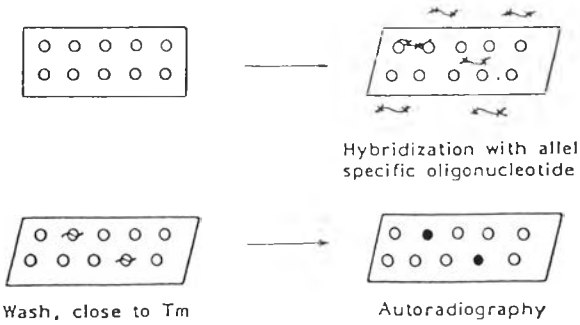
ต่อด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น หากมิวเตชั่นที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะใช้เทคนิค PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) โดยมีหลักการว่า การหายไปหรือเพิ่มขึ้นของจุดตัดเอนไซม์นั้น จะทำให้ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดย PCR เมื่อนำมาทำการตัดด้วยเอนไซม์แล้ว จะให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน ดังรูปที่ 4



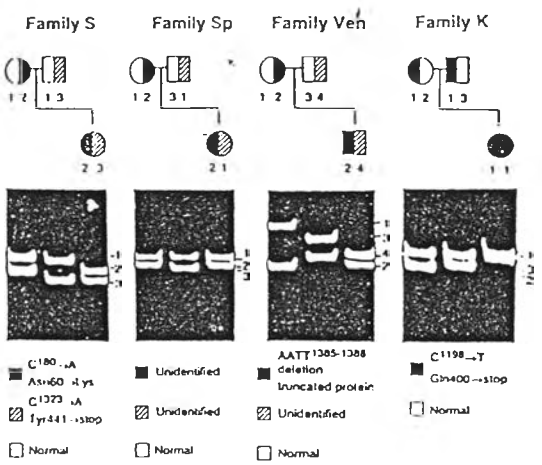
รูปที่ 4 แสดงการตรวจวิเคราะห์ยีนที่ผิดปกติ โดยวิธี PCR-RFLP

อย่างไรก็ตามหากมิวเตชั่นที่ทราบชนิดนั้นไม่ได้เปลี่ยนแปลงจุดตัดของเอนไซม์ อาจจะใช้เทคนิคที่เรียกว่า ดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น (dot biot hybridization) โดยการหยดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ลงบนแผ่นเมมเบรนชนิดพิเศษ แล้วนำมาทำไฮบริไดเซชั่นกับตัวติดตามซึ่งส่วนมากเป็นดีเอ็นเอ (DNA probe) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับของนิวคลีโอไทด์มากจนสามารถที่จะบอกความแตกต่างเมื่อมีการเปลี่ยนปลงของนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่งได้ดังรูปที่ 5 หรืออาจจะต้องใช้การหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป โดยมีการติดฉลากนิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งในปฏิกิริยาด้วยสารรังสี แล้วอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์มีลักษณะคล้ายขั้นบันได หรืออาจจะใช้การติดฉลากด้วยสารเรื่องแสงแทนสารรังสี แล้วจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ซึ่งจให้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ออกมามีลักษณะคล้ายสัญญาณคลื่นเรียงต่อๆ กัน ดังรูปที่ 6 ในบางกรณีมิวเตชั่นชนิดที่มีนิวคลีโอไทด์ขาดหายไป (deletion) หรือมีนิวคลีโอไทด์เกิน (insertion) อาจจะสามารถทำการตรวจได้ โดยการเปรียบเทียบระยะทาง

การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอต่างขนาดกันในวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า โดยระยะทางการเคลื่อนที่จะแปรผกผันกับขนาด (ความยาว) ของสายดีเอ็นเอ



รูปที่ 5 แสดงการตรวจวิเคราะห์ยีนที่ผิดปกติโดยวิธีดอท บลอท ไฮบริไดเซชั่น

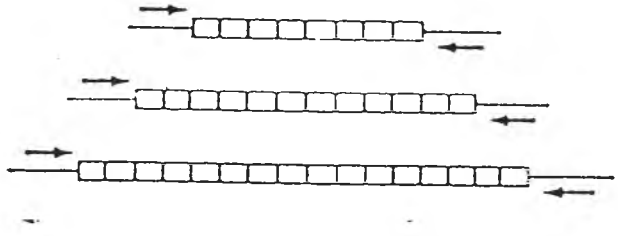


รูปที่ 6 แสดงรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอโดยการติดฉลากด้วยสารรังสี (ก) และโดยการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (ข)

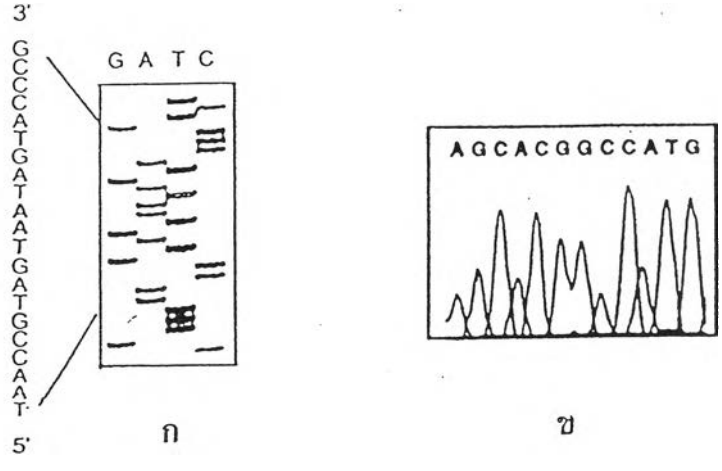
ในกรณีที่ไม่ทราบชนิดของมิวเตชั่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปก็เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมทำกัน แต่ว่าค่อนข้างยาก ใช้เวลารวมทั้งอาศัยความชำนาญของผู้ปฏิบัติการ เพราะต้องตรวจนิวคลีโอไทด์ทุกตัวในยีนที่ต้องสงสัย ในบางครั้งหากมิวเตชั่นเกิดในส่วนของอินเตรอน (intronic sequence) ที่มีขนาดใหญ่และข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้มิวเตชั่นอาจถูกมองข้ามไป ดังนั้นจึงนิยมตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติโดยทางอ้อม โดยตรวจการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติในครอบครัวที่มีสมาชิกอย่างน้อย 1 ราย เป็นโรคพันธุกรรมนั้น

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอ็นเอลิงค์เกจ (DNA linkage analysis) ซึ่งเป็นการตรวจดูการถ่ายทอดส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้หรือภายในยีนที่ผิดปกติ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอลิงค์เกจมิใช่การหามิวเตชั่นโดยตรง วิธีนี้ทำโดยการใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอบริเวณที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (DNA polymorphism) ชนิดที่เรียกว่า short tandem repeat (STR) polymorphism กล่าวคือ ในจีโนมของคนเราจะมีลักษณะชุดการซ้ำๆ กันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดสั้นๆ ประมาณ 2-4 นิวคลีโอไทด์ ดังรูปที่ 7 การที่สามารถใช้การวิเคราะห์ดีเอ็นเอลิงค์เกจในการทำนายการถ่ายทอดยีนที่ผิดปกติในครอบครัวได้นั้น เพราะยีนที่ผิดปกติจะถูกถ่ายทอดไปพร้อมๆ กับลักษณะความหลากหลายที่เป็น STR (รูปที่ 8) อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ต้องทำในครอบครัวที่สมาชิกคนใดคนหนึ่งเป็นโรคกรรมพันธุ์อย่างแน่ชัด



