

การพัฒนาวิธีที่รวดเร็วในการตรวจเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ดื้อยา คลาริโธรมัยซิน ด้วย
เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นางสาวธนกร จำปาไทย



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวชศาสตร์

การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF RAPID CLARITHROMYCIN RESISTANT *Helicobacter pylori* STRAINS
DETECTION BY LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION COMBINED WITH
RESTRICTION ENDONUCLEASE DIGESTION

Miss Thanaporn Champathai



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology
Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology
Faculty of Allied Health Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาวิธีที่รวดเร็วในการตรวจเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> ที่ดี้อย่า คลาริโธรมัยซิน ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
โดย	นางสาวธนกร จำปาไทย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์ และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของ
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวนรรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)

ธนกร จำปาไทย : การพัฒนาวิธีที่รวดเร็วในการตรวจเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ดื้อยา คลาริโธรมัยซิน ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (DEVELOPMENT OF RAPID CLARITHROMYCIN RESISTANT *Helicobacter pylori* STRAINS DETECTION BY LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION COMBINED WITH RESTRICTION ENDONUCLEASE DIGESTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.นันทรี ชัยชนะ วงศาโรจน์, 125 หน้า.

ยากลาริโธรมัยซิน เป็นยาปฏิชีวนะหลักของการรักษามาตรฐานแบบ Triple therapy ที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งในปัจจุบันพบว่ามีปัญหาการดื้อยากลาริโธรมัยซินเพิ่มสูงขึ้นและทำให้การรักษาล้มเหลว กลไกการดื้อยาเกิดจากการกลายพันธุ์ในบริเวณ peptidyltransferase ของ domain V ของ ยีน 23S rRNA พบว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G มีความสัมพันธ์กับการดื้อยาอย่างมีนัยสำคัญและเป็นตำแหน่งกลายพันธุ์ที่มีอุบัติการณ์สูงในหลายประเทศ งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยากลาริโธรมัยซิน ที่มีกลายพันธุ์ใน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (LAMP-RFLP) โดยทำการตรวจยืนยันเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิค PCR และตรวจการกลายพันธุ์ของ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR –RFLP ทำการออกแบบไพรเมอร์ LAMP ของยีน 23S rRNA และ ทดสอบสถานะที่เหมาะสม พบว่าตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกจำนวน 353 ตัวอย่าง มีเชื้อ *H. pylori* จำนวน 101 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่กลายพันธุ์ใน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G คิดเป็น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (4/53) ผลวิเคราะห์ลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* 29 สายพันธุ์ พบการกลายพันธุ์ของ 23S rRNA ตำแหน่ง A2142G, A2143G, T2182C และ A2143G+T2182C คิดเป็น 3.4, 3.4, 48.3 และ 10.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* จะใช้ความเข้มข้นของสารต่างๆ ดังนี้ ไพรเมอร์ FIP/BIP เป็น 1.6 ไมโครโมลาร์ F3/B3 เป็น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ LF/LB เป็น 0.8 ไมโครโมลาร์ เบตาอิน เป็น 0.8 โมลาร์ ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต เป็น 1.4 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟต เป็น 0.6 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำผลผลิต LAMP ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*I พบว่าสามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ได้สำเร็จ โดย wild type จะเห็นลักษณะสเมียร์แบบขั้นบันได ขณะที่ A2143G mutant type จะเห็นแถบดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 92, 103 และ 250 bp ดังนั้นเทคนิค LAMP-RFLP ที่พัฒนาขึ้นน่าจะเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับตรวจการกลายพันธุ์ใน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจคัดกรองการดื้อยากลาริโธรมัยซินจากตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในประเทศที่มีอัตราการดื้อยาสูงเพื่อเลือกใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมได้

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต

คลินิก ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยา
 ทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2557

5476653137 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS: HELICOBACTER PYLORI / CLARITHROMYCIN / 23S RRNA / LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

THANAPORN CHAMPATHAI: DEVELOPMENT OF RAPID CLARITHROMYCIN RESISTANT *Helicobacter pylori* STRAINS DETECTION BY LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION COMBINED WITH RESTRICTION ENDONUCLEASE DIGESTION. ADVISOR: ASST. PROF.NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D., 125 pp.

Clarithromycin is the key antibiotic of standard triple therapy to treat *Helicobacter pylori* infection. The problem of clarithromycin resistance has been dramatically increased nowadays which contributed to eradication failure. The mechanism of clarithromycin resistance is due to mutation in the peptidyltransferase region of domain V of the 23S rRNA. Mutation at the position A2143G significantly correlated to antibiotic resistance and found high prevalence in many countries. In this study, LAMP based assay with restriction enzyme analysis (LAMP-RFLP) was developed for determination of A2143G mutations in 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *H. pylori*. PCR amplification was used for the confirmation of *H. pylori* identification in positive urease test samples and PCR-RFLP method was performed to detect an A2143G point mutation in 23S rRNA. LAMP primers of 23S rRNA were designed and tested for optimal conditions. Of all 353 positive urease test samples, 101 could be amplified for *H. pylori* gene and 7.5% (4/53) were mutated at A2143G of 23S rRNA gene. Sequencing results of 23S rRNA among the 29 strains of *H. pylori* found the mutations at position A2142G 3.4%, A2143G 3.4%, T2182C 48.3% and A2143G+T2182C 10.3%. The optimal conditions for LAMP amplification of *H. pylori* 23S rRNA contained 0.2 μ M each of F3 and B3, 1.6 μ M each of FIP and BIP, 0.8 μ M each of LF and LB, 0.8 M betaine, 1.4 mM of deoxynucleoside triphosphates and 6 mM MgSO₄, incubated at 65°C for 60 min. The restriction enzyme analysis of LAMP products with *Bsa*I could successfully distinguished wild type and mutant type with the ladder like pattern in wild type and three different sizes of 92 bp, 103 bp and 250 bp in A2143G mutant type. Therefore, our LAMP-RFLP assay should be a rapid and simple method for the detection of A2143G mutation in 23S rRNA gene of *H. pylori* which will be useful for primary clarithromycin resistance screening of *H. pylori* isolated from patients in countries with a high prevalence of clarithromycin resistance for appropriate antibiotic treatment.

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature

Clinical Microbiology Advisor's Signature

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เกิดจากบุคคลที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ มากมาย จึงขอขอบพระคุณคณะบุคคลต่าง ๆ มา ณ โอกาสนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทริชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้ความรู้ เทคนิค และคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ในภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ และ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนวิชาความรู้ต่างๆ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อ.ดร.เขมาภรณ์ บุญบำรุง ที่กรุณารับเป็นประธานสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ อ.พิทักษ์ สันตนิรันดร์ และ อ.ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกูล ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา หัวหน้าภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความรู้ เทคนิค และคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนมูลนิธิกระจกอาซาฮี (Asahi Glass Foundation)

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่าน ในแผนก Enteric diseases, AFRIMS ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความสะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี และความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมา ในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณเพื่อนและน้องนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอกทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
1. เชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>).....	6
2. อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ <i>H. pylori</i>	18
3. ยาปฏิชีวนะคลาโรไธรมัยซิน (Clarithromycin).....	19
4. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	42
1. สารเคมีและน้ำยา.....	42
2. เครื่องมือ	43
3. วิธีการทดลอง.....	43
3.1 ตัวอย่าง	43
3.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ <i>H. pylori</i>	44

3.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนทรอป	45
3.4 วิธีการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis).....	45
3.5 การตรวจยืนยันเชื้อ <i>H. pylori</i> จากตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวก และ เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ทางคลินิกที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) บริเวณยีน 16S rRNA หรือ ยีน <i>glmM</i>	46
3.6 การตรวจการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ <i>H.pylori</i> ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP).....	47
3.7 การหาลำดับเบส (Sequencing)	48
3.8 การโคลนนิ่ง (Cloning).....	48
3.9 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification	49
3.10 การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี LAMP ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ [Loop-mediated isothermal amplification - restriction fragment length polymorphism (LAMP-RFLP)].....	55
บทที่ 4 ผลการทดลอง	57
1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง urease test เชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน	57
2. การตรวจยืนยันเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยวิธี PCR บริเวณยีน 16S rRNA หรือ บริเวณยีน <i>glmM</i> ..	58
3. การตรวจสอบหาเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR-RFLP	61
4. การโคลนนิ่ง (Cloning).....	63
5. การหาลำดับเบส (Sequencing).....	64
6. การออกแบบไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะกับยีนบริเวณ 23S rRNA	68
7. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ด้วยวิธี LAMP	73

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	92
สรุปผลการทดลอง.....	103
รายการอ้างอิง	104
ภาคผนวก.....	121
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	125



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงปัจจัยการก่อโรคของเชื้อ <i>H. pylori</i>	9
ตารางที่ 2.2 แสดงการให้ยารักษาหลังการติดเชื้อ <i>H. pylori</i> ตามอ้างอิงตาม National Medicines Information Centre.....	18
ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะ 1-4.....	54
ตารางที่ 4.1 การตรวจวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และ ยีน <i>glmM</i> จากตัวอย่าง urease test ด้วยวิธี PCR.....	60
ตารางที่ 4.2 การตรวจวิเคราะห์ PCR-RFLP ยีน 23S rRNA และตัดด้วยเอนไซม์ <i>BsaI</i> จากตัวอย่าง urease test และ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์คลินิกที่ต่อยาคลาริโรรมัยซิน.....	63
ตารางที่ 4.3 แสดงตำแหน่งและเปอร์เซ็นต์ของเชื้อ <i>H. pylori</i> สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์บริเวณยีน 23S rRNA จากตัวอย่าง urease test 29 ตัวอย่าง.....	67
ตารางที่ 4.4 แสดงชื่อของไพรเมอร์, ลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3', ความยาว, ค่า Tm, ค่า Delta G และ อัตรา GC ของไพรเมอร์ LAMP.....	72
ตารางที่ 4.5 แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบครั้งที่ 1-3, ลำดับเบสและความยาวของชุดไพรเมอร์ LAMP บริเวณ 23S rRNA ที่ออกแบบทั้งหมดในการศึกษานี้.....	73

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1 แสดงปัจจัยการก่อโรค (Virulence factors) ของเชื้อ <i>H. pylori</i>	10
รูปที่ 2.2 แสดงชุดตรวจ CLOtest* ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก	14
รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของยาคลารีโธรมัยซิน.....	19
รูปที่ 2.4 แสดงตำแหน่งของไพโรเมอร์และ probe ของหลักการ FRET.....	23
รูปที่ 2.5 แสดง Melting curve ของ Wild type, A2144G และ A2143G ของหลักการ FRET....	23
รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของไพโรเมอร์ของหลักการ DPO PCR.....	24
รูปที่ 2.7 แสดงการแปลผลของของ DPO PCR.....	25
รูปที่ 2.8 แสดงขั้นตอนที่ 1 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพโรเมอร์.....	28
รูปที่ 2.9 แสดงขั้นตอนที่ 2 ของปฏิกิริยา LAMP ในการจับของไพโรเมอร์ FIP ที่บริเวณ F2.....	28
รูปที่ 2.10 แสดงขั้นตอนที่ 3 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพโรเมอร์ F3.....	28
รูปที่ 2.11 แสดงขั้นตอนที่ 4 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอหลังการทำงานของ ไพโรเมอร์ F3.....	28
รูปที่ 2.12 แสดงบริเวณของผลผลิต LAMP ที่สามารถจับกันเป็นห่วง (stem-loop) ที่ปลาย 5'.....	29
รูปที่ 2.13 แสดงขั้นตอนที่ 6 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพโรเมอร์ BIP และ B3.....	29
รูปที่ 2.14 แสดงขั้นตอนที่ 7 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ.....	29

รูปที่ 2.15 แสดงขั้นที่ 8 ของปฏิกิริยา LAMP ของโครงสร้างหลักที่เป็นจุดเริ่มต้นของ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบๆ.....	30
รูปที่ 2.16 แสดงขั้นตอนที่ 8-11 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบๆ.....	31
รูปที่ 2.17 แสดงไพรเมอร์ 4 เส้น ของปฏิกิริยา LAMP	32
รูปที่ 2.18 แสดงไพรเมอร์ 6 เส้น ของปฏิกิริยา LAMP	32
รูปที่ 2.19 แสดงไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP กรณีที่มี Loop primer.....	33
รูปที่ 2.20 แสดงระยะห่างของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP.....	34
รูปที่ 2.21 แสดงหลักการปฏิกิริยา LAMP ของ specific primer เพื่อตรวจวิเคราะห์ wild type และ mutant allele.....	35
รูปที่ 2.22 แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยา LAMP ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส	36
รูปที่ 2.23 แสดงกราฟของ SYBR Green I เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย แสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 497 นาโนเมตร และคายพลังงานที่ความ ยาวคลื่น 590 นาโนเมตร.....	37
รูปที่ 2.24 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ด้วยสี SYBR Green I.....	37
รูปที่ 2.25 แสดงปฏิกิริยาการตกตะกอนของ LAMP amplicon-PEI complex.....	38
รูปที่ 2.26 แสดงการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ด้วยอนุภาคทองคำนาโน.....	39
รูปที่ 3.1 ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ <i>Bsa</i> I	48
รูปที่ 3.2 แสดงรูปของ Vector และแผนที่ของ Vector pSC-A-amp/Kan	49
รูปที่ 3.3 แสดงหน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม PrimerExplorer V4.....	50

รูปที่ 3.4 แสดงหน้าต่างของโปรแกรมในการออกแบบไพรเมอร์แบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)]	51
รูปที่ 3.5 แสดงหน้าต่างของโปรแกรมที่แสดงรายละเอียดของชุดไพรเมอร์แบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)] ที่ออกแบบได้.....	52
รูปที่ 4.1 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง เชื้อ <i>H. pylori</i>	58
รูปที่ 4.2 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR ยีน 16S rRNA.....	59
รูปที่ 4.3 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR ยีน <i>glmM</i>	60
รูปที่ 4.4 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR ยีน 23S rRNA.....	62
รูปที่ 4.5 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR-RFLP.....	62
รูปที่ 4.6 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ การโคลนนิ่ง.....	64
รูปที่ 4.7 แสดงการทำ Multiple Alignment.....	65
รูปที่ 4.8 แสดงลำดับเบสบริเวณ 2281 – 2640 จากธนาคารยีน.....	68
รูปที่ 4.9 แสดงชุดของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ทั้งหมดในครั้งที่ 1 โดยใช้โปรแกรม Easy Mode.....	69
รูปที่ 4.10 แสดงลำดับเบสและตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้น จากการออกแบบโดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer v4 Software แบบมาตรฐาน.....	70
รูปที่ 4.11 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT.....	74
รูปที่ 4.12 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน.....	75
รูปที่ 4.13 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างๆ กัน.....	76

รูปที่ 4.14 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของเบตาอินต่างๆ กัน.....	77
รูปที่ 4.15 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของ dNTPs ต่างๆ กัน.....	78
รูปที่ 4.16 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตต่างๆ กัน.....	79
รูปที่ 4.17 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT.....	81
รูปที่ 4.18 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน.....	82
รูปที่ 4.19 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นต่างๆ กัน.....	83
รูปที่ 4.20 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นของเบตาอินต่างๆ กัน.....	84
รูปที่ 4.21 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นของ dNTPs ต่างๆ กัน.....	85
รูปที่ 4.22 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตต่างๆ กัน.....	86
รูปที่ 4.23 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2.....	87
รูปที่ 4.24 แสดง Restriction map ของผลผลิต LAMP และแผนที่ตำแหน่งที่ <i>BsaI</i> และ <i>Avall</i> ตัดบน ลำดับเบสจาก F3-B3.....	89
รูปที่ 4.25 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ที่ถูกตัดด้วย <i>BsaI</i>	90
รูปที่ 4.26 แสดงอะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ที่ถูกตัดด้วย <i>BsaI</i> และ <i>Avall</i>	91

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Helicobacter pylori เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะอาหารอักเสบ (Gastritis) แผลเปปติก (Peptic ulcer) มะเร็งกระเพาะอาหาร (Gastric cancer) มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas และอาการแทรกซ้อน เช่น ตกเลือดในกระเพาะอาหารและกระเพาะอาหารทะลุ (1, 2) ในปี ค.ศ. 1994 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ได้ประกาศให้เชื้อนี้อยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 (Class I Carcinogen) (3) พบว่าประชากรทั่วโลกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ มีการติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งส่วนใหญ่อาจไม่แสดงอาการ ความชุกของโรคแตกต่างกันตามภูมิภาค และลักษณะเฉพาะของประชากรนั้นๆ (4) โดยในประเทศที่พัฒนาแล้วจะมีความชุกของโรคที่ต่ำกว่าประเทศที่ยังไม่พัฒนา เนื่องจากมีสุขลักษณะนิสัยและสาธารณสุขที่ดีกว่า (4) การระบาดในทวีปเอเชียพบว่าประเทศที่กำลังพัฒนาจะพบความชุกของโรคมากกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ในประเทศบังกลาเทศพบ 92 เปอร์เซ็นต์ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบความชุกของโรคที่สูง โดยพบว่าในประเทศจีน, ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ มีความชุกของโรค คิดเป็น 58.07, 39.3 และ 59.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศมาเลเซีย, สิงคโปร์ และ ไทย พบความชุกของโรค คิดเป็น 35.9, 31 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (5) การติดต่อของเชื้อเกิดได้หลายทาง เช่น การรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำร่วมกับคนที่ติดเชื้อ หรือรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเข้าไป จะเกิดการติดเชื้อได้ง่ายในเด็กและคนที่อยู่ในครอบครัวเดียวกัน เนื่องจากการใช้ของส่วนตัวร่วมกันหรือภาชนะร่วมกัน (6)

การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ทั่วโลก ปกติจะเริ่มทำการรักษาด้วย Standard triple therapy อ้างอิงตามรายงานของ Maastricht IV consensus report โดยจะเริ่มทำการรักษาด้วย First line therapy ก่อน ซึ่งจะประกอบไปด้วย ยาลดกรด (Proton Pump Inhibitors, PPIs) ร่วมกับยาปฏิชีวนะอีก 2 ชนิด คือ อะม็อกซิซิลลิน (Amoxicillin) และ คลาริโธรมัยซิน (Clarithromycin) สำหรับผู้ป่วยที่แพ้เพนิซิลลิน (Penicillin) ให้ใช้เมโทรนิดาโซล (Metronidazole) แทนอะม็อกซิซิลลิน (Amoxicillin) เป็นเวลา 10-14 วัน (7, 8) ในปัจจุบันพบว่าอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นสูงทั่วโลก ซึ่งจะทำให้การรักษาประสบความสำเร็จลดลง โดยพบว่ามี การดื้อยา

เมโทรนิดาโซล, คลาริโธรมัยซิน, อะม็อกซิซิลลิน, เลโวฟลอกซาซิน (Levofloxacin), เตตราซัยคลิน (Tetracyclin), ไรฟาบูติน (Rifabutin) และ ดื้อยาหลายชนิด (Multiple antibiotics) คิดเป็น 26.7, 17.2, 11.2, 16.2, 5.9, 1.4 และ 9.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (9) ประเทศไทย มีรายงานในปี ค.ศ. 2013 พบว่ามีการดื้อยา เมโทรนิดาโซล, คลาริโธรมัยซิน, อะม็อกซิซิลลิน, เลโวฟลอกซาซิน, เตตราซัยคลิน, ซิโพรฟลอกซาซิน และ ดื้อยาหลายชนิด คิดเป็น 36, 3.7, 5.2, 7.2, 1.7, 7.7 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (10)

คลาริโธรมัยซิน จัดเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม มาโครไลด์ (Macrolide) มีกลไกการออกฤทธิ์ โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย จึงส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเติบโตไม่ได้ (Bacteriostatic activity) การดื้อยาเกิดจากการเปลี่ยนแปลง target site ที่ 23S rRNA โดยขบวนการ methylation หรือ เกิดการกลายพันธุ์ที่ Domain V บริเวณ Peptidyltransferase region ของ 23S rRNA (11, 12) โดยตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์มากที่สุด คือตำแหน่ง A2143G (11, 13, 14) เช่น ที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ. 2011 พบอัตราการกลายพันธุ์ตำแหน่ง A2143G สูงถึง 96.5 เปอร์เซ็นต์ (15) ที่ประเทศอิหร่านในปี ค.ศ. 2011 พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G สูงถึง 93.7 เปอร์เซ็นต์ (16) มีรายงานว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G จะเกี่ยวข้องกับการทำให้การรักษาเชื้อประสบความสำเร็จล้มเหลวอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าที่ตำแหน่ง A2142G หรือ A2142C (17)

การดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori* มีความแตกต่างกันไปแต่ละภูมิภาค เช่น ในยุโรปคิดเป็น 11.1 เปอร์เซ็นต์ ในเอเชียคิดเป็น 18.9 เปอร์เซ็นต์ ในอเมริกา คิดเป็น 29.3 เปอร์เซ็นต์ ในทวีปเอเชียพบว่า ประเทศจีนและญี่ปุ่นมีอัตราการดื้อยาในระดับที่สูง คิดเป็น 84.9 และ 40.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าประเทศมาเลเซียมีอัตราการดื้อยาดำต่ำสุด คิดเป็น 2.1 เปอร์เซ็นต์ (9, 18) สำหรับประเทศไทยมีอัตราการดื้อยา คิดเป็น 3.7 เปอร์เซ็นต์ (10) และเมื่อเชื้อเกิดการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ก็จะสามารถทำให้ดื้อต่อยา generation ที่สูงกว่าได้ โดยมีรายงานว่าถ้าเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน จะทำให้ดื้อยาในกลุ่ม quinolone ได้ (15, 19) ถึงแม้ในปัจจุบันอัตราความสำเร็จในการรักษาด้วยวิธี Standard triple therapy ได้ลดลงในหลายภูมิภาคก็ตาม แต่ก็ยังเป็นวิธีการรักษาที่ยังแนะนำให้ใช้อยู่สำหรับในพื้นที่ที่มีอัตราการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ตามรายงานของ Maastricht IV (20) ซึ่งประเทศไทยก็ยังคงมีการรักษาด้วยวิธี Standard triple therapy อยู่

ปัจจุบันการทดสอบการดื้อยาของเชื้อจะใช้วิธีมาตรฐานตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) คือ การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Antimicrobial Susceptibility Testing) โดยวิธี Agar dilution หรือวิธีของ Epsilometer (E-Test) ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยากเนื่องจากต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นเชื้อที่โตยาก ใช้เวลานาน 10-14 วัน ซึ่งสิ้นเปลืองเวลามาก (21) ต่อมาจึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธี Hybridization probe และ Fluorescent in-situ hybridization (22-24) แต่มีข้อเสียเนื่องจากต้องใช้เวลานานในการติด probe ต่อมาจึงพัฒนาใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และวิธีของ Dual priming oligonucleotide PCR (DPO PCR) ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูง รวดเร็ว ใช้ปริมาณสารตั้งต้นเพียงเล็กน้อย (25, 26) และ Real-Time PCR ซึ่งสามารถวัดเชิงปริมาณได้ (27, 28) อย่างไรก็ตามวิธี PCR เป็นวิธีที่ต้องอาศัยบุคลากรที่ชำนาญ และจำเป็นต้องมีเครื่อง Thermal cycler จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่มีเครื่อง Thermal cycler รวมทั้งการตรวจ ณ จุดดูแลผู้ป่วย (point of care) และการตรวจภาคสนามในพื้นที่ชนบทที่ห่างไกลได้ ขณะที่วิธีการหาลำดับเบส (Sequencing) ถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงและเป็นวิธีที่รวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสีย คือ ราคาตรวจวิเคราะห์ที่แพง (29, 30)

เทคนิคของ Loop-mediated isothermal amplification หรือ LAMP (31) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิเดียว จึงไม่จำเป็นต้องมีเครื่อง Thermal cycler ซึ่งมีราคาแพง เป็นวิธีที่สะดวกเพราะสามารถใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น ก่อ่งร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) หรืออ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ในการทำปฏิกิริยาได้ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 4-6 เส้น จึงมีความไวและความจำเพาะสูง ใช้ระยะเวลาในการตรวจที่สั้น โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิเดียวคือ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อหลายชนิดทั้ง ปรสิต ไวรัส และแบคทีเรีย เช่น *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia*, *Cronobacter* spp. และ *H. pylori* เป็นต้น (32-35) ซึ่งมีรายงานว่าเทคนิค LAMP มีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าหรือมากกว่าวิธี PCR (32) มีการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อวินิจฉัยและจำแนกชนิดของเชื้อ เช่น มีการใช้เทคนิค Multiplex Loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) ซึ่งจะใช้ออนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaI* ในการแยกแยะระหว่าง *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในตัวอย่างนม (36) ใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ *AccI* เพื่อแยกแยะระหว่างจีโนไทป์ของ Herpesvirus 6 (HHV-6) type A และ B (37) ใช้วิธี Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) ร่วมกับการใช้ออนไซม์ตัดจำเพาะ *ScaI* ในการแยกสายพันธุ์ของวัคซีนป้องกันคางทูม ระหว่าง wild type และสายพันธุ์ Hoshino ได้ (38)

ในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori* (11, 13, 14) โดยใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งสามารถประยุกต์เทคนิค LAMP-RFLP ที่พัฒนาขึ้นไปใช้ตรวจการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน จากสิ่งตรวจโดยตรง หรือ พัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบที่รวดเร็วในการตรวจ ณ จุดดูแลผู้ป่วย และ การศึกษาระบาดวิทยาในพื้นที่ต่างๆ ได้

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ที่มีการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (LAMP-RFLP)

3. ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง urease test 2 แบบ คือ ตัวอย่าง Campylobacter-like organism test (CLO test) จำนวน 210 ตัวอย่าง และ in house urease test จำนวน 143 ตัวอย่าง และตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ และทำ PCR ยีน 16S rRNA หรือ ยีน *glmM* เพื่อตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อ *H. pylori* จากนั้นตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ของ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR-RFLP และส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (Sequencing) เพื่อวิเคราะห์ตำแหน่งการกลายพันธุ์อื่นๆ การพัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับตรวจสอบการกลายพันธุ์ที่ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ จำนวนทั้งหมด 6 เส้น คือ F3, B3, FIP, BIP, LF และ LB และนำมาทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยปฏิกิริยา LAMP โดยหาระยะเวลาในการบ่มที่เหมาะสม ความเข้มข้นของ ไพรเมอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต เบตาอิน และ แมกนีเซียมซัลเฟต และนำผลผลิต LAMP มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 เอนไซม์ คือ *Avall* กับ *Bsal* โดย *Avall* ตัดตรงช่วงห่วง (loop) ทั้งสองข้าง และ *Bsal* จะตัดแยกระหว่าง wild type และ mutant type ตรงตำแหน่ง A2143G

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเทคนิค LAMP-RFLP มาใช้ตรวจหาฮีนต้อยาคลารีโรรมัยซิน ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ที่ 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่างสิ่งตรวจ urease test ได้โดยตรง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีในงานประจำ โดยไม่ต้องเสียเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เชื้อ *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

1.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *H. pylori*

เชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 โดย Robin Warren และ Barry J. Marshall ซึ่งเป็นนายแพทย์ชาวออสเตรเลีย โดยได้ค้นพบเชื้อในเยื่อบุกระเพาะอาหารเป็นครั้งแรก และสามารถเพาะเชื้อ *H. pylori* ได้สำเร็จในปี ค.ศ. 1983 (39) โดยชื่อเดิมคือ *Campylobacter pyloridis* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเกลียว ไม่สร้างสปอร์ มีแฟลกเจลลาแบบ Multiple monopolar sheathed flagella เซลล์มีขนาดความกว้าง 0.3 ถึง 1.0 ไมโครเมตร และ ยาว 1.5 ถึง 10.0 ไมโครเมตร สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในปริมาณน้อย (Microaerophilic) เพื่อการเจริญเติบโต (มี O₂ 5-10 เปอร์เซ็นต์, มี CO₂ 5-22 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งอาจเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่มีสภาวะ Microaerophilic หรือเพาะเลี้ยงใน Anaerobic jar ร่วมกับการใช้ Gas Pack การเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหาร (gastric biopsy) ควรทำการบดเสียก่อนเพื่อให้เชื้อที่เกาะหรืออยู่ในเยื่อบุกระเพาะอาหารออกมา (39, 40) อาหารเลี้ยงเชื้อมีหลายชนิด เช่น Non selective agar ได้แก่ Brucella agar, Columbia agar, Wilkins Chalgren agar, Brain heart infusion หรือ Trypticase soy agar ผสม 7-10 เปอร์เซ็นต์ เลือดแกะหรือเลือดม้า นอกจากนี้อาจเติม Supplement คือ Cyclodextrin ลงไปด้วยสำหรับ Selective agar ได้แก่ Skirrows selective agar และ Dents selective agar (40) การย้อมสีแกรม (Gram stain) จะเป็นแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนโค้งหรือเกลียว (Curve/Spiral-shaped) หรือส่องด้วยกล้อง dark field จะเห็นการเคลื่อนที่แบบหัวสว่าน (corkscrew like) ลักษณะทางชีวเคมี ที่แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นๆ และเชื้อ *Helicobacter* สายพันธุ์อื่นๆ มีดังนี้ Catalase (+), Oxidase (+), Nitrate (-), Alkaline phosphatase (+), Urease (+), Indoxyl acetate (-), gamma-Glutamyl transferase (+), ไม่เจริญที่ 42 องศาเซลเซียส และไม่เจริญใน 1 เปอร์เซ็นต์ของ Glycine ให้ผลคือต่อยา Nalidixic acid และไวต่อยา Cephalothin (39, 40)

H. pylori จะมีกลุ่มยีน 2 กลุ่ม คือ Cytotoxin-associated gene pathogenicity island (cag PAI) และ Vacuolating cytotoxin (*VacA*) (39, 40) ทำให้สามารถแบ่ง *H. pylori* ได้

2 กลุ่ม คือ Type I คือ มี *cag* PAI และสร้าง *VacA* ส่วน Type II จะไม่มี *cag* PAI และไม่สร้าง *VacA* สำหรับ *cag* PAI จะมีขนาด 37 กิโลเบส ประกอบด้วยกลุ่มยีน 29 ยีน ซึ่งจะมี *cagA* เป็นโปรตีนขนาด 120 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนแรกและเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้าง virulence factor ในห้องทดลองพบว่าสายพันธุ์ที่มี *cag* PAI จะเหนี่ยวนำทำให้เกิดการทำลายกระเพาะและนำไปสู่สาเหตุของโรคกระเพาะอาหารอักเสบ แผลเปปติก และอาจเป็นสาเหตุของมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (41, 42) ส่วน *VacA* เป็น exotoxin มีขนาด 95 กิโลดาลตัน ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการก่อโรคเช่นเดียวกัน และเป็นสาเหตุทำให้เกิด epithelial cell vacuolation (43)

1.2 อาการของโรค (Signs and symptoms)

เชื้อ *H. pylori* ทำให้เกิดความผิดปกติในระบบกายวิภาคและสรีรวิทยาของกระเพาะอาหาร ลดการดูดซึมเหล็กและวิตามินบี 12 เพิ่มโอกาสการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร (Enteric infection) เกิดแผลเปปติก ซึ่งจะทำให้เกิดผลแทรกซ้อน เช่น ตกเลือดในกระเพาะอาหารและกระเพาะอาหารทะลุ โรคกระเพาะอาหารที่ไม่มีแผล (Non ulcer dyspepsia) เกิดกระเพาะอาหารอักเสบ เกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร และเกิดมะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด MALT lymphoma (2, 40)

อย่างไรก็ตามการติดเชื้อ *H. pylori* โดยส่วนใหญ่มักไม่แสดงอาการเมื่อได้รับเชื้อเข้าไปแล้ว (44) และหลังจากได้รับเชื้ออาจจะพัฒนาไปเป็นกระเพาะอาหารอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute gastritis) ภายใน 2 ชั่วโมง หรืออาจเกิดเป็นกระเพาะอาหารอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic gastritis) ซึ่งมีหลายประเภทได้แก่ atrophic gastritis, gastritis ulcer, gastric adenocarcinomas และ gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas (40, 45)

จากรายงานการประชุมของ National Institute of Health Consensus Development Conference ในปี ค.ศ. 1994 ได้สรุปว่าเชื้อ *H. pylori* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดแผลเปปติก และผู้ป่วยที่ติดเชื้อควรได้รับการรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะ (46) และ ในปีเดียวกันองค์การอนามัยโลก ได้จัดให้เชื้อ *H. pylori* เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 (group I, Carcinogen) ซึ่งหมายถึง สารที่ก่อให้เกิดมะเร็งโดยตรงต่อมนุษย์ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความรุนแรงที่สุด (3) สารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 109 ชนิด เช่น อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin), เบนซีน (Benzene) และเชื้อ *H. pylori* เป็นต้น ซึ่งนิยามของสาเหตุกลุ่มต่างๆ คือ กลุ่มที่ 1 หมายถึง สารก่อมะเร็งในคน (Carcinogenic to humans) คือ มีหลักฐานเพียงพอที่สามารถจะสรุปได้ว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งในคนได้ และมีหลักฐานเพียงพอสำหรับการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง กลุ่มที่ 2A หมายถึง น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในคน (Probably carcinogenic to humans) คือ มีหลักฐานที่สามารถจะสรุปได้ว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งในคนได้แต่หลักฐานอาจมีอย่างจำกัดหรือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ 1 แต่มีหลักฐานเพียงพอสำหรับการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง กลุ่มที่ 2B หมายถึง อาจจะเป็นสารก่อมะเร็ง

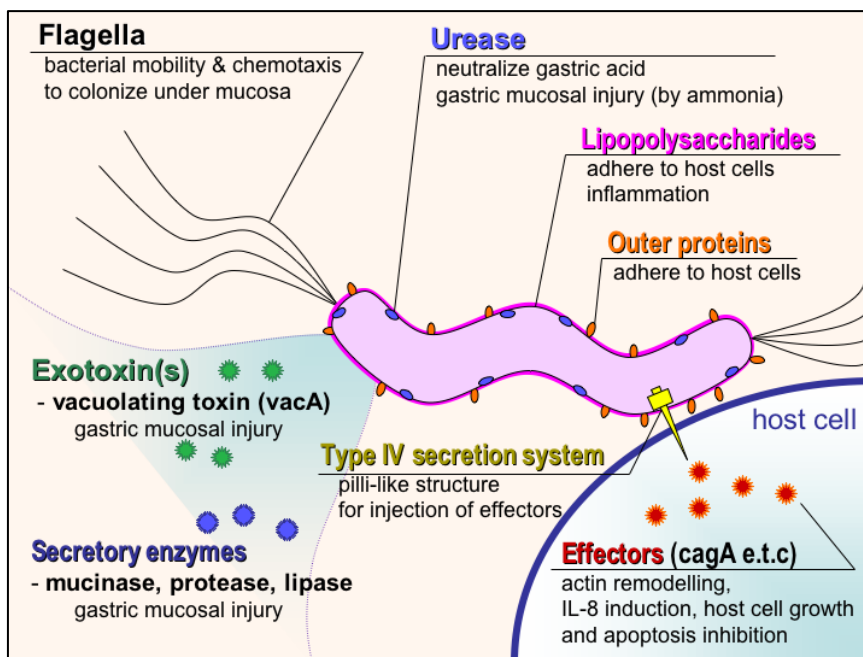
ในคน (Possibly carcinogenic to humans) คือหลักฐานเพียงพอว่าทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่หลักฐานเพียงพอในการเกิดมะเร็งในคน กลุ่มที่ 3 หมายถึง ไม่เป็นสารก่อมะเร็งในคน (Not classification as to its carcinogenicity to humans) และ กลุ่มที่ 4 หมายถึง ไม่น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งในคน (Probably not carcinogenic to humans) (3)