รูปที่7 แสดงลักษณะของ STR ซึ่งเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบได้ในประชากรปกติ



รูปที่ 8 แสดงการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอลิงค์เกจโดยอาศัยความหลากหลายของ STR ในแต่ละครอบครัว

Quantitative PCR

วิธีการ PCR สามารถนำมาใช้หาปริมาณของ DNA หรือ RNA target ได้โดยวิธีการที่เรียกว่า competitive PCR[28] โดยการใช้ competitor DNA ที่ทราบปริมาณลงในปฏิกิริยา PCR ด้วย โดยการขยายเพิ่มจำนวน unknown DNA พร้อมๆ กันกับ competitor DNA ที่ทราบปริมาณวิธีการนี้นำมาใช้ศึกษาการ express ของยีนต่างๆ ในเซลล์หรือหาปริมาณไวรัสต่างๆ จากเลือดผู้ป่วย (Viral load) เช่น HIV, HCV, และ HBV

In Situ PCR

เป็นการเพิ่มจำนวน DNA ในเซลล์แทนที่จะเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง[29] วิธีการก็คล้ายกับ PCR ในหลอดทดลอง แต่ทำใน tissue ที่ fix อยู่บนสไลด์ โดยการเติม PCR reaction ลงบน tissue แล้วนำไปผ่าน Thermal Cycler ที่มี heat block พิเศษสำหรับสไลด์โดยการ cover reaction ไม่ให้ระเหยด้วย cover slip และ seal ขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ ถ้า label primer ด้วยสารเรืองแสงก็สามารถจะตรวจสอบผลได้โดยกล้อง fluorescence วิธีนี้เป็นการศึกษาตำแหน่งของ target DNA ที่อยู่ในเซลล์ เช่นจะศึกษาว่าไวรัสที่เข้าไปในเซลล์ อยู่ส่วนไหนของเซลล์

Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) หรือ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นการใช้ PCR ในการทำ genome fingerprints จาก DNA ของ organisms ซึ่งไม่ต้องทราบ sequence โดยที่ primer ที่สร้างมาจะมี sequence ที่มีส่วนคล้ายกับ target จึง amplify ได้แต่เนื่องจาก primer จะเข้าไป anneal หลายตำแหน่งจึงได้ PCR product จำนวนมากและถ้า organisms นี้ relate กันแต่มีการเรียงตัวของเบสต่างกันบางส่วน pattern ของ PCR product จะออกมาแตกต่างกันคล้าย fingerprints

สรุป วิธีการ PCR สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในทางการแพทย์มากมาย เช่นการหา mutation ในโรคทางพันธุกรรม, การวินิจฉัยโรคมะเร็งบางชนิด เช่น การ detect หา Philadelphia chromosome ใน leukemia เป็นต้น การวินิจฉัยโรคติดเชื้อแทบทุกชนิดไม่ว่าจะเป็น แบคทีเรีย, ไวรัส, เชื้อรา หรือพยาธิ ก็สามารถใช้วิธี PCR มาช่วยในการวินิจฉัยได้ โดยเฉพาะถ้าการวินิจฉัยโรคนั้นๆ ทำโดยวิธธรรมดาไม่ได้ หรือต้องใช้เวลานานในการตรวจวินิจฉัย เช่น ไวรัส ต้องอาศัยวิธี culture ทำให้ทราบผลช้าอาจมีผลต่อการรักษาได้ในทางนิติเวช PCR ก็

นำไปประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์บุคคล หรือพิสูจน์ความเป็นพ่อ, แม่ได้โดยการทำ PCR fingerprint เป็นต้น

Helicobacter Pylori

สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่พบในกระเพาะอาหารนั้นพบมานานกว่า 100 ปี แต่ความสัมพันธ์กับโรคของกระเพาะอาหารนั้นเพิ่งค้นพบประมาณปี ค.ศ.1970' อย่างไรก็ดีในปี ค.ศ.1982 Marshall และ Warren สามารถเพาะเชื้อแบคที่อยู่ในกระเพาะอาหารได้สำเร็จ เรียกชื่อว่า Campylobacter pyloridis ซึ่งต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น Helicobacter pylori (H.pylori)[30]

ลักษณะทางจุลชีววิทยา (Microbiology)

เชื้อ H.pylori เป็นแบคทีเรียกรัมลบชนิด microaerophilic ลักษณะกลมเรียว บิดเป็นเกลียวมี flagella ประมาณ 7 อันเพื่อใช้ช่วยในการเคลื่อนที่ มีขนาดยาว 3.5 ไมโครเมตร และกว้าง 0.5 ไมโครเมตร เชื้อนี้สามารถเจริญได้ในหลอดทดลองโดยอาศัยอาหารเพาะเชื้อหลายชนิดเช่น blood agar, chocolate agar และ brain heart infusion agar เป็นต้น โดยนำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนร้อยละ 5 นานประมาณ 3-7 วัน โคโลนีของแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะเล็กใส ขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งเราสามารถพิสูจน์ได้โดยนำไปย้อมกรัมก็จะพบลักษณะเฉพาะดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้เชื้อ H pylori ยังมีลักษณะทางชีวเคมีมีให้ผลบวกกับการตรวจด้วยวิธี catalase oxidase และ urease อีกด้วย

ระบาดวิทยา (Epidemiology)

การติดเชื้อ H. pylori เป็นการติดเชื้อแบคทีเรียที่พบได้บ่อยที่สุดในคน ซึ่งพบได้ทั่วโลกและในทุกช่วงอายุ มีการสำรวจพบว่าประมาณครึ่งหนึ่งของประชากรโลกติดเชื้อนี้ โดยพบว่าการติดเชื้อ H. pylori ในประเทศกำลังพัฒนา จะพบในช่วงอายุที่ต่ำกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งเมื่อมีการติดเชื้อชนิดนี้แล้วอาจทำให้เกิดโรคหรือไม่เกิดโรคก็ได้[31]

สำหรับปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ H. pylori เชื่อว่าเกิดจากหลายปัจจัยได้แก่สถานะทางเศรษฐกิจ และสภาวะแวดล้อมเช่นความแออัด ระบบสาธารณูปโภคที่ยังไม่ดีเพียงพอ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะเพิ่มโอกาสการติดเชื้อ มีรายงานว่าสภาวะทางเศรษฐกิจที่ดีขึ้นแปรผกผันกับการติดเชื้อชนิดนี้

การแพร่กระจายของเชื้อ H. pylori (Transmission)

การแพร่กระจายของเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน ปัจจุบันมีข้อมูลจากหลายการศึกษาเชื่อว่ากลไกของการระบาดของเชื้อ H. pylori น่าจะคล้ายคลึงกับการระบาดของเชื้อไวรัสตับอักเสบเอ คือผ่านทาง fecal-oral exposure คือการติดเชื้อผ่านทางการรับประทาน (oral inoculation) จากการใช้ endoscope และการตั้งใจรับประทานเชื้อโรค (voluntary ingestion) เท่านั้น[32] ส่วนในรูปแบบอื่นๆ เช่น feco-oral หรือ oral to oral ยังไม่มีหลักฐานยืนยันชัดเจน

แหล่งเพาะเชื้อ (reservoir) พบเฉพาะในคนที่ติดเชื้อเท่านั้นไม่พบในสัตว์ชนิดอื่น

เมื่อมีการติดเชื้อแล้วจะคงอยู่ตลอดไปจนกว่าจะได้รับการรักษา

พยาธิกำเนิด (Pathogenesis)

เมื่อได้รับเชื้อ H. pylori ในช่วงแรกจะเกิดภาวะอักเสบแบบฉับพลัน (acute inflammatory response) โดยจะมีนิวโตรฟิล (neutrophil) มาอยู่บริเวณดังกล่าวต่อมาในผู้ป่วยเฉพาะบางรายเท่านั้นจะเกิดภาวะการอักเสบเรื้อรังติดตามมา (Chronic inflammatory response) ซึ่งการดำเนินโรคดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับ 4 ปัจจัยคือ

1. เชื้อ H. pylori มี virulence factor เป็นตัวกำหนดซึ่งจะประกอบด้วย

1.1 colonization factors ได้แก่ motility, induction of hypochlorhydria เอนไซม์ urease, P type ATPase

1.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิด tissue injury ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS), leukocyte recruitment และ activating factors, heat shock protein, Cag A และ Vac A protein ซึ่งสามารถแบ่งชนิดของ H. pylori เป็น 2 ชนิด คือ Cag A. Vac A+ และ Cag A, Vac A-

2. ผู้ป่วย (host susceptibility)

3. ปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environment) เช่น การสูบบุหรี่พบว่าจะเพิ่มโอกาสการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้[33]

4. อายุของผู้ป่วยที่ติดเชื้อ พบว่าถ้าติดเชื้อในวัยเด็กจะมีความเสี่ยงที่จะเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารสูงขึ้น แต่ไม่มีผลในการเกิดแผลของกระเพาะอาหาร[34]

Virulence factors ของเชื้อ H. pylori

สำหรับ virulence factors ของเชื้อ H. pylori นั้น สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ปัจจัยที่มีผลช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อ (colonization factors) และปัจจัยที่มีผล

ต่อการเกิดโรค (disease-associated factors) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 1 ปัจจัยที่มีผลในการช่วยการเจริญเติบโตของเชื้อที่สำคัญคือ urease motility และ adhesins ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีความสำคัญ ทำให้สามารถเข้าใจถึงการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถอาศัยและเจริญเติบโตในเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารในคนได้อย่างไร อันนำไปสู่การคิดค้นยาในการจำกัดเชื้อนี้ การศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบว่า urease ซึ่งเชื่อว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญและการคงอยู่ของเชื้อนี้ อาจไม่เป็นความจริงแล้วเนื่องจากพบว่าสามารถเพาะเชื้อ H. pylori ที่ไม่มี urease (urease negative H. pylori ได้และเชื้อชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตในกระเพาะอาหารของสัตว์ทดลองได้หลังจากที่กินเชื้อนี้เข้าไป สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคนั้น Graham และ Yamaoka [51]ได้ทำการศึกษาพบว่าไม่มีปัจจัยใดของเชื้อ H. pylori ที่มีความสัมพันธ์เฉพาะโรคในโรคหนึ่งในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม (disease specific H. pylori virulence factors) และพบว่าปริมาณของยีน cag A ของเชื้อ H. pylori เท่านั้นที่มีข้อสนับสนุนว่าเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดโรคคือทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Interleukin 8 (IL8) ซึ่งเป็นปัจจัยที่กระตุ้นทำให้เกิดอาการอักเสบขึ้น และ IL 8 นี้พบสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ H. pylori ที่มียีน cag A

สำหรับยีน ice A, vag A, bab A ยังไม่มีข้อมูลสนับสนุน สรุปได้ว่าปัจจัยที่สำคัญในการเกิดโรคของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนดูโอนัมนั้นน่าจะเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกันคือจากแบคทีเรีย คนที่ติดเชื้อเอง และสภาวะแวดล้อม virulence factors ของแบคทีเรียมีส่วนในการกระตุ้นในระยะแรกเท่านั้น และไม่สามารถบอกถึงผลที่จะตามมา

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยที่สำคัญในการเจริญเติบโตและการเกิดโรคของเชื้อ H. pylori

Colonization	Disease-associated
urease	cag
motility	vag
catalase	bab
adhesins	ice
internalization	

การวินิจฉัยการติดเชื้อ H. pylori

การวินิจฉัยการติดเชื้อ H. pylori ในทางคลินิก สามารถทำได้หลายวิธีทั้งการส่องกล้องและตัดชิ้นเนื้อมาทำการตรวจด้วยวิธี rapid urease test หรือการทำ urea breath test และ serology ซึ่งไม่ต้องอาศัยการส่องกล้อง อย่างไรก็ดีมีข้อควรระวังในการแปลผลในผู้ป่วยบางกลุ่มเช่น การได้รับยาปฏิชีวนะ ยาที่มีส่วนประกอบของ bismuth และยาลดกรดบางชนิดซึ่งอาจทำให้ผลการทดสอบของเชื้อผิดพลาดไปได้

การศึกษาแบบ metaanalysis เสนอว่าการทำ non-invasive test เพื่อหา H.pylori เช่นการทำ urea breath test และ serology สามารถแทนการวินิจฉัยโดย invasive test เช่น การส่องกล้องและตัดชิ้นเนื้อในคนไข้ dyspepsia ที่อายุน้อยกว่า 5 ปี และไม่มี alarming symptoms หรือมีประวัติรับประทาน NSAIDs มาก่อน โดยพบว่าถ้ามีการติดเชื้อ H. pylori และกำจัดเชื้อนี้จะทำให้อาการของผู้ป่วยดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา โดยให้เหตุผลในการกำจัดเชื้อ H. pylori ว่ามีการพบแผลในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัมในคนไข้ที่ตรวจพบ H. pylori ถึงร้อยละ 20-50 นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะไม่มีแผลแต่ H. pylori ก็เพิ่มโอกาสของการเกิดแผลในอนาคต และทำให้เสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารอีกด้วย เนื่องจากในคนที่อายุน้อยกว่า 55 ปี ที่ไม่มี alarming symptoms นั้นมีโอกาสการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารน้อยมาก ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องส่องกล้องเพื่อหาสาเหตุนี้[35]

อย่างไรก็ดียังไม่สามารถนำมาใช้ในประเทศไทยได้เนื่องจากการศึกษานี้ยังมีจำนวนผู้ป่วยไม่มากพอและการเกิดโรคจากการติดเชื้อของ H. pylori ในประเทศทางตะวันตก และประเทศไทยแตกต่างกัน อีกทั้งไม่มีข้อมูลสนับสนุนที่เพียงพอ

การวินิจฉัยภาวะติดเชื้อ H.pylori

แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. Invasive technique ใช้ endoscope ในการตรวจวินิจฉัยประกอบด้วย[36]

   1.1 Rapid urease test (CLO test^{R}, hp fast^{R}, Pyloritek II^{R})

   โดยอาศัยคุณสมบัติของการมี urease enzyme ของ H. pylori ในการวินิจฉัยซึ่งจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังสมการ

$$(NH_2)_2CO + 2H_2O + H^+ \xrightarrow{\text{urease}} 2NH_4^+ + HCO_3^-$$

$$2NH_4^+ + HCO_3^- + OH^- \longrightarrow 2NH_4OH + CO_2$$

ammonium hydroxide (NH_4OH) ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์เป็นด่างสามารถเปลี่ยนสีของ phenol red จากสีเหลืองเป็นแดงได้ โดยจะทำปฏิกิริยานี้ได้ดีในอุณหภูมิ 30-40°ซ ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาดังกล่าวประมาณ 24 ชั่วโมง ถือว่าวิธีนี้เป็น standard ในการตรวจหาภาวะการติดเชื้อ H. pylori