1.3 ปัจจัยการก่อโรค (Virulence factors)

เมื่อเชื้อเข้าสู่ร่างกายจะไปเกาะที่เยื่อบุของกระเพาะโดยการใช่แฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ ซึ่งจะเป็แบบ multiple monopolar sheathed flagella มี 4-6 เส้น อยู่ทางด้านใดด้านหนึ่ง จะผ่านเข้าไปโคโลไนส์ (colonize) ที่เยื่อบุกระเพาะอาหาร (epithelium cell) ซึ่งจะเข้าไปอยู่ในชั้นเยื่อเมือก (mucous) และจะไปหลบอยู่ในชั้นเยื่อเมือก เนื่องจากหลบระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย การยึดเกาะที่เยื่อบุกระเพาะโดยการสร้างโปรตีน adhesin ในการยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ ถึงแม้ว่ากระเพาะอาหารจะมีการหลั่งกรดเพื่อป้องกันเชื้อโรค แต่เชื้อมีกลไกในการสร้างแอมโมเนีย ซึ่งเป็นเบสเพื่อมาลบล้างสภาวะที่เป็นกรดได้ จากนั้นเชื้อจะทำลายเนื้อเยื่อบริเวณกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กตอนต้นได้หลายขบวนการ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น protease ที่จะย่อยโปรตีน mucinase ที่จะย่อย mucin และ lipase ที่จะย่อยไขมัน เชื้อจะมีการสร้างสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งจะช่วยยึดเกาะกับเยื่อบุผิวได้ดีและทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้น เชื้อมีการสร้าง Vacuolating cytotoxin A หรือ VacA ซึ่งเป็น Exotoxin ไปทำลายเยื่อบุผิว โดยทำให้การทำงานของ tight junctions เสียไปและเป็นสาเหตุทำให้เกิด apoptosis อีกด้วย เชื้อมีระบบที่เรียกว่า type IV secretion system ซึ่งจะทำให้เกิดการปล่อยโปรตีน cagA เข้าไปในโฮสต์ ไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการหลั่งไซโตไคน์ และเกิดขบวนการอักเสบเกิดขึ้น ซึ่ง cagA จะเป็นโปรตีนแรกในการสร้างปัจจัยการก่อโรค และเกี่ยวข้องกับขบวนการ tyrosine kinase (TK) ทำให้เกิดการอักเสบรุนแรงมากขึ้น และอาจทำให้มีโอกาสเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (39, 47, 48) ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงปัจจัยการก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* (39)

ปัจจัยในการก่อโรค	ผลกระทบ
การยึดเกาะ	
Flagella	ช่วยในการเคลื่อนที่ผ่าน Mucin
Urease	ลบล้างความเป็นกรด
Adhesins	ช่วยในการยึดเกาะเยื่อบุผิว
การทำลายเนื้อเยื่อ	
Proteolytic enzymes	ช่วยในการทำงานของ Glucosulfatase ในการย่อย Mucin
120-K Da Cytotoxin (<i>cagA</i>)	ทำให้เกิดแผลในกระเพาะ และเป็นกระเพาะอาหารอักเสบรุนแรงมากขึ้น
Vacuolating cytotoxin (<i>VacA</i>)	ทำลายเยื่อบุผิว
Urease	เป็นพิษต่อเยื่อบุผิวและ รบกวนการทำงานต่อ Tight junctions ของ Cell
Phospholipase A	ย่อย Phospholipids ในเยื่อหุ้มเซลล์
Alcohol dehydrogenase	เกิดแผลในเยื่อบุกระเพาะ
การดำรงชีวิต	
Intracellular surveillance	ป้องกันการจับกินของเม็ดเลือดขาว
Superoxide dismutase	ป้องกันการจับกินของเม็ดเลือดขาว
Catalase	ป้องกันการจับกินของเม็ดเลือดขาว
Coccioid forms	รูปร่างเป็นทรงกลมในการหยุดพักตัว
Urease	เป็น Sheathing antigen
อื่นๆ	
Lipopolysaccharide	ทำให้ Biological activity ต่ำ
Lewis X/Y blood-group homology	มีผลต่อ Autoimmunity



รูปที่ 2.1 แสดงปัจจัยการก่อโรค (Virulence factors) ของเชื้อ *H. pylori* (49)

1.4 การติดต่อ

การติดต่อของโรคเกิดได้หลายสาเหตุดังนี้

1.4.1 การติดต่อทางปากสู่ปาก (Oral-Oral) เชื้อสามารถติดต่อทางน้ำลาย โดยมีรายงานว่าเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนในน้ำลายและสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ (50) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อในคราบแบคทีเรียบนผิวฟัน (dental plaque) และจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหารอีกด้วย (51, 52) ดังนั้นการดื่มน้ำร่วมกับผู้ที่ติดเชื้อนี้สามารถติดต่อกันได้ และมีรายงานการติดต่อของเชื้อจากการดื่มน้ำหรือการรับประทานอาหารร่วมกัน (51, 52) แต่บางรายงานพบว่าเชื้อสามารถจะติดต่อเฉพาะการดื่มน้ำร่วมกันเท่านั้น สำหรับการรับประทานอาหารร่วมกันไม่สามารถติดต่อได้ (6)

1.4.2 การติดต่อทางทวารหนักสู่ปาก (Fecal-Oral) เชื้อสามารถแพร่กระจายจากน้ำหรืออาหารที่มีการปนเปื้อนของอุจจาระที่มีเชื้อ และเข้าสู่ทางปากโดยการกินหรือดื่มน้ำได้ โดยมีรายงานว่าพบดีเอ็นเอของเชื้อหลังจากการเก็บตัวอย่างอุจจาระมาตรวจด้วยวิธี PCR (51, 52)

1.4.3 ติดต่อกันโดยการรักษาของแพทย์ (Latrogenic) ซึ่งอาจเกิดจากการใช้อุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ไม่สะอาด เช่น หลอดหรืออุปกรณ์ของกล้อง (Gastro endoscopy) ทำให้เกิดการติดต่อได้ในผู้ป่วย (51, 52)

1.4.4 การติดต่อจากคนสู่คน (Person to person) การติดเชื้อเกิดได้ง่ายในเด็กและคนที่อยู่ในครอบครัวเดียวกัน เนื่องจากการใช้ของส่วนตัวหรือภาชนะร่วมกัน เช่น จาน ช้อน หรือที่นอน เป็นต้น หรือในที่ชุมชนแออัด หรือแหล่งชุมชนที่มีสุขอนามัยที่ไม่ดี (51, 52)

มีรายงานว่า มักจะพบการติดเชื้อได้ง่ายโดยเฉพาะเด็กที่มีอายุต่ำกว่า 10 ปี (53, 54) การติดเชื้อ *H. pylori* ในวัยผู้ใหญ่ (adult acquired disease) มีอัตราน้อย ซึ่งจะพบเพียง 0.3 ถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อปี (53, 54) พบว่าอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เสี่ยงต่อการติดเชื้อ คือ ปัจจัยทางด้านเศรษฐกิจและสังคม (Socioeconomic status) โดยพบว่าในครอบครัวที่ยากจนจะทำให้โอกาสติดต่อกันได้ง่ายกว่า เนื่องจากสุขอนามัยที่ไม่ดีในครอบครัว (53, 54)

1.5 ระบาดวิทยา

อุบัติการณ์การติดเชื้อ

พบว่าประชากรประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ทั่วโลกมีการติดเชื้อ *H. pylori* ซึ่งส่วนใหญ่อาจไม่แสดงอาการ ความชุกของโรคทั่วโลกแตกต่างกันตามภูมิประเทศ และลักษณะเฉพาะของประชากรนั้นๆ โดยในประเทศที่พัฒนาแล้วพบความชุกของโรคที่ต่ำกว่าประเทศที่ยังไม่พัฒนาเนื่องจากมีสุขลักษณะนิสัยและสาธารณสุขที่ดีกว่า (4) พบว่าในประเทศที่พัฒนาแล้วหรือประเทศอุตสาหกรรมมีความชุกของโรค คิดเป็น 20–50 เปอร์เซ็นต์ และสำหรับประเทศที่ยังไม่พัฒนาพบความชุกของโรคมามากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (47) ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบความชุกของโรคสูงในประชากรที่มีเชื้อชาติแอฟริกัน และ เชื้อชาติฮิสปานิก (Hispanic) (55) ในทวีปยุโรป พบความชุกของโรคทางตอนเหนือของทวีปสูง คิดเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนประชากรทั้งหมด ทวีปยุโรปตอนใต้และตะวันออก อเมริกาใต้ และเอเชีย พบความชุกของโรคมามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (56)

การระบาดในทวีปเอเชียมีความคล้ายกับ ทวีปอื่นๆ พบว่าประเทศที่กำลังพัฒนาจะพบความชุกของโรคมามากกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ในบังคลาเทศพบ 92 เปอร์เซ็นต์ อินเดียพบ 79 เปอร์เซ็นต์ เวียดนามพบ 74.6 เปอร์เซ็นต์ ในเอเชียตะวันออกพบว่า ประเทศจีนมีความชุกของโรค คิดเป็น 58.07 เปอร์เซ็นต์ ญี่ปุ่น 39.3 เปอร์เซ็นต์ เกาหลีใต้ 59.6 เปอร์เซ็นต์ และไต้หวัน 54.5

เปอร์เซ็นต์ สำหรับเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบว่า ประเทศมาเลเซียพบความชุกของโรค คิดเป็น 35.9 เปอร์เซ็นต์ สิงคโปร์ 31 เปอร์เซ็นต์ และประเทศไทยพบ 57 เปอร์เซ็นต์ (5)

สำหรับอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งทั่วโลก รายงานจาก GLOBOCAN ปี ค.ศ. 2012 (WHO, GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012) พบว่าชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุด 5 อันดับ ในเพศชาย คือ มะเร็งปอด, มะเร็งต่อมลูกหมาก, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งตับ พบอุบัติการณ์การเกิดโรค คิดเป็น 16.7, 15.0, 10.0, 8.5 และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับในเพศหญิง พบว่าชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุด 5 อันดับ คือ มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งปอด, มะเร็งปากมดลูก และมะเร็งกระเพาะอาหาร พบอุบัติการณ์การเกิดโรค คิดเป็น 25.2, 9.2, 8.8, 7.9 และ 4.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (57) มีรายงานว่าในทวีปเอเชีย มะเร็งที่พบมากที่สุด 5 อันดับ คือ มะเร็งปอด มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ และ มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งอัตราการพบมะเร็งแต่ละชนิดแตกต่างกันในแต่ละประเทศ โดยพบว่าเพศชายจะเป็นมะเร็งปอดมากที่สุด เช่น ในประเทศจีน อินโดนีเซีย เนปาล และฟิลิปปินส์ มะเร็งกระเพาะอาหารพบมากที่สุดที่ประเทศอิหร่าน อัฟกานิสถาน เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น และสำหรับในเพศหญิงพบมะเร็งเต้านมมากที่สุดเกือบทุกประเทศ (58) และมีรายงานว่าอัตราการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร พบสูงที่ตอนกลางและตอนใต้ของทวีปอเมริกา และทวีปเอเชีย (59) สำหรับอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งในประเทศไทย รายงานจาก GLOBOCAN ปี ค.ศ. 2012 พบว่าชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุด 5 อันดับ ในเพศชาย คือ มะเร็งปอด, มะเร็งตับ, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งเม็ดเลือดขาว พบอุบัติการณ์การเกิดโรครคิดเป็น 23.5, 20.9, 10.3, 5.1 และ 3.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหารเป็นอันดับที่ 10 ซึ่งพบอุบัติการณ์การเกิด คิดเป็น 2.6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในเพศหญิง พบว่าชนิดของมะเร็งที่พบมากที่สุด 5 อันดับ คือ มะเร็งเต้านม, มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งปอด, มะเร็งตับ และมะเร็งลำไส้ใหญ่ พบอุบัติการณ์การเกิดโรค คิดเป็น 22.4, 13.4, 10.5, 9.4 และ 8.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามะเร็งกระเพาะอาหารเป็นอันดับที่ 12 ซึ่งพบอุบัติการณ์การเกิด คิดเป็น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (57)

ความชุกทางจีโนไทป์ (Genotype prevalence) ของเชื้อ *H. pylori* ทั่วโลก มีความแตกต่างกันไปแต่ละพื้นที่ (60) โดยยีน *cagA* พบที่ทวีปยุโรปและอเมริกา คิดเป็น 60-70 เปอร์เซ็นต์ และพบมากที่เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และพบยีน *VacAs1* มากในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ (60) และพบ sub type *iceA1* มากกว่า *iceA2* ในชาวจีน ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และชาวต่างชาติ แต่พบ sub type *iceA2* มากในชาวบราซิล ชาวยุโรป และชาวอเมริกัน (61) พบว่ายีน *vacA* มีแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ โดยพบ sub type *s1c* มากในเอเชียกลาง, *s1a* พบมากที่สุดที่ยุโรปตอนเหนือ และ *s1b* พบมากที่สุดที่สเปนและยุโรป รายงานการศึกษาในประเทศตุรกี พบมียีน *cagA*, *vacA s1*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2* และ *babA2* คิดเป็น 61.2, 91.8, 22.4, 28.6, 57.1 และ

40.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยจะพบจีโนมไทป์ที่เด่น คือ *vacA s1m2*, *cagA* และ *iceA2* (60) และมีรายงานในประเทศไทยว่าพบยีน *vacAs1*, *vacAs2*, *cagA*, *cagE*, *iceA1*, *iceA2*, และ *babA2* คิดเป็น 100, 0, 98.2, 88.4, 45.5, 33.1 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบ sub type *vacAs1m1* มากกว่า *vacAs1m2* ซึ่งจะพบจีโนมไทป์ที่เด่น คือ *vacAs1m1*, *cagA*, *cagE*, *iceA1* และ *babA2* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในเอเชีย ว่ามีลักษณะจีโนมไทป์เหมือนกับประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลีใต้ (61)

1.6 การวินิจฉัย

การวินิจฉัยทำได้หลายวิธี โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ (62)

1.6.1 Invasive tests

เป็นวิธีที่ต้องตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหาร ด้วยการส่องกล้อง แล้วจึงนำมาทดสอบหาเชื้อ *H. pylori* ซึ่งมีหลายวิธีดังนี้

1.6.1.1 วิธีจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ (histology)

ตรวจโดยพยาธิแพทย์ สามารถตรวจหาตัวเชื้อได้โดยตรงด้วยการย้อมสี Giemsa หรือการย้อมด้วยสี Genta ช่วยให้เห็นทั้งตัวเชื้อและเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารที่มีการอักเสบ เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีความจำเพาะ 90 เปอร์เซ็นต์ และความไว 53 เปอร์เซ็นต์ แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้เวลาในการวินิจฉัยนานถึง 2-3 วัน และ ในกรณีที่ผู้ป่วยได้รับยาปฏิชีวนะมาก่อน จะทำให้โอกาสในการพบเชื้อลดลง (62, 63)

1.6.1.2 วิธีการเพาะเลี้ยง (culture)

เพาะเลี้ยงจากชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหารที่ตัดจาก บริเวณ antrum และ corpus ของกระเพาะ โดยการส่องกล้อง ขนาดชิ้นเนื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร หรือขนาดเท่ากับเมล็ดข้าว เชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อที่ตายได้ง่าย จึงจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปไม่เกิน 2 ชั่วโมง ต้องเลี้ยงในสภาวะ microaerophilic ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ ที่นิยมใช้ได้แก่ Brain-heart infusion หรือ Columbia blood agar ร่วมกับการเติมยาปฏิชีวนะ การเพาะเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 3-5 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โคโลนีมีลักษณะกลมขนาดเล็กสีขาวขุ่น จำแนกชนิดของเชื้อ *H. pylori* โดยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี วิธีนี้มีความจำเพาะ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ความไวค่อนข้างต่ำ และเป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลานาน (62, 63)

1.6.1.3 Rapid urease test

โดยการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ที่เชื้อ *H. pylori* ผลิตขึ้น ซึ่งเปลี่ยนยูเรียเป็นแอมโมเนีย เพื่อเพิ่ม pH ภายในกระเพาะอาหารให้เหมาะสมต่อการอยู่ดำรงชีพของเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนสีของ phenol red ซึ่งเป็น indicator จากสีเหลืองเป็นสีแดง แสดงว่าขึ้นเนื้อนั้นมีเชื้อ *H. pylori* (62, 64) ปัจจุบันมีการผลิต Rapid urease test ในเชิงการค้าหลายชนิด เช่น Campylobacter-like organism test (CLO test), CPtest และ PyloriTek เป็นต้น (62) นอกจากนี้อาจมีการใช้อาหารยูเรียที่เตรียมใช้เอง (in house urease test) ซึ่งตัวอย่าง CLOtest* ของบริษัท Kimberly-Clark ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกดังแสดงในรูปที่ 2.2 มีขั้นตอนวิธีการทดสอบ คือ ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อแคะตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ที่ได้จากการส่องกล้อง มาวางลงในเจลที่อยู่ข้างใน ปิดฝาทิ้งไว้ 20 นาที แล้วอ่านผล โดยถ้า CLOtest* เป็นสีแดง คือให้ผลบวก แสดงว่าขึ้นเนื้อนั้นมีเชื้อ *H. pylori* ผลลบก็จะเป็นสีเหลืองเหมือนเดิม จากนั้นอ่านผลอีกครั้ง ที่ 24 ชั่วโมง และพบว่า ความไวและความจำเพาะของการตรวจเชื้อ *H. pylori* ขึ้นอยู่กับวิธีทดสอบนั้นๆ CLOtest* พบว่า มีความไวและความจำเพาะ 99.0 และ 91.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ in house urease test มีความไวและความจำเพาะ 100 และ 88.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (65) การทดสอบยูเรียเอสเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดเมื่อต้องทำวิธีตัดชิ้นเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารด้วยการส่องกล้อง ข้อดี คือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี histology และวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่อาจทำให้เกิดผลลบปลอม ได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะพร่องกรดเกลือในน้ำย่อย (achlorhydria) ซึ่งส่งผลให้เชื้อตายและเกิดผลลบปลอมได้ (62, 66)



รูปที่ 2.2 แสดงชุดตรวจ CLOtest* ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (64)

หลักการตรวจวิเคราะห์และการรักษาของเชื้อ *H. pylori* ในโรงพยาบาลทั่วไป จะไม่นิยมทำการตรวจทางพีโนไบป์ โดยสมาคมแพทย์ ระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย ได้ กำหนดแนวทางการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย dyspepsia และผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ใน ประเทศไทย พ.ศ. 2553 ไว้ (67) คือ ขั้นแรกจะทำการส่องกล้องและตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหาร หลังจากนั้นจะตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี Rapid urease test (RUT) แต่ถ้าผลการตรวจเชื้อด้วย วิธี RUT เป็นลบ จะต้องส่งตรวจทาง histology เพื่อทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง ผู้ป่วยที่ตรวจพบว่ามี การติดเชื้อ ไม่ว่าจะจากวิธี RUT หรือ การตรวจทาง histology ควรได้รับยากำจัดเชื้อทุกราย และให้ยา ปฏิชีวนะสูตร PPI-based triple therapy ซึ่งเป็นสูตรยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อ (67)

1.6.2 Non-invasive tests

เป็นวิธีการทดสอบหาเชื้อทางอ้อม โดยไม่ต้องทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะ อาหารแล้วส่องกล้อง ซึ่งแต่ละวิธีมีความไวและความจำเพาะแตกต่างกันดังนี้

1.6.2.1 เทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา (Serology)

เทคนิคทางน้ำเหลืองวิทยา นิยมใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อ *H. pylori* ชนิด IgG ในซีรัม และ IgA ในน้ำลายของผู้ป่วย เทคนิคที่นิยมคือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ latex agglutination เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีความจำเพาะ 50-96 เปอร์เซ็นต์ และ มีความไว 90-97 เปอร์เซ็นต์ แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถแยกการติดเชื้อปัจจุบัน ออกจากการติดเชื้อครั้งก่อนได้ นอกจากนี้ยังมีวิธีการตรวจหาแอนติเจนของเชื้อ *H. pylori* ที่อาจปะปนมา กับอุจจาระของผู้ป่วย เทคนิคที่นิยมใช้ เช่น enzymatic immunoassay (EIA) มีประสิทธิภาพใน ระดับเดียวกันกับวิธี Urea breath test และสามารถทำได้ทั้งตรวจหาเชื้อและตรวจยืนยันถึง ผลสำเร็จของการรักษาได้ (62, 63)

1.6.2.2 การทดสอบหายใจในระบบทางเดินหายใจ (Urea breath test)

โดยให้ผู้ป่วยกลืน C^{13} -urea isotope ซึ่งไม่เป็นอันตราย แล้วใช้คุณสมบัติ ของเอนไซม์ยูเรียเอส ที่เชื้อ *H. pylori* ผลิตขึ้น และสลายได้แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นถ้าผู้ป่วยติดเชื้อ *H. pylori* จะตรวจหา $C^{13}O_2$ จากลมหายใจได้ วิธีนี้มีความจำเพาะ 95-97 เปอร์เซ็นต์ และมีความไว 90-96 เปอร์เซ็นต์ วิธีนี้อาจให้ผลลบปลอม ในผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม proton pump inhibitors วิธีนี้สามารถทำได้ทั้งการตรวจหาเชื้อและตรวจยืนยันถึงผลสำเร็จของการรักษาได้ ในต่างประเทศเป็นวิธีทดสอบมาตรฐานในการทดสอบว่าสามารถกำจัดเชื้อได้สำเร็จได้หรือไม่ แต่ใน ประเทศไทยวิธีนี้ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง (62, 63)

1.6.2.3 เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular techniques)

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคนี้ มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* มากขึ้น โดยเฉพาะเทคนิค PCR เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก (62, 68, 69) สามารถ

ตรวจได้ทั้งตัวอย่างจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร น้ำลาย และอุจจาระ โดยการตรวจหา ยีน *ureA*, *ureC* หรือ cytotoxin-associated A (*cagA*) แต่ก็มีข้อเสียคือ ในตัวอย่างอุจจาระและน้ำลายมักมีสารรบกวนปฏิกิริยา PCR รวมทั้งเชื้อที่ตรวจพบ ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อเป็นหรือเชื้อตาย (62, 63) เทคนิคทางอณูชีววิทยามีหลายวิธีดังนี้

1.6.2.3.1 วิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) และ Hybridization probe

วิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) และ Hybridization probe พบว่ามีความไวและความจำเพาะคิดเป็น 84.2 และ 90.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (22-24) มีข้อดี คือ เป็นเครื่องมือที่ราคาไม่แพง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก มีข้อเสีย คือ มีขั้นตอนยุ่งยากและเสียเวลาในการติด probe มีรายงานการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ยีน 16S rRNA โดยจะทำการติดฉลากสารเรืองแสงกับ oligonucleotide ด้วย fluorochrome Cy3 ซึ่งให้สีแดง จากนั้นทำการ hybridization และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (22, 24)

1.6.2.3.2 เทคนิค PCR และ Real-Time PCR

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย เช่น มีรายงานว่ามีการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่าง CLO test โดยใช้ 4 ยีน คือ *hpaA*, 16S rRNA, 860-bp DNA fragment และ *ureC* หรือ *glmM* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี histology และ urease test มีความจำเพาะคือ 76, 76, 80 และ 84.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า ยีน *glmM* มีจำเพาะสูงที่สุด (70) ในปี ค.ศ. 2009 ที่ประเทศญี่ปุ่น มีการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่างอุจจาระในคนที่ไม่มีอาการป่วย (71) ด้วยวิธีการตรวจแอนติเจน และตรวจยีน 16S rRNA ด้วยวิธี Real-Time PCR เพื่อยืนยันผลอีกครั้ง และได้ทำการตรวจยีน *cagA* อีกด้วย พบว่าอัตราการติดเชื้อในคนที่ไม่มีอาการป่วยคิดเป็น 37.5 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบยีน *cagA* คิดเป็น 18.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็น type ที่มีความรุนแรงในเอเชียกลาง ซึ่งเทคนิคอณูชีววิทยานี้ สามารถตรวจสอบระดับวิทยาในคนที่ไม่มีอาการป่วยได้ (71) มีรายงานการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่าง gastric biopsy ด้วยวิธี PCR โดยใช้ 3 ยีน คือ 16S rRNA, *glmM* และ *cagA* พบว่าการใช้ยีน *glmM* เป็นยีนที่มีความน่าเชื่อถือมากที่สุด เนื่องจากมีความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก (Positive predictive value, PPV) และ ค่าทำนายผลลบ (Negative predictive value, NPV) มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี histology คือ 92.9, 78.6, 68.4 และ 95.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (72)

1.6.2.3.3 เทคนิค LAMP

มีรายงานในปี ค.ศ. 2006 เริ่มมีการใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับเทคนิคการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Brushing ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* โดยการตรวจสอบบริเวณยีน

glmM พบว่าวิธี LAMP สามารถตรวจหาเชื้อต่ำสุดที่ 10^2 CFU/ml มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (35)

ข้อเสนอแนะสำหรับกลุ่มผู้ป่วยในการตรวจหาและกำจัดเชื้อ *H. pylori* มีดังนี้

1.6.3 กลุ่มผู้ป่วยที่แนะนำว่าควรตรวจหาเชื้อและกำจัดเชื้อ *H. pylori* (2)

แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

1.6.3.1 ผู้ป่วยที่ต้องทำการตรวจหาเชื้อและกำจัดเชื้อ

คือ บุคคลที่มีคุณสมบัติดังนี้ ได้แก่ ผู้ป่วยโรคแผลเปปติก ผู้ป่วยที่มีการอักเสบของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมรุนแรง ผู้ป่วยที่ตรวจพบมีภาวะ atrophic gastritis ผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัวเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร ผู้ป่วยหลังผ่าตัดมะเร็งกระเพาะอาหารระยะแรก และผู้ป่วยมะเร็งน้ำเหลืองชนิด MALT lymphoma

1.6.3.2 ผู้ป่วยที่ควรตรวจหาเชื้อและกำจัดเชื้อ

คือ บุคคลที่มีคุณสมบัติดังนี้ ได้แก่ ผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม NSAIDs หรือ aspirin ในระยะยาว ผู้ป่วยที่มีประวัติครอบครัวเป็นแผลในลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenal ulcer) ผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ไม่มีแผล และผู้ป่วยที่ต้องการตรวจ

1.7 การรักษา

การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* มีหลายวิธี เช่น Standard triple therapy ซึ่งจะเริ่มต้นการรักษาด้วยวิธี First line therapy อ้างอิงตามรายงานของ Maastricht IV ประกอบด้วย ยาลดกรด ร่วมกับยาปฏิชีวนะอีก 2 ชนิด คือ อะม็อกซิซิลลิน และ คลาริโธรมัยซิน สำหรับผู้ป่วยที่แพ้ยาเพนิซิลลินให้ใช้ เมโทรนิดาโซล แทน อะม็อกซิซิลลิน เป็นเวลา 10-14 วัน (7) นอกจากนี้ยังมีการรักษาด้วยวิธี First line therapy อื่นๆ อีก ที่เป็นทางเลือก ได้แก่ Bismuth quadruple therapy ประกอบด้วย ยาลดกรด, Bismuth citrate ร่วมกับยาปฏิชีวนะอีก 2 ชนิด คือ เมโทรนิดาโซล และ เตตราซัยคลิน เป็นเวลา 10-14 วัน และวิธี Sequential therapy ซึ่งจะประกอบไปด้วย Dual therapy คู่กับ Standard triple therapy ประกอบด้วย ยาลดกรด ร่วมกับ อะม็อกซิซิลลิน เป็นเวลา 5 วัน และรักษาต่อยาลดกรด ร่วมกับยาคลาริโธรมัยซิน และ เมโทรนิดาโซล เป็นเวลา 5 วัน แต่การรักษาแบบนี้ใช้ไม่ได้ ในผู้ป่วยที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน และดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ร่วมกับ เมโทรนิดาโซล (73)

ถึงแม้ในปัจจุบันอัตราความสำเร็จในการรักษาด้วยวิธี Standard triple therapy ได้ลดลงในหลายภูมิภาคก็ตาม แต่ก็ยังเป็นวิธีการรักษาที่ยังแนะนำให้ใช้อยู่สำหรับในพื้นที่ที่มีอัตราการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ตามรายงานของ Maastricht IV (20) มีรายงานว่า การรักษาแบบ First line therapy ไม่ได้ผลถึงเกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ (74) จึงต้องปรับเปลี่ยนเป็นการ

รักษาด้วย Second line therapy และ Rescue therapy ต่อไป การให้ยารักษาหลังการติดเชื้ออ้างอิงตาม National Medicines Information Centre (8) และอ้างอิงตามรายงานของ Maastricht IV (75) ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการให้ยารักษาหลังการติดเชื้อ *H. pylori* ตามอ้างอิงตาม National Medicines Information Centre (8)

การรักษา	การให้ยา	ระยะเวลา(วัน)
1. First line therapy	ยาลดกรด 2 ครั้งต่อวัน + อะม็อกซิซิลลิน 1 กรัม 2 ครั้งต่อวัน + คลาริโธรมัยซิน 500 มิลลิกรัม 2 ครั้งต่อวัน	10-14
	หมายเหตุ: สำหรับผู้ป่วยที่แพ้ เพนิซิลลิน ให้ใช้ เมโทรนิดาโซล 400 มิลลิกรัม แทน อะม็อกซิซิลลิน	
2. Second line therapy	ยาลดกรด 2 ครั้งต่อวัน + เลโวฟลอกซาซิน 500 มิลลิกรัม 2 ครั้งต่อวัน + อะม็อกซิซิลลิน 1 กรัม 2 ครั้งต่อวัน	10
	หมายเหตุ: สำหรับผู้ป่วยที่แพ้ เพนิซิลลิน ให้ใช้ คลาริโธรมัยซิน แทน อะม็อกซิซิลลิน	
3. Rescue therapy	ผู้ป่วยควรรักษาด้วยการส่องกล้อง (endoscopy) และการรักษาขึ้นอยู่กับผลการทดสอบความไว (susceptibility testing)	-

2. อุบัติการณ์การดื้อยาของเชื้อ *H. pylori*

ในปัจจุบันพบว่าอัตราการดื้อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นสูงทั่วโลก ทำให้การรักษาประสบความสำเร็จลดลง โดยพบว่าการดื้อยา เมโทรนิดาโซล, คลาริโธรมัยซิน, อะม็อกซิซิลลิน, เลโวฟลอกซาซิน, เตตราซัยคลิน, ไรฟาบูติน และ ดื้อยาหลายชนิด คิดเป็น 26.7, 17.2, 11.2, 16.2, 5.9, 1.4 และ 9.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (9) ประเทศไทยในปี ค.ศ. 2013 พบว่าการดื้อยาเมโทรนิดาโซล, คลาริโธรมัยซิน, อะม็อกซิซิลลิน, เลโวฟลอกซาซิน, เตตราซัยคลิน, ซิโพรฟลอกซาซิน และ ดื้อยาหลายชนิด คิดเป็น 36.0, 3.7, 5.2, 7.2, 1.7, 7.7 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (10) อุบัติการณ์การดื้อยา คลาริโธรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori* ทั่วโลก มีอัตราที่เพิ่มสูงมากขึ้น (76, 77) และพบว่าการดื้อยา

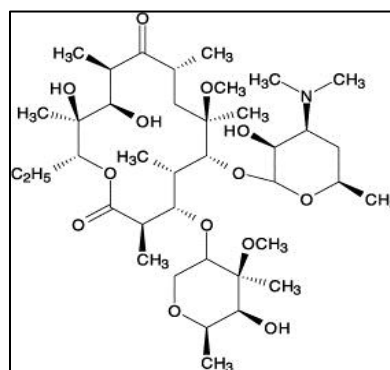
คลาริโธรมัยซินทำให้การรักษาแบบ First line therapy มีประสิทธิภาพลดลงในช่วงหลายปีที่ผ่านมา (78) และเมื่อเชื้อเกิดการดื้อต่อยาคลาริโธรมัยซิน ก็จะสามารถทำให้ดื้อต่อยา generation ที่สูงกว่าได้ โดยมีรายงานว่าถ้าเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน จะทำให้ดื้อยาในกลุ่ม quinolone ได้ (15, 19)

การดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori* มีความแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคประเทศ เช่น ในยุโรปคิดเป็น 11.1 เปอร์เซ็นต์ ในเอเชียคิดเป็น 18.9 เปอร์เซ็นต์ ในอเมริกาคิดเป็น 29.3 เปอร์เซ็นต์ ในยุโรปพบการดื้อยามากที่สุดที่ประเทศสเปน และการดื้อยาต่ำสุดที่ประเทศสวีเดนและเนเธอร์แลนด์ และในเอเชียพบว่าประเทศจีนและญี่ปุ่นมีอัตราการดื้อยาในระดับที่สูง คิดเป็น 84.9 และ 40.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าประเทศมาเลเซียมีอัตราการดื้อยาต่ำสุด คิดเป็น 2.1 เปอร์เซ็นต์ (9, 18) สำหรับประเทศไทยมีอัตราการดื้อยาที่ไม่สูงมากนัก จากรายงานวิจัยในปี ค.ศ. 2008 ประเทศไทยพบการดื้อยา คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (79) และในปี ค.ศ. 2013 พบการดื้อยา คิดเป็น 3.7 เปอร์เซ็นต์ (10)

3. ยาปฏิชีวนะคลาริโธรมัยซิน (Clarithromycin)

3.1 โครงสร้างยา

ยาคลาริโธรมัยซิน มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{38}H_{69}O_{13}$ จัดเป็นยาปฏิชีวนะในกลุ่ม มาโครไลด์ มีสรรพคุณใช้รักษาโรคต่อมทอลซิลอักเสบ กลองเสียงอักเสบ หลอดลม อักเสบ ปอดบวม และการติดเชื้อ *H. pylori* ของกระเพาะอาหาร มีกลไกการออกฤทธิ์ โดยจะไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเติบโตไม่ได้ (Bacteriostatic activity) (14) ซึ่งโครงสร้างของยาคลาริโธรมัยซิน ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของยาคลาริโธรมัยซิน (80)

3.2 กลไกการดื้อยา

ยาคลาริโทรรมัยซิน มีกลไกการออกฤทธิ์ โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียเจริญเติบโตไม่ได้ การดื้อยาเกิดจากการเปลี่ยนแปลง target site ที่ 23S rRNA โดยขบวนการ methylation หรือเกิดการกลายพันธุ์ที่ Domain V บริเวณ Peptidyltransferase region ของ 23S rRNA (11, 12) มีรายงานที่ประเทศสเปน ในปี 2011 พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142G, A2143G, T2182C, A2143G+T2182C และ A2142G+T2182C คิดเป็น 5.8, 76.5, 5.8, 8.8 และ 2.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (14) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ของ 23S rRNA ตำแหน่งอื่นๆ ได้แก่ A2115G, G2141A, C2147G, T2190C, C2195T, A2223G และ C2694A (81, 82)

จากการศึกษาในหลายๆ ประเทศพบว่า ตำแหน่ง A2143G เป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์มากที่สุด พบได้ตั้งแต่ 76.5-96.5 เปอร์เซ็นต์ (13-16, 83, 84) โดยมีรายงานว่าการศึกษาเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ในชาวสเปน พบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G พบมากที่สุดคิดเป็น 85.3 เปอร์เซ็นต์ (14) การตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา quinolone และ คลาริโทรรมัยซิน ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G พบมากที่สุด คิดเป็น 96.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2142G เพียง 3.5 เปอร์เซ็นต์ (15) การตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน ในผู้ป่วยที่เป็น Dyspeptic ในประเทศอิหร่าน พบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G พบมากที่สุด คิดเป็น 93.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2144G เพียง 3.1 เปอร์เซ็นต์ (16) การศึกษาการกลายพันธุ์ที่บริเวณ 23S rRNA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยา คลาริโทรรมัยซิน ในประเทศเกาหลีใต้ พบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G พบมากที่สุด จำนวน 8 สายพันธุ์ ในขณะที่พบตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ T2182C เพียง 4 สายพันธุ์ (83)

มีรายงานว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G มีมากกว่าตำแหน่ง A2142G หรือ A2142C ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้การรักษาประสบความสำเร็จอย่างมีนัยสำคัญ (17) โดยพบว่าอัตราความสำเร็จหลังจากรักษาด้วยวิธี Standard triple therapy และ วิธี Sequential therapy พบการกลายพันธุ์ที่ A2143G ประสบความสำเร็จในการรักษา คิดเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ตำแหน่ง A2142G หรือ A2142C ประสบความสำเร็จในการรักษา คิดเป็น 93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าในการรักษาแบบ Sequential therapy เมื่อเทียบกับวิธี Standard triple therapy พบว่ากลายพันธุ์ที่ A2143G ประสบความสำเร็จอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับตำแหน่ง A2142G หรือ A2142C (17)

3.3 เทคนิคการตรวจวิเคราะห์การดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori*

ปัจจุบันการทดสอบการดื้อยาของเชื้อมีหลายวิธี ได้แก่ วิธี Agar dilution หรือวิธีของ Epsilometer (E-Test) เป็นวิธีที่ยุ่งยาก สิ้นเปลืองเวลามาก และมีความไวต่ำ ต่อมาจึงได้นำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา โดยมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธี Hybridization probe, Fluorescent in-situ hybridization, วิธี fluorescence resonance energy transfer (FRET), Polymerase Chain Reaction (PCR) และ วิธีการหาลำดับเบส (Sequencing) (22, 84, 85) ทำให้การตรวจวิเคราะห์รวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละวิธีดังนี้

3.3.1 วิธี Agar dilution หรือ วิธี Epsilometer (E-Test)

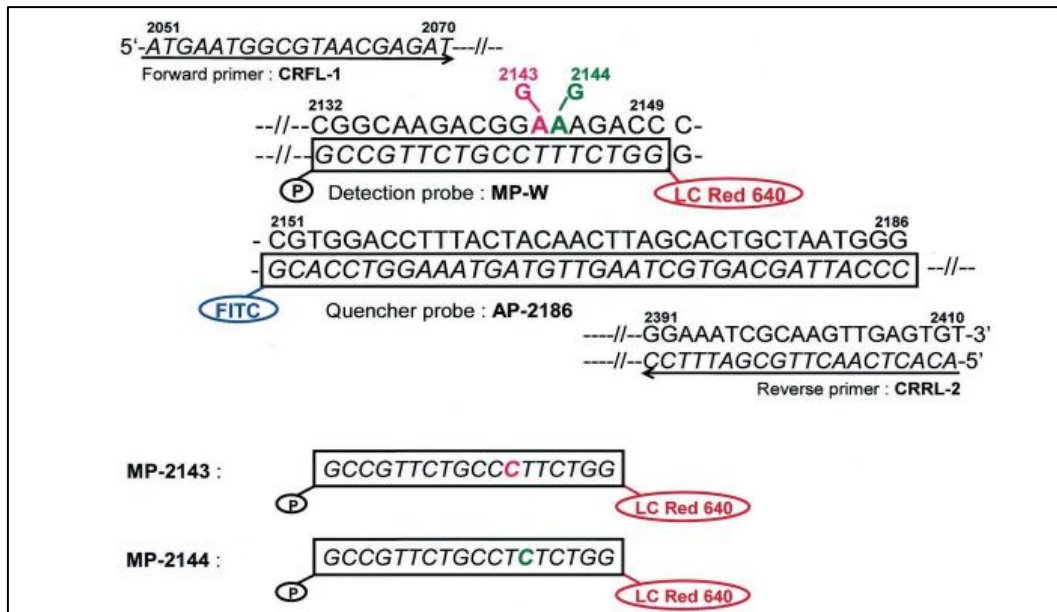
วิธีมาตรฐานในการทดสอบความไว (Antimicrobial Susceptibility Testing) ต่อยาคลาริโทรรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori* ตามมาตรฐานของ CLSI ปี ค.ศ. 2010, CLSI document M45-A2, Volume 30, No. 18 จะใช้วิธี Agar dilution หรือ วิธี Epsilometer (E-Test) มีเกณฑ์การแปลผล คือ ถ้ามีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถือว่าเชื้อดื้อยา (21) วิธี Agar dilution หรือ วิธี E-Test มีข้อดีคือ มีความจำเพาะสูง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ความไวค่อนข้างต่ำ (62, 63) มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน 10-14 วัน (21, 86)

3.3.2 วิธี Fluorescence in situ hybridisation (FISH) และ Hybridization probe

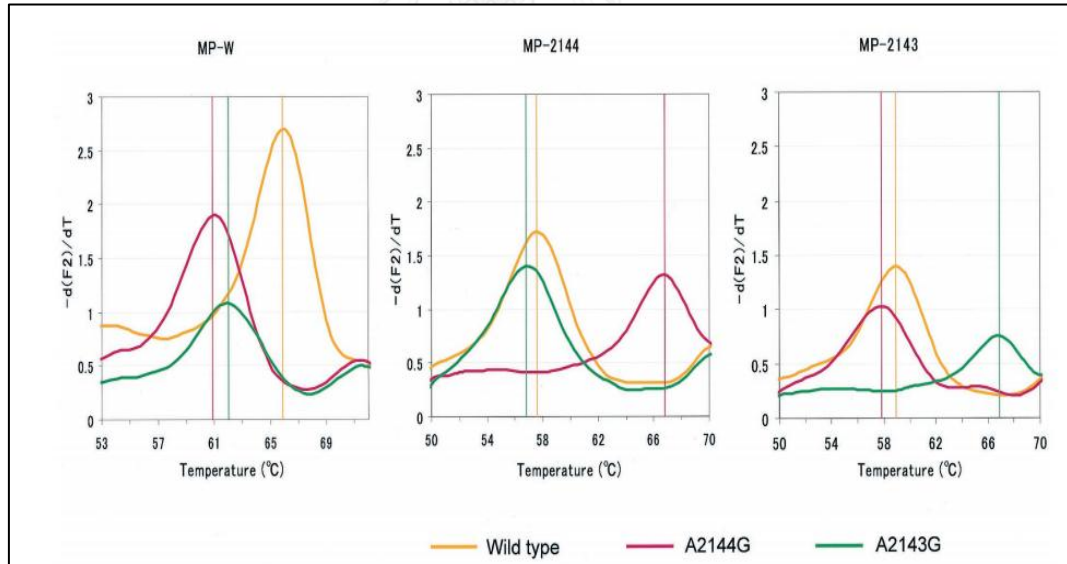
วิธี Fluorescence in situ hybridisation (FISH) และ Hybridization probe พบว่ามีความไวและความจำเพาะคิดเป็น 84.2 และ 90.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (22-24) มีข้อดีคือ เป็นเครื่องมือที่ราคาไม่แพง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก มีข้อเสียคือมีขั้นตอนยุ่งยากและเสียเวลาในการติด probe มีรายงานการตรวจหาตำแหน่ง 16S rRNA และ 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยจะทำการติดฉลากสารเรืองแสงกับ oligonucleotide โดยตำแหน่ง 16S rRNA จะติดฉลากด้วย fluorochrome Cy3 ซึ่งให้สีแดง และตำแหน่ง 23S rRNA จะติดฉลากด้วย fluorescein ซึ่งให้สีเขียวจากนั้นทำการ hybridization และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (22, 24) วิธีการตรวจโดยใช้หลักการ Hybridization probe เป็นอีกวิธีหนึ่ง จากการศึกษาพบว่าสามารถใช้วิธี excimer-forming DNA probe ในตรวจสอบ SNP ที่บริเวณ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2144G และ A2143G ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซินได้ (23)

3.3.3 วิธี Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

พบว่าวิธี Real-Time FRET-PCR มีความไวและความจำเพาะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 และ 80.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (26) มีข้อดีคือ มีความไวและความจำเพาะสูงแต่มีข้อเสีย คือ มีค่าใช้จ่ายสูง วิธีนี้มีหลักการคือ ใช้ probe 2 ตัว ซึ่งเป็นสาร fluorochrome ที่เปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์แตกต่างกัน ติดที่ DNA ที่ต้องการตรวจสอบ เมื่อ probe ตัวแรก (Quencher) ถูกกระตุ้นด้วยแสงพลังงานสูง จะดูดพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงานให้ probe ตัวที่สอง (reporter dye) และจะตรวจสอบปริมาณแสงที่เปล่งออกมา มีรายงานวิจัยการตรวจสอบตำแหน่งกลายพันธุ์ของ *H. pylori* ที่ตำแหน่ง A2143C และ A2143G โดยการติด probe 2 ตัว โดยที่ใช้ SYBR Green I เป็น probe ตัวที่ 1 และ probe ตัวที่ 2 จะติด fluor dye Cy5 ทางด้านปลาย 5' และติดด้วย biotin ทางด้านปลาย 3' จากนั้นเมื่อเกิดขบวนการ Hybridization probe ตัวที่ 2 จะมีการเปล่งแสงออกมา และตรวจวัดได้ ซึ่งจะทำให้มี melting point (T_m) ที่แตกต่างกัน โดย wild type จะมี melting peak ที่สูงกว่า mutant type และสำหรับ mutant type แต่ละตำแหน่งจะมี melting peak ที่แตกต่างกันด้วย (87) มีการศึกษาตำแหน่งกลายพันธุ์ของ *H. pylori* บริเวณ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G และ A2144G โดยใช้ probe 2 ตัว คือ ใช้ fluorescein เป็น probe ตัวที่ 1 และ probe ตัวที่ 2 จะติดสาร LC-Red 640 ทางด้านปลาย 5' และติด phosphate ทางด้านปลาย 3' จากนั้นเมื่อเกิดขบวนการ Hybridization probe ตัวที่ 2 ถูกกระตุ้น จะปลดปล่อยพลังงานออกมา ทำให้มี melting point (T_m) ของ wild type และ mutant type แตกต่างกัน โดย wild type จะมี melting peak ที่สูงกว่า mutant type และสำหรับ mutant type แต่ละตำแหน่งจะมี melting peak ที่แตกต่างกันด้วย (88, 89) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และ 2.5



รูปที่ 2.4 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์และ probe ของหลักการ FRET (88)

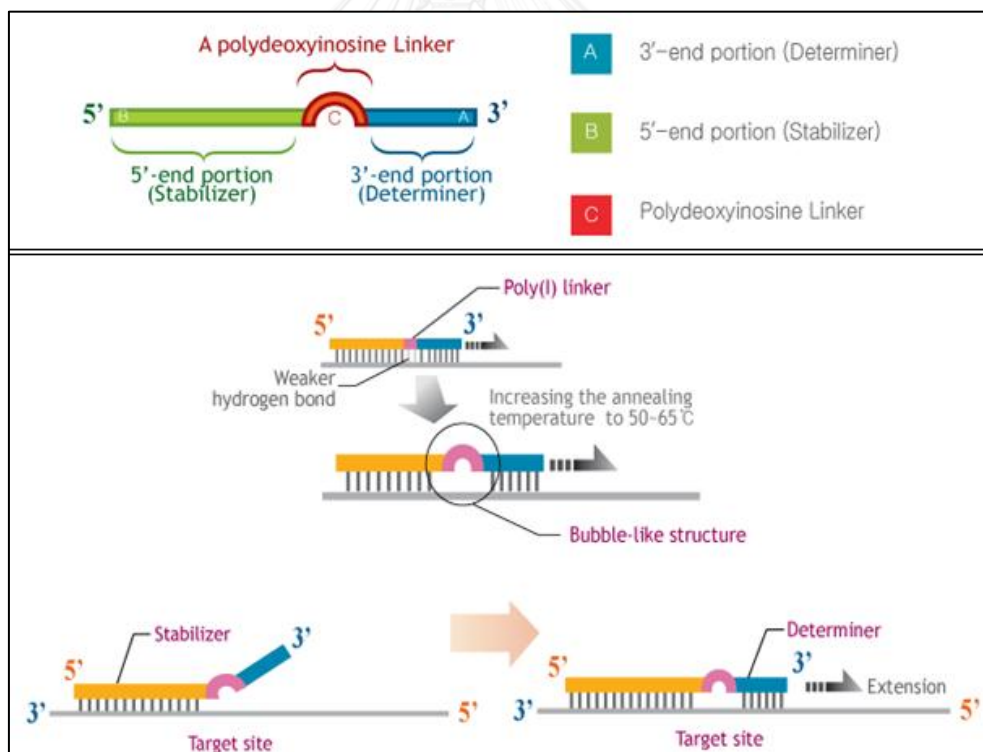


รูปที่ 2.5 แสดง Melting curve ของ Wild type, A2144G และ A2143G ของหลักการ FRET (88)

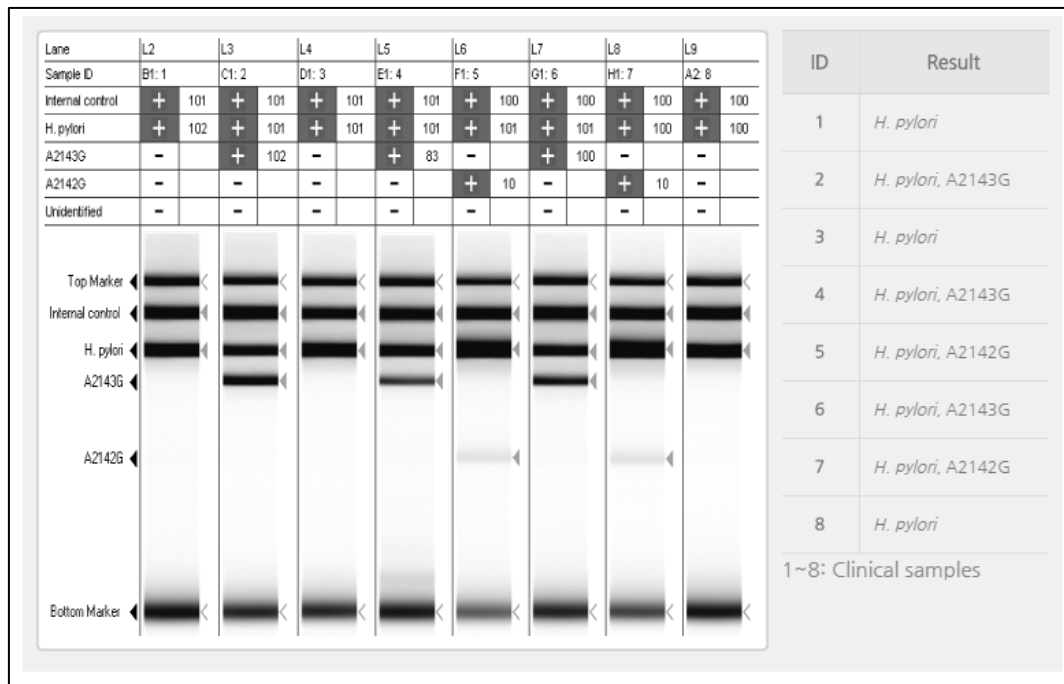
3.3.4 วิธีของ Dual priming oligonucleotide PCR (DPO PCR)

วิธีของ Dual priming oligonucleotide PCR (DPO PCR) ซึ่งเป็นชุดทดสอบทางการค้าชื่อ Seplex® ClaR-*H. pylori* เป็นเทคนิค multiplex PCR โดยใช้ DPO primer ที่

ความยาวประมาณ 35 bp ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ขนาด คือ 5'-end stabilizer ที่มีความยาว 20 bp และ 3'-end determiner ที่มีความยาว 10 bp และมี polydeoxyinosine linker ที่มีความยาว 5 bp เชื่อมระหว่างไพรเมอร์ทั้ง 2 ขนาด ดังแสดงดังรูปที่ 2.6 ซึ่งสามารถตรวจตำแหน่งกลายพันธุ์ได้ 2 ตำแหน่ง คือ A2142G และ A2143G สามารถตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่าง gastric biopsy โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ วิธีการตรวจสอบผลผลิตเป็นแบบ Auto-capillary Electrophoresis โดยมีการแปลผล ดังนี้ ถ้าเป็นเชื้อ *H. pylori*, *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G และ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142G รูปแบบของการแสดงผลอยู่ในช่องที่ 1, 2 และ 5 ตามลำดับ ดังแสดงดังรูปที่ 2.7 มีข้อดี คือเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง ไม่มี non specific band มีความรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย โดยพบว่า วิธี DPO PCR มีความไวและความจำเพาะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 97.7 และ 83.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีข้อเสีย คือ ชุดทดสอบมีราคาแพง (26)



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของไพรเมอร์ของหลักการ DPO PCR (90)



รูปที่ 2.7 แสดงการแปลผลของของ DPO PCR (90)

3.3.5 วิธี Polymerase Chain Reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการของการทำ PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) วิธี PCR-RFLP มีข้อดีคือ มีความไวและความจำเพาะสูง คิดเป็น 89 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (91) เป็นวิธีที่รวดเร็วเนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย ซึ่งในปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยมนำมาตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา คลาริโธรมัยซิน (85) แต่มีข้อเสีย คือ เป็นวิธีที่จำเป็นต้องอาศัยบุคลากรที่ชำนาญ และจำเป็นต้องมีเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycler) จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ตรวจในห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่มีเครื่อง Thermal cycler มีรายงานการตรวจหา *H. pylori* ที่ดื้อยา คลาริโธรมัยซิน ที่ตำแหน่ง A2143G และ A2144G โดยการใช้เอนไซม์ *Bsa*I และ *Mbo*II ตามลำดับ (92) วิธี PCR-RFLP สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่างน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และ gastric biopsy ได้โดยตรง โดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร (93) และมีการพัฒนาให้วิธีมีความเร็วและความจำเพาะมากขึ้นโดยใช้หลักการ 3' Mismatched PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142C (94)

3.3.6 วิธี PCR และ Real time PCR

วิธี PCR และ Real-Time PCR เป็นวิธีที่มีข้อดี คือ มีความไวและความจำเพาะสูง รวดเร็วเนื่องจากไม่จำเป็นต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเชื้อ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นน้อย (27, 28) มีรายงานว่า มีการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่าง gastric biopsy ที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน และ เตตราซัยคลิน ซึ่งการศึกษานี้พบว่าวิธี PCR สามารถตรวจหาเชื้อดื้อยาได้ โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ (25) นอกจากนี้มีรายงานว่า การใช้วิธี PCR ในการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน ในตัวอย่าง gastric biopsy ซึ่งเป็นวิธีที่ลดอัตราความล้มเหลวในการรักษาได้ (95) สำหรับวิธี Real-Time PCR ใช้หลักการเช่นเดียวกับวิธี PCR แต่สามารถวัดเชิงปริมาณได้ มีรายงานว่าวิธี Hybridization Real-Time PCR เป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงในการตรวจยีนดื้อยาที่บริเวณ 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยพบว่ามีมีความไวและความจำเพาะคิดเป็น 95.6 และ 94.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (96) วิธี PCR มีข้อเสีย คือ ใช้เวลานาน ขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยาก เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเนื่องจากมีขั้นตอนหลัง PCR ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และไม่สามารถแยกผลผลิตที่มีขนาดเท่ากันได้ (25) สำหรับวิธี Real-Time PCR มีข้อดี คือ วัดปริมาณผลผลิต PCR ได้โดยตรง สามารถทำการเพิ่มปริมาณและการตรวจวัดในขั้นตอนเดียว มีความรวดเร็วกว่าวิธี PCR มีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี PCR และสามารถแยกความแตกต่างเพียง 1 เบสได้ แต่มีข้อเสีย คือ เครื่องมือราคาแพงและจำเป็นต้องมีบุคลากรที่มีความชำนาญมากกว่าวิธี PCR (27, 28)

3.3.7 วิธีการหาลำดับเบส (Sequencing)

วิธีการหาลำดับเบส ข้อดี คือ เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงและเป็นวิธีที่รวดเร็ว มีรายงานการตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน ด้วยวิธี pyrosequencing มีความไวและความจำเพาะคิดเป็น 75 และ 98.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธี E-test ซึ่งเป็น gold standard แต่ก็มีข้อเสียคือ ขั้นตอนยุ่งยาก ราคาตรวจวิเคราะห์แพง (30) ในปี ค.ศ. 2014 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา มีรายงานการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* ในเด็ก โดยการหาลำดับเบสจากตัวอย่าง Gastric biopsy จำนวน 38 ตัวอย่าง พบว่ามีการกลายพันธุ์คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเชื้อทั้งหมด ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ A2142G หรือ A2143G โดยพบที่ตำแหน่ง A2143G มากกว่า A2142G และพบว่าอัตราการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นอัตราการดื้อยาที่สูงขึ้น ซึ่งรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าอัตราการดื้อยาน้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (97) ในปี ค.ศ. 2011 ที่ประเทศญี่ปุ่น มีรายงานการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยการหาลำดับเบส ซึ่งใช้ตัวอย่าง Gastric biopsy และน้ำล้างกระเพาะ (Gastric wash) จำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่ามีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2144G คิดเป็น

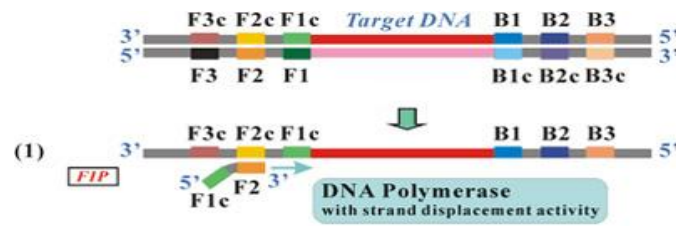
34.3 เปอร์เซนต์ ไม่พบตำแหน่ง A2142G หรือ A2143G และพบเป็น wild type คิดเป็น 65.7 เปอร์เซนต์ (98)

4. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

4.1 หลักการของ LAMP

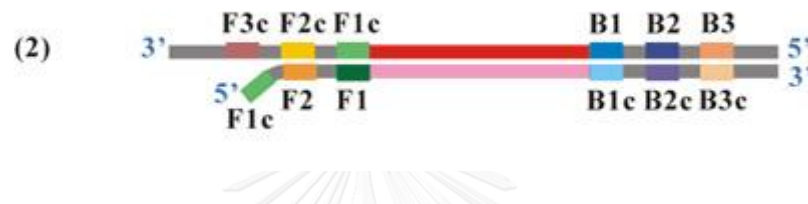
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ คิดค้นโดย Notomi และคณะ (31) ซึ่งเป็นเทคนิคในการเพิ่มจำนวนของ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ ภายใต้อุณหภูมิเดียว คือ ที่ 60-65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30-60 นาที โดยใช้เอนไซม์ *Bst* DNA Polymerase ที่มีคุณสมบัติ 5'→3' Polymerase และคุณสมบัติการแทนที่ (Strand Displacement) แต่จะขาดคุณสมบัติ 3'→5' Exonuclease (99) ซึ่งแตกต่างจากการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ไม่มีคุณสมบัติการแทนที่ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่อง Thermo cycle เหมือนกับการทำด้วยเทคนิค PCR เป็นวิธีที่สะดวกเพราะสามารถใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) หรืออ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) สามารถอ่านผลการทดสอบได้ด้วยตาเปล่าโดยดูจากความขุ่นหรือใช้สารเรืองแสง เช่น SYBR Green I เป็นต้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ถึง 10^9 copies เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะสูง เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ 4-6 เส้น ได้แก่ Forward Inner Primer (FIP), Backward inner primer (BIP), Outer Forward Primer (F3) และ Outer Backward Primer (B3) นอกจากนี้อาจมี Loop Primer เพิ่มอีก ซึ่งประกอบไปด้วย Loop Primer Forward (LF) และ Loop Primer Backward (LB) เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ปริมาณมากขึ้น วิธี LAMP มีข้อดี คือ เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ราคาถูก มีความไวและความจำเพาะสูง (100) แต่มีข้อเสีย คือ การออกแบบไพรเมอร์มีขั้นตอนยุ่งยาก เนื่องจากมีไพรเมอร์ 4-6 เส้น และสำหรับไพรเมอร์ที่มีความยาวมากๆ ได้แก่ FIP และ BIP ควรใช้ความบริสุทธิ์ชนิด HPLC ซึ่งมีราคาแพงกว่าประเภทอื่นๆ (101) ขั้นตอนของปฏิกิริยา LAMP มีดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เมื่อเข้าสู่สภาวะที่เหมาะสม คือที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase และคุณสมบัติการแทนที่ไพรเมอร์ FIP ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ F1c และ F2 จะเข้าจับที่บริเวณตำแหน่ง F2c ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงขั้นตอนที่ 1 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ (102)

ขั้นตอนที่ 2 เกิดการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอแม่แบบ โดยอาศัยคุณสมบัติของการแทนที่ของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase จาก F2 ถึง B3c ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงขั้นตอนที่ 2 ของปฏิกิริยา LAMP ในการจับของไพรเมอร์ FIP ที่บริเวณ F2 (102)

ขั้นตอนที่ 3 ไพรเมอร์ F3 จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่แบบที่บริเวณ F3c ซึ่งจะอยู่ด้านนอกของไพรเมอร์ FIP จากนั้นเริ่มการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอเส้นใหม่ แทนที่เส้นเดิมแล้วปล่อยเส้นที่เป็นคู่สมกับเส้นที่ไพรเมอร์ FIP สังเคราะห์เส้นแรกออกมา ดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แสดงขั้นตอนที่ 3 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ F3 (102)

ขั้นตอนที่ 4 จะเกิดเป็นดีเอ็นเอสายคู่ จากการสังเคราะห์ของไพรเมอร์ F3 ดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 แสดงขั้นตอนที่ 4 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอหลังการทำงานของ

ไพรเมอร์ F3 (102)

ขั้นตอนที่ 5 สายดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกปล่อยออก จากสายที่เป็นคู่สมกับเส้นที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ FIP จะเข้าจับกันเป็นห่วง ที่ปลาย 5' เนื่องจากเป็นเบสคู่สมกันระหว่าง F1 และ F1c ดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 แสดงบริเวณของผลผลิต LAMP ที่สามารถจับกันเป็นห่วง (stem-loop) ที่ปลาย 5'(102)

ขั้นตอนที่ 6 ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากขั้นตอนที่ 5 จะเป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการทำงานของไพรเมอร์ BIP โดยจะเข้าจับที่ปลาย 3' จากนั้นสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีลำดับเบสคู่สมกันไปจนถึงบริเวณที่จับกันเป็นห่วง ซึ่งจะทำให้กลับคืนเป็นเส้นตรง ไพรเมอร์ B3 จะเข้ามาจับบริเวณ B3c ซึ่งอยู่ด้านนอกของไพรเมอร์ BIP แล้วสร้างสายดีเอ็นเอเส้นใหม่ แทนที่เส้นที่สร้างจาก ไพรเมอร์ BIP ก่อนหน้านี้ จากนั้นปล่อยดีเอ็นเอสายเดี่ยวหลุดออกมาดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 แสดงขั้นตอนที่ 6 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าจับของไพรเมอร์ BIP และ B3 (102)

ขั้นตอนที่ 7 จะได้ดีเอ็นเอสายคู่หลังจากเกิดการสังเคราะห์ในขั้นตอนที่ 6 ดังรูปที่ 2.14



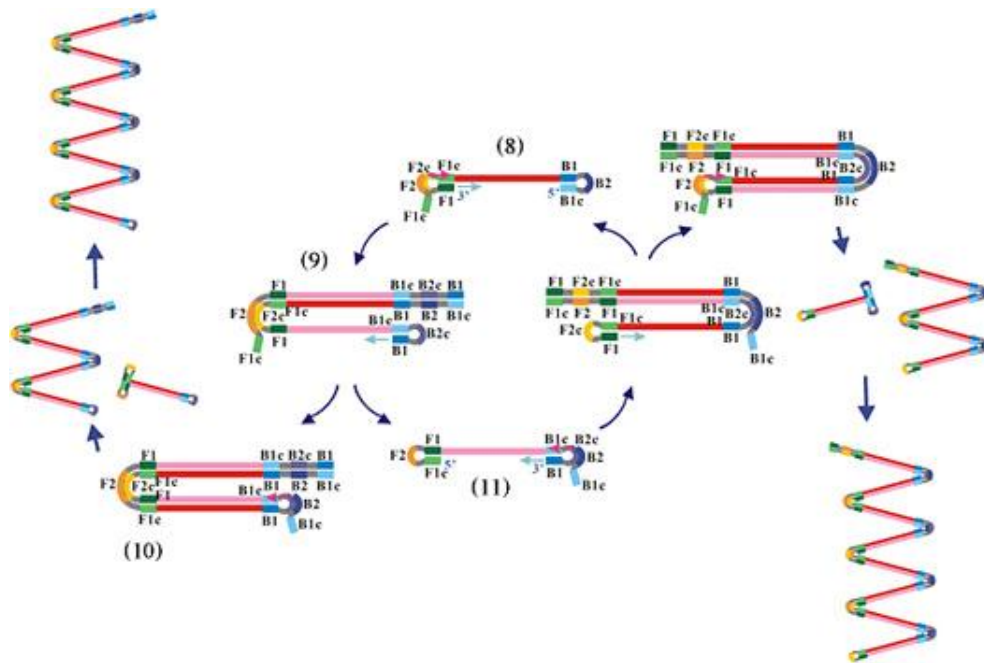
รูปที่ 2.14 แสดงขั้นตอนที่ 7 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ (102)

ขั้นตอนที่ 8 สายดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมจากการสร้างด้วยไพรเมอร์ BIP ที่ถูกปล่อยออก โดยการแทนที่ในขั้นตอนที่ 6 จะจับกันเป็นห่วง ที่ปลายทั้งสองข้างของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายกับดัมเบล (dumbbell) โครงสร้างนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณของปฏิกิริยา LAMP เป็นรอบๆ (LAMP cycling) ดังรูปที่ 2.15



รูปที่ 2.15 แสดงขั้นที่ 8 ของปฏิกิริยา LAMP ของโครงสร้างหลักที่เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป็นรอบๆ (102)

ขั้นตอนที่ 8-11 ดังรูปที่ 2.16 ในขั้นตอนที่ 8 จะเริ่มการสร้างจากโครงสร้างดัมเบล คือ 3'-F1-F2c-F1c---B1-B2-B1c-5' การสร้างจะเริ่มที่ปลาย 3' โดยใช้สายดีเอ็นเอของตัวเองเป็น template และเริ่มการสร้างต่อด้าน F1 ส่วนสีแดง-B1-B2-B1c-5' คือ template ในการสร้าง ในขั้นตอนที่ 8 ส่วนสีชมพู-B1c-B2c-B1-3' คือส่วนที่สร้างได้ใหม่ ขั้นตอนนี้จะได้ดีเอ็นเอ 1 เส้น ดีเอ็นเอส่วนที่เป็น template และส่วนที่สร้างใหม่ยังเป็นเส้นเดียวกัน คือ 5'-B1c-B2-B1-ส่วนสีแดง-F1c-F2c-F1-ส่วนสีชมพู-B1c-B2c-B1-3' เรียกว่าเส้นที่ 1 ขณะเดียวกันขั้นตอนที่ 9 โปรเมอร์ FIP จะจับที่บริเวณ F2c และมีการสังเคราะห์ พร้อมกับการแทนที่เส้นเดิมที่สังเคราะห์ก่อนให้หลุดออกมา พร้อมกัน ได้ดีเอ็นเอเพิ่มอีก 1 เส้น คือ 5'-F1c-F2-F1-ส่วนสีชมพู-B1c-B2c-B1-3' เรียกว่าเส้นที่ 2 มีความยาวสั้นกว่าเส้นที่ 1 เมื่อเส้นที่ 2 สร้างจนสุดปลายที่ปลาย 3' เส้นที่ 1 จะถูกแทนที่และหลุดออกเป็นสายเดี่ยว ทำให้ B1 วนกลับมาจับกับ B1c เป็นห่วง และเริ่มการสังเคราะห์ในขั้นตอนที่ 10 โดยใช้ template เป็น B1c-F1-F2c-F1c---B1-B2-B1c ได้เป็นเส้นที่มีความยาวกว่าเดิม 4 เท่า ในขณะที่สร้างเกิดการแทนที่ทำให้เส้นที่ 2 หลุดออกมา ดังขั้นตอนที่ 11 ต่อมาในขั้นตอนที่ 11 เส้นที่ 2 จะเริ่มเป็นโครงสร้างดัมเบลเหมือนกับขั้นตอนที่ 8 แต่ต่างกันที่เป็นเส้นคู่สมกัน และจะเริ่มการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' โดยมี B1 เป็นโปรเมอร์ และสร้างโดยใช้ template คือ B1c---F1, F2, F1c ได้เป็นดีเอ็นเอที่มีความยาวเป็น 2 เท่าของขั้นตอนที่ 8 ขณะเดียวกันก็จะมีโปรเมอร์ BIP มาจับที่ตำแหน่ง B2c และเริ่มการสังเคราะห์ พร้อมกับการเกิดการแทนที่ ทำให้เส้นเดิมหลุดออก ทำให้ได้ ดีเอ็นเอเส้นที่ 3 ซึ่งจะเหมือนกับขั้นตอนที่ 8 และที่ปลาย 3' จะมีการสังเคราะห์ต่อไปเรื่อยๆ (102)