พบ false positive ได้ 1-10% ในกรณีที่มี Campylobacter like organsim อยู่เช่นเชื้อ H.heilmani

พบ false negative ในกรณีที่ได้ยาปฏิชีวนะหรือ proton pump inhibitor (PPI) หรือ bismuth ภายใน 2 สัปดาห์ก่อนทำการตรวจหรือในภาวะที่มีเชื้อ H. pylori น้อย หรือถ้าติดตามผลการกำจัดเชื้อ H. pylori เร็วกว่า 28 วันหลังจากครบการรักษา

1.2 Histology & Phase contrast microscopic technique

การ smear ดูเชื้อ H. pylori จากชิ้นเนื้อซึ่งอาจใช้วิธี phase contrast microscope หรือย้อมด้วย Gram's stain, H&E, Giemsa, Warthin-Starry (Gold standard), PAS หรือ Crystal fast violet

พบว่ามีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้เนื่องจากเชื้อ H. pylori มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ Helicobacter ชนิดอื่นและยังขึ้นกับประสบการณ์ของผู้ดู จำเป็นต้องใช้วิธีย้อมพิเศษในกรณีที่จำเป็น เช่น การใช้ immunocy-tochemistry หรือ monoclonal/polyclonal antibody ต่อ H.pylori หรือการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเอลดรอนช่วยวินิจฉัย

ประโยชน์ของ histology ในการวินิจฉัยคือยังสามารถบอกข้อมูลถึงพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อว่ามักมีการอักเสบเรื้อรังหรือไม่

1.3 การเพาะเชื้อ (culture และ sensitivity)

ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการวินิจฉัยการติดเชื้อใดๆ ก็ตาม รวมถึงการติดเชื้อ H.pylori นี้ด้วยแต่เนื่องจากความสามารถและประสิทธิภาพการเพาะเชื้อ H.pylori มีข้อจำกัดในแต่ละสถานที่ จึงทำให้ความสำคัญดังกล่าวถูกจำกัดลง การเพาะเชื้อมีค่าความไว (sensitivity) เพียง 50-90%[37] แล้วแต่ละห้องปฏิบัติการส่วนความจำเพาะ (specificity) มีค่า 100%

ในปัจจุบันเรามีการใช้วิธีการเพาะเชื้อและหาค่าความไวต่อยาในกรณีการรักษาครั้งแรกล้มเหลว (treatment failure) หรือสำหรับการวิจัยเท่านั้น

ส่วนวิธีอื่นๆ เช่น PCR หรือ in situ hybridization ยังไม่มีใช้ทั่วไป

จำนวน biopsy ที่เหมาะสมในการวินิจฉัย H.pylori ควรใช้ประมาณ 5-7 ชิ้น เนื่องจากพบว่าการกระจายตัวของ H.pylori เป็นแบบ patchy แต่ในทางปฏิบัติอาจทำเพียง 2 ชิ้นคือ บริเวณ anterior และ posteroir wall ของ antrum ห่างจากส่วน pylori opening 1-2 ซม ซึ่งจะมีความไว (sensitivity) ประมาณ 90%[38]

2. Noninvasive technique ประกอบด้วย[39]

2.1 serology สามารถวัดภูมิต้านทาน (antibody, Ab) จากสารคัดหลั่งของ H.pylori ชนิดต่างๆ เช่น urease, adhesin molecules หรือ lipopolysaccharie ได้ในรูปของ IgM, IgG หรือ IgA ด้วยวิธี ELISA หรือ western blot พบว่ามี false positive ได้ เนื่องจากสามารถ cross reaction กับเชื้อ Campylobacter ได้ ไม่สามารถบอก activity ของโรคได้ว่าเป็นการติดเชื้อในอดีตหรือปัจจุบันเพราะค่า Ab titer ลดลงช้าจึงทำให้ไม่สามารถใช้ในการติดตามผลการรักษาได้ดี มักนิยมใช้ในการทำศึกษาระบาดวิทยาเท่านั้น

2.2 Urea breath test (UBT) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ urease ของ H.pylori ซึ่งใช้ย่อยสลาย urea ที่ใส่วนประกอบของ ^{13}C (non radioactive agent) หรือ ^{14}C (radioactive agent) สามารถวัดปริมาณ $^{13}CO_2$ หรือ $^{14}CO_2$ ที่เกิดขึ้นได้ทางลมหายใจ

false positive เกิดจากการมีเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ในช่องปากที่มีเอนไซม์ urease อยู่ซึ่งแก้ไขโดยการแปรงฟันก่อนทำการตรวจ

2.3 STOOL ANTIGEN TEST นี้ใช้วิธีการตรวจอยู่ 2 วิธี คือ EIALENZYME IMMUNO ASSAY และ PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) ซึ่งปัจจุบันยังมีราคาต่อการทดสอบค่อนข้างแพง

2.4 PCR ตรวจ H.pylori จากน้ำย่อยกระเพาะอาหาร ซึ่งจะมีการกล่าวถึงรายละเอียดในตอนท้าย

H.pylori และเกิดโรค (H.pylori disease association)

การติดเชื้อ H.pylori นั้นอาจไม่มีอาการผิดปกติเลย จนถึงทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ ดังนั้นจะขอกล่าวในรายละเอียดของแต่ละโรคดังนี้

1. Asymptomatic chronic gastritis

กลุ่มคนส่วนใหญ่ที่ติดเชื้อ H.pylori นั้นไม่มีอาการ จะมีบางส่วนเท่านั้น ที่เกิดมีการอักเสบเรื้อรังของเยื่อบุกระเพาะอาหาร ซึ่งพบว่าการติดเชื้อ H.pylori ที่ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังนี้ มักจะเป็นกลุ่มที่มียีน cag A และมียีน vag A ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบคือจะมี loss

of glands ซึ่งเรียกว่า atrophy ร่วมกับมี intestinal metaplasia ซึ่งส่วนใหญ่มักจะเกิดที่บริเวณ antrum บางครั้งพบที่บริเวณ corpus และ cardia มักพบการเกิด atrophy ในประเทศที่กำลังพัฒนามากกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เชื่อว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมน่าจะมีบทบาทสำคัญด้วย นอกจากนั้นการที่มี atrophy บริเวณ corpus ยังมีส่วนสำคัญที่ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดของกระเพาะอาหารลดลงอีกด้วย[40-42]

2. H.pylori associated dyspepsia

กลไกของการเกิดอาการ dyspepsia จากการติดเชื้อ H. pylori ยังไม่เป็นที่แน่ชัด และการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าแม้จะกำจัดเชื้อ H. pylori แล้วอาการของผู้ป่วยส่วนใหญ่ก็ไม่ได้ดีขึ้นชัดเจน[43] อย่างไรก็ดีมีการศึกษาโดยการทำ metaanalysis โดย Jaakkimainen และคณะ และการศึกษาของ McColl พบว่าการกำจัดเชื้อ H. pylori ในกลุ่มผู้ป่วย dyspepsia ทำให้อาการของผู้ป่วยดีขึ้นอย่างชัดเจน[44] แต่เนื่องจากจำนวนประชากรของการศึกษายังไม่มากพอ จึงยังไม่สามารถสรุปได้

3. H. pylori associated ulcer disease

กลไกของการเกิดแผลจากเชื้อ H. pylori ปัจจุบันมีความเข้าใจมากขึ้น[45] โดยเชื่อว่าน่าจะเป็นจากหลายปัจจัยร่วมกันทั้งปัจจัยจากเชื้อ H. pylori เอง ปัจจัยจากผู้ที่ติดเชื้อและสภาวะแวดล้อม[46] อย่างไรก็ตามการศึกษาระยะยาวพบว่าการกำจัดเชื้อ H. pylori สามารถทำให้แผลนั้นหายขาด และมีโอกาสกลับเป็นซ้ำน้อยมาก การศึกษาในระยะต่อมาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของแผลที่ไม่พบ H. pylori หรือประวัติการใช้ NSAIDs ร่วมด้วย (H. pylori-negative ulcer) ซึ่งเรียกว่า idiopathic ulcer disease โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา[47] ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการเกิดแผลชนิดนี้ มีบางการศึกษาตั้งสมมติฐานว่าอาจเกิดจาก idiopathic acid hypersecretion และ rapid gastric emptying time แต่ก็ยังไม่มีข้อพิสูจน์[48] ในอนาคตคาดว่าจะมีการพบ idiopathic H. pylori negative ulcer มากขึ้น ซึ่งแผลในลักษณะนี้มีแนวโน้มที่จะรักษาหายยาก และต้องการใช้ยาในกลุ่ม proton pump inhibitor ในปริมาณที่สูงและนานขึ้น สำหรับการใช้ยาลดกรดกลุ่มอื่นๆ มักใช้ไม่ค่อยได้ผล ซึ่งแผลชนิดนี้ แนะนำว่าควรอยู่ในความดูแลของแพทย์เฉพาะทางระบบทางเดินอาหาร[49]

4. H. pylori and gastroesophageal reflux disease

ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ H.pylori และกลไกการเกิด gastroesophageal reflux disease (GERD) กำลังเป็นที่น่าสนใจ[50] โดยพบว่าการติดเชื้อ H. pylori ที่บริเวณ corpus โดยเฉพาะชนิดที่มียีน cag A มีแนวโน้มที่จะลดโอกาสการเกิด GERD เชื่อว่าการที่มีการอักเสบบริเวณ corpus จะลดการหลั่งกรดของกระเพาะอาหาร ได้เทียบเท่ากับการรับประทานยาลดกรดในปริมาณน้อย[51] จึงทำให้มีการแนะนำว่าไม่ควรกำจัดเชื้อ H. pylori ในคนที่มีแนวโน้มจะเกิด GERD อย่างไรก็ดีมีข้อมูลพบว่า อัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อ H. pylori นั้นสูงกว่าการเกิดมะเร็งหลอดอาหาร ในกลุ่มที่ไม่ติดเชื้อ[52] ดังนั้น การกำจัดเชื้อ H. pylori ในผู้ป่วย GERD จึงยังจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลเพิ่มเติม เพื่อหาข้อสรุปต่อไป

5. H. pylori-associated gastric adenocarcinoma

การติดเชื้อ H. pylori โดยเฉพาะชนิดที่มียีน cag A และ vag A เป็นระยะเวลานาน เพิ่มโอกาสของการเกิด atrophy และ metaplasia ของเยื่อบุกระเพาะอาหาร ซึ่งจะเกิด dysplasia ตามมา และกลายเป็นมะเร็งของกระเพาะอาหารในที่สุด ซึ่งปัจจุบันยังไม่ทราบระยะเวลาที่แน่นอน[52] มีหลายข้อมูลสรุปถึงความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ H. pylori กับมะเร็งกระเพาะอาหารดังนี้

1. สามารถตรวจพบเชื้อ H. pylori ในเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหาร[53]

2. H. pylori สามารถกระตุ้นให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ในสัตว์ทดลอง[54]

3. การศึกษาทางระบาดวิทยาพบความสัมพันธ์อย่างชัดเจนระหว่างการติดเชื้อ H. pylori กับมะเร็งกระเพาะอาหาร[55]

นอกจากนี้ยังพบว่าการติดเชื้อ H. pylori ในวัยเด็กนั้นสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารมากกว่าติดเชื้อในผู้ใหญ่

สำหรับกลไกของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารจากการติดเชื้อ H. pylori มีข้อมูลจากหลายการศึกษาเช่นอาจเกิดจาก neutrophil activation[56] hypochlorhydria ร่วมกับ ascorbic acid และ apoptosis ร่วมกับ hyperproliferation เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นเช่น ประวัติโรคมะเร็งกระเพาะอาหารในครอบครัว ซึ่งทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดมากกว่าคนปกติ 1.53-3 เท่า และพบว่าปัจจัยนี้มีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ H. pylori ในครอบครัว

การรักษาการติดเชื้อ H. pylori ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะอาหารพบว่าสามารถลดอาการอักเสบของเยื่อบุผิวกระเพาะอาหาร อัตราการเกิด apoptosis และภาวะ intestinal metaplasia ได้ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ช่วยลดโอกาสการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ดี มีบางการศึกษาพบว่าแม้จะกำจัดเชื้อ H. pylori แล้ว แต่ก็ยังไม่สามารถลดอัตราการเกิด intestinal metaplasia ได้ โดยเฉพาะใน H. pylori ที่มียีน cag A[57]

ในปัจจุบันนี้แม้จะพบว่า H. pylori สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร แต่ก็ยังไม่มีข้อมูลเพียงพอ ที่จะสนับสนุนการกำจัดเชื้อ H. pylori ในกลุ่มคนที่ไม่มีอาการ ซึ่งการตัดสินใจในการหาและกำจัดเชื้อ H. pylori ที่อาจเป็นสาเหตุของมะเร็งกระเพาะอาหาร ควรดูจากปัจจัยอื่นประกอบเช่น เชื้อชาติ และประวัติของการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในครอบครัว เป็นต้น

6. H. pylori and Mucosal associated lymhoid tissue lymphoma

มีหลายการศึกษาแสดงถึงความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ H. pylori และการเกิด Mucosal associated lymhoid tissue lymphoma (MALToma) พบว่าอัตราการเกิด MALToma สัมพันธ์กับอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ H. pylori และสามารถกระตุ้นให้เกิด lymphoma ได้ในหนูทดลอง[58] และพบว่า H. pylori กระตุ้นให้เกิด chemokine BCA1 ซึ่งพบได้ปริมาณสูงใน MALToma และที่สำคัญที่สุดคือ เมื่อกำจัดเชื้อ H. pylori พบว่าผู้ป่วย MALTOma มีอาการดีขึ้น[59] สำหรับ MALTOma ซึ่งสามารถหายขาดได้จากการกำจัดเชื้อ H. pylori อย่างเดียวนั้น มักจะขนาดไม่ใหญ่หรือนูนมาก อยู่บริเวณผิว และไม่มีการกระจาย ซึ่งพบว่า มีน้อยกว่าร้อยละ 10 ของทั้งหมด[60] ซึ่งถ้ามีลักษณะต่างไปจากนี้ควรให้การรักษาชนิดอื่น เช่น ยาเคมี บำบัด การผ่าตัด หรือฉายแสงร่วมด้วย อย่างไรก็ดีพบว่าถ้ามีการติดเชื้อ H. pylori เกิดขึ้นใหม่ lymphoma cell ก็จะเจริญตามมาอย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรมีการเฝ้าระวังการกลับเป็นซ้ำของเนื้องอก และการติดเชื้อซ้ำของเชื้อ H. pylori เป็นระยะ