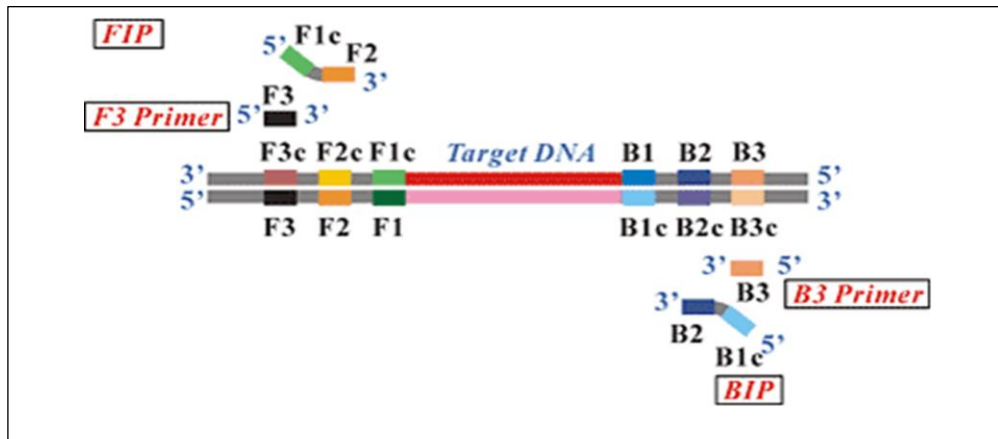
รูปที่ 2.16 แสดงขั้นตอนที่ 8-11 ของปฏิกิริยา LAMP ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบๆ (102)

4.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP

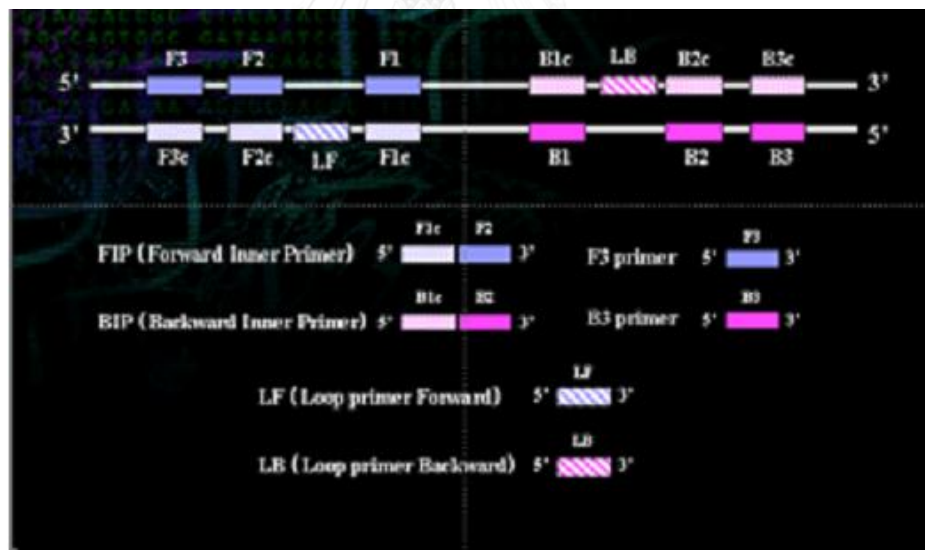
การออกแบบไพรเมอร์ LAMP แบ่งเป็น 2 แบบ คือ

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์ LAMP แบบมาตรฐาน [Standard primer design (Easy mode)]

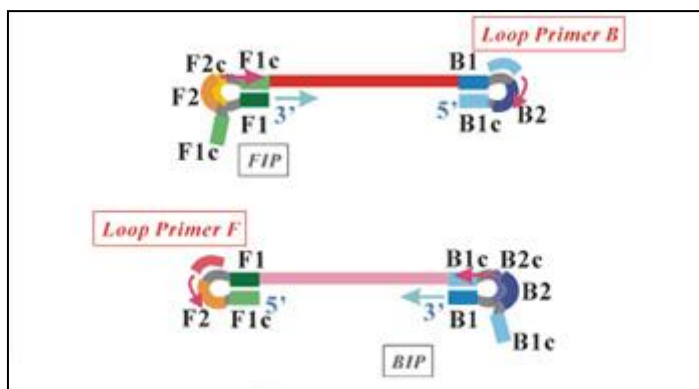
การออกแบบไพรเมอร์ LAMP จะใช้โปรแกรม PrimerExplorer v4 Software (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>) (103) โดยไพรเมอร์ในปฏิกิริยา LAMP มีทั้งหมด 4-6 เส้น คือ F3, B3, Forward Inner primer (FIP) ประกอบไปด้วยบริเวณ F1c และ F2, Backward Inner Primer (BIP) ประกอบไปด้วยบริเวณ B1c และ B2 ดังแสดงในรูปที่ 2.17 ซึ่งจะจำเพาะกับ 6 ตำแหน่ง คือ F3, F2, F1, B1, B2 และ B3 และอาจมี Loop Primer Forward (LF) และ Loop Primer Backward (LB) อีก 2 เส้น ดังแสดงในรูปที่ 2.18 ซึ่ง Loop Primer จะทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ปริมาณมากขึ้น โดย Loop Primer จะอยู่ตำแหน่งระหว่าง B1 และ B2 และ F1 และ F2 ซึ่งอยู่ทางปลาย 5' ของโครงสร้างดัมเบล จะทำให้เพิ่มจุดเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา LAMP เพิ่มมากขึ้น ทำให้การสังเคราะห์มีคุณภาพดีกว่าแบบใช้ 4 เส้น (102) ดังรูปที่ 2.19 ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์แบบมาตรฐานตามโปรแกรม จะได้ไพรเมอร์ไม่เกิน 5 คู่ และเลือกคู่ที่ดีที่สุดมาใช้งาน



รูปที่ 2.17 แสดงไพรเมอร์ 4 เส้น ของปฏิกิริยา LAMP (102)



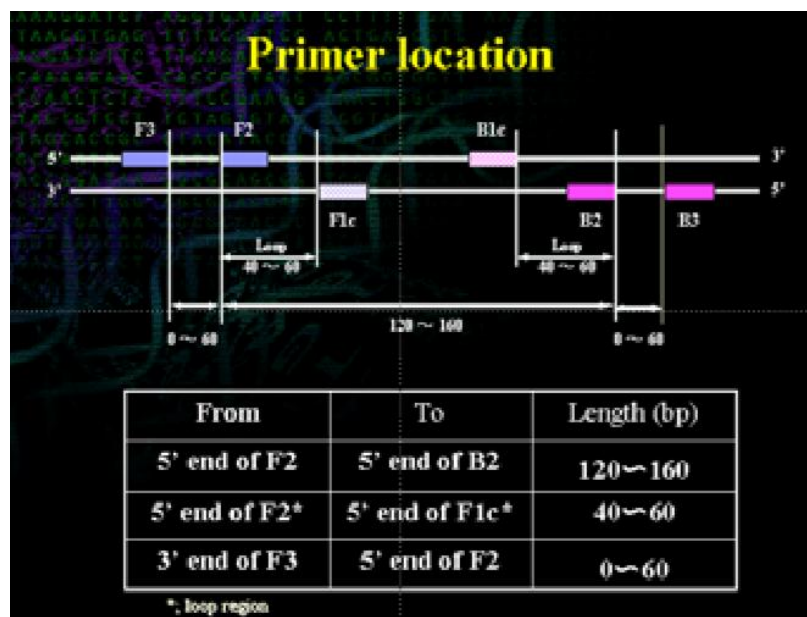
รูปที่ 2.18 แสดงไพรเมอร์ 6 เส้น ของปฏิกิริยา LAMP (103)



รูปที่ 2.19 แสดงไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP กรณีที่มี Loop primer (102)

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP (103) มีดังนี้

1. ความยาวและระยะห่างที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์แต่ละเส้น แสดงดังรูปที่ 2.20 ระยะห่างระหว่างปลาย 5' ของ F2 และปลาย 5' ของ B2 ต้องอยู่ระหว่าง 120-160 bp ระยะห่างระหว่างปลาย 5' ของ F2 ถึงปลาย 5' ของ F1 ต้องอยู่ระหว่าง 40-60 bp ระยะห่างระหว่างปลาย 3' ของ F3 และปลาย 5' ของ F2 อยู่ระหว่าง 0-60 bp
2. การคำนวณค่าอุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_m) จะมีผลต่อสถานะของปฏิกิริยา ดังนั้นค่า T_m ในแต่ละบริเวณของไพรเมอร์ได้แก่ F1c, B1c ต้องมีค่าประมาณ 65 องศาเซลเซียส (64-66 องศาเซลเซียส) ส่วนบริเวณของไพรเมอร์ F2, B2, F3 และ B3 ต้องมีค่าประมาณ 60 องศาเซลเซียส (59-61 องศาเซลเซียส)
3. ความเสถียรที่บริเวณปลายของไพรเมอร์ (stability of primer end) ซึ่งจะเป็นจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ของดีเอ็นเอ โดยที่ปลาย 3' ของบริเวณ F2/B2, F3/B3 และที่ปลาย 5' ของบริเวณ F1c/ B1c จะต้องมีค่าพลังงานอิสระ (ΔG) เท่ากับหรือน้อยกว่า -4 กิโลแคลอรี/โมล
4. ค่า GC รวม (GC contents) จะอยู่ที่ 40-65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่า GC รวมที่อยู่ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าเป็นลักษณะของไพรเมอร์ที่ดี
5. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) มีความสำคัญสำหรับ Inner primer คือต้องไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เพื่อป้องกันการเกิดไดเมอร์ โดยต้องแน่ใจว่าไม่มีลำดับเบสคู่สมกันกับไพรเมอร์อื่นที่ปลาย 3'
6. อื่นๆ ถ้าทราบตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ (restriction enzyme sites) ยกเว้นว่าเป็นตำแหน่งอยู่บนไพรเมอร์ เราสามารถตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะได้



รูปที่ 2.20 แสดงระยะห่างของไพรเมอร์ที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP (103)

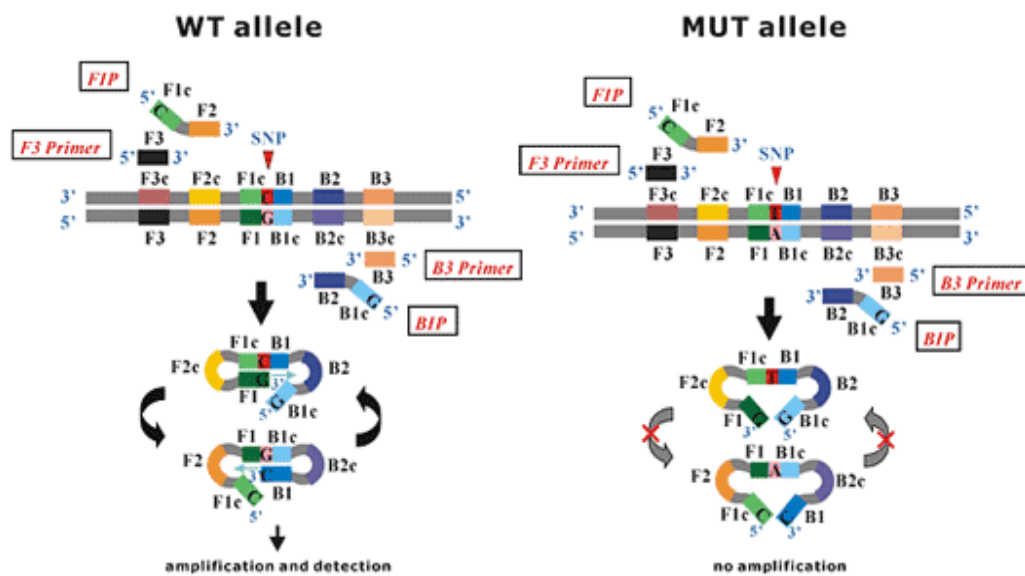
4.2.2 การออกแบบไพรเมอร์ LAMP เพื่อหาการกลายพันธุ์ (LAMP-based SNPs typing) ตามหลักการการออกแบบแบบขั้นพัฒนา (Advance primer design)

การออกแบบไพรเมอร์ LAMP ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่ตำแหน่งเดียว (point mutation) และประยุกต์ใช้ในการศึกษา single nucleotide polymorphism (SNP) ตามหลักการ การออกแบบแบบขั้นพัฒนา (Advance primer design) ในการออกแบบ Specific primer ไพรเมอร์ที่ออกแบบลักษณะนี้จะสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง wild type และ mutant type ได้ ซึ่งถ้าต้องการให้ไพรเมอร์สามารถ amplify สำหรับ mutant type แต่ไม่สามารถ amplify สำหรับ wild type จะต้องเลือกไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งของ SNP อยู่ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งดังนี้ (103)

- a) ที่ปลายด้าน 5' ของ F1c หรือ B1c
- b) ที่ปลายด้าน 3' ของ F2 หรือ B2
- c) ที่ปลายด้าน 3' ของ F3 หรือ B3

จากตัวอย่างดังรูปที่ 2.21 จะออกแบบให้เป็น Specific primer สำหรับ wild type โดยออกแบบให้เบส C อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ F1c เพื่อที่จะจับกับ wild type allele (WT)

ที่มีเบส G และจับกับ mutant allele ที่มีเบส A โดยที่ WT primer จับกับ wild type allele จะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น ซึ่งจะเริ่มจากโครงสร้างดัมเบล และจะสังเคราะห์แบบสมมาตร ทำให้เกิดผลผลิต LAMP ขึ้น แต่ถ้ายื่นเป้าหมาย เป็น mutant allele (MUT) จะไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากโครงสร้างดัมเบล ถึงแม้ว่าจะมีการผิดพลาดเพียงแค่ 1 เบส (Miscopy) แต่ทำให้หยุดขบวนการสังเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ทำให้ไม่มีผลผลิต LAMP เกิดขึ้น



รูปที่ 2.21 แสดงหลักการปฏิกิริยา LAMP ของ specific primer เพื่อตรวจวิเคราะห์ wild type และ mutant type allele (104)

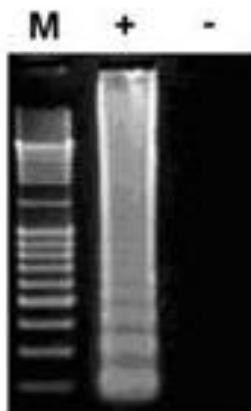
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.3 วิธีการตรวจสอบผลผลิตของ LAMP

ทำได้หลายวิธี ได้แก่

4.3.1 วิธีการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

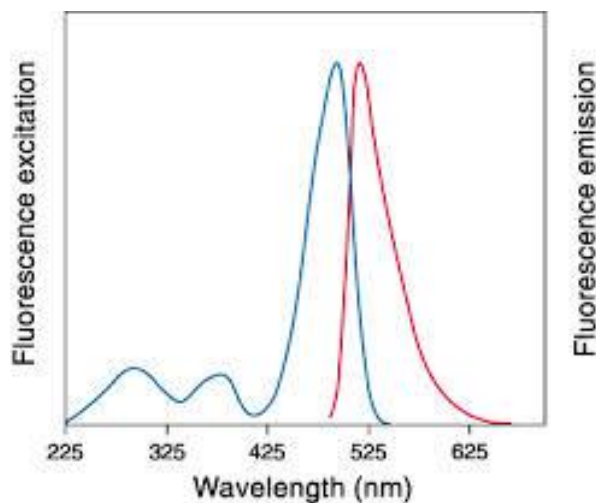
โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส จากนั้นนำวุ้นมาย้อมด้วยเอทีเดียมโบรไมด์ และดูผลบนเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator) จะเห็นลักษณะของผลผลิต LAMP เป็นแถบคล้ายกับขั้นบันได (ladder) ซึ่งเกิดจากมีดีเอ็นเอ หลายๆ ขนาด จากขนาดเล็กไปถึงขนาดใหญ่ ความยาวตั้งแต่ F3 ถึง B3 จนถึงดีเอ็นเอขนาดใหญ่มากถึง 100 กิโลเบส (32, 35) ดังรูปที่ 2.22



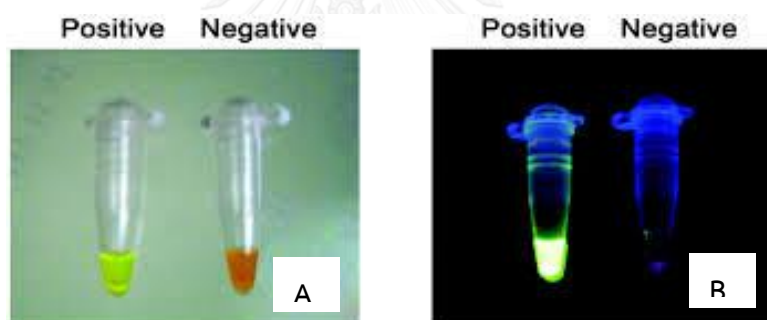
รูปที่ 2.22 แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยา LAMP ที่แยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส โดยเลนส์ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder), + คือ ผลบวก, - คือ ผลลบ (32)

4.3.2 การตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ SYBR Green I

SYBR Green I ซึ่งเป็นสีฟลูออเรสเซนซ์ มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{32}H_{37}N_4S$ เป็นสารประเภท ฟลูออโรโครม (Fluorochrome) การเติมสี SYBR Green I ลงไปในปฏิกิริยา LAMP สีจะเข้าจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ ทำให้ได้สารประกอบเชิงซ้อน (DNA-dye-complex) เมื่อสารนี้ถูกกระตุ้น (excite) ที่ความยาวคลื่น 497 นาโนเมตร ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะมีการคายพลังงาน (emission) เป็นแสงของฟลูออเรสเซนซ์สีเขียวออกมาที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ดังรูปที่ 2.23 แต่ถ้าไม่มีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ SYBR-Green I จะอยู่ในรูปอิสระ และคายพลังงานในช่วงความยาวคลื่นเดิมที่ 590 นาโนเมตร จึงเห็นเป็นสีส้มเหมือนเดิม (105, 106) ดังรูปที่ 2.24



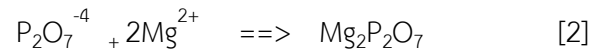
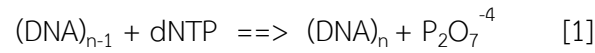
รูปที่ 2.23 แสดงกราฟของ SYBR Green I เข้าจับกับดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ที่ความยาวคลื่น 497 นาโนเมตร และคายพลังงานที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (105)



รูปที่ 2.24 แสดงผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP ด้วยสี SYBR Green I (A) คือผลบวกและผลลบภายใต้แสงไฟธรรมดา, (B) คือผลบวกและผลลบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (107)

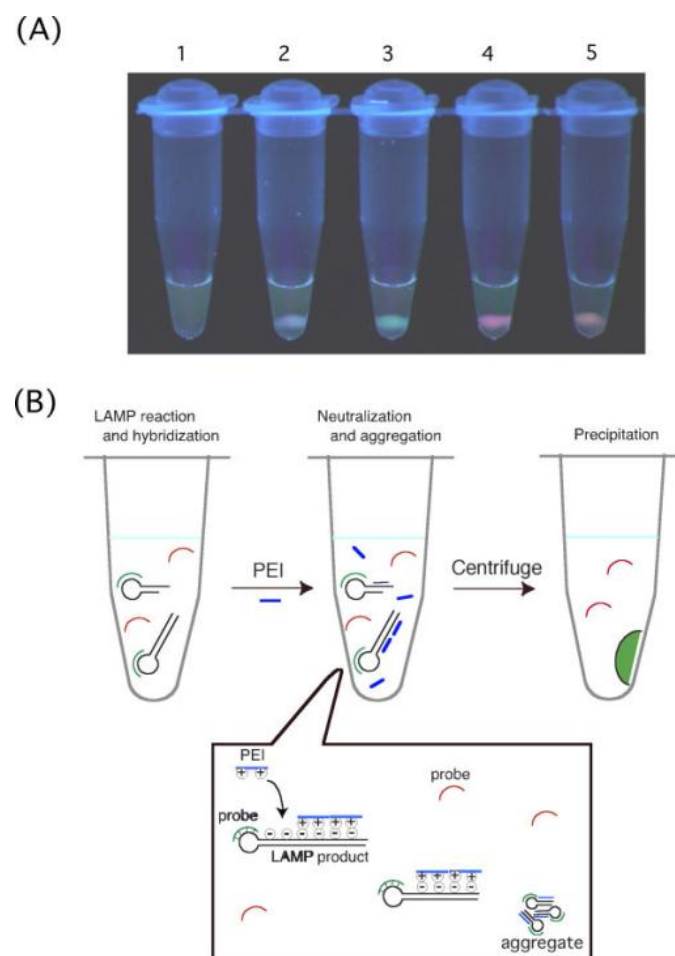
4.3.3 การดูความขุ่นจากการเกิดแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (Turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation)

ในขบวนการ LAMP จะเกิดการรวมกันของไพโรฟอสเฟตจาก dNTPs กับแมกนีเซียมไอออน ที่เป็นส่วนประกอบบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ทำให้ได้ผลผลิตเป็น แมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (magnesium pyrophosphate, $Mg_2P_2O_7$) เห็นเป็นตะกอนขุ่นขาว และสามารถวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร การเกิดปฏิกิริยาดังสมการด้านล่าง ค่าการดูดกลืนแสงนี้ สามารถนำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของดีเอ็นเอได้ (32, 108)



4.3.4 การตรวจวัดลำดับเบสที่จำเพาะของปฏิกิริยา LAMP โดยการเติม cationic polymers

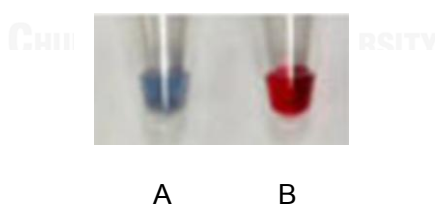
เตรียม Oligo DNA Probe โดยการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง สำหรับการตรวจจับ multiplex nucleic acid template โดยการเติมสาร polyethylenimine (PEI) ลงไป หลังสิ้นสุดปฏิกิริยา LAMP ทำให้เกิดการตกตะกอนของ LAMP amplicon-PEI complex โดย Oligo DNA Probe เกิดขบวนการ hybridization กับผลผลิต LAMP ซึ่งจะทำให้เกิดการตกตะกอนขึ้น และเกิดการเปล่งแสงฟลูออเรสเซนซ์ต่อออกมาภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (109) ดังรูปที่ 2.25



รูปที่ 2.25 แสดงปฏิกิริยาการตกตะกอนของ LAMP amplicon-PEI complex (109)

4.3.5 การตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP โดยการเติมอนุภาคทองคำ (LAMP-goldnanoparticle)

ในปัจจุบันได้มีวิธีการนำเอาอนุภาคทองคำ (AuNPs) มาตรวจสอบผลผลิต LAMP ทองคำที่อยู่ในรูปทั่วไป จะมองเห็นเป็นสีเหลือง เนื่องจากทองคำอยู่เป็นก้อนขนาดใหญ่ จะดูดกลืนแสงสีน้ำเงิน ทำให้มองเห็นเป็นสีเหลือง แต่ถ้าทำให้ทองคำมีขนาดเล็กลงจนมีหน่วยเป็นนาโนเมตร จะทำให้ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเปลี่ยนไป อนุภาคทองคำสามารถเตรียมใช้เอง หรือ ซื้อแบบสำเร็จรูปได้ หลักการ คือ เริ่มต้นด้วยการเตรียม Oligonucleotide probe โดยใช้เป็นชนิด thiol ซึ่งจะจับกับอนุภาคนาโนทองคำ จากนั้นเติมผลผลิต LAMP ลงไป แล้วเติมเกลือ ถ้าในสถานะที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย Oligonucleotide probe จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายจับกันเป็นสายคู่ ทำให้สามารถดูดกลืนแสงสีเขียว ที่ความยาวคลื่นประมาณ 500 นาโนเมตร ทำให้เห็นอนุภาคนาโนเป็นสีแดงเหมือนเดิม แต่ถ้าในสถานะที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย Oligonucleotide probe จะไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และภายหลังจากเติมเกลือ จะทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการตกตะกอน โดยจะดูดกลืนความยาวคลื่นแสงในช่วงที่ยาวขึ้น ทำให้สีเปลี่ยนเป็นสีม่วง สามารถตรวจสอบผลด้วยตาเปล่าได้ ผลบวกจะเป็นสีแดง ผลลบจะเป็นสีม่วงดังแสดงในรูปที่ 2.26 นอกจากนี้ยังสามารถวัดผลโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ได้ (110, 111)



รูปที่ 2.26 แสดงการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP ด้วยอนุภาคทองคำ โดยที่ A คือ ผลลบ, B คือ ผลบวก (111)

4.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP

มีการนำเทคนิค LAMP มาใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อก่อโรคได้หลากหลาย เช่น ไวรัส, แบคทีเรีย และปรสิต เป็นต้น สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค LAMP นั้นพบว่ามี การใช้กับเชื้อที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ หรือ เพาะเลี้ยงได้ยาก เช่น มีการใช้เทคนิค LAMP ในการ

ตรวจหาเชื้อ *Mycoplasma pneumoniae* พบว่าเป็นวิธีที่รวดเร็วในการตรวจวินิจฉัย และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบแอนติบอดี ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานพบว่ามีควมไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และ ค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 94.8, 91.9, 91.1 และ 95.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (112) มีการใช้เทคนิค LAMP ตรวจเชื้อ *Cronobacter* spp. ที่ปนเปื้อนในนมผงเด็กแรกเกิดพบว่ามีควมจำเพาะสูง และมีความไวในการตรวจมากกว่าวิธี PCR และ Real-Time PCR โดยตรวจได้ที่ 9.1 fg/ul ในขณะที่วิธี Real-Time PCR มีความไวเท่ากับ 91 และ 9.1 pg/ul ตามลำดับ (32) การตรวจเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี LAMP ร่วมด้วยเทคนิคการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Brushing พบว่าสามารถตรวจหาเชื้อต่ำสุดที่ 10^2 CFU/ml มีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (35) มีการศึกษาวิธี LAMP เทียบกับ Real-Time PCR ในการตรวจเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex พบว่ามีความไวเท่ากับวิธี Real-Time PCR เท่ากับ 100 fg/ul และมีความจำเพาะเทียบกับวิธี Real-Time PCR คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (113) ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Yersinia enterocolitica* พบว่าวิธี LAMP มีความแม่นยำสูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานตาม ISO 10273 (114) เชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่มีการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี LAMP ในปัจจุบันมีหลากหลายได้แก่ *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio vulnificus*, *Campylobacter jejuni* และ *Campylobacter coli* เป็นต้น (36, 115-118)

สำหรับการตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสด้วยวิธี LAMP เช่น Herpesvirus, SARS, H5 Avian influenza และ Adenoviruses เป็นต้น (37, 38, 116, 119) การใช้เทคนิค multiplex RT-LAMP ในการตรวจวิเคราะห์โรคปากและเท้าเปื่อย เปรียบเทียบกับวิธี Real-Time RT-PCR พบว่ามีความไวและความจำเพาะ 98 และ 98.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (120) การตรวจ Human Adenoviruses (hAdVs) ซีโรไทป์ 40 และ 41 ในตัวอย่างเชื้อ Adenoviruses สายพันธุ์คลินิก โดยพบว่า มีความไวอยู่ในช่วง 50–100 copies/reaction และมีความจำเพาะเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (119)

สำหรับการใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจวินิจฉัยหาเชื้อปรสิต ตัวอย่างเช่น *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp. และ *Giardia lamblia* เป็นต้น (33, 34, 116) การใช้เทคนิค LAMP สำหรับการตรวจจำแนกสปีชีส์เชื้อมาลาเรีย พบว่ามีความไวและความจำเพาะในการตรวจเชื้อ *P. falciparum* เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็น 95 และ 93.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าสามารถตรวจหาเชื้อปริมาณต่ำสุดเท่ากับ 10 และ 40 copies สำหรับเชื้อ *P. vivax* และ *P. falciparum* ตามลำดับ (33) มีรายงานว่าใช้เทคนิค LAMP ในการ

ตรวจเชื้อมาลาเรีย ซึ่งมีความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และ ค่าทำนายผลลบ เท่ากับ 95.7, 100, 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธี malaria rapid diagnostic tests (RDTs) และพบว่า มีความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก, ค่าทำนายผลลบ และ ค่าความถูกต้อง เท่ากับ 88.9, 96.9, 92.2, 95.5 และ 94.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับวิธีส่องกล้องซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (121)

นอกจากนี้เทคนิค LAMP ยังสามารถประยุกต์ใช้ในงานอื่นๆ ด้วย เช่น โรคมะเร็ง การเกษตร พืช และ สัตว์ มีรายงานวิจัยของ Hayama M. และคณะ ได้ใช้ one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay ซึ่งเป็นชุดทดสอบทางการค้าที่ใช้หลักการของ LAMP ในการตรวจหาการเกิด metastasis ของต่อมน้ำเหลือง (lymph node) ในผู้ป่วยมะเร็งปอด โดยวิธีนี้มีความไวและความจำเพาะ คิดเป็น 100 และ 91.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าวิธีนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการเกิด metastasis ของต่อมน้ำเหลืองในผู้ป่วยมะเร็งปอดได้ (122) รายงานวิจัยของ Feng J. และคณะ ได้ใช้เทคนิค LAMP ในการตรวจพืชตัดแปลงพันธุกรรม (GMOs) ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับวิธี Real-Time PCR และพบว่าเทคนิค LAMP เป็นวิธีที่ง่าย สะดวกและรวดเร็วในการตรวจคัดกรองพืชตัดแปลงพันธุกรรมได้ (123)

มีการใช้เทคนิค Multiplex Loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในตัวอย่างนม ซึ่งจะใช้ไพรเมอร์ของเชื้อแต่ละชนิดรวมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaI* สามารถแยกแยะระหว่าง *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ได้ และพบว่ามีความไวในการตรวจเชื้อทั้งสองเท่ากับ 100 fg DNA/tube ซึ่งมีความไวมากกว่าวิธี multiplex PCR ซึ่งมีความไวเท่ากับ 1 pg DNA/tube (36) การหาจีโนมไทป์ของ Herpesvirus 6 (HHV-6) โดยใช้วิธีของ LAMP ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ *AccI* สามารถแยกแยะระหว่าง type A และ B ได้ (37) การแยกสายพันธุ์ของวัคซีนป้องกันคางทูม ด้วยวิธี Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *ScaI* สามารถแยกแยะระหว่าง wild type และสายพันธุ์ Hoshino ได้ (38) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยการตรวจโรค Bursal Diseases ในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (wIBDVs) ออกจากสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง (non-wIBDVs) ในตัวอย่างสัตว์ปีก ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tfi I* (124)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและน้ำยา

- 1.1 2-propanol, Ethanol, Boric acid, Tryptic soy broth (TSB) [บริษัท Merck ประเทศเยอรมัน]
- 1.2 Lb broth, miller (Luria bertani) [บริษัท BD ประเทศสหรัฐอเมริกา]
- 1.3 Brain heart infusion agar [บริษัท Oxoid ประเทศอังกฤษ]
- 1.4 Betaine (N,N,N-trimethylglycine), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 5 - bromo -4 - chloro -3- indolyl - β -D- galactopyranoside (X-Gal), Dimethylformamide (DMF) [บริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน]
- 1.5 ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs), 6X Gel Loading Dye (Blue), *Taq* DNA polymerase, *Bst* DNA polymerase, 1X Standard *Taq* Reaction Buffer, 1X ThermoPol Reaction Buffer, *Bsa*I, *Ava*II, 1X CutSmart buffer, 1X NEBuffer 4 [บริษัท New England Biolabs ประเทศสหรัฐอเมริกา]
- 1.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp ladder , 100 bp ladder [บริษัท Thermo scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา]
- 1.7 Tris Base [บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา]
- 1.8 Ethidium bromide (EtBr) [บริษัท plusOneTM ประเทศสหรัฐอเมริกา]
- 1.9 StrataClone PCR Cloning Kit [บริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา]
- 1.10 Gas Pack [AnaeroPack-MicroAero, บริษัท MGC ประเทศญี่ปุ่น]
- 1.11 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit

[บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา]

1.12 Agarose [บริษัท Genemate ประเทศสหรัฐอเมริกา]

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Micro high speed refrigerate centrifuge)

[บริษัท Vision ประเทศเกาหลีใต้]

2.2 กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Heat block) [บริษัท Wealtec ประเทศไต้หวัน]

2.3 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) [บริษัท Genie2 ประเทศสหรัฐอเมริกา]

2.4 เครื่องปั่นแห้งสุญญากาศ (DNA Speed Vacuum) [บริษัท Thermo

Savant ประเทศสหรัฐอเมริกา]

2.5 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) [บริษัท Myrun ประเทศญี่ปุ่น]

2.6 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตและกล่อง (UV transilluminator)

G: BOX, Chemi SD [บริษัท SynGene ประเทศสหรัฐอเมริกา]

2.7 เครื่องนาโนดรอป (Nanodrop) [บริษัท Thermo Scientific

ประเทศสหรัฐอเมริกา]

2.8 เครื่อง Thermo cycler [บริษัท Biorad ประเทศสหรัฐอเมริกา]

3. วิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่าง

3.1.1 เชื้อ *H. pylori* และการเพาะเลี้ยง

เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 (สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection, ATCC) และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ต๋อพยาบาลโรคมัยซิน จำนวน

5 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.นพ.รัฐกรณ์ วิไลชนม์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain heart infusion agar ที่ผสมเลือดแกะ 7 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะ Microaerophilic (มี O₂ 5-10 เปอร์เซ็นต์, มี CO₂ 5-22 เปอร์เซ็นต์) เป็นเวลา 3-5 วัน โดยใช้ Gas Pack

3.1.2 ตัวอย่าง urease test

ตัวอย่าง urease test ที่ทดสอบจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย ที่ให้ผลบวก ในเดือนมีนาคม ปี พ.ศ. 2555 ถึง เดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2557 (ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์) จำนวน 353 ตัวอย่าง เป็น Campylobacter-like organism tests (CLOtest*) (Kimberly Clark ประเทศสหรัฐอเมริกา) จำนวน 210 ตัวอย่าง และอาหารยูเรียที่เตรียมเอง (in-house urease test) จำนวน 143 ตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori*

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อ

H. pylori สายพันธุ์ทางคลินิกที่ต้อยาคาริโรมัยชิน

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ต้อยาคาริโรมัยชิน โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit เริ่มจากใช้ห่วงเพาะเชื้อ (Sterile loop) เชี่ยเชื้อ *H. pylori* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Brain heart infusion agar ที่ผสมเลือดแกะ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยระวังไม่ให้ชุดวัฒนธรรมมาด้วย ประมาณ 1 loopfull ใส่ลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร ผสมเชื้อให้แตกกระจาย จากนั้นนำไปปั่น ที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไป แล้วเติม Nuclei Lysis Solution 600 ไมโครลิตร จากนั้น Resuspend ด้วยการดูดขึ้นลงเบาๆ ด้วยปิเปต นำไปบ่มที่กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Protein Precipitation Solution 200 ไมโครลิตร ผสมสารด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร 20 วินาที นำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสใสในหลอดใหม่ เติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 3-5 ครั้ง ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตากให้แห้งในอากาศหรือใช้เครื่องปั่นแห้งสุญญากาศ ที่ความเร็วปานกลาง เป็นเวลา 15 นาที สูดทำละลายดีเอ็นเอด้วย DNA Rehydration Solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน นำดีเอ็นเอไป

แยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกผลโดยการใช้กล้อง วัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนทรอป หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR และ LAMP ต่อไป

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่าง Urease test

นำวุ้นในตัวอย่าง CLOtest* หรือ in house urease test ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 300 ไมโครลิตร ใช้แท่งบดปลอดเชื้อ (pestle) บดตัวอย่างให้แตกกระจาย จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบน ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติม Absolute ethanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วดูด ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ออกให้หมด ตากให้แห้งในอากาศหรือใช้เครื่องปั่นแห้งสุญญากาศ โดยปั่นที่ความเร็วปานกลางเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนทรอป เก็บรักษาไว้ที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR และ LAMP ต่อไป

3.3 การวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนทรอป

การวัดปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องนาโนทรอป ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) โดยมีเกณฑ์พิจารณา ดังนี้

อัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 แสดงว่าดีเอ็นเอสายคู่บริสุทธิ์ แต่ถ้ามีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนเปื้อนสูง และถ้ามีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนสูง

3.4 วิธีการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส โดยเตรียมวุ้นในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE (รายละเอียดในภาคผนวก) นำวุ้นที่เตรียมไว้ไปวางลงในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส เติบบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ลงไปให้ท่วมวุ้น ผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมให้เข้ากันดี โดยการปิเปตขึ้นลง ใช้ปิเปตหยอดลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 50 นาที ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต และทำการบันทึกผลโดยการใช้กล้อง

3.5 การตรวจยืนยันเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวก และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) บริเวณยีน 16S rRNA หรือ ยีน *glmM*

3.5.1 การตรวจเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR บริเวณยีน 16S rRNA

ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Standard buffer [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 8.8) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$, pH 8.3) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์], ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, Forward primer (5'-GGG TGC ACA AAG AGA AGC A-3'), Backward primer (5'-GGG CAC TAG CCA ATT TAG CA-3') ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่บริษัท Biodesign ประเทศไทย, DNA template ความเข้มข้น 10-300 นาโนกรัม และ 1.25 Unit ของ *Taq* DNA polymerase สภาวะปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที, 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที สำหรับ Negative Control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และใช้เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 เป็น Positive Control นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกผลโดยการใช้กล้องขนาดผลผลิต PCR เท่ากับ 219 bp

3.5.2 การตรวจเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR บริเวณยีน *glmM*

ทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Standard buffer [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 8.8) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$, pH 8.3) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์], ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, Forward primer (5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3'), Backward primer (5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3') (125) ความเข้มข้นอย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่บริษัท Biodesign ประเทศไทย, DNA template ความเข้มข้น 10-300 นาโนกรัม และ 1.25 Unit ของ *Taq* DNA polymerase สภาวะปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส 5 นาที, 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที สำหรับ Negative Control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และใช้เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 เป็น Positive Control นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา

50 นาที จากนั้นเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกลง โดยการใช้กล้อง ขนาดผลผลิต PCR เท่ากับ 294 bp

3.6 การตรวจการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

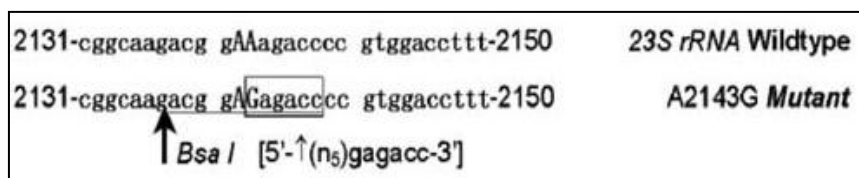
3.6.1 การทำ PCR ยีน 23S rRNA

ทำ PCR ที่บริเวณ 23S rRNA จากตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการทำ PCR ยีน 16S rRNA หรือ ยีน *glmM* ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Standard buffer [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 8.8) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$, pH 8.3) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์], ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์, K1 primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (5'-CCA CAG CGA TGT GGT CTC AG-3'), K2 primer ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ (5'-CTC CAT AAG AGC CAA AGC CC-3') อ้างอิงจาก Kang และคณะ (83) โดยสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่บริษัท Biodesign ประเทศไทย, DNA template ความเข้มข้น 10-300 นาโนกรัม และ 1.25 Unit ของ *Taq* DNA polymerase สภาวะปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที, 35 รอบของ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที สำหรับ Negative Control จะใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และใช้เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 เป็น Positive Control นำผลผลิต PCR ที่ได้ไปตรวจสอบโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกลงโดยการใช้กล้อง ขนาดผลผลิต PCR เท่ากับ 425 bp

3.6.2 การตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaI* โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ดังนี้ 1X CutSmart buffer ประกอบด้วย [โพแทสเซียมอะซิเตท ($C_2H_3KO_2$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, ทริส-อะซิเตท ($C_6H_{15}NO_5$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมอะซิเตท ($Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร], *BsaI* 0.5 ไมโครลิตร และผลผลิต PCR 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ตรวจสอบโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดแสง

อัลตราไวโอเลตและบันทึกผลโดยใช้กล้อง หากมีการกลายพันธุ์ (mutant) ที่ A2143G จะได้ ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น คือ ขนาด 324 และ 101 bp ถ้าไม่มีการกลายพันธุ์ (wild type) จะไม่ถูกตัดด้วย *Bsa*I ทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิมคือ 425 bp ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ *Bsa*I แสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ *Bsa*I (14)

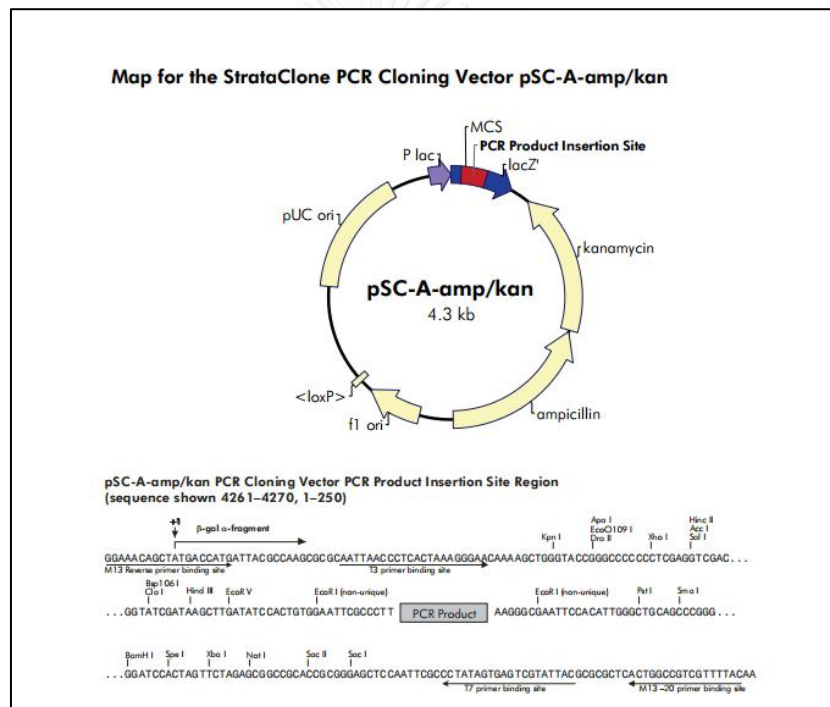
3.7 การหาลำดับเบส (Sequencing)

เพื่อหาอุบัติการณ์การกลายพันธุ์ตำแหน่งอื่นๆ ของ 23S rRNA ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา คลาริโธรมัยซิน จึงทำการหาลำดับเบส ของผลผลิต PCR โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Wardmedic จำกัด และ บริษัท U2Bio (Thailand) จำกัด ใช้ผลผลิต PCR ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณอย่างน้อย 20 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ K1 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในธนาคารยีน (Genbank) โดยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (126)

3.8 การโคลนนิ่ง (Cloning)

เพื่อโคลนยีน 23S rRNA ที่มีการกลายพันธุ์ ที่ตำแหน่ง A2143G ไว้ใช้เป็นดีเอ็นเอ แม่แบบในการพัฒนาเทคนิค LAMP ในการตรวจการกลายพันธุ์ดังกล่าว จึงได้นำตัวอย่าง urease test ที่ได้ทำการตรวจยืนยันลำดับเบสว่ามีกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G มาโคลนเข้ากับพาหะ (StrataClone PCR Cloning vector pSC-A- amp/Kan) (127) และถ่ายโอนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ คอมพิเทนต์ (competent cells) *E. coli* โดยมีขั้นตอนและวิธีการดังนี้ เตรียมผลผลิต PCR จาก ตัวอย่าง urease test ที่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G ดังในขั้นตอนที่ 3.6.1 จากนั้นเตรียม ปฏิกริยา Ligation ดังนี้ นำผลผลิต PCR จำนวน 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้น 5–50 นาโนกรัม) ผสม กับ StrataClone Cloning Buffer 3 ไมโครลิตร StrataClone Vector (pSC-A-amp/Kan) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็ง เพื่อนำไปถ่ายโอนเข้าสู่ เซลล์คอมพิเทนต์ โดยนำ StrataClone SoloPack competent cells ที่เก็บรักษาไว้ที่ -80 องศา เซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง เดิมส่วนผสม ligation ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันบ่มใน น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ทำการ Heat-shock โดยบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้ว เดิม LB medium ที่ทำการอุ่นไว้ก่อนหน้า ที่ 42 องศาเซลเซียส จำนวน 250 ไมโครลิตร บ่มที่ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปิเปตดูด เซลล์คอมพลีเทนต์ จำนวน 100 ไมโครลิตร หยดลงบน LB agar ที่มียาแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2 เปอร์เซ็นต์ของ X-gal จำนวน 40 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการคัดกรอง โคลน โดยนำโคลนที่มีสีขาวเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ใส่ยาแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (insert DNA) ที่ต้องการหรือไม่ โดยการทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*I ดังขั้นตอนในข้อ 3.6.1 และ 3.6.2 ทำการเก็บรักษาเชื้อใน TSB ที่ผสม 15 เปอร์เซ็นต์ของกลีเซอรอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ -80 องศาเซลเซียส รูป pSC-A-amp/Kan Vector และแผนที่ของ Vector ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แสดงรูปของ Vector และแผนที่ของ Vector pSC-A-amp/Kan (127)

3.9 การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยวิธี Loop-mediated isothermal amplification

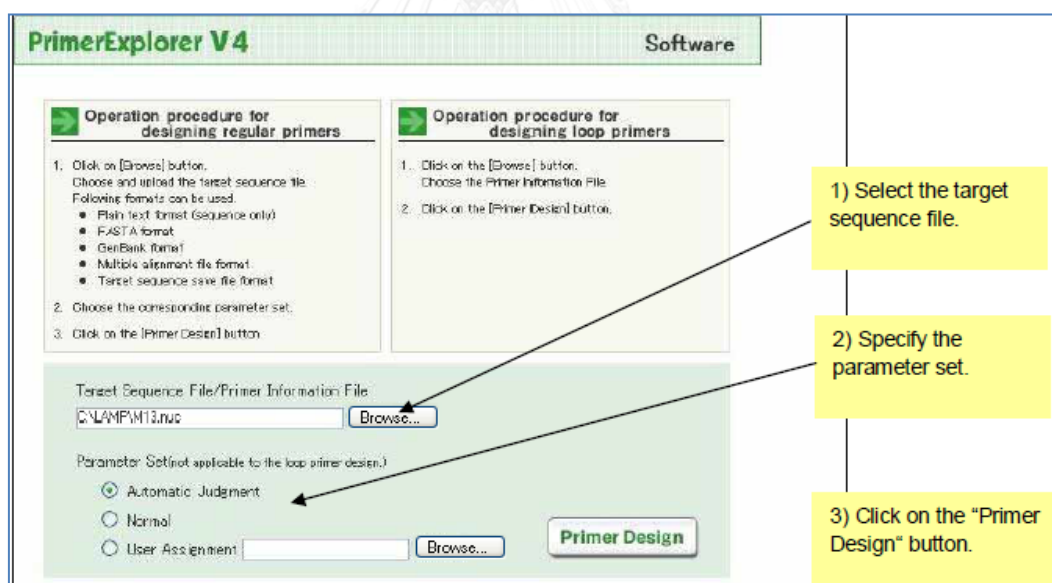
3.9.1 การออกแบบไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะกับยีน 23S rRNA

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากธนาคารยีน (GenBank, Accession no. U27270) บริเวณ 2281-2640 ได้

ทั้งหมด 6 เส้นคือ F3, B3, Forward Inner primer (FIP) ประกอบไปด้วยบริเวณ F1c และ F2, Backward Inner Primer (BIP) ประกอบไปด้วยบริเวณ B1c และ B2, Loop Primer Forward (LF) และ Loop Primer Backward (LB) โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer v4 Software (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>) (128) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ คือแบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)]

การออกแบบไพรเมอร์แบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)] มีขั้นตอนดังนี้

อัปโหลดไฟล์ลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) โดยลำดับเบสที่ใส่ต้องมีความยาวน้อยกว่า 2,000 bp และลำดับเบสต้องมีรูปแบบใดรูปแบบหนึ่ง คือ plain text format, FASTA format และ GenBank format คลิกที่ปุ่ม Browse และอัปโหลดไฟล์ที่ต้องการ เลือกพารามิเตอร์ และคลิกปุ่ม Primer design ดังแสดงในรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 แสดงหน้าต่างเริ่มต้นของโปรแกรม PrimerExplorer V4 (103)

คลิกปุ่ม Generate โปรแกรมจะออกแบบไพรเมอร์คู่ที่ดีที่สุดมาไม่เกิน 5 คู่ จากนั้นคลิกปุ่ม Display ดังแสดงในรูปที่ 3.4 จะแสดงผลของชุดไพรเมอร์ ดังรูปที่ 3.5 และ save ข้อมูลนี้ สำหรับการออกแบบ loop primer ต่อไป

จากการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมดที่ได้ จะเลือกไพรเมอร์คู่ที่ดีที่สุด โดยใช้เกณฑ์ในการเลือกคือ จะต้องเลือกชุดไพรเมอร์ที่มีค่า dimer (minimum) Delta G น้อยที่สุด

The screenshot displays a primer design software interface. At the top, it shows the uploaded file path: "UPLOAD FILE : C:\LAMP\M13.nuc". Below this is a DNA sequence with line numbers 1, 81, 161, 241, 321, 401, 481, 561, and 641. To the right of the sequence are controls for "Set Mutation" (Mut/Cons, Clear) and "Fixed Primer" (F3, F2, F1, B1, B2, B3, Clear). Below these are "Design Option" radio buttons for Default, Common, and Specific. A yellow callout box points to the "Generate" button with the text "Click on the 'Generate' button". Below the sequence, it shows "Number of Primer Candidates: F1=191, F2=187, F3=398, B1=215, B2=189, B3=393, F1P=205, B1P=248" and "5 Primer set(s) were generated." Below this are two steps: "1. Generate" with a "Generate" button and "2. Display" with a "Display" button. A yellow callout box points to the "Display" button with the text "Click on the 'Display' button". At the bottom, there is a "Detail Settings" button and the text "If you can have more detail settings, please click below."

รูปที่ 3.4 แสดงหน้าต่างของโปรแกรมในการออกแบบไพรเมอร์แบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)] (103)

PrimerExplorer V4 Software

1. Push "Order" button in order to transfer to a Genome ORDER site.
(Colored primers will be ordered.)
2. Push "Primer Information" button to download Primer Information format file.

Order DesignID: 070118143652

Primer Information

1 ID: 26 dimer (minimum) 303--2.36
label 5'pos 3'pos len Tm 5'GC 3'GC GCrate Sequence
F3 607 624 18 59.42 -3.96 -4.69 0.56 ACTACTGGGTCTCTCTCT
B3 784 802 19 60.31 -5.20 -4.90 0.56 GTCTCTGGGAAATGACC
FIP 41 AGCTGACTGGGTGAAGGCTCT-GCAGGATGATAGGGA
BIP 40 CATGACTATCTGGGGACT-CAGCTTCTAAGGATTC
F2 628 646 19 60.89 -6.10 -5.20 0.56 GCAGGATGATAGGGA
F1c 668 689 22 65.68 -5.49 -5.93 0.55 AGCTGACTGGGTGAAGGCTCT
B2 751 769 19 59.31 -5.50 -5.40 0.56 CACTTCTCTAAGGATTC
B1c 799 729 21 64.31 -4.56 -6.57 0.57 CATGACTATCTGGGGACT

Primer Information

2 ID: 40 dimer (minimum) 303--1.95
label 5'pos 3'pos len Tm 5'GC 3'GC GCrate Sequence
F3 1576 1592 18 59.72 -7.03 -4.72 0.56 CGGACTGAGCAACA
B3 1769 1786 18 59.08 -5.00 -5.75 0.56 AACTGGGTATGGATTC
FIP 41 ACATAAAGGTGAGGGGCTG-TGAATGCTCTGGTTTGG
BIP 40 CGGAGATGCTGCTGACT-ATGACTGAGGCTGAATGC
F2 1594 1613 20 59.76 -4.07 -5.30 0.50 TGAATGCTCTGGTTTGG
F1c 1643 1663 21 65.39 -3.29 -7.42 0.57 ACATAAAGGTGAGGGGCTG
B2 1733 1752 20 59.64 -4.06 -5.40 0.50 AATGACTGAGGCTGAATGC
B1c 1677 1696 20 65.39 -7.02 -5.42 0.65 CGGAGATGCTGCTGACT

Primer Information

3 ID: 6 dimer (minimum) 303--2.23
label 5'pos 3'pos len Tm 5'GC 3'GC GCrate Sequence
F3 128 145 18 60.55 -5.94 -5.42 0.61 AGCTGATGCTGTAGGC
B3 317 334 18 59.61 -6.54 -6.03 0.61 GCCTCCAGTAGGGAAGC
FIP 40 CTGACTGGGATGCTGTGG-GCTTGGTATGGGGTACTG
BIP 39 TATGGCTCTCTAGGCTA-CAGGCGTGGGAGTGC
F2 150 169 20 60.49 -5.85 -4.23 0.55 GCTTGGTATGGGGTACTG
F1c 198 217 20 65.19 -4.90 -6.19 0.65 CTGACTGGGATGCTGTGG
B2 279 296 18 60.06 -5.01 -5.95 0.61 CAGGCGTGGGAGTGC
B1c 218 238 21 65.99 -4.98 -6.50 0.57 TATGGCTCTCTAGGCTA

รูปที่ 3.5 แสดงหน้าต่างของโปรแกรมที่แสดงรายละเอียดของชุดไพรเมอร์แบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)] ที่ออกแบบได้ (103)

สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งหมดจากบริษัท Biodesign ประเทศไทย โดยคุณภาพของไพรเมอร์เป็นชนิด Desalt ละลายไพรเมอร์ในบัฟเฟอร์ TE [1 M Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM EDTA (pH 8.0)] ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในปฏิกิริยา LAMP ต่อไป

3.9.2 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ *H. pylori*

สารตั้งต้นในปฏิกิริยา LAMP ประกอบด้วยไพรเมอร์ FIP, BIP, F3, B3, LF และ LB ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 5 โมลาร์, ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, 10X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 8.8) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄ .7H₂O)

ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์], *Bst* DNA Polymerase ความเข้มข้น 8000 ยูนิต/มิลลิลิตร และดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ความเข้มข้น 10-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับ Negative Control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

3.9.2.1 การทดสอบหาระยะเวลาของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา LAMP ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, 1X บัฟเฟอร์ ประกอบด้วย [ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl, pH 8.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO₄ .7H₂O) ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์และ Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์], *Bst* DNA Polymerase ความเข้มข้น 8 ยูนิต/มิลลิลิตร และดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* 10-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับ Negative Control ใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิต LAMP จะเห็นเป็นสเมียร์แบน

3.9.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.9.2.1 ยกเว้นความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างๆ กัน ดังตารางที่ 3.1 บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.1 จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิต LAMP จะเห็นเป็นสเมียร์แบน

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะ 1-4

สภาวะ	ความเข้มข้นของไพรเมอร์					
	FIP(μ M)	BIP(μ M)	F3(μ M)	B3(μ M)	LF(μ M)	LB(μ M)
สภาวะที่ 1	0.8	0.8	0.2	0.2	0.8	0.8
สภาวะที่ 2	1.2	1.2	0.2	0.2	0.8	0.8
สภาวะที่ 3	1.6	1.6	0.2	0.2	0.8	0.8
สภาวะที่ 4	1.8	1.8	0.2	0.2	0.8	0.8

3.9.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอินของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.9.2.1 ยกเว้นความเข้มข้นของเบตาอินแตกต่างกันตั้งแต่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.1 และ ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.2 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิต LAMP จะเห็นเป็นสเมียร์แบน

3.9.2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.9.2.1 ยกเว้นความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.1, ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.2 และใช้ความเข้มข้นของเบตาอินที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.3 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิต LAMP จะเห็นเป็นสเมียร์แบน

3.9.2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

เตรียมปฏิกิริยา LAMP เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.9.2.1 ยกเว้นความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ให้แตกต่างกัน ตั้งแต่ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.1, ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.2, ใช้ความเข้มข้นของเบตาอินที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง

3.9.2.3 และใช้ความเข้มข้นของไดออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง 3.9.2.4 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยผลผลิต LAMP จะเห็นเป็นสเมียร์แบน

3.10 การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี LAMP ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ [Loop-mediated isothermal amplification - restriction fragment length polymorphism (LAMP-RFLP)]

วิเคราะห์ชนิดและตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* จากตำแหน่ง F3 ถึง B3 (2412-2606) ด้วยโปรแกรม NEB cutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) ซึ่งจะเลือกเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ชนิดที่ 1 จะตัดบริเวณห่วง (loop) จาก F3 ถึง B3 ทั้งสองข้างได้เอนไซม์ *Avall* และเอนไซม์ชนิดที่ 2 ใช้เอนไซม์ *Bsal* ในการแยกการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G ซึ่งจะสามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ได้ โดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา LAMP มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวดังนี้

3.10.1 ตัดผลผลิต LAMP ด้วย *Bsal*

เตรียมปฏิกิริยาการตัดเอนไซม์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาดังนี้ 1X CutSmart buffer ประกอบด้วย [โพแทสเซียมอะซิเตต ($C_2H_3KO_2$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, ทริส-อะซิเตต ($C_6H_{15}NO_5$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมอะซิเตต ($Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ BSA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร], *Bsal* 0.5 ไมโครลิตร และผลผลิต LAMP 5 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

3.10.2 ตัดผลผลิต LAMP ด้วย *Avall*

เตรียมปฏิกิริยาการตัดเอนไซม์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาดังนี้ 1X NEB buffer 4 ประกอบด้วย [โพแทสเซียมอะซิเตต ($C_2H_3KO_2$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, ทริส-อะซิเตต ($C_6H_{15}NO_5$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมอะซิเตต

($Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ DDT ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์], *Avall* 0.5 ไมโครลิตร และผลผลิต LAMP 5 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกผลโดยการใช้กล้อง

3.10.3 ตัดผลผลิต LAMP ด้วย *Avall* และ *Bsal*

เตรียมปฏิกิริยาการตัดเอนไซม์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาดังนี้ 1X CutSmart buffer ประกอบด้วย [โพแทสเซียมอะซิเตท ($C_2H_3KO_2$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ , ทริส-อะซิเตท ($C_6H_{15}NO_5$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมอะซิเตท ($Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ BSA ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร], *Bsal* 0.5 ไมโครลิตร , *Avall* 0.5 ไมโครลิตร และผลผลิต LAMP 5 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน ตรวจสอบผลผลิตโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกผลโดยการใช้กล้อง

บทที่ 4

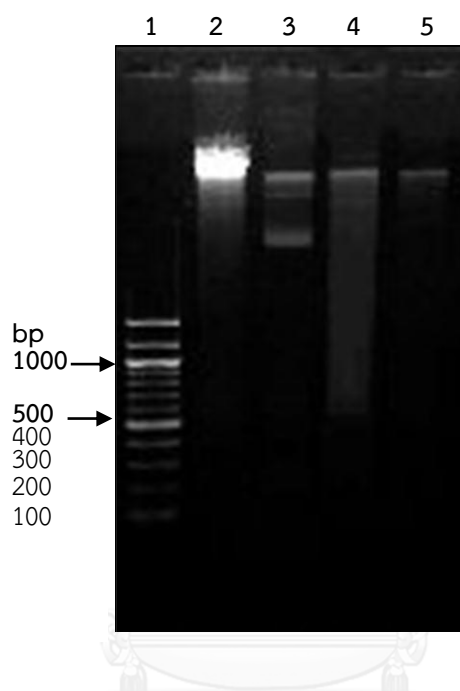
ผลการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง urease test เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คลินิกที่ติดยาคลาริโธรมัยซิน

ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 และเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ติดยาคลาริโธรมัยซิน ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Wizard® Genomic DNA Purification Kit จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ และวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องนาโนทรอป ผลที่ได้แสดงในรูปแบบที่ 4.1 สำหรับเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ ซึ่งจะเห็นเป็นแถบเข้ม และมีดีเอ็นเอบางส่วนเสี้ยวจากขนาดใหญ่จนถึงขนาดเล็ก และสำหรับ *H. pylori* สายพันธุ์คลินิก พบดีเอ็นเอขนาดใหญ่แถบเข้ม 2 ขนาด และมีดีเอ็นเอบางส่วนเสี้ยวจากขนาดใหญ่จนถึงขนาดเล็ก เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน และสายพันธุ์คลินิกมีความเข้มข้นจากการวัดด้วยเครื่องนาโนทรอปประมาณ 10-300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, มีอัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 สรุปว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปทำ PCR และ LAMP ต่อไป

นอกจากตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยง ในงานวิจัยยังใช้ตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* ที่มาจากตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวก เนื่องจากในงานประจำวันการตรวจคัดกรองผู้ป่วยว่ามีการติดเชื้อ *H. pylori* หรือไม่ แพทย์จะใช้วิธีการตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารบริเวณ antrum และ corpus ด้วยการส่องกล้อง จากนั้นจะนำชิ้นเนื้อมาทำการทดสอบ urease test ซึ่งผลการทดสอบที่บวก แสดงว่าน่าจะมีการติดเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อจะไม่เป็นที่นิยมทำ เนื่องจากมีความยุ่งยากและเสียเวลานาน ดังนั้นในการตรวจยืนยันเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR จึงได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวก ด้วยวิธีการต้มและตกตะกอนด้วย ethanol และทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนทรอป โดยตัวอย่าง urease test จำนวนทั้งหมด 353 ตัวอย่าง แบ่งเป็น urease test สำเร็จรูปที่เรียกว่า CLOtest* จำนวน 210 ตัวอย่าง และ urease test ที่เตรียมเอง (in house urease test) จำนวน 143 ตัวอย่าง ตรวจสอบโดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปแบบที่ 4.1 พบว่าตัวอย่าง CLOtest* และตัวอย่าง in house urease test ให้ผลเหมือนกันคือ ดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่

ซึ่งจะเห็นเป็นแถบเข้ม แต่ความเข้มจะน้อยกว่าของ เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์คลินิก และมีดีเอ็นเอบางส่วนเสื่อมยู่จากขนาดใหญ่จนถึงขนาดเล็ก และมีความเข้มข้นจากการวัดด้วยเครื่องนาโนทรอปประมาณ 10-300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีอัตราส่วน A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วงระหว่าง 1.80-2.00 สรุปว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปทำ PCR และ LAMP ต่อไป

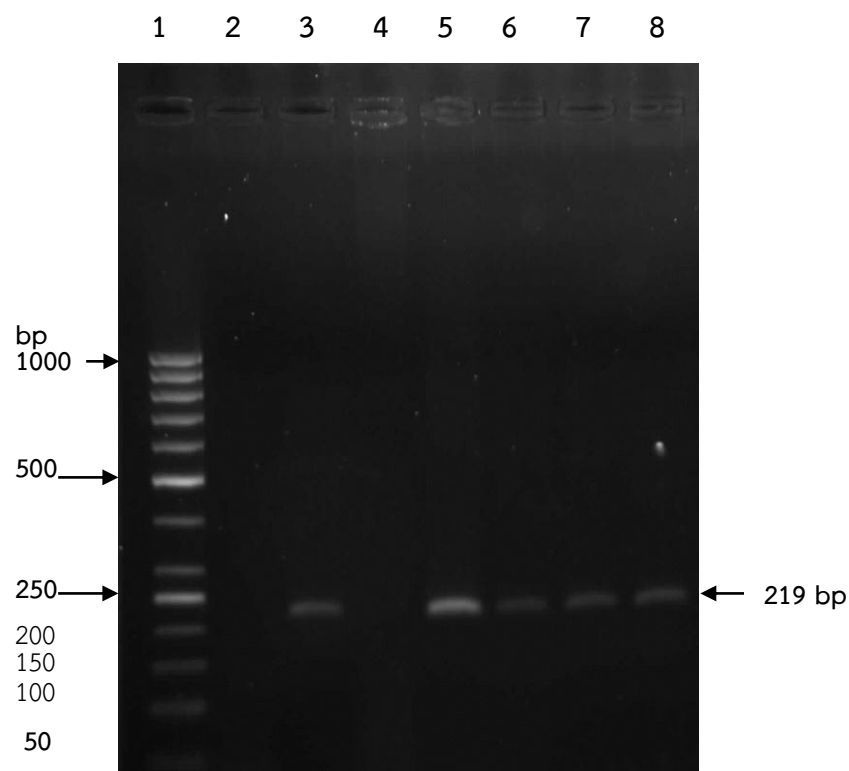


รูปที่ 4.1 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 0.7 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* แถวที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504, แถวที่ 3 เชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ทางคลินิกที่ดื้อยา คลาริโธรมัยซิน, แถวที่ 4 ตัวอย่าง CLOtest* และแถวที่ 5 ตัวอย่าง in house urease test

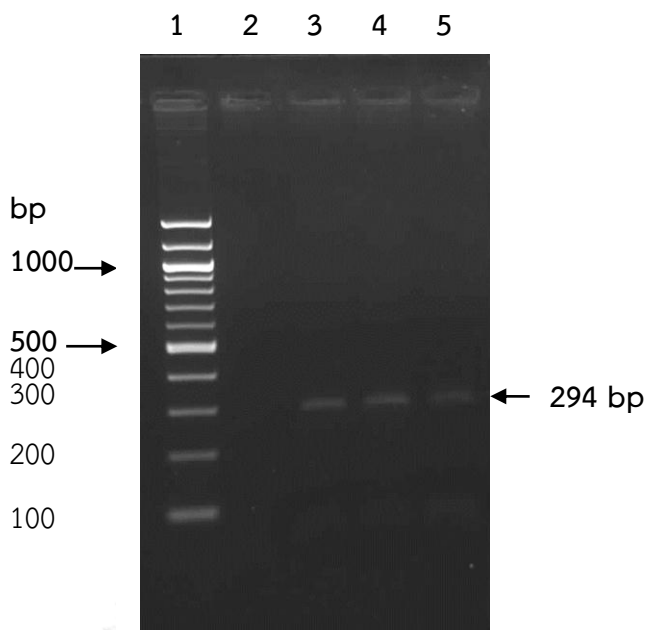
2. การตรวจยืนยันเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR บริเวณยีน 16S rRNA หรือ บริเวณยีน *glmM*

เพื่อตรวจยืนยันว่าตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกนั้นมีเชื้อ *H. pylori* จริง จึงทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยยีนที่ทำการตรวจวิเคราะห์ มี 2 ยีน คือ ยีน 16S rRNA มีขนาดผลผลิต เท่ากับ 219 bp ดังรูปที่ 4.2 หรือ ยีน *glmM* มีขนาดผลผลิต เท่ากับ 294 bp ดังรูปที่ 4.3 ซึ่งแต่ละตัวอย่างจะตรวจวิเคราะห์เพียงยีนใดยีนหนึ่งเท่านั้น ผลการทำ PCR ที่บริเวณยีน 16S rRNA จากตัวอย่าง in house urease test ทั้งหมด 52 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจำนวน 19 ตัวอย่าง และตัวอย่าง CLOtest* ทั้งหมด 46 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจำนวน 23 ตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่าง urease test

ที่ให้ผลบวกกับยีน 16S rRNA มีทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1 และผลการทำ PCR บริเวณยีน *glmM* จากตัวอย่าง in house urease test ทั้งหมด 91 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจำนวน 16 ตัวอย่าง จากตัวอย่าง CLOtest* ทั้งหมด 164 ตัวอย่าง ให้ผลบวกจำนวน 43 ตัวอย่าง ดังนั้นตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกกับยีน *glmM* มีทั้งสิ้น 59 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1 สรุปตัวอย่าง urease test ทั้งหมด 353 ตัวอย่าง มีเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 101 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.6 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 4.2 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR ยีน 16S rRNA; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp, แถวที่ 2 Negative Control (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ), แถวที่ 3 Positive control (ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504), แถวที่ 4-8 ตัวอย่าง urease test รหัส 021212-1, 021212-3, 021212-1, 021212-5 และ 021212-9 ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR ยีน *glmM*; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 Negative Control (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ), แถวที่ 3 Positive control (ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504), แถวที่ 4 และ 5 ตัวอย่าง urease test รหัส 240713-7 และ 240713-7 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 การตรวจวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และยีน *glmM* จากตัวอย่าง urease test ด้วยวิธี PCR