7. H. pylori and Quasispecies

ปัจจุบันพบว่าเชื้อ H. pylori มีความสามารถในการ mutation ได้ ทำให้มี mutants หลายชนิดอยู่ในคนๆเดียวกัน คล้ายไวรัสตับอักเสบซี เรียกภาวะนี้ว่า Quasispecies[61] นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ H. pylori ที่อยู่ตำแหน่งต่างๆ กันในกระเพาะอาหารเป็น strain ที่ต่างกัน ซึ่งความสำคัญของภาวะนี้และการเกิดโรคยังไม่เป็นที่แน่ชัด คงต้องอาศัยข้อมูลจากการวิจัยที่กำลังดำเนินอยู่ต่อไป

การรักษาการติดเชื้อ H. pylori

สำหรับการกำจัดเชื้อ H. pylori ที่เป็นสาเหตุของโรคในระบบทางเดินอาหารนั้น ทางสมาคมแพทย์ทางเดินอาหารแห่งประเทศไทยแนะนำให้ใช้ proton pump inhibitor Triple regimen นาน 7 วัน ซึ่งได้ผลมากกว่าร้อยละ 80 ในการกำจัดเชื้อ ในกรณีที่การกำจัดเชื้อครั้งแรกล้มเหลว สูตรที่มียา clarithromycin และ amoxycillin อาจให้สูตรยาเดิมซ้ำได้อีกกรณีที่สูตรยาเดิมมี metronidazole แนะนำให้เปลี่ยนเป็น amoxycillin หรืออาจพิจารณาเปลี่ยนยาลดกรดกลุ่ม proton pump inhibitor เป็น ranitidine bismuth citrate แทน และให้นานขึ้นเป็น 14 วัน[62] สำหรับในประเทศตะวันตกนั้นการกำจัดเชื้อในครั้งแรกคล้ายคลึงกับในประเทศไทย แต่มักจะนาน 10-14 วัน และถ้าการกำจัดเชื้อครั้งแรกล้มเหลว แนะนำให้ใช้ Quadruple regimen ในการรักษาครั้งต่อไป

1. สูตร PPI base triple therapy สามารถลดระยะเวลาการรักษา H. pylori ลงจาก 14 วันของสูตร bismuth based triple therapy เป็น 7 วัน[62] แต่ยังคงมีปัญหาอยู่บ้าง ในการรักษากลุ่ม H. pylori ที่ดื้อต่อ metronidazole โดยเฉพาะสูตรการรักษาในกรณียาที่มี metronidazole ร่วมด้วยได้ผลค่อนข้างต่ำ ซึ่งอาจแก้ไขโดยเปลี่ยนเป็นสูตรอื่นที่ไม่มี metronidazole ดังใน ตารางที่ 8 และ 9 คือสูตร OAC หรือ LAC ระยะเวลา 7 วัน หรือใช้สูตรที่มี metronidazole อยู่ด้วย แต่ให้ระยะเวลาในการรักษานานออกไปเป็น 14 วัน หรืออาจใช้เป็นสูตรยา 4 ตัว (quardruple therapy) ซึ่งจะกล่าวต่อไปภายหลัง

2. สูตร PPI base triple therapy ขณะนี้ถือว่าเป็นสูตรยาที่ควรใช้เป็นลำดับแรกตาม Maastricht Consensus report

ส่วนสูตรอื่นๆ มีกล่าวไว้แต่ไม่ได้รับความนิยมหรือกำลังศึกษาผลการรักษาคือ

- metronidazole+amoxicillin/clarithromycin+ranitidine มีอัตราการกำจัดเชื้อ 90%
- RBC + ยาปฏิชีวนะ 2 ตัว กำลังศึกษาอยู่พบว่าผลการกำจัดเชื้อมีค่อนข้างสูงคือ ประมาณ 80-90%

3. สูตรยา 4 ตัว (quardruple therapy)

ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะ 2 ตัว และยาที่ไม่ใช่ยาปฏิชีวนะ 2 ตัว สูตรยาที่เป็นที่ยอมรับมีดังนี้ –ranitidine+bismuth based triple therapy

เป็นการพัฒนาจากสูตร triple therapy มี bismuth เป็นองค์ประกอบหลัก เนื่องจากสูตรดังกล่าวหลังจากเริ่มใช้รักษากันอย่างแพร่หลายพบว่ามีปัญหาเรื่องความร่วมมือในการรักษา (compliance) เพราะใช้เวลานานถึง 14 วัน และการบริหารยาค่อนข้างยากจึงมีผู้เสริม

ranitidine เข้าไปในในสูตรดังกล่าวเพื่อแก้ปัญหาข้างต้นพบว่าสามารถลดการรักษาลงได้เหลือ 1 สัปดาห์[63] เท่านั้นซึ่งจะเป็นการเพิ่ม compliance ของผู้ป่วยได้ โดยเชื่อว่า ranitidine สามารถลดกรดในกระเพาะอาหาร ทำให้ฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะออกฤทธิ์ได้ดีรวมทั้งฤทธิ์ของ bismuth ด้วย พบอาการข้างเคียงน้อยกว่า 5%

- PPI+bismuth based triple therapy ต่อมาได้มีผู้ทดลองใช้ยาในกลุ่ม PPI แทน ranitidine เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาพบว่าได้ผลดีมาก และเมื่อพิจารณาในแง่ผลการกำจัดเชื้อ H. pylori ที่ดื้อต่อยา metronidazole ก็ได้ผลดีมากเช่นเดียวกัน มีการเปรียบเทียบผลของ proton inhibitor ตัวอื่นๆ หรือ lansoprazole และ pentoprazole พบว่าเท่ากันกับ omeprazole

ข้อเสีย ของสูตรยา 4 ตัว - ราคาแพง

- ค่อนข้างจะยุ่งยากในการบริหารยา

ข้อสรุป ยา 4 ตัว

- ในปัจจุบันนี้สูตรการใช้ยา 4 ตัวพบว่ามีประสิทธิภาพสูง และได้ผลในทุกกลุ่มถึงแม้จะเป็นกลุ่มของ H. pylori ที่ดื้อต่อ metronidazole ซึ่งมักจะมีปัญหาในการรักษาด้านสูตรอื่นๆ รวมทั้งระยะเวลาสามารถใช้ได้สั้นคือ ประมาณ 1 สัปดาห์ และยังสามารถลดลงเหลือ 5 วันได้ ถ้าเป็นกลุ่มซึ่งไวต่อ metronidazole (แต่ต้องรับประทานยา PPI ก่อนให้การรักษา H. pylori อีก 3 วันก่อนที่จะเริ่มยาอีกตัวที่เหลือ)

- ผลการรักษาหลังจากใช้สูตรยา 4 ตัว 1 วัน ได้ผลถึง 50-70% ซึ่งน่าจะมีประโยชน์มากในผู้ป่วยที่มีเลือดออกในกระเพาะอาหาร

- มีการศึกษาสูตรยา 5 ตัว (pentuple therapy) โดยเปรียบเทียบกับ triple quadruple tehrapy พบว่าได้ผลดีกว่า triple therapy แต่ไม่แตกต่างกับ quardruple therapy