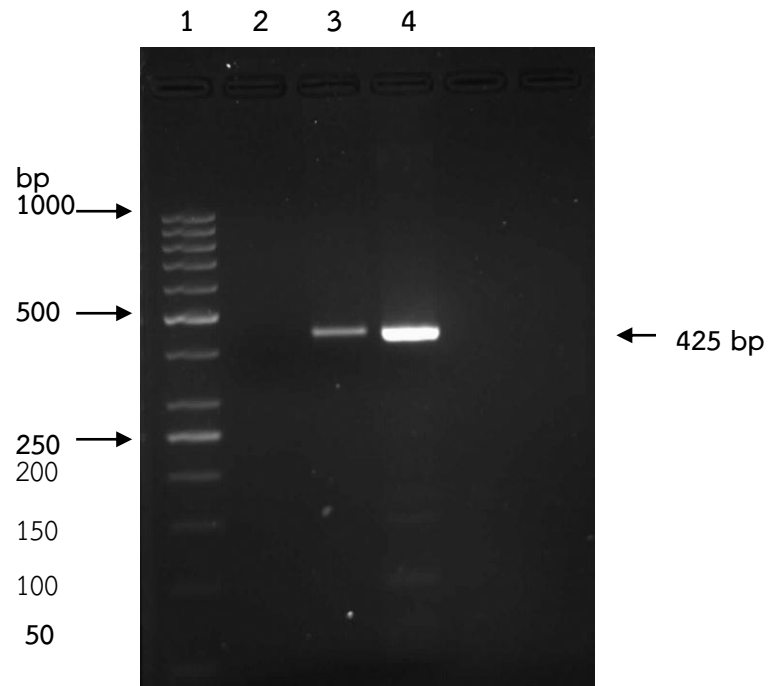
ชนิดของ Urease test	จำนวนตัวอย่างที่ทดสอบทั้งหมด	ผลบวกกับ PCR 16S rRNA (n)	ผลบวกกับ PCR <i>glmM</i> (n)
in house	143	19 (52)	16 (91)
CLOtest*	210	23 (46)	43 (164)
รวม	353	42	59

หมายเหตุ

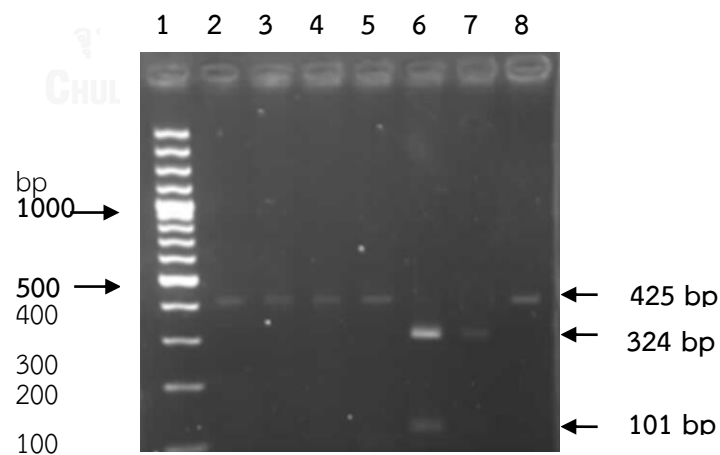
(n) คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

3. การตรวจสอบหาเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR-RFLP

การตรวจสอบหาเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์ที่บริเวณ 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR-RFLP เริ่มจากการเพิ่มจำนวนยีน 23S rRNA ด้วยวิธี PCR ได้ขนาดของผลผลิตเท่ากับ 425 bp ผลดังรูปที่ 4.4 และตัดด้วยเอนไซม์ *Bsa*I จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ ขนาด 324 และ 101 bp ผลดังรูปที่ 4.5 สรุปลักษณะ urease test ที่ตรวจยืนยันว่ามีเชื้อ *H. pylori* จำนวนทั้งหมด 101 ตัวอย่าง พบให้ผลผลิตกับ PCR 23S rRNA ทั้งสิ้น 53 ตัวอย่าง และสามารถตัดด้วย *Bsa*I ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกกับ PCR ยีน 16S rRNA จำนวน 42 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับ PCR 23S rRNA จำนวน 23 ตัวอย่าง และสามารถตัดด้วย *Bsa*I จำนวน 3 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกกับ PCR ยีน *glmM* จำนวน 59 ตัวอย่าง ให้ผลบวกกับ PCR 23S rRNA จำนวน 30 ตัวอย่าง และสามารถตัดด้วย *Bsa*I จำนวน 1 ตัวอย่าง และจากตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คลินิกที่ต่อยาคลารีโรรมัยซิน จำนวนทั้งหมด 5 ตัวอย่าง พบให้ผลผลิตกับ 23S rRNA ทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง และสามารถตัดด้วย *Bsa*I ทั้งหมด 1 ตัวอย่าง ดังสรุปในตารางที่ 4.2



รูปที่ 4.4 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR ยีน 23S rRNA; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp, แถวที่ 2 Negative Control (น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ), แถวที่ 3 Positive control (ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504), แถวที่ 4 ตัวอย่าง urease test รหัส 140912-1



รูปที่ 4.5 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำ PCR-RFLP; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2-8 ตัวอย่าง urease test รหัส 281013-24, 221113-23, 221113-16, 221113-15, 290912-1, 191113-9 และ 041113-14 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 การตรวจวิเคราะห์ PCR-RFLP ยีน 23S rRNA และตัดด้วยเอนไซม์ *BsaI* จากตัวอย่าง urease test และ *H. pylori* สายพันธุ์คลินิกที่ต๋อยาคารโรรมัยจีน

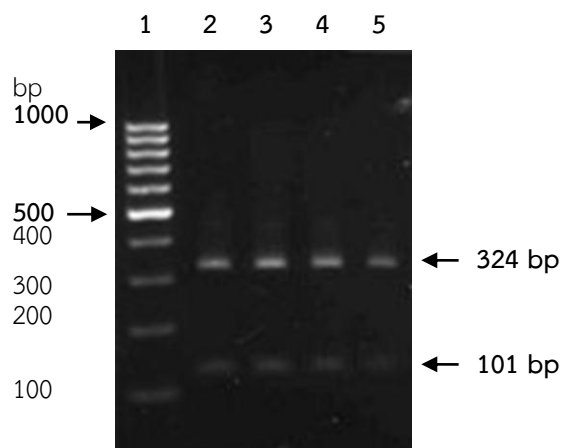
ประเภทตัวอย่าง	จำนวนที่ให้ผลบวก	จำนวนที่ให้ผลบวกกับ PCR 23S rRNA	จำนวนที่สามารถตัดด้วย <i>BsaI</i>
Urease test ที่ให้ผลบวกกับ PCR 16S rRNA	42	23	3
Urease test ที่ให้ผลบวกกับ PCR <i>glmM</i>	59	30	1
รวม	101	53	4
<i>H. pylori</i> สายพันธุ์คลินิก	N/A	5	1

หมายเหตุ

N/A : ไม่ได้ทำ PCR 16S rRNA/*glmM*

4. การโคลนนิ่ง (Cloning)

เนื่องจากตัวอย่าง urease test ที่ตรวจยืนยันว่ามีกรกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G นั้นเป็นตัวอย่างที่มาจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย ซึ่งมีดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ในปริมาณที่น้อยมาก ไม่เพียงพอในการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอควบคุมบวก (Positive Control) ตลอดการวิจัย จึงทำการโคลนยีน 23S rRNA ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G ใน StrataClone PCR Cloning vector pSC-A-amp/Kan และถ่ายโอนเข้าสู่ *E. coli* ทำการคัดเลือกโคลนที่มีสีขาวมาทำตรวจยืนยันว่ามียีน 23S rRNA ที่การกลายพันธุ์ที่ A2143G หรือไม่โดยวิธี PCR-RFLP ได้ผลดังรูปที่ 4.6 ซึ่งจะเห็นว่าโคลนที่มียีนกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G จะสามารถตัดด้วยเอนไซม์ *BsaI* ได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 324 และ 101 bp ส่วนโคลนที่ไม่มียีนที่ต้องการจะมีขนาดเท่าเดิม คือ 425 bp และจากผลการส่งหาลำดับเบสของโคลนที่คัดเลือกยืนยันได้ว่าเป็นยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* และมีกรกลายพันธุ์ A2143G จริง



รูปที่ 4.6 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง urease test ที่ทำการโคลนนิ่ง; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2-5 ตัวอย่าง urease test ที่ทำการโคลนนิ่ง โคลนนี้ที่ 1-4 ตามลำดับ

5. การหาลำดับเบส (Sequencing)

เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ยีน 23S rRNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP นั้น เป็นการตรวจการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G เท่านั้น ในงานวิจัยนี้จึงต้องการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 23S rRNA จากตำแหน่ง 2191 ถึง 2615 ทั้งหมด เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ตำแหน่งอื่นๆ โดยนำตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวก จากการทำ PCR 23S rRNA จำนวน 29 ตัวอย่าง และตัวอย่างเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คลินิกที่ต๋อยาคารโรรมัยชิน ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสกับลำดับเบสในธนาคารยีน (Genbank) โดยโปรแกรม Blast ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมด ดังรูปที่ 4.7 พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142G, T2182C, A2143G และ A2143G + T2182C ตามลำดับ

```

1st_U27270(k1k2) -----aaagagtcctcccgactgtttacaaaaacacagca
8-star-K1 -----gaactttccggactgtttac--aaaaacacagca
10-star-K1 -----aactctgactgataacaaaaacacagca
9-star-K1 -----gaaaacaaggggactgagatac-caaaaacacagca
B_1_K1      ttccacagcgatgtggtctcagcaaaagagtcctcccgactgtttacaaaaacacagca
                                     *****
1st_U27270(k1k2) ctttgccaaactcgtbaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccgggtgctcgaagggttaa
8-star-K1      ctttgccaaactcgtbaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccgggtgctcgaagggttaa
10-star-K1     ctttgccaaactcgtbaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccgggtgctcgaagggttaa
9-star-K1     ctttgccaaactcgtbaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccgggtgctcgaagggttaa
B_1_K1        ctttgccaaactcgtbaagaggaagtataaggtgtgacgcctgcccgggtgctcgaagggttaa
*****
1st_U27270(k1k2) gaggatgctcagtcgcgaagatgaagcgttgaaatgaagcccgagtaaacggcggccgcta
8-star-K1      gaggatgctcagtcgcgaagatgaagcgttgaaatgaagcccgagtaaacggcggccgcta
10-star-K1     gaggatgctcagtcgcgaagatgaagcgttgaaatgaagcccgagtaaacggcggccgcta
9-star-K1     gaggatgctcagtcgcgaagatgaagcgttgaaatgaagcccgagtaaacggcggccgcta
B_1_K1        gaggatgctcagtcgcgaagatgaagcgttgaaatgaagcccgagtaaacggcggccgcta
*****
1st_U27270(k1k2) actataacgggtcctaaggtagcgaattccttgtcgggttaaataccgaacctgcatgaatg
8-star-K1      actataacgggtcctaaggtagcgaattccttgtcgggttaaataccgaacctgcatgaatg
10-star-K1     actataacgggtcctaaggtagcgaattccttgtcgggttaaataccgaacctgcatgaatg
9-star-K1     actataacgggtcctaaggtagcgaattccttgtcgggttaaataccgaacctgcatgaatg
B_1_K1        actataacgggtcctaaggtagcgaattccttgtcgggttaaataccgaacctgcatgaatg
*****
1st_U27270(k1k2) gcgtaacgagatgggagctgtctcaaccagagattcagtgaaattgtagtggagggtgaaa
8-star-K1      gcgtaacgagatgggagctgtctcaaccagagattcagtgaaattgtagtggagggtgaaa
10-star-K1     gcgtaacgagatgggagctgtctcaaccagagattcagtgaaattgtagtggagggtgaaa
9-star-K1     gcgtaacgagatgggagctgtctcaaccagagattcagtgaaattgtagtggagggtgaaa
B_1_K1        gcgtaacgagatgggagctgtctcaaccagagattcagtgaaattgtagtggagggtgaaa
*****

```

รูปที่ 4.7 แสดงการทำ Multiple Alignment โดย Sequence ลำดับที่ 1 U27270 (สายพันธุ์อ้างอิง), Sequence ลำดับที่ 2-5 ตัวอย่าง urease test รหัส 8-star-K1, 10-star-K1, 9-star-K1 และ B_1_K1 ตามลำดับ

```

1st_U27270(k1k2 atctectactacccegggcaagaeggaaagaccccgtggaccttactacaacttagcaact
8-star-K1 atctectactacccegggcaagaeggaaagaccccgtggaccttactacaacttagcaact
10-star-K1 atctectactacccegggcaagaeggaaagaccccgtggaccttactacaacttagcaact
9-star-K1 atctectactacccegggcaagaeggaaagaccccgtggaccttactacaacttagcaact
B_1_K1 atctectactacccegggcaagaeggaaagaccccgtggaccttactacaacttagcaact
*****
          A2142G A2143G
          ^ ^
1st_U27270(k1k2 gctaaagggaatatacatgcccaggataggtgggaaggctttgaaagtaagggtcttggctct
8-star-K1 gctaaagggaatatacatgcccaggataggtgggaaggctttgaaagtaagggtcttggctct
10-star-K1 gctaaagggaatatacatgcccaggataggtgggaaggctttgaaagtaagggtcttggctct
9-star-K1 gctaaagggaatatacatgcccaggataggtgggaaggctttgaaagtaagggtcttggctct
B_1_K1 gctaaagggaatatacatgcccaggataggtggaag-----
*****
          T2182C
          ^
1st_U27270(k1k2 tatggag----
8-star-K1 tatggagaa--
10-star-K1 ttaatgggaga
9-star-K1 ttatggagaa-
B_1_K1 -----

```

รูปที่ 4.7 (ต่อ) แสดงการทำ Multiple Alignment โดย Sequence ลำดับที่ 1 U27270 (สายพันธุ์อ้างอิง), Sequence ลำดับที่ 2-5 ตัวอย่าง urease test รหัส 8-star-K1, 10-star-K1, 9-star-K1 และ B_1_K1 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 แสดงตำแหน่งและเปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ไม่มีการกลายพันธุ์บริเวณยีน 23S rRNA จากตัวอย่าง urease test 29 ตัวอย่าง

ตำแหน่งการกลายพันธุ์	จำนวน	อัตราการกลายพันธุ์ (เปอร์เซ็นต์)
A2142G	1	3.4
A2143G	1	3.4
T2182C	14	48.3
A2143G+T2182C	3	10.3
wild type	10	0
รวม	29	

จากตัวอย่าง urease test ทั้งสิ้น 29 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส พบการกลายพันธุ์ ดังสรุปในตาราง 4.3 จากตารางจะเห็นว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2142G, A2143G, T2182C และ A2143G+T2182C คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 3.4, 3.4, 48.3 และ 10.3 ตามลำดับ โดยพบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ T2182C พบมากที่สุด คิดเป็น 48.3 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาพบการกลายพันธุ์สองตำแหน่งคือ A2143G+T2182C คิดเป็น 10.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การกลายพันธุ์ที่ A2142G และ A2143G พบเพียง 3.4 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดลองนี้ ไม่สามารถส่งหาลำดับเบสของตัวอย่างที่ PCR 23S rRNA ให้ผลบวกทั้งหมดได้เนื่องจาก ตัวอย่าง urease test มีข้อจำกัด คือ มีปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* น้อย ทำให้ได้ผลผลิต PCR ไม่เพียงพอสำหรับการส่งหาลำดับเบส

นอกจากนั้นยังได้ทำการหาลำดับเบสของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์คลินิกที่ดื้อยา คลาริโธรมัยซิน ทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ผลพบว่ามีตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2142G จำนวน 1 เชื้อ, A2143G จำนวน 1 เชื้อ และ T2182C จำนวน 3 เชื้อ

6. การออกแบบไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะกับยีนบริเวณ 23S rRNA

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer v4 Software ซึ่งใช้ข้อมูลลำดับเบสจากธนาคารยีน (GenBank, Accession no. U27270) บริเวณ 2281-2640 ดังรูปที่ 4.8 ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 4 เส้น คือ F3, B3, Forward Inner primer (FIP) ประกอบไปด้วยบริเวณ F1c และ F2 และ Backward Inner Primer (BIP) ประกอบไปด้วยบริเวณ B1c และ B2 การออกแบบไพรเมอร์ครั้งที่ 1 จะเป็นแบบมาตรฐาน [Standard primer design window (Easy mode)] ซึ่งจะได้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 2 ชุด ดังแสดงในรูปที่ 4.9 เลือกไพรเมอร์ที่ดีที่สุดคือ ID 1 โดยใช้เกณฑ์ในการเลือกคือ มีค่า dimer (minimum) Delta G น้อยที่สุดจากที่โปรแกรมคำนวณให้ ลำดับเบสและคุณสมบัติของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 4.4



2281	tgacgcctgc ccgggtgctcg aaggtaaga ggatgctca gtcgcaagat gaagcgttga (60)
2341	attgaagccc gagtaaaccg cggccgtaac tataacggtc ctaaggtagc gaaattcctt (120)
2401	gtcggtaaaa taccgacctg catgaatggc gtaacgagat gggagctgtc tcaaccagag (180)
2461	attcagtgaa attgtagtgg aggtgaaaat tctcctacc cgcggcaaga cggaaagacc (240)
2521	ccgtggacct ttactacaac ttagcactgc taatgggaat atcatgca g gataggtgg (300)
2581	gaggcttga agtaagggtc ttggctctta tggagtcac cttgagatac cacccttgat (360)

รูปที่ 4.8 แสดงลำดับเบสบริเวณ 2281 – 2640 จากธนาคารยีน (GenBank, Accession no. U27270)

PrimerExplorer V4 Software

1. Turn on the check box to choose primer set.
2. Push "Confirm" button to transfer to Primer Information page.
3. Push "Save List" button to download Excel format file.

Confirm Save List DesignId 141119235836

Primer set: sorting rule [Easy]

Target DNA GTCGGTTAAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCACACAGAGATTCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACC CGCGGCAAG
(Complement) cagccaatttatggctggacgtacttaaccgattgctcta ccctcgacagagtggctcttaagtcacttcaacatcacctccacttttaaggaggatggcgccgttc
CONSENSUS(*)

Primer ID	dG(dimer)	121	131	141	151	161	171	181	191	201	211	221
<input type="checkbox"/> [1]	-2.36	[1]	ACCGACCTGCATGAATGG	GTAACGAGAT	GGGAGCTGTC						cttttaaggaggatggcgccgAAG	
<input type="checkbox"/> [14]	-2.36	[14]	GATGAATGGCGTAACGAGA	GGGAGCTGTC	CAACAGAGA						cttttaaggaggatggcgccgAAG	

[outputs: 2 sets] Displayed 1 - 2. DesignId 141119235836

รูปที่ 4.9 แสดงชุดของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ทั้งหมดในครั้งที่ 1 โดยใช้โปรแกรม [Standard primer design (Easy mode)]

จากนั้นทำการออกแบบ Loop Primer คือ Loop Primer Forward (LF) และ Loop Primer Backward (LB) ได้จำนวนทั้งหมด 11 ชุด และได้เลือก Loop Primer ชุดที่ดีที่สุด 1 ชุด โดยใช้เกณฑ์ในการเลือกคือ มีค่า dimer (minimum) Delta G น้อยที่สุดจากที่โปรแกรมคำนวณให้ รายละเอียดลำดับเบสและคุณสมบัติของไพรเมอร์ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้นบนลำดับเบสดังรูปที่ 4.10

	F3	F2	
2401	gtcggtaa	taccgacctg catgaatggc	gtaacgagat gggagctgtc tcaaccagag
	LF	F1c	SNP= A2143G
2461	attcagtga	attgtagtgg aggtgaaaat	tcctcctacc cgcggaaga cggaAagacc
	B1c	LB	B2
2521	ccgtggacct	ttactacaac taagcactgc	taatgggaat atcatgca ggataggigg
		B3	
2581	gaggcttga	agtaagggct ttggctctta	tggagtcac cttgagatac cacccttgat

รูปที่ 4.10 แสดงลำดับเบสและตำแหน่งของไพรเมอร์ทั้ง 6 เส้น จากการออกแบบโดยใช้โปรแกรม PrimerExplorer v4 Software แบบมาตรฐาน (Easy mode)

เนื่องด้วยการออกแบบไพรเมอร์ LAMP แบบมาตรฐาน ไม่สามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ได้ เนื่องจากเป็น Common primer คือ amplify ได้ทั้ง wild type และ mutant type ซึ่งเกิดจากลำดับเบสของไพรเมอร์ BIP_WT (CGGAAAGACCCCGTGGACCT-AGCCTCCCACCTATCCTG) บริเวณ B1c ที่ไปทับส่วนการกลายพันธุ์ (SNP) จึงทำการออกไพรเมอร์ BIP ในครั้งที่ 2 โดยตั้งชื่อว่า BIP_MT (GAGACCCCGTGGACCTTT-AGCCTCCCACCTATCCTG) โดยการเลื่อนไพรเมอร์ BIP ออกไป ซึ่งจะให้ตำแหน่งการกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 5' ของ B1C และเพิ่มความยาวทางด้านปลาย 3' อีก 2 bp คือเบส TT ตามหลักการการออกแบบขั้นพัฒนา (Advance primer design) แบบ Highly specific primer ซึ่งตามหลักการกล่าวไว้ว่า ถ้ากำหนดตำแหน่งการกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 5' ของ B1c จะสามารถ amplify ได้เฉพาะ mutant type เท่านั้น แต่สำหรับ wild type ไม่สามารถ amplify ได้ รายละเอียดของลำดับเบสและคุณสมบัติของไพรเมอร์ BIP_MT ดังแสดงในตารางที่ 4.4 แต่อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ชุดนี้ยังไม่สามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ได้ จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ในครั้งที่ 3 ได้เป็น BIP_MT-2 (ACCCCGTGGACCTTTAC-AGCCTCCCACCTATCCTG) โดยจะทำการเลื่อนไพรเมอร์ BIP ออกไป

ให้ห่างจาก SNP 3 bp ทางด้านปลาย 5' และเพิ่มความยาวทางด้านปลาย 3' อีก 4 bp คือเบส TTAC เนื่องจากลำดับเบสของ BIP_MT-2 ทางด้านปลาย 3' ทับส่วนของไพรเมอร์ LB ทำให้ต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ LB ใหม่ จากเดิมลำดับเบส คือ ACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGG เป็น ACAACTTAGCACTGCTAATGGGAAT โดยการเลื่อนลำดับของไพรเมอร์ให้ห่างออกไปจากตำแหน่งเดิมจำนวน 3 bp ทางด้านปลาย 5' และเพิ่มความยาวด้านปลาย 3' อีก 3 bp คือเบส AAT ตั้งชื่อไพรเมอร์ใหม่ว่า LB+2 รายละเอียดของลำดับเบสและคุณสมบัติของไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งหมดดังสรุปในตารางที่ 4.5



ตารางที่ 4.4 แสดงชื่อของไพรเมอร์, ลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3', ความยาว, ค่า Tm, ค่า Delta G และ อัตรา GC ของไพรเมอร์ LAMP

ไพรเมอร์	ตำแหน่ง ปลาย 5'	ตำแหน่ง ปลาย 3'	ความ ยาว (bp)	ค่า Tm	5'dG	3'dG	อัตรา GC	ลำดับเบส
F3	132	149	18	59.01	-6.18	-4.51	0.56	ACCGACCTGCATGAATGG
B3	307	326	20	59.22	-5.75	-4.02	0.45	AGCCAAAGCCCTTACTTCAA
FIP	-	-	42	-	-	-	-	GCCGCGGTAGGAGGAATTTTC -GTAACGAGATGGGAGCTGTC
BIP_WT	-	-	38	-	-	-	-	CGGAAAGACCCCGTGGACCT- AGCCTCCCACCTATCCTG
F2	151	170	20	59.27	-4.67	-5.75	0.55	GTAACGAGATGGGAGCTGTC
F1c	205	226	22	65.46	-8.70	-3.17	0.59	GCCGCGGTAGGAGGAATTTTC
B2	289	306	18	59.26	-5.93	-4.74	0.61	AGCCTCCCACCTATCCTG
B1c_WT	231	250	20	65.88	-5.30	-5.69	0.65	CGGAAGACCCCGTGGACCT
LF	179	203	25	60.60	-5.70	-3.75	0.40	CCTCCACTACAATTTCACTGAA TCT
LB	253	277	25	62.63	-4.13	-5.00	0.44	ACTACAATTAGCACTGCTAAT GGG
BIP_MT	-	-	35	-	-	-	-	GAGACCCCGTGGACCTTT- AGCCTCCCACCTATCCTG
B1c_MT	235	252	18	58.4	-	-	0.61	GAGACCCCGTGGACCTTT
BIP_MT- 2	-	-	35	-	-	-	-	ACCCCGTGGACCTTTAC- AGCCTCCCACCTATCCTG
B1c_MT- 2	238	254	17	54.9	-	-	0.59	ACCCCGTGGACCTTTAC
LB+2	256	280	25	62.5	-	-	0.40	ACAATTAGCACTGCTAATGGG AAT

ตารางที่ 4.5 แสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบครั้งที่ 1-3, ลำดับเบสและความยาวของชุดไพรเมอร์ LAMP บริเวณ 23S rRNA ที่ออกแบบทั้งหมดในการศึกษานี้

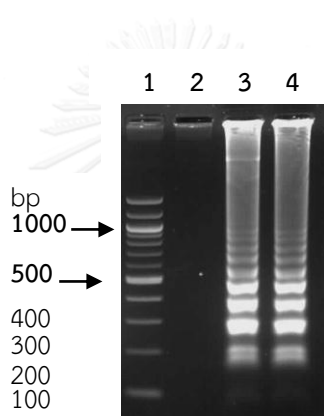
ครั้งที่ในการออกแบบ	ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ความยาว (bp)
1	F3	5'-ACCGACCTG CATGAATGG-3'	18
1	B3	5'-AGCCAAAGCCCTTACTTCAA-3'	20
1	LF	5'-CCTCCACTACAATTTCACTGAATCT-3'	25
1	LB	5'-ACTACAACCTAGCACTGCTAATGGG-3'	25
1	FIP	5'-GCCGCGGGTAGGAGGAATTTTC-GTAACGAGATGGGAGCTGTC-3'	42
1	BIP_WT	5'-CGGAAGACCCCGTGGACCT-AGCCTCCCACCTATCCTG-3'	38
			(B1C: 20, B2:18)
2	BIP_MT	5'-GAGACCCCGTGGACCTTT-AGCCTCCCACCTATCCTG-3'	35
			(B1C: 18, B2:18)
3	BIP_MT-2	5'-ACCCCGTGGACCTTTAC-AGCCTCCCACCTATCCTG-3'	35
			(B1C:17, B2:18)
3	LB+2	5'-ACAACCTAGCACTGCTAATGGGAAT-3'	25

7. การทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ด้วยวิธี LAMP

7.1 การทดสอบสถานะที่เหมาะสมของไพรเมอร์ LAMP ในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA

เพื่อหาสถานะต่างๆ ที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา LAMP บริเวณยีน 23S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 6 เส้น คือ F3, B3, FIP, BIP_WT, LF และ LB ดังแสดงในตารางที่ 4.4 ประกอบด้วย FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่ 65

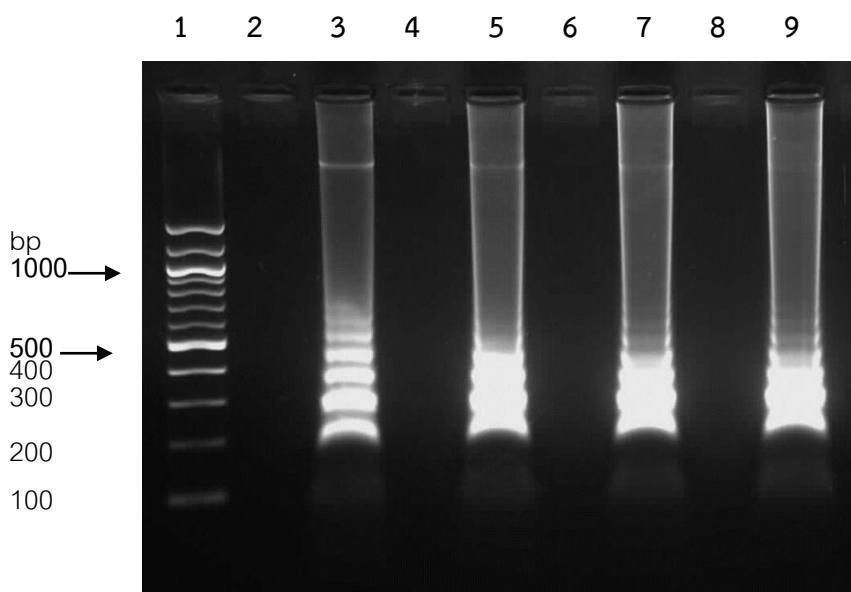
องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการทดสอบกับเชื้อ wild type ซึ่งใช้เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 และ A2143G mutant type ผลการทำ LAMP พบผลผลิตเป็นขั้นบันได (ladder like pattern) มีขนาดตั้งแต่ 195 bp จนถึงช่องที่ใส่ตัวอย่าง ทั้งจากตัวอย่าง wild type และ A2143G mutant type ดังแสดงในรูปที่ 4.11 แสดงว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนี้สามารถเกิดปฏิกิริยา LAMP ได้สำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของปฏิกิริยา LAMP จึงได้ทดสอบหา ระยะเวลา ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของเบตาอิน ความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต และความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.11 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, แถวที่ 3 wild type (*H. pylori* ATCC 43504), แถวที่ 4 ตัวอย่าง urease test ที่เป็น A2143G mutant type รหัส 290912-1

7.1.1 การทดสอบหาระยะเวลาของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

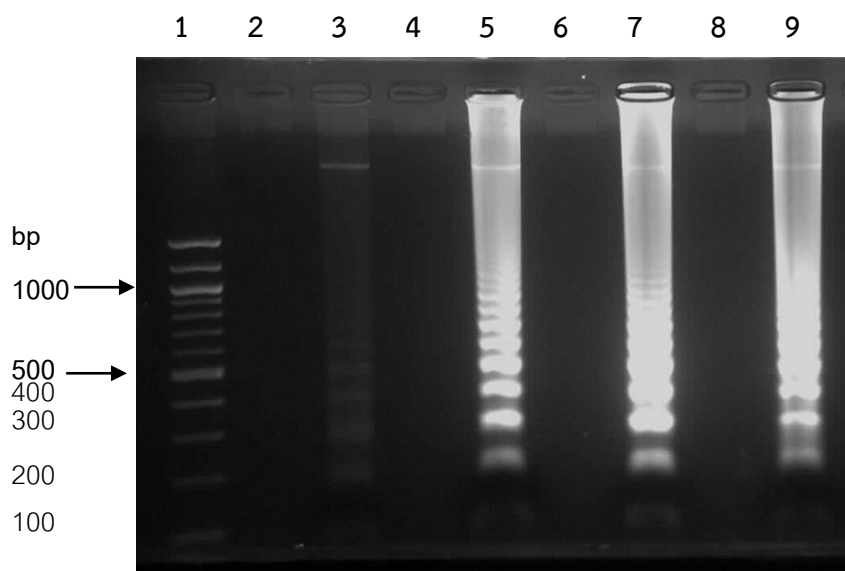
สำหรับการทดสอบหาระยะเวลาบ่มของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม ในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ของ *H. pylori* โดยการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เวลาที่ 35, 45, 55 และ 60 นาที เกิดผลผลิต LAMP ทั้งหมด ดังรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 3, 5, 7 และ 9 ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ในเวลา 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ, แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อในเวลา 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ

7.1.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

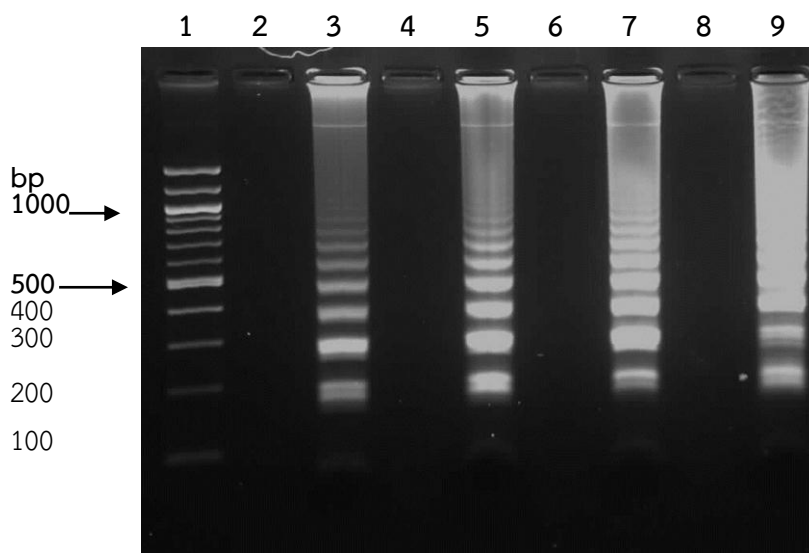
สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม จะทดสอบที่ความเข้มข้น 4 สภาวะ คือสภาวะที่ 1 ความเข้มข้นเป็น 0.8, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ สภาวะที่ 2 ความเข้มข้นเป็น 1.2, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ สภาวะที่ 3 ความเข้มข้นเป็น 1.6, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ และสภาวะที่ 4 ความเข้มข้นเป็น 1.8, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ สำหรับไพรเมอร์ FIP/BIP, F3/B3 และ LF/LB ตามลำดับ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะที่ 1 มีผลผลิต LAMP น้อยมาก ทำให้มีแถบจางมาก ส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์สภาวะที่ 2 มีผลผลิตมากขึ้นกว่าสภาวะที่ 1 แต่ความเข้มข้นยังไม่ชัดเจนมาก และพบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะที่ 3 และ 4 มีผลผลิตมากที่สุดและให้แถบที่ชัดเจนที่สุดดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 3, 5, 7 และ 9 ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สถานะที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ, แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สถานะที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

7.1.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอินของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

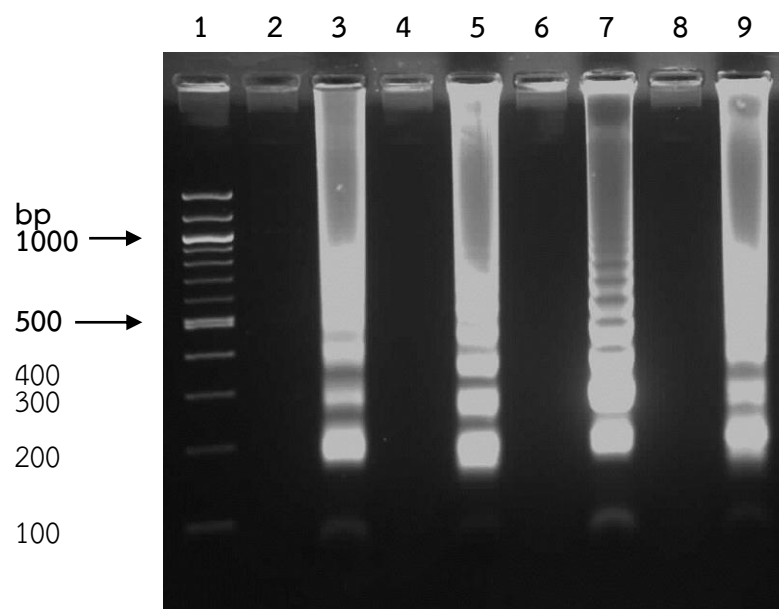
สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอินที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ดังนี้ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของเบตาอิน ที่ 0.4 และ 0.6 โมลาร์ มีผลผลิต LAMP มากขึ้นเป็นลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของเบตาอินที่ 0.8 และ 1.0 โมลาร์ มีผลผลิตมากที่สุดและให้แบนที่ชัดเจนที่สุดดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของเบตาอินต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 3, 5, 7 และ 9 ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ที่ใช้เบตาอินความเข้มข้นที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้เบตาอิน ความเข้มข้นที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมลาร์ ตามลำดับ

7.1.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ดังนี้ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ และใช้เบตาอินความเข้มข้น 0.8 ไมลาร์ ป่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการป่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบผลผลิต LAMP เกิดขึ้นที่ทุกความเข้มข้น และพบว่าที่ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์ มีผลผลิตมากที่สุดและให้แบนเข้มมากที่สุดดังรูปที่ 4.15

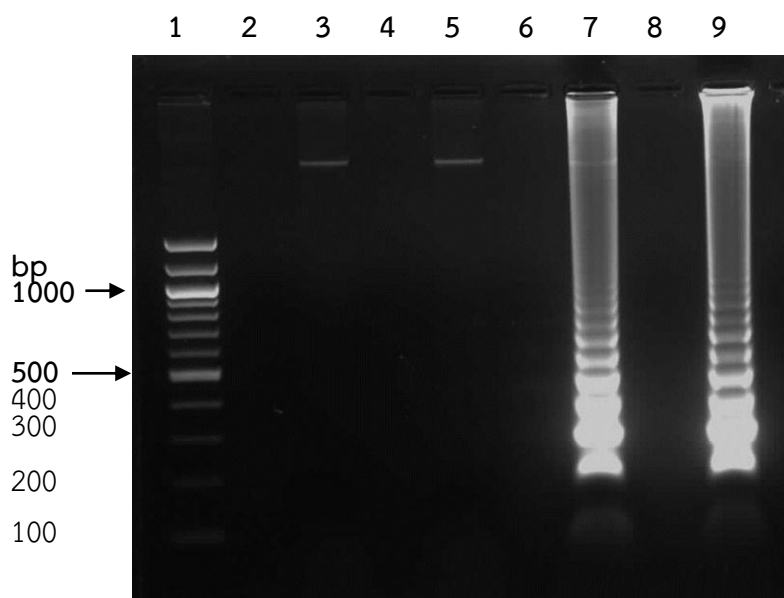


รูปที่ 4.15 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 3, 5, 7 และ 9 ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ที่ใช้ดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้นที่ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้ดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้นที่ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

7.1.5 การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ ดังนี้ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, ใช้เบตาอินที่ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ และใช้ดีออกซีโรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้นที่ 1.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของ

แมกนีเซียมซัลเฟตที่ 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ ไม่พบผลผลิต ขณะที่ความเข้มข้น 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ มีผลผลิตมากใกล้เคียงกัน ดังรูปที่ 4.16



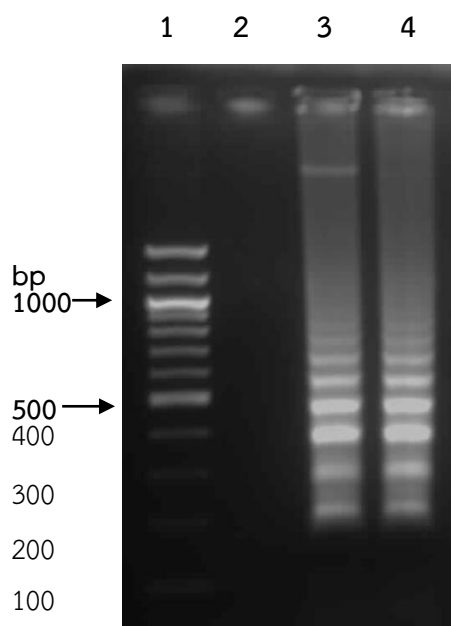
รูปที่ 4.16 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_WT ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 3, 5, 7 และ 9 ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นที่ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 2, 4, 6 และ 8 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นที่ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

สรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ด้วยวิธี LAMP ประกอบด้วย FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์, *Bst* DNA Polymerase ความเข้มข้น 8 ยูนิต/มิลลิลิตร และดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* 10-100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตโดยการแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยผลผลิต LAMP จะเห็นเป็นสเมียร์แบน

แต่อย่างไรก็ตามไพรเมอร์ชุดนี้ไม่สามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ได้ เนื่องจาก บริเวณการกลายพันธุ์ (SNP) อยู่ในบริเวณของไพรเมอร์ BIP_WT ทำให้ amplify ได้ทั้ง wild type และ mutant type จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ BIP ใหม่

7.2 การทดสอบสภาวะ LAMP ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ BIP_MT

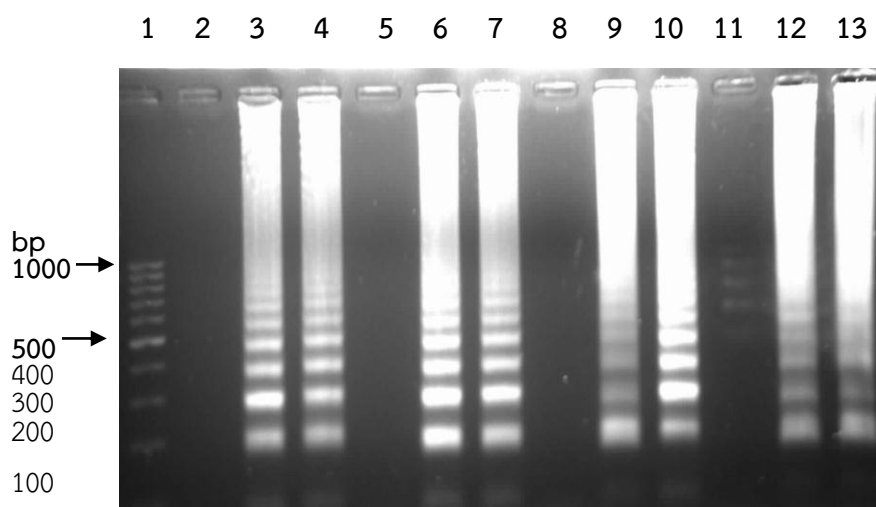
ในการทดลองนี้จะใช้ไพรเมอร์ BIP_MT แทน BIP_WT สำหรับไพรเมอร์ FIP, F3, B3, LF และ LB จะใช้เส้นเดิมเหมือนการทดลองในหัวข้อ 7.1 ซึ่ง BIP_MT จะแตกต่างจาก BIP_WT คือ มีลำดับเบสที่แตกต่างดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5 โดยออกแบบให้ตำแหน่งการกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 5' ของ B1C และเพิ่มความยาวทางด้านปลาย 3' อีก 2 bp คือเบส TT โดยตามหลักเกณฑ์ดังกล่าวของการออกแบบขั้นพัฒนา (Advance primer design) แบบ Highly specific primer ดีเอ็นเอ wild type จะไม่เกิดผลผลิต ขณะที่ mutant type จะเกิดผลผลิต ปฏิกริยา LAMP ประกอบด้วย FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบผลผลิต LAMP ลักษณะสเมียร์แบนเป็นชั้นบันได้ทั้งกับเชื้อ wild type ซึ่งใช้เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 และ A2143G mutant type ดังแสดงในรูปที่ 4.17 จึงได้ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ เพื่อที่จะแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.17 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT; แลวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แลวที่ 2 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, แลวที่ 3 wild type (*H. pylori* ATCC 43504), แลวที่ 4 ตัวอย่าง urease test ที่เป็น A2143G mutant type รหัส 290912-1

7.2.1 การทดสอบหาระยะเวลาของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

โดยการทดสอบปฏิกิริยา LAMP ที่ระยะเวลาต่างกันคือ 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้ง wild type และ mutant type ให้ผลเหมือนกัน คือ ที่เวลา 35, 45, 55 และ 60 นาที มีผลผลิต LAMP เกิดขึ้นทั้งหมด ดังรูปที่ 4.18 สรุปว่าไพรเมอร์ BIP_MT ไม่สามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ที่เวลาการทำปฏิกิริยาระหว่าง 35-60 นาที ได้ จึงได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

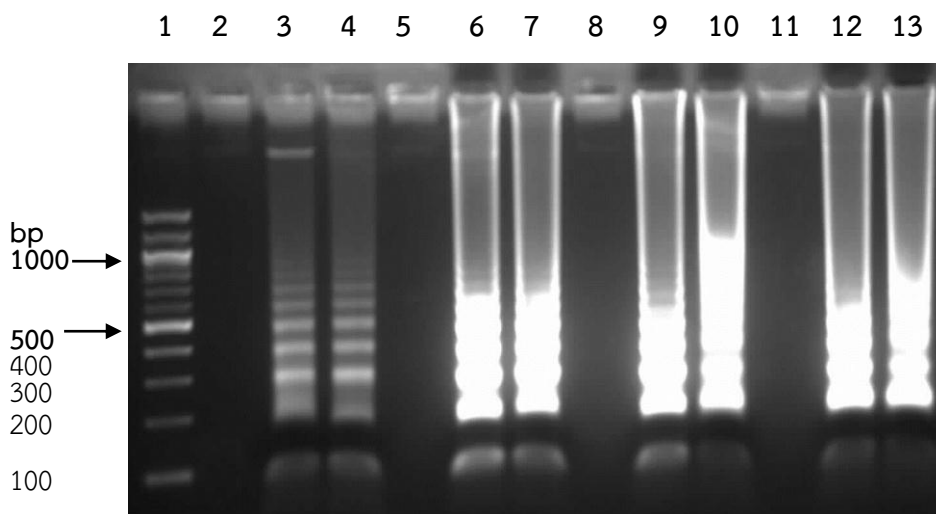


รูปที่ 4.18 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน; แลวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แลวที่ 2, 5, 8 และ 11 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อในเวลา 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ, แลวที่ 3, 6, 9 และ 12 ดีเอ็นเอของ wild type ในเวลา 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ, แลวที่ 4, 7, 10 และ 13 ดีเอ็นเอของ A2143G mutant type รหัส 290912-1 ในเวลา 35, 45, 55 และ 60 นาที ตามลำดับ

7.2.2 การทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม จะทดสอบที่ความเข้มข้น 4 สภาวะ คือสภาวะที่ 1 ความเข้มข้นเป็น 0.8, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ สภาวะที่ 2 ความเข้มข้นเป็น 1.2, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ สภาวะที่ 3 ความเข้มข้นเป็น 1.6, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ และสภาวะที่ 4 ความเข้มข้นเป็น 1.8, 0.2, 0.8 ไมโครโมลาร์ สำหรับไพรเมอร์ FIP/BIP, F3/B3 และ LF/LB ตามลำดับ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการบ่มนาน 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้ง wild type และ mutant type ให้ผลเหมือนกันคือ พบว่าเกิดผลผลิต LAMP ทั้ง 4 สภาวะ โดยความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะที่ 1 พบผลผลิตน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะที่ 2-4 แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าในสภาวะที่ 3 และ 4 จะมีแบนที่ชัดที่สุดเมื่อเทียบกับสภาวะที่ 2 ดังรูปที่ 4.19

สรุปว่าไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นทั้ง 4 สภาวะ ไม่สามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type ได้ จึงได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

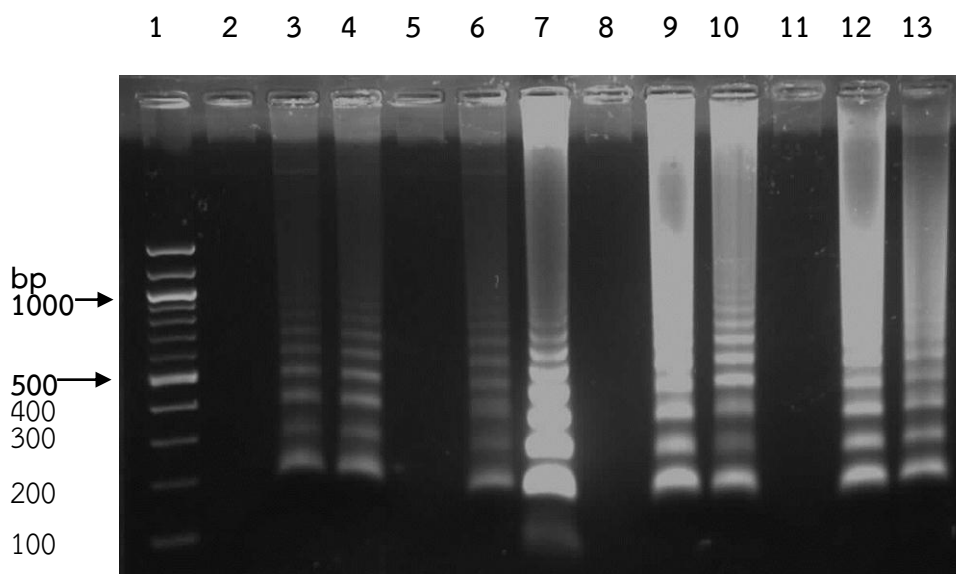


รูปที่ 4.19 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ไพรเมอร์ความเข้มข้นต่างๆ กัน; แลวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แลวที่ 2, 5, 8 และ 11 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ, แลวที่ 3, 6, 9 และ 12 ดีเอ็นเอของ wild type ที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ, แลวที่ 4, 7, 10 และ 13 ดีเอ็นเอของ A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่สภาวะที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

7.2.3 การทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอินของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของเบตาอินที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ดังนี้ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/ LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้ง wild type และ mutant type ให้ผลผลิต LAMP ที่ทุกความเข้มข้น โดยพบว่าความเข้มข้นของเบตาอินที่ 0.8 และ 1.0 โมลาร์ มีผลผลิตมากที่สุดดังรูปที่ 4.20

สรุปว่า เบตาอินที่ความเข้มข้น 0.4-1.0 โมลาร์ ไม่สามารถแยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้ จึงได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป



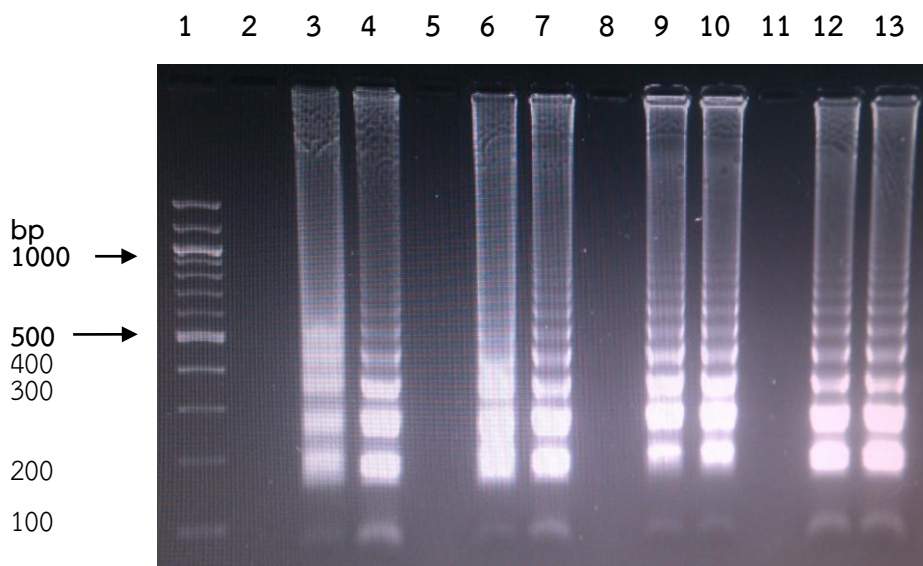
รูปที่ 4.20 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นของเบตาอินต่างๆ กัน; แลวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แลวที่ 2, 5, 8 และ 11 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อใช้เบตาอินความเข้มข้นที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ, แลวที่ 3, 6, 9 และ 12 ดีเอ็นเอของ wild type ที่ใช้เบตาอินความเข้มข้นที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ, แลวที่ 4, 7, 10 และ 13 ดีเอ็นเอของ A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ใช้เบตาอินความเข้มข้นที่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 โมลาร์ ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.2.4 การทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ ดังนี้ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์ และใช้เบตาอินที่ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้ง wild type และ mutant type ให้ผลผลิต LAMP ที่ทุกความเข้มข้น ดังรูปที่ 4.21

สรุปว่า ดิโออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ที่ความเข้มข้น 0.2-1.4 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถแยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้ จึงได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆ ต่อไป

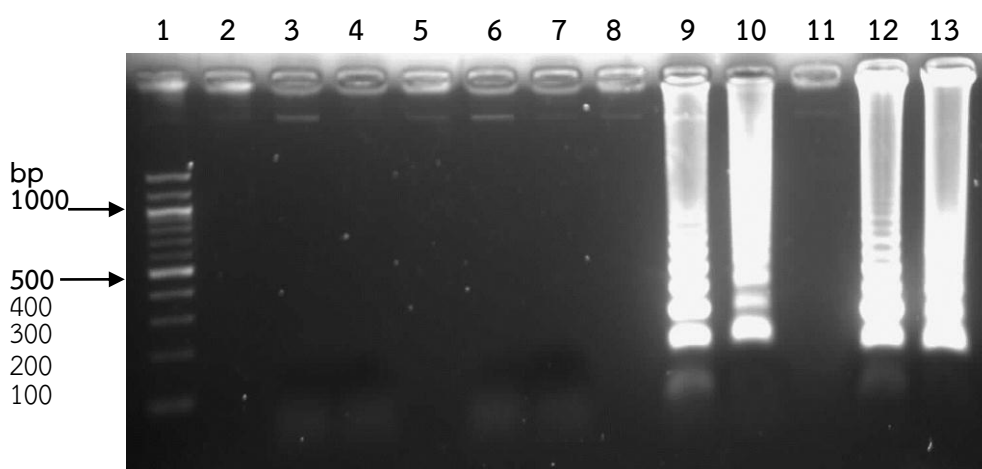


รูปที่ 4.21 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นของไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2, 5, 8 และ 11 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้นที่ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 3, 6, 9 และ 12 ดีเอ็นเอของ wild type ที่ใช้ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้นที่ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 4, 7, 10 และ 13 ดีเอ็นเอของ A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ใช้ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้นที่ 0.2, 0.6, 1.0 และ 1.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

7.2.5 การทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม

สำหรับการทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสม โดยทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ดังนี้ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, ใช้เบตาอินที่ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ และใช้ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้นที่ 1.4 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60

นาที่ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้ง wild type และ mutant type ให้ผลเหมือนกันคือ พบผลผลิต LAMP ที่ความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟต 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ เท่านั้น ขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ 2 และ 4 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลผลิตเกิดขึ้น ดังรูปที่ 4.22 สรุปว่าแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2-8 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถแยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้



รูปที่ 4.22 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตต่างๆ กัน; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2, 5, 8 และ 11 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นที่ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 3, 6, 9 และ 12 ดีเอ็นเอของ wild type ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นที่ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ, แถวที่ 4, 7, 10 และ 13 ดีเอ็นเอของ A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ใช้แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นที่ 2, 4, 6 และ 8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

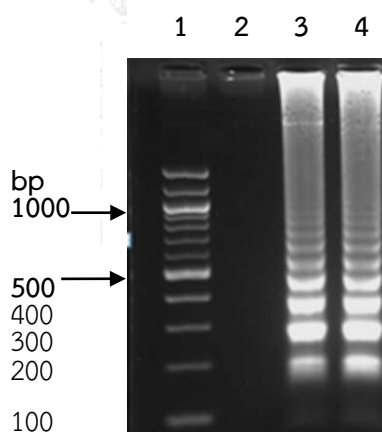
ดังนั้นไพรเมอร์ BIP_MT ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 5' ของ B1C ไม่สามารถใช้แยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้ เนื่องจากให้ผลผลิต LAMP กับดีเอ็นเอทั้ง 2 แบบ ทำให้ต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่

7.3 การทดสอบปฏิกิริยา LAMP ของไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2

ในการออกแบบไพรเมอร์ BIP ครั้งที่ 3 จะปรับปรุงจากไพรเมอร์ BIP_MT เดิม โดยจะทำการเลื่อนไพรเมอร์ BIP ออกไปให้ห่างจาก SNP 3 bp ทางด้านปลาย 5' และเพิ่มความยาวทางด้านปลาย 3' อีก 4 bp คือเบส TTAC ได้เป็น BIP_MT-2 เพื่อไม่ให้บริเวณ SNP อยู่ในลำดับเบส

ของไพรเมอร์ เนื่องจากลำดับเบสของ BIP_MT-2 ทางด้านปลาย 3' ทับส่วนของไพรเมอร์ LB ทำให้ต้องมีการออกแบบ LB ใหม่ จากเดิม โดยการเลื่อนลำดับของไพรเมอร์ให้ห่างออกไปจากตำแหน่งเดิมจำนวน 3 bp ทางด้านปลาย 5' และเพิ่มความยาวด้านปลาย 3' อีก 3 bp คือเบส AAT ตั้งชื่อไพรเมอร์ใหม่ว่า LB+2 และสามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ mutant type โดยการตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa*I เช่นเดียวกับ PCR-RFLP ได้

ผลการทดสอบปฏิกิริยา LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ร่วมกับไพรเมอร์ FIP, F3, B3 และ LF เส้นเดิมตั้งในหัวข้อ 7.1 โดยใช้สภาวะคือ FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบผลผลิต LAMP ลักษณะสมเมียร์แบนเป็นชั้นบันไดทั้งกับเชื้อ wild type ซึ่งใช้เชื้อ *H. pylori* ATCC 43504 และ A2143G mutant type ดังแสดงในรูปที่ 4.23

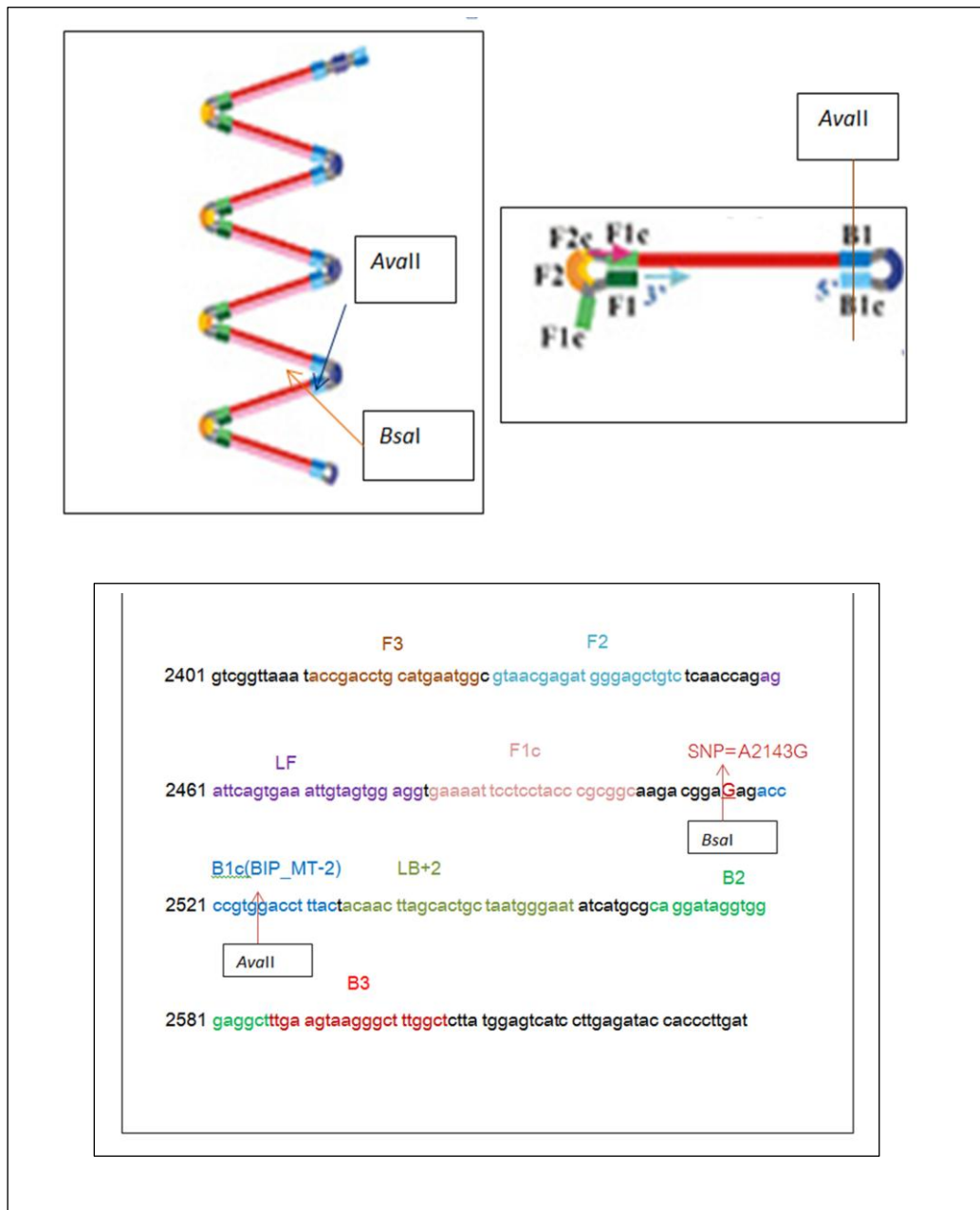


รูปที่ 4.23 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ, แถวที่ 3 wild type (*H. pylori* ATCC 43504), แถวที่ 4 ตัวอย่าง urease test ที่เป็น A2143G mutant type รหัส 290912-1

7.4 การตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification - restriction fragment length polymorphism (LAMP-RFLP)

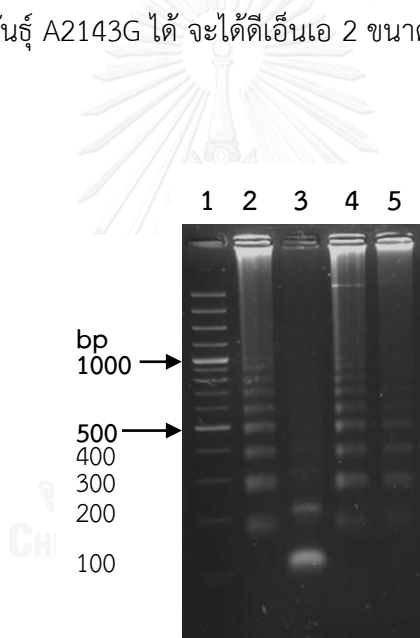
จากผลสำเร็จในการทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ซึ่งผลิตบริเวณ SNP จะเป็นคู่สมตามดีเอ็นเอต้นแบบ หากเป็น wild type ที่ตำแหน่ง 2143 จะเป็นเบส A และ mutant จะเป็นเบสอื่นๆ ซึ่งถ้ากลายพันธุ์ไปเป็น G จะสามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Bsa*I ที่ตำแหน่งดังกล่าวได้ และ เพื่อยืนยันว่าผลิต LAMP ดังกล่าว เป็นยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* จริง จึงได้เลือกเอนไซม์ *Ava*II ที่สามารถตัดยีน 23S rRNA บริเวณห้วง มาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบ LAMP-RFLP ด้วย ดังรูปที่ 4.24 จากนั้นตรวจสอบผลผลิตด้วยวิธีแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์



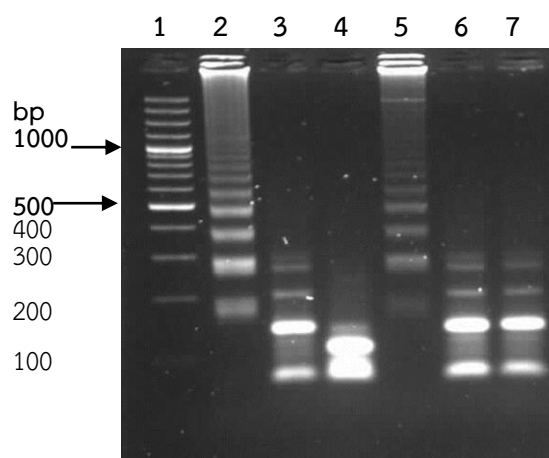


รูปที่ 4.24 แสดง Restriction map ของ ผลผลิต LAMP และแผนที่ ตำแหน่งที่ Bsal และ Avall ตัดบนลำดับเบสจาก F3-B3

ผลการตัดผลผลิต LAMP- BIP_MT-2 และ LB+2 ด้วย *Bsa*I พบลักษณะแบนของ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดย wild type จะไม่ถูกตัดด้วย *Bsa*I ทำให้แบนมีลักษณะเป็นชั้นบันไดเหมือนเดิม และ A2143G mutant type จะถูกตัดด้วย *Bsa*I ทำให้แบนมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิม คือ จะได้ ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 92, 103 และ 250 bp แต่จากรูปการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสจริงๆ จะเห็น แค่ 2 ขนาด คือ 103 และ 250 bp เนื่องจากที่ 92 และ 103 bp มีขนาดใกล้เคียงกันมาก ดังรูปที่ 4.25 และเมื่อตัดด้วย *Av*all และ *Bsa*I+*Av*all ได้ผลดังรูป 4.26 ดังนี้ คือ wild type เมื่อถูกตัดด้วย *Av*all และ *Bsa*I+*Av*all เอนไซม์ *Av*all จะตัดบริเวณห่าง จาก F3 ถึง B3 ขณะที่ *Bsa*I ไม่สามารถตัด wild type ได้ จึงทำให้มีลักษณะของแบนที่เหมือนกัน คือ จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 81 และ 170 bp ขณะที่ A2143G mutant type เอนไซม์ *Av*all จะตัดบริเวณห่าง จาก F3 ถึง B3 ทำให้ได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 81 และ 170 bp แต่เมื่อตัดด้วย *Bsa*I+*Av*all เอนไซม์ *Bsa*I สามารถที่จะตัดตรงตำแหน่งกลายพันธุ์ A2143G ได้ จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 81 และ 160 bp ซึ่งเป็นขนาดตามที่คาดหวัง



รูปที่ 4.25 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ที่ถูกตัดด้วย *Bsa*I; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 A2143G mutant type รหัส 290912-1, แถวที่ 3 A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ถูกตัดด้วย *Bsa*I, แถวที่ 4 *H. pylori* ATCC 43504 และ แถวที่ 5 *H. pylori* ATCC 43504 ที่ถูกตัดด้วย *Bsa*I



รูปที่ 4.26 แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส 1.5 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตปฏิกิริยา LAMP 23S rRNA ที่ใช้ไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ที่ถูกตัดด้วย *Bsa*I และ *Av*all; แถวที่ 1 แสดงดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp, แถวที่ 2 A2143G mutant type รหัส 290912-1, แถวที่ 3 A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ถูกตัดด้วย *Av*all, แถวที่ 4 A2143G mutant type รหัส 290912-1 ที่ถูกตัดด้วย *Bsa*I และ *Av*all, แถวที่ 5 *H. pylori* ATCC 43504, แถวที่ 6 *H. pylori* ATCC 43504 ที่ถูกตัดด้วย *Av*all และ แถวที่ 7 *H. pylori* ATCC 43504 ที่ถูกตัดด้วย *Bsa*I และ *Av*all

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์ โดยเป็นสาเหตุของอาการหลายอย่าง เช่น โรคกระเพาะอาหารอักเสบ แผลในกระเพาะอาหาร มะเร็งกระเพาะอาหาร มะเร็งชนิด gastric adenocarcinomas และ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิด gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas (40, 45) ซึ่งปี ค.ศ.1994 องค์การอนามัยโลก ได้ประกาศให้เชื้อนี้อยู่ในกลุ่มสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 (3) การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* แบบมาตรฐานที่เป็นที่ยอมรับตามคู่มือการรักษานานาชาติ ปี ค.ศ. 1996 คือ การรักษาแบบ Standard first-line therapy ประกอบด้วย ยาลดกรด ร่วมกับยาปฏิชีวนะอีก 2 ชนิด คือ อะม็อกซิซิลลิน และ คลาริโธรมัยซิน สำหรับผู้ป่วยที่แพ้เพนิซิลลิน ให้ใช้เมโทรนิดาโซล แทน อะม็อกซิซิลลิน เป็นเวลา 10-14 วัน (129) ประสิทธิภาพของการรักษานี้ขึ้นกับการดื้อต่อยาคลาริโธรมัยซิน ซึ่งความสำเร็จของการรักษามีอัตราลดลงอย่างมากในระยะเวลา 10 ปี ที่ผ่านมา ทั้งในสหรัฐอเมริกาและยุโรป (129) ตามรายงานของ Maastricht IV ระบุไว้ว่า ถ้าพื้นที่นั้นมีเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การรักษาแบบ First line therapy ไม่ได้ผล (7) การดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ของเชื้อ *H. pylori* มีความแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค เช่น ยุโรปคิดเป็น 11.1 เปอร์เซ็นต์ เอเชียคิดเป็น 18.9 เปอร์เซ็นต์ อเมริกาคิดเป็น 29.3 เปอร์เซ็นต์ (9) ถึงแม้ในปัจจุบันการรักษาแบบ Standard triple therapy ได้ลดลงในหลายภูมิภาค แต่ยังเป็นวิธีการรักษาที่ยังแนะนำให้ใช้อยู่ในปัจจุบัน (20) การตรวจเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยาคลาริโธรมัยซิน จึงเป็นประโยชน์ต่อการเริ่มการรักษาด้วยวิธี First line therapy

กลไกการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน เกิดจากการเปลี่ยนแปลง target site ที่ 23S rRNA โดยขบวนการ methylation หรือ เกิดการกลายพันธุ์ที่ Domain V บริเวณ Peptidyltransferase region ของ 23S rRNA (11, 12) โดยอาจมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆคือ A2142G, A2143G, T2182C, A2143G+T2182C, A2142G+T2182C, A2115G, G2141A, C2147G, T2190C, C2195T, A2223G และ C2694A (14, 81, 82) จากการศึกษาตำแหน่งกลายพันธุ์บริเวณ 23S rRNA ที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโธรมัยซิน พบว่าในหลายประเทศ เช่น สเปน สหรัฐอเมริกา แคนาดา และญี่ปุ่น ตำแหน่งที่ 2143 เป็นตำแหน่งที่มีอุบัติการณ์สูงสุด โดยเปลี่ยนจากเบส A เป็น G (11, 13-15) และพบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G เกี่ยวข้องกับการทำให้การรักษาเชื้อประสบความสำเร็จล้มเหลวอย่างมีนัยสำคัญมากกว่าที่ตำแหน่ง A2142G หรือ A2142C (17) งานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนา

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยาคลาริโธรมัยซินที่มีการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ LAMP-RFLP จากตัวอย่าง urease test