จากข้อมูลข้างต้น de Boer และคณะ[64] ได้สรุปสูตรการรักษา H. pylori โดยดูในแง่ประสิทธิภาพ

1. ในกรณีไม่ทราบผลความไวของเชื้อจะให้การรักษาเป็น

1.1 ใช้ได้ทุกกรณี เลือกสูตรยา 4 ตัว ใช้ระยะเวลา 7 วัน (PPI+bismuth+tetracycline+metronidazole)

1.2 ในกรณีที่มี H. pylori ดื้อต่อ metronidazole <20% เลือกสูตรยา 4 ตัว ใช้ระยะเวลา 4 วัน (PPI+bismuth+tetracycline+metronidazole

หรือสูตรยา 3 ตัว bismuth based therapy ระยะเวลา 7 วัน (bismuth+tetracycline+metronidazole)

หรือสูตรยา 3 ตัว PPI based therapy ระยะเวลา 7 วัน (PPI+amoxicillin +metronidazole)

1.3 ในกรณีที่มี H. pylori ดื้อต่อ metronidazoel >20% เลือกสูตรยา 4 ตัว ใช้ระยะเวลา 7 วัน (PPI+bismuth+tetracycline+metronidazole)

หรือสูตรยา 3 ตัว bismuth based therapy หรือ PPI based therapy ใช้เวลา 14 วัน

2. กรณีที่ทราบความไวของเชื้อ

2.1 ในกรณีที่เชื้อไวต่อ metronidazole เลือกสูตรยา 4 ตัว ระยะเวลา 5 วัน (PPI+bismuth+tetracycline+metronidazole)

หรือสูตรยา 3 ตัว ระยะเวลา 7 วัน (bismuth+tetracyclin+metronidazole หรือ PPI+amoxicillin+metronidazole) หรือ (PPI+clarithromycin+metronidazole)

2.2 ในกรณีที่เชื้อดื้อต่อ metronidazole เลือกสูตรยา 4 ตัว ระยะเวลา 7 วัน (PPI+bismuth+tetracycline+metronidazole) หรือสูตรยา 3 ตัว ระยะเวลา 14 วัน (bismuth+ tetracycline+metronidazole หรือ PPI+clarithromymcin+metronidazole) ซึ่งข้อสรุปดังกล่าวยังไม่เป็นที่ยอมรับทั่วไป การศึกษายังน้อย และประสิทธิภาพของสูตรยา 3 ตัว โดยเฉพาะ PPI based triple therapy ที่ใช้กันอยู่มีผลดีมากและไม่ด้อยกว่าผลที่ได้ของสูตรยา 4 ตัว ชัดเจน รวมทั้งข้อเสียจากสูตรยา 4 ตัวก็มีค่อนข้างมาก

ต่อมาในการประชุมที่ Maastricht Consensus ค.ศ.1996 ได้สรุปการรักษา H.pylori ว่าให้ใช้ triple therapy ก่อนซึ่งประกอบด้วย

1. PPI 2 ครั้งต่อวัน +metronidazole 400 มก. + clrithromycin 250 มก. 2 ครั้งต่อวัน

2. PPI 2 ครั้งต่อวัน +amoxicillin 1000 มก. 2 ครั้งต่อวัน + clarithromycin 500 มก. 2 ครั้งต่อวัน (ในที่ที่มีการดื้อต่อยา metronidazole สูง)

3. PPI 2 ครั้งต่อวัน +amoxicillin 500 มก. 3 ครั้งต่อวัน +metronidazole 500 มก. 3 ครั้งต่อวัน +metronidazole 500 มก. 3 ครั้งต่อวัน +metronidazole 400 มก. 3 ครั้งต่อวัน หรือ tinidazole 500 มก. 2 ครั้งต่อวัน (ในที่ที่มีการดื้อ claritromycin สูง) ระยะเวลาการรักษานาน 7 วัน ถ้ามีปัญหาการดิดเชื้อหรือต้องการเริ่มการรักษาใหม่ มีแนวทางได้ 2 ประการ คือ

1. ให้ยาตามความไวที่ได้จากการเพาะเชื้อและให้การรักษาจนครบ

2. ให้ยา empirical treatment ไปเลยด้วยสูตรยา (quardruple therapy) PPI+bismuth based triple therapy นาน 7 วัน

การติดตามผลการรักษา

1. Maastricht Consensus ได้กำหนดกลุ่มผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มเพื่อประโยชน์ในการติดตามผลการรักษาคือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วย complicated peptic ulcer, gastic ulcer และ MALT lymphoma การติดตามผลการรักษาจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้ invasive technique เพื่อยืนยันว่าการรกัษานั้นทำให้การติดเชื้อหายไปและบอกถึงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อว่าอยู่ในสภาวะใดโดยการทำ biopsy เพื่อดู histology

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย uncomplicated peptic ulcer (DU) หรือ non ulcer dyspepsia แนะนำให้ติดตามการรักษาทุกรายเช่นเดียวกันแต่ใช้เป็นวิธี non invasive technique คือวิธี C-urea breath test เป็น gold standard (ในบางการศึกษาแนะนำว่าถ้าอาการดังกล่าวหายไปก็ไม่จำเป็นต้องทำก็ได้ ให้ใช้การติดตามดูอาการจนกว่าจะเกิดอาการกลับมาเป็นซ้ำอีก)

ควรจะติดตามผลการรักษาก็ต่อเมื่อได้หยุดการรักษาอย่างน้อย 4 สัปดาห์

ส่วนการติดตามผลการรักษาโดยการใช้ serology นั้นมักจะไม่เป็นที่นิยมเนื่องจาก antibody titer จะลดลงค่อนข้างช้า คือลดลง 50% ในเวลา 6 เดือน แต่บางการศึกษาก็อาจใช้ titer ของ serology ติดตามดูในกลุ่ม uncomplicated group ได้ ถ้าไม่มีอาการกลับมาเป็นใหม่ เกณฑ์การวินิจฉัยโดยการใช้ serology ว่าหายนั้นคือ การลดลงของ titer มากกว่า 50% 2. การกลับเป็นซ้ำ (recurrence)

จากข้อมูลในประเทศที่พัฒนาแล้วพบว่าอัตราการเกิดซ้ำใน 1 ปีแรกพบได้ 9% จากการติดตามดูผู้ป่วย 173 คน พบว่าค่าเฉลี่ยในการกลับเป็นซ้ำ คือระยะเวลา 8.7 เดือน มีรายงานในประเทศกำลังพัฒนาพบได้ 20-30%

สรุป รูปแบบการรักษา H.pylori ในปัจจุบัน

1. เริ่มการรักษาเมื่อมีข้อบ่งชี้ เมื่อสามารถยืนยันได้ว่ามีการติดเชื้อ H.pylori จริงและการติดเชื้อดังกล่าวเข้าตามข้อบ่งชี้ที่มีก็ให้เริ่มการรักษาได้

2. กรณีผู้ป่วยที่มีอาการ dyspepia เป็นอาการนำมานั้น consensus ให้แยกผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม คือ

I 19970146

2.1 อายุ > 45 ปี หรือมีอาการให้นึกถึงโรคที่รุนแรง เช่น มะเร็ง หรือมีเลือดออก ไม่ว่าจะอายุเท่าใดให้ส่งต่อผู้เชี่ยวชาญเลย

2.2 อายุ < 45 ปี มีอาการ dyspepia อาการนั้นไม่มีความเสี่ยงต่อโรคที่มีอันตรายอาจจะหลีกเลี่ยงการใช้ gastroscope ได้ โดยการใช้ noninvasive technique ในการวินิจฉัยว่า dyspepia นั้นอาจเกิดจาก H.pylori ได้แก่ urea breath test หรือ serology ถ้าผลเป็น + ให้ทำการรักษา H.pylori ร่วมไปกับการรักษา dyspepsia ด้วย

สำหรับแนวทางการวินิจฉัย H.pylori อันเป็นที่ยอมรับในประเทศไทยนั้นยังคงต้องพิสูจน์ให้แน่ชัดว่ามีแผลในกระเพาะอาหารร่วมกับการติดเชื้อ H.pylori ด้วยหรือไม่ โดยการทำ gastroscope และ rapid urease test หรือ histology ในกรณีที่วิธีแรกไม่พบเชื้อ 3. เลือกสูตรยาที่เหมาะสมและระยะเวลาที่เหมาะสมซึ่งสำหรับประเทศไทย ซึ่งมีอัตราการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ H.pylori สูง (52%) น่าจะเป็นสูตร PPI+amoxicillin+clarithromycin นาน 7 วัน เนื่องจากความชุกของสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ metronidazole มีค่อนข้างสูง

4. ติดตามผลหลังการรักษาครบแล้ว 4 สัปดาห์

วัคซีนของ H.pylori

มีความจำเป็นต้องพัฒนาวัคซีนของ H.pylori ขึ้นเพราะ[65, 66]

1. มีปัญหาหรือการรักษา H.pylori ค่อนข้างมาก เนื่องจากการรักษาใช้ค่าจ่ายค่อนข้างแพง และมีปัญหาเรื่องการดื้อยามาก

2. การติดเชื้อ H.pylori พบได้ทั่วโลกและมีอัตราค่อนข้างสูงรวมทั้งการแพร่กระจายของสายพันธุ์ที่ดื้อยาก็มีค่อนข้างสูงขึ้นเรื่อยๆ เช่น การศึกษาในประเทศไอร์แลนด์ได้ติดตามเชื้อ H.pylori ที่ดื้อต่อ clarithromycin พบว่าสูงขึ้นจาก 5.3% เป็น 8.6% ในเวลา 5 ปี รวมทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อต่อ metronidazole 32% เป็น 46%

ขั้นตอนการศึกษาเรื่อง vaccine

พยายามค้นหา antigen (Ag) เพื่อเป็นตัวที่ใช้ในการผลิต vaccine ของ H.pylori ขึ้นโดยอาศัยจาก virulent factor เช่น urease, flagella, adhesion molecule, Cag A Vag A และ Hsp A (H.pylori heat shock proteins)

มีการศึกษาในหนูทดลองโดย Chen et al, 1993, ใช้ H.fellis เป็น antigen เพื่อทดสอบประสิทธิภาพที่แท้จริงของวัคซีนในรูปการรับประทาน (oral vaccine) ซึ่งมีส่วนประกอบของ cholera toxin เป็นตัว mucosal adjuvant หรืออาจใช้ heat labile toxin จาก E. coli พบว่า

สามารถป้องกันการติดเชื้อของ Helicobacter ได้จริง ต่อมาพัฒนา vaccine ต่อ urease enzyme พบว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อ H.pylori ได้ในหนูทดลองส่วนการใช้ในมนุษย์เพื่อป้องกันหรือรักษานั้นกำลังทำการศึกษาอยู่

การตรวจวินิจฉัย H.pylori โดยวิธี PCR assay เริ่มนำมาใช้ครั้งแรกในปี 1985 โดยทำการวิเคราะห์จากชิ้นเนื้อของกระเพาะอาหารก่อน โดยใช้วิธีส่องกล้อง primer ที่นำมาใช้เป็น substrate ได้แก่ 16S-ribosomal RNA (เป็น primer ตัวแรกที่นำมาใช้), gene encoding specific 26k protein, adhesion subunit A (hpa-A) ure A, ure B, ureC, cagA, vacA ซึ่งเป็น encoding protien ที่ specitic พอสมควรกับ H.pylori ได้ผ่านขั้นตอนการ validation และนำมาใช้ในการศึกษาการติดเชื้อ H.pylori ในปัจจุบัน[67]

ความสามารถในการตรวจจับเชื้อ (Sensitivity of detection) สามารถวินิจฉัยได้ แม้มีเชื้อปริมาณน้อยมาก (1-100 organism)[67] ในชิ้นเนื้อหรือ reservoir ต่างๆ แต่การตรวจโดยวิธี PCR of H.pylori ใน vitro study พบว่าสามารถมี cross reaction ได้กับ Helicobacter บางสายพันธุ์แต่เมื่อทำการศึกษาในสิ่งมีชีวิต พบว่าสายพันธุ์ที่มีโอกาส cross reaction ได้ในการตรวจโดยวิธี PCR นี้ไม่มีการติดเชื้อหรือเติบโตในร่างกายมนุษย์

การตรวจ H.pylori โดยวิธี PCR assay จากน้ำย่อยในกระเพาะอาการ[68] เริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ปี 1991 และมีการพัฒนาเทคนิค, การเลือกใช้ primer ที่เหมาะสม และมีการ validation ประเมินความไวและความจำเพาะของการตรวจโดยวิธีนี้ ที่สำคัญมี 2 การศึกษา[69, 70] คือในญี่ปุ่นปี 1994 และในอเมริกาปี 1993 ใช้ primer คือ urea A, 16S-RNA แต่รายละเอียดวิธีการทำต่างกัน พบว่าความไวในการตรวจต่างกัน URA 72% และ 94% และมีการนำวิธีการนี้ไปใช้ในการวินิจฉัย resistant strain to antibiotic (clarithromycin) เนื่องจากว่าการให้ยาปฏิชีวนะเป็นการรักษาการติดเชื้อ H.pylori ในปัจจุบันที่นิยมใช้กันทั่วไปคือ amoxicillin, clarithromycin, metronidazole หรือ tinidazole การวินิจฉัยการติดเชื้อ H.pylori และหาความไวของยาต่อเชื้อเป็นสิ่งสำคัญในการที่จะบอกว่าผู้ป่วย peptic ulcer disease รายใดสมควรที่จะได้รับยารักษาและควรให้ยาตำรับใดบ้าง เนื่องจากประมาณ 55% และ 70% ของผู้ป่วยแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นเท่านั้นที่ติดเชื้อ H.pylori ตามลำดับและพบว่าในจำนวนผู้ป่วยที่ติดเชื้อมีผู้ป่วยมากกว่า 50% ที่เชื้อมีการดื้อต่อยากรักษาอย่างน้อย 1 ชนิด และวิธีการนี้สามารถตรวจวินิจฉัยได้ภายในเวลาสั้น (ไม่เกิน 6 ชม.) และ less invasive[70] ทำให้สามารถเริ่มให้ eradication regimen ที่เหมาะสมได้ โดยไม่ต้องรอผลการเพาะเชื้อ และความไวต่อยาปฏิชีวนะซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยต้องเสียเวลา และค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นจากการปรับเปลี่ยน regimen ที่ใช้รักษาในกรณีที่ดื้อต่อยาชุดแรกที่ได้รับไป