การทดสอบ urease test เป็นวิธีการทดสอบเพื่อตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่าง gastric biopsy ของผู้ป่วยในงานประจำวันของโรงพยาบาล ตัวอย่างที่ให้ผลการทดสอบบวก แสดงว่าน่าจะมีการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างไรก็ตามการทดสอบ urease test เป็นวิธีที่มีทั้งข้อดีและข้อเสีย ข้อดี คือเป็นวิธีสะดวก รวดเร็วกว่าวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี histology แต่มีข้อเสีย คือ ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ (62, 64, 66) จากการเปรียบเทียบความไวและความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีต่างๆ พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อ การย้อมแกรม การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ (histology) การทดสอบทางน้ำเหลืองวิทยา การทดสอบด้วย CLO test และ in house urease test มีความไว 55.9, 89.3, 93.5, 96.8, 99.0 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีความจำเพาะ 100, 93.5, 90.4, 96.8, 91.9 และ 88.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (65) จะเห็นได้ว่าตัวอย่าง urease test ทั้ง CLO test และ in-house urease test อาจเกิดผลบวกปลอมได้ประมาณ 8.1 และ 11.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (65, 130, 131) ดังนั้นจึงทำการตรวจยืนยันเชื้อ *H. pylori* ด้วยการทำ PCR ยีน 16S rRNA หรือ PCR ยีน *glmM* โดยนำตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลการทดสอบบวก มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการต้มและตกตะกอนด้วย ethanol ซึ่งเป็น วิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย อีกทั้งไม่ต้องตัดชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารผู้ป่วยเพิ่มเติม

การตรวจยืนยันการติดเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี PCR มีการพัฒนาในหลายยีน ดังนี้ 16S rRNA, *glmM*, *cagA*, *hpaA*, 860-bp DNA และ *ureA* (62, 63, 70, 72) แต่ยีนที่พบว่ามี ความไวและความจำเพาะสูง คือ 16S rRNA และ *glmM* ซึ่งผลการศึกษาความไวและความจำเพาะของทั้ง 2 ยีน มีความแตกต่างกันไปในแต่ละงานวิจัย จากการศึกษาการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่าง gastric biopsy ด้วยวิธี Real-Time PCR โดยเปรียบเทียบระหว่างยีน 16S rRNA และ *glmM* พบว่ายีน 16S rRNA เป็นยีนที่มีความเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากมีความไวสูงที่สุด คือ 0.1 pg และความจำเพาะอยู่ในเกณฑ์ที่สูงคือ 88.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยีน *glmM* มีความจำเพาะสูง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความไวเพียง 100 pg (132) การตรวจหาเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่าง gastric biopsy โดยเปรียบเทียบวิธี PCR กับ 4 ยีน คือ *hpaA*, 16S rRNA, 860-bp DNA และ *glmM* พบว่ายีน *glmM* มีความไวและความจำเพาะคิดเป็น 61.5 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนยีน 16S rRNA มีความไวและความจำเพาะคิดเป็น 100 และ 76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (70) และมีการเปรียบเทียบยีน 16S rRNA, *glmM* และ *cagA* ในการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในตัวอย่าง gastric biopsy ด้วยวิธี PCR พบว่ายีน *glmM* มีความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และ ค่าทำนายผลลบ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี histology คือ 92.9, 78.6, 68.4 และ 95.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ

ยีน 16S rRNA มีความไว, ความจำเพาะ, ค่าทำนายผลบวก และ ค่าทำนายผลลบ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี histology คือ 100, 68, 59.1 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (72) จะเห็นว่ายีน *glmM* มีความจำเพาะมากกว่ายีน 16S rRNA ขณะที่ยีน 16S rRNA มีความไวมากกว่ายีน *glmM*

ในการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจยืนยันการติดเชื้อ *H. pylori* จากจำนวนตัวอย่าง urease test ที่ให้ผลบวกทั้งหมด 353 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์ว่าเป็นเชื้อ *H. pylori* จริง โดยการทำให้ผลบวกทั้งหมด 42 ตัวอย่าง และ 59 ตัวอย่าง ตามลำดับ ดังนั้นตัวอย่าง urease test ที่ยืนยันว่ามีเชื้อ *H. pylori* รวมทั้งสิ้น 101 ตัวอย่าง คิดเป็น 28.6 เปอร์เซ็นต์ (101/353) เท่านั้น จากนั้นได้นำดีเอ็นเอจำนวน 101 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกด้วยวิธี PCR มาทำการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ในตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่ามีเพียง 53 ตัวอย่าง คิดเป็น 52.3 เปอร์เซ็นต์ (53/101) เท่านั้น ที่สามารถให้ผลผลิต PCR กับยีน 23S rRNA และมี 4 ตัวอย่าง ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G คิดเป็น 7.5 เปอร์เซ็นต์ (4/53) จะเห็นได้ว่าตัวอย่าง urease test นั้น ให้ผลบวกในการทำ PCR น้อย สาเหตุอาจเนื่องมาจากในตัวอย่าง urease test มีดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* น้อยผสมอยู่กับดีเอ็นเอปริมาณมากที่มาจาก gastric biopsy ของคน ซึ่งรบกวนปฏิกิริยา PCR ของเชื้อได้ นอกจากนั้นตัวอย่าง urease test มีความเป็นด่างสูง ดังนั้นในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ต้องตกตะกอน ล้าง และ ละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอน PCR เพื่อปรับ pH ของสารละลายดีเอ็นเอให้เป็นกลาง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงไม่สามารถหาอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* และการกลายพันธุ์ของยีน 23S rRNA โดยการตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่าง urease test ด้วยวิธี PCR ได้ เนื่องจากมีปัจจัยที่มีผลทำให้ผลบวกต่ำกว่าที่ควรจะเป็น อย่างไรก็ตามสามารถนำดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่กลายพันธุ์ในตำแหน่ง A2143G มาใช้ในการพัฒนาการตรวจการกลายพันธุ์ด้วยเทคนิค LAMP ได้

ในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน 23S rRNA ที่กลายพันธุ์ พบว่ามี การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142G, A2143G, T2182C และ A2143G+T2182C คิดเป็น 3.4, 3.4, 48.3 และ 10.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสต่ำกว่าวิธี PCR-RFLP เนื่องจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดไม่เท่ากัน ในการวิเคราะห์ลำดับเบสต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเออย่างน้อย 20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณอย่างน้อย 20 ไมโครลิตร ดังนั้นจึงมีจำนวนตัวอย่างที่มีดีเอ็นเอเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสเพียง 29 ตัวอย่างเท่านั้น ขณะที่ในการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ตำแหน่ง A2143G ด้วยวิธี PCR-RFLP มีตัวอย่างทั้งสิ้น 53 ตัวอย่าง อย่างไรก็ตามข้อมูลการกลายพันธุ์เบื้องต้นที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา โดยในปี ค.ศ. 2011 ในประเทศไทย ได้ตรวจหาเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ดื้อยาและไวต่อยาคลาริโดรมัยซิน ในการรักษาด้วยวิธี Sequential therapy ด้วยวิธี PCR โดยพบตำแหน่งกลายพันธุ์ 2 ตำแหน่งที่ A2143G และ A2142G รวมกันคิดเป็น 11.3 เปอร์เซ็นต์ (133)

ซึ่งเป็นอุบัติการณ์การดื้อยาคลาริโทรรมัยซินที่ต่ำกว่าเกณฑ์รายงานของ Maastricht IV ระบุไว้ เช่นเดียวกับในหลายๆ ประเทศที่ยังพบความชุกของการดื้อยาคลาริโทรรมัยซินที่ต่ำ เช่น ในปี ค.ศ. 2013 ที่เกาะเซจู ประเทศเกาหลีใต้ อัตราการกลายพันธุ์ที่ A2142G และ A2143G คิดเป็น 7.9 และ 18.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (134) ที่ประเทศตุรกี พบอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2144G คิดเป็น 29.7 เปอร์เซ็นต์ และ A2143G คิดเป็น 10.8 เปอร์เซ็นต์ (135) ขณะที่ประเทศที่พบว่ามีความชุกของการกลายพันธุ์ที่สูง ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ. 2011 พบอัตราการกลายพันธุ์ตำแหน่ง A2143G สูงถึง 96.5 เปอร์เซ็นต์ (15) ประเทศอิหร่าน ในปี ค.ศ. 2011 พบว่าอัตราการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G สูงถึง 93.7 เปอร์เซ็นต์ (16) ประเทศโคลัมเบียมีรายงานว่า พบการกลายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* ที่ตำแหน่ง A2143G คิดเป็น 90.5 เปอร์เซ็นต์ (136) ประเทศตูนีเซีย ปี ค.ศ. 2010 พบอัตราการกลายพันธุ์ตำแหน่ง A2143G สูงถึง 88.1 เปอร์เซ็นต์ (137) ประเทศสเปน พบกลายพันธุ์ที่ A2143G มากที่สุดคิดเป็น 85.3 เปอร์เซ็นต์ (14) ประเทศอิตาลี พบว่าตำแหน่ง A2143G เป็นตำแหน่งที่พบมากที่สุด คิดเป็น 64.0 เปอร์เซ็นต์ (138)

มีรายงานว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G จะเกี่ยวข้องกับการทำให้การรักษาเชื้อประสบความสำเร็จอย่างมีนัยสำคัญ (17) ที่ประเทศเกาหลีใต้พบว่าที่ตำแหน่ง A2143G มีผลทำให้การรักษาเกิดความล้มเหลวในอัตราสูงถึง 58.3 เปอร์เซ็นต์ (14/24) (134) และมีรายงานว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2143G จะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน โดยพบว่าค่าเฉลี่ยของค่า MIC มีค่าสูง เท่ากับ 13.6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่า MIC ของเชื้อที่กลายพันธุ์ตำแหน่ง 2182 คือ 5.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (81) นอกจากการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 2143 จากเบส A เป็น G แล้ว ยังพบเป็นเบสอื่นอีกเช่น C หรือ T โดยในปี ค.ศ. 1998 ที่ประเทศฝรั่งเศส พบตำแหน่ง A2143C คิดเป็น 4.3 เปอร์เซ็นต์ (1/23) (139) และในปี ค.ศ. 2013 ที่ประเทศจีน พบที่ตำแหน่ง A2143T คิดเป็น 19.2 เปอร์เซ็นต์ (5/26) (140)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2142G เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน เช่นเดียวกันกับตำแหน่ง A2143G (141) โดยที่ตำแหน่ง 2142 จากเบส A พบมีการกลายพันธุ์เป็นเบส G, C หรือ T (141, 142) สำหรับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142G ในการศึกษานี้มีอัตรา คิดเป็น 3.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของความชุกที่ไม่สูงมากเช่นเดียวกันกับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2143G ในประเทศโคลัมเบียพบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง A2142G คิดเป็น 7.1 เปอร์เซ็นต์ (3/42) (136) ในประเทศญี่ปุ่นพบว่าตำแหน่งกลายพันธุ์ที่ A2142G คิดเป็น 3.5 เปอร์เซ็นต์ (3/85) (15)

ในการศึกษาครั้งนี้พบการกลายพันธุ์สูงสุดที่ตำแหน่ง T2182C คิดเป็น 48.3 เปอร์เซ็นต์ และพบตำแหน่ง A2143G+T2182C คิดเป็น 10.3 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่าตำแหน่ง T2182C นี้พบมากกว่าตำแหน่ง A2142G และ A2143G เช่นเดียวกับรายงานในบางประเทศ เช่น ทางตอนเหนือ

ของบราซิล (แถบแม่น้ำอเมซอน) พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T2182C มากกว่า ที่ A2143G เช่นเดียวกัน โดยพบที่ตำแหน่ง T2182C คิดเป็น 12.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ตำแหน่ง A2143G พบเพียง 3.3 เปอร์เซ็นต์ (143) และที่ประเทศมาเลเซีย ในปี ค.ศ. 2009 พบว่าเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ดื้อยา คลาริโทรรมัยซิน มีการกลายพันธุ์ตำแหน่ง A2142G คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ (1/4), A2143G คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ (1/4), T2182C+A2142G คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ (1/4) และตำแหน่ง T2182C +A2143G คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ (1/4) และในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ไวต่อยาคลาริโทรรมัยซินพบ มีการกลายพันธุ์ตำแหน่ง T2182C คิดเป็น 92.8 เปอร์เซ็นต์ (13/14) (144) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T2182C จะเกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซินหรือไม่ เนื่องจากมีรายงานทั้งที่สนับสนุนและคัดค้าน รายงานที่สนับสนุน เช่น ที่ประเทศเกาหลีใต้ในปี ค.ศ. 2002 รายงานว่าการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T2182C เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน เนื่องจากมีค่า MIC มากกว่า 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (83) ที่ประเทศเกาหลี ในปี ค.ศ. 2008 พบว่า ตำแหน่ง T2182C เกี่ยวกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซินเช่นเดียวกับตำแหน่ง A2143G เนื่องจากมีผล สอดคล้องกันคือมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (81) ที่ประเทศสเปน ปี ค.ศ. 2010 ได้ทดสอบหาความไวต่อยาด้วยวิธี E-test ในเชื้อ *H. pylori* พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T2182C โดยมีค่า MIC มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (145) อย่างไรก็ตามมีบาง รายงานที่คัดค้านว่าตำแหน่ง T2182C นี้ ไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน เช่น ที่ประเทศ มาเลเซีย ในปี ค.ศ. 2009 ได้พบตำแหน่ง T2182C คิดเป็น 92.8 เปอร์เซ็นต์ (13/14) ในเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์ที่ไวต่อยา และถึงแม้จะพบตำแหน่งนี้ในสายพันธุ์ที่ดื้อยาแต่ก็พบตำแหน่ง A2142G หรือ A2143G ร่วมด้วย โดยพบตำแหน่ง T2182C+A2142G และ T2182C+A2143G คิดเป็นอย่าง ละ 25 เปอร์เซ็นต์ (1/4) และสรุปว่าตำแหน่งนี้ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน (144) ที่ประเทศเยอรมัน ในปี ค.ศ. 2007 พบว่าตำแหน่ง T2182C พบในสายพันธุ์ที่ไวต่อยาจำนวน 6 สาย พันธุ์ และพบเพียง 1 สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาแต่เป็นการกลายพันธุ์ร่วมกับตำแหน่ง A2142G (30) และที่ ประเทศจีน ในปี ค.ศ. 2013 พบตำแหน่ง T2182C ในสายพันธุ์ที่ดื้อยาในครั้งแรก (primary claritromycin resistant) คิดเป็น 72.2 เปอร์เซ็นต์ ในสายพันธุ์ที่ดื้อยาในครั้งที่ 2 (secondary claritromycin resistant) คิดเป็น 87.5 เปอร์เซ็นต์ และพบในสายพันธุ์ที่ไวต่อยา คิดเป็น 86.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปว่าตำแหน่ง T2182C ไม่ มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน (140) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจในการพิสูจน์ความ สัมพันธ์ของการดื้อยาคลาริโทรรมัยซินกับการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง T2182C โดยวิธีมาตรฐานในการ ทดสอบความไว คือ วิธี Agar dilution หรือ วิธี E-Test (21) ในอนาคตต่อไป ซึ่งจะทราบว่าตำแหน่ง นี้มีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาคลาริโทรรมัยซินหรือไม่ และจะเป็นประโยชน์ในการรักษาได้

งานวิจัยนี้ไม่ได้ตรวจการดื้อยาคลาริโธรมัยซินของเชื้อ *H. pylori* ในระดับพีโนไทป์ เนื่องจากไม่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อจากตัวอย่าง urease test ของผู้ป่วยได้ สาเหตุจากตัวอย่าง CLOtest* มีปริมาณเชื่อน้อยมากและเชื่อน่าจะตาย เพราะในการทดสอบ Urease test หรือ CLOtest* ไม่ได้ทำในสภาวะ Microaerophilic แต่ทดสอบโดยบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที (64) แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ต้องรับนำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อบุกระเพาะอาหาร ที่ได้จากการส่องกล้อง มาเพาะเลี้ยงภายในเวลาไม่เกิน 2 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นเชื้อที่ตายง่าย (146) ดังนั้นจึงตรวจวิเคราะห์การดื้อยาคลาริโธรมัยซินจากตัวอย่าง CLOtest* ในระดับจีโนไทป์โดยการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* เท่านั้น ซึ่งในงานประจำวันสำหรับการตรวจคัดกรองการติดเชื้อ *H. pylori* จะทำการทดสอบ rapid urease test เพียงอย่างเดียวเช่นกัน การเพาะเลี้ยงเชื้อและการตรวจการดื้อยาในระดับพีโนไทป์ จะทำเฉพาะในงานวิจัย สำหรับข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์จีโนไทป์เพียงอย่างเดียว คือ ไม่ทราบว่าเป็นเชื้อดื้อหรือไวต่อยา ไม่สามารถอ่านค่าของความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (Minimum inhibitory concentration, MIC) แต่มีข้อดี คือ สะดวกและรวดเร็ว มีความไวและความจำเพาะสูง ขณะที่การตรวจทางพีโนไทป์ ทั้งวิธี Agar dilution หรือ วิธี E-Test มีความไวค่อนข้างต่ำ ขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานาน 10-14 วัน (21, 86)

การออกแบบไพรเมอร์ LAMP ที่จำเพาะกับยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* โดยโปรแกรมมี 2 รูปแบบ คือ แบบมาตรฐาน [Standard primer design (Easy mode)] ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 6 เส้น คือ F3, B3, FIP, BIP, LF และ LB ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา LAMP กับยีน 23S rRNA ได้สำเร็จ แต่เนื่องจากมีตำแหน่งของเบสที่กลายพันธุ์ (SNP) อยู่ภายในไพรเมอร์ของ BIP (BIP_WT) จึงไม่สามารถแยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้ ขณะที่การออกแบบขั้นพัฒนา (Advance primer design) คือใช้ไพรเมอร์ 5 เส้นเดิม ที่ได้จากแบบมาตรฐาน คือ F3, B3, FIP, BIP, LF, LB และ BIP ที่ออกแบบใหม่ในครั้งที่ 2 คือ BIP_MT ที่ออกแบบให้ตำแหน่งการกลายพันธุ์อยู่ที่ปลาย 5' ของ B1c ซึ่งตามทฤษฎีจะสามารถ amplify ได้เฉพาะ mutant type เท่านั้น เนื่องจากจะออกแบบให้เป็น Specific primer สำหรับจับกับ mutant type allele ได้เท่านั้น สำหรับ wild type allele เอนไซม์ DNA polymerase จะจับกับดีเอ็นเอช่วงดังกล่าวได้ยาก จึงยับยั้งการเพิ่มปริมาณยีน (128) อย่างไรก็ตามพบว่าไพรเมอร์ BIP_MT ที่ออกแบบใหม่นั้นสามารถเกิดปฏิกิริยา LAMP ได้สำเร็จ แต่ไม่สามารถแยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้ ซึ่งไม่เป็นไปตามหลักการ จึงต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่ในครั้งที่ 3 คือ BIP_MT-2 โดยจะทำการเลื่อนลำดับของไพรเมอร์ BIP ออกไป 3 bp จากตำแหน่งกลายพันธุ์ A2143G และออกแบบ LB ใหม่ โดยตั้งชื่อว่า LB+2 ซึ่งไพรเมอร์ชุดนี้ สามารถแยกระหว่าง wild type และ mutant type ได้สำเร็จ

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP จะซับซ้อนและยากกว่าการออกแบบไพรเมอร์สำหรับ PCR เนื่องจากวิธี PCR มีไพรเมอร์เพียง 2 เส้น ส่วนความยาวของไพรเมอร์ประมาณ 18-22 bp (147) ขนาดของผลผลิตมีเพียง 1 ขนาด (25) แต่สำหรับ LAMP มีไพรเมอร์ 4-6 เส้น ทำให้วิธี LAMP มีความจำเพาะมากกว่าวิธี PCR ขนาดของผลผลิตมีหลายขนาดเป็นสมิแยร์แบน ซึ่งมีความยาวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือ จาก F3 ถึง B3 ขนาดประมาณ 200 bp ไปจนถึงขนาดใหญ่เป็นกิโลเบส ความยาวและระยะห่างของไพรเมอร์ LAMP แต่ละเส้นมีความแตกต่างกันอ้างอิงตามคู่มือโปรแกรม PrimerExplorer v4 Software โดยเฉพาะ FIP ประกอบด้วยบริเวณ F1c และ F2 และ BIP ประกอบด้วยบริเวณ B1c และ B2 มีความยาวอยู่ในช่วง 36-45 bp จึงมีความยาวมาก ซึ่งเกณฑ์ความยาวของไพรเมอร์แต่ละเส้น คือ ไพรเมอร์ F1c/B1c เท่ากับ 18-23 bp, ไพรเมอร์ F2/B2, F3/B3 เท่ากับ 18-22 bp และไพรเมอร์ LF/LB เท่ากับ 15-25 bp (103, 148) การออกแบบไพรเมอร์ LAMP จึงมีความยุ่งยากมากกว่า เนื่องจากไพรเมอร์มีหลายเส้น คือ FIP, BIP, F3 และ B3 อาจมี loop primer LF และ LB หรือไม่ได้ แต่การมี loop primer จะช่วยในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (102) และสำหรับไพรเมอร์ที่มีความยาวมากๆ ได้แก่ FIP และ BIP ควรใช้ความบริสุทธิ์เป็นชนิด HPLC (101) แต่มีราคาแพง ส่วนไพรเมอร์ LAMP เส้นอื่นๆ ใช้ชนิด Desalted grade ได้ (149) มีรายงานว่าไพรเมอร์ชนิด FIP และ BIP หากใช้เป็นชนิด HPLC จะดีกว่าชนิด Desalted grade (101) ซึ่งแตกต่างกับไพรเมอร์ของวิธี PCR ที่สามารถเลือกใช้ชนิด Desalted grade ได้ ซึ่งราคาจะถูกกว่า

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา LAMP ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลา ความเข้มข้นของไพรเมอร์ ความเข้มข้นของเบตาอีน ความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต และความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ด้วยวิธี LAMP กับไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดที่ 1 ประกอบด้วย FIP, BIP_WT, F3, B3, LF และ LB ทดสอบกับดีเอ็นเอของ wild type อย่างเดียว เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา LAMP ของ Common primer ส่วนชุดที่ 2 ประกอบด้วย FIP, BIP_MT, F3, B3, LF และ LB ทดสอบกับดีเอ็นเอของ wild type และ mutant type เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการจำแนกระหว่าง wild type และ mutant type ซึ่งตามหลักเกณฑ์ wild type จะไม่เกิดผลผลิต ขณะที่ mutant type จะเกิดผลผลิต ซึ่งผลการทดสอบสภาวะทั้งหมดกับไพรเมอร์ทั้งสองชุดให้ผลเหมือนกัน ดังนี้

การทดสอบระยะเวลาของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม พบว่า ที่ 60 นาที เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด งานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้เวลาเท่ากับงานวิจัยนี้ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี LAMP ร่วมด้วยเทคนิคการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Brushing และการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Campylobacter jejuni* และ *Campylobacter coli* ด้วยวิธี LAMP ที่ใช้เวลา 60 นาที (35,

118) มีรายงานการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Cronobacter* spp. ด้วยวิธี LAMP โดยทำการทดสอบหาระยะเวลาของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสมตั้งแต่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 นาที พบว่า เริ่มมีผลผลิตเกิดขึ้นที่เวลา 40 นาที และพบว่ามีผลผลิตชัดเจนที่ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 60 นาที (32) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการใช้ระยะเวลาน้อยกว่า 60 นาที เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. jejuni* ด้วยวิธี LAMP ที่เลือกใช้ระยะเวลาในการทดสอบนาน 50 นาที (150) และมีรายงานการใช้ระยะเวลามากกว่า 60 นาที โดยใช้ตรวจหา *Salmonella* serogroup D ใช้เวลา 75 นาทีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (151) ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา LAMP อยู่ระหว่าง 45-60 นาที (32, 152)

การทดสอบความเข้มข้นไพรเมอร์ของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นไพรเมอร์ FIP/BIP, F3/B3 และ LF/LB ที่เหมาะสม เป็น 1.6, 0.2 และ 0.8 ไมโคร โมลาร์ ตามลำดับ พบว่ามีหลายงานวิจัยที่ใช้ความเข้มข้นไพรเมอร์ในปริมาณและสัดส่วนเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *C. jejuni* และ *C. coli* และ การตรวจวิเคราะห์เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LAMP (118, 120) การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Edwardsiella ictaluri* ที่ก่อโรคในปลากดอเมริกัน (*Lctalurus punctatus*) โดยทดสอบความเข้มข้นของไพรเมอร์ LAMP ที่เหมาะสมจากอัตราส่วนของไพรเมอร์ FIP/BIP ต่อ F3/B3 จาก 1:1 ถึง 1:10 พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สุด คือ 1:8 (153) นอกจากนี้ยังพบอัตราส่วนที่เหมาะสมอื่นๆ อีก เช่น ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Cronobacter* spp. ด้วยวิธี LAMP พบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของไพรเมอร์ FIP/BIP ต่อ F3/B3 ที่เหมาะสมที่สุด คือ 1:4 (32) ดังนั้นความเข้มข้นของ FIP/BIP ที่เหมาะสมประมาณ 0.8-2.4 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของ F3/B3 ที่เหมาะสมประมาณ 0.05-0.2 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของ LF/LB ที่เหมาะสมประมาณ 0.8-1 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของ FIP/BIP จะมากกว่า F3/B3 ประมาณ 4-8 เท่า (32, 117, 153)

การทดสอบความเข้มข้นเบตาอินของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นของเบตาอินที่ 0.8 โมลาร์ เหมาะสมมากที่สุด เบตาอินเป็นสารที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ DMSO คือ ช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและเพิ่มความจำเพาะให้สูงขึ้น (153-155) เบตาอินจะช่วย 2 กลไก คือ ทำให้ *Bst* DNA polymerase สามารถที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอได้ดีขึ้น และ ทำให้ลำดับเบสที่มี GC-rich เกิดความเสถียรน้อยลง (153) งานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้ความเข้มข้นเบตาอินในปริมาณเท่ากับงานวิจัยนี้ เช่น การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *E. ictaluri* ที่ก่อโรคในปลากดอเมริกัน (153) การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Vibrio vulnificus* ด้วยวิธี LAMP และ การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Bean pod mottle virus ในเมล็ดถั่วเหลือง ด้วยวิธี RT-LAMP ที่เลือกใช้ความเข้มข้นของเบตาอินที่ 0.8 โมลาร์ (117, 156) นอกจากนี้ยังมีบางงานที่ใช้ความเข้มข้นที่มากกว่า 0.8 โมลาร์ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี LAMP ร่วมด้วยเทคนิคการเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Brushing ที่ใช้ความเข้มข้นของเบตาอินที่ 2.0 โมลาร์

(35) มีรายงานการใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.8 โมลาร์ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Muscovy duck parvovirus ในเป็ด ด้วยวิธี LAMP พบว่าความเข้มข้นของเบตาอินที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.6 โมลาร์ (157)

การทดสอบความเข้มข้นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม พบว่าที่ความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์ เหมาะสมมากที่สุด มีรายงานว่าความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต มีผลต่อความจำเพาะของเอนไซม์ DNA polymerase (153, 158) งานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้ความเข้มข้นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตในปริมาณเท่ากับงานวิจัยนี้ เช่น ในการตรวจวิเคราะห์การแยกสายพันธุ์ของวัคซีนป้องกันคางทูม ระหว่าง wild type และสายพันธุ์ Hoshino และ การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อย ที่เลือกใช้ความเข้มข้นของดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต เป็น 1.4 มิลลิโมลาร์ (38, 120) แต่อย่างไรก็ตามมีบางงานที่ใช้ความเข้มข้นมากกว่า 1.4 มิลลิโมลาร์ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Cronobacter* spp. ด้วยวิธี LAMP ที่เลือกใช้ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ (32) มีรายงานการใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 1.4 มิลลิโมลาร์ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ Muscovy duck parvovirus ในเป็ด ด้วยวิธี LAMP พบว่าความเข้มข้นของเข้มข้นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ที่เหมาะสมที่สุด คือ 1.2 มิลลิโมลาร์ (157) และรายงานการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรีย *E. ictaluri* ที่ก่อโรคในปลาหมออเมริกัน ที่เลือกใช้ความเข้มข้นที่ 1.0 มิลลิโมลาร์ (153)

การทดสอบความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสม พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมมากที่สุดคือ ที่ 6 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมซัลเฟตจะมีผลทำให้การจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบดีขึ้น และทำให้การทำงานของ DNA Polymerase ดีขึ้น (159) งานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้ความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟตในปริมาณเท่ากับงานวิจัยนี้ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *V. vulnificus* และ การตรวจหาเชื้อ *Salmonella* serogroup D ด้วยวิธี LAMP ที่เลือกใช้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ 6 มิลลิโมลาร์ (117, 151) การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *E. ictaluri* ที่ก่อโรคในปลาหมออเมริกัน ด้วยวิธี LAMP โดยทำการทดสอบหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตของปฏิกิริยา LAMP ที่เหมาะสมตั้งแต่ 0-10 มิลลิโมลาร์ พบว่าความเข้มข้นที่ 6 มิลลิโมลาร์ เหมาะสมที่สุด (153) แต่อย่างไรก็ตามมีบางงานที่ใช้ความเข้มข้นมากกว่า 6 มิลลิโมลาร์ เช่น การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อยด้วยวิธี LAMP ที่ใช้ความเข้มข้นที่ 8 มิลลิโมลาร์ (120) และมีงานที่ใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า 6 มิลลิโมลาร์ เช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Cronobacter* spp. ด้วยวิธี LAMP ที่เลือกใช้ที่ความเข้มข้นที่ 4 มิลลิโมลาร์ (32) และการตรวจวิเคราะห์เชื้อ Muscovy duck parvovirus ในเป็ด ด้วยวิธี LAMP พบว่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุด คือ 5 มิลลิโมลาร์ (157)

การตรวจวิเคราะห์ยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค LAMP-RFLP กับไพรเมอร์ BIP_MT-2 และ LB+2 ร่วมกับไพรเมอร์ FIP, F3, B3 และ LF เส้นเดิม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ พบว่าสามารถแยกแยะระหว่าง wild type และ A2143G mutant type ได้สำเร็จ โดย wild type จะไม่ถูกตัดด้วย *BsaI* ทำให้แบนมีลักษณะเป็นขั้นบันไดเหมือนเดิม ขณะที่ตัด A2143G mutant type ได้ดีเอ็นเอ 3 ขนาด คือ 92, 103 และ 250 bp เช่นเดียวกับ *BsaI*+*Avall* จะให้รูปแบบของขนาดดีเอ็นเอระหว่าง wild type และ mutant type ที่แตกต่างกัน ดังนี้ wild type ได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 81 และ 170 bp ส่วน A2143G mutant type ได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 81 และ 160 bp เทคนิค LAMP-RFLP มีข้อดีกว่าเทคนิค PCR-RFLP คือ สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิต่ำ ใช้ไพรเมอร์ 4-6 เส้น จึงมีความจำเพาะสูง สะดวกและรวดเร็ว สามารถใช้อุปกรณ์ที่มีอยู่ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น กล่องร้อนควบคุมอุณหภูมิ หรือ อ่างควบคุมอุณหภูมิ สำหรับการทดสอบได้ ใช้เวลาเพียง 30-60 นาที อ่านผลการทดสอบได้ง่าย วิธีการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา LAMP มีหลายวิธี เช่น แยกด้วยกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส ซึ่งมีข้อเสีย คือ ขั้นตอนการเตรียมยุ่งยาก ใช้เวลานาน และอาจเสี่ยงกับการสัมผัสสารเอทิลเดียมโบรไมด์ ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) ได้ การดูผลด้วยตาเปล่าจากการเติมสี SYBR Green I ซึ่งถ้ามีผลผลิตจะให้เห็นเป็นสีเขียวและถ้าไม่มีผลผลิตจะให้แสงสีส้ม (105, 106, 160, 161) การตรวจดูความขุ่นด้วยตาเปล่าจากการเกิดแมกนีเซียมฟอสเฟต หรือวัดเชิงปริมาณโดยวัดค่าดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (32, 108) มีการเปรียบเทียบเทคนิค LAMP กับเทคนิค PCR ในหลายงานวิจัย เช่น การแยกสายพันธุ์ของวัชชีนป้องกันคางทูม ระหว่าง wild type และสายพันธุ์ Hoshino พบว่าวิธี RT-PCR และ RFLP ใช้เวลานานหลายชั่วโมง แต่เทคนิค RT-LAMP และ RFLP ใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมง (38) การตรวจโรค Bursal Diseases ในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (vvBDVs) ออกจากสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง (non-vvBDVs) ในตัวอย่างสัตว์ปีก ด้วยเทคนิค LAMP-RFLP พบว่า เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกโดยวิธี conventional RT-PCR, Real-Time RT-PCR และ RT-LAMP คิดเป็น 79.2, 95.8 และ 95.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าวิธี RT-LAMP เทียบกับวิธี Real-Time RT-PCR และ conventional RT-PCR มีเปอร์เซ็นต์ของ correlate คิดเป็น 100 และ 83.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (124) การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* complex พบว่าวิธี LAMP มีความไวและความจำเพาะเท่ากับวิธี Real-Time PCR โดยมีค่าเท่ากับ 100 fg/ul และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (113) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิค LAMP-RFLP ในการตรวจวิเคราะห์ต่างๆ เช่น เทคนิค Multiplex Loop-mediated isothermal amplification ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII* (mLAMP-RFLP) สามารถแยกแยะเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Shigella* spp. ในตัวอย่างนมได้ (36) การตรวจหาจีโนมไทป์ของ Herpesvirus 6 (HHV-6) โดยใช้วิธีของ LAMP method ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ *AccI* สามารถแยกแยะระหว่าง type A และ B ได้ (37)

วิธี Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Scal* ใช้แยกสายพันธุ์ของวัคซีนป้องกันคางทูม ระหว่าง wild type และสายพันธุ์ Hoshino ได้ (38) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจโรค Bursal Diseases ในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรง (vvIBDVs) ออกจากสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง (non-vvIBDVs) ในตัวอย่างสัตว์ปีก ด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tfi I* (124)

เทคนิค LAMP มีข้อควรระวัง คือ เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ ซึ่งงานวิจัยนี้พบปัญหาการเกิดผลบวกปลอมในบางการทดลองเช่นกัน วิธีป้องกันการปนเปื้อน เช่น แยกพื้นที่สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ การเตรียมน้ำยา และ การตรวจสอบผลผลิตของ LAMP ออกจากกัน ทำความสะอาดอุปกรณ์และพื้นที่ปฏิบัติงานด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทุกครั้งก่อนและหลังใช้งาน เปิดแสงอัลตราไวโอเล็ตในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 15 นาที ก่อนและหลังใช้งาน และควรเปิดแสงอัลตราไวโอเล็ตในห้องทดลองทิ้งไว้ข้ามคืน อย่างน้อยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง (162) พบปัญหาการปนเปื้อนในงานวิจัยอื่นๆ ที่ผ่านมาเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การตรวจวิเคราะห์เชื้อปรสิต *Toxoplasma gondii* ในตัวอย่างเลือด ด้วยวิธี LAMP พบว่ามีผลบวกปลอมเกิดขึ้น ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหานี้ด้วยการเปลี่ยนถุงมือและการเปลี่ยนใช้ปิเปตในแต่ละพื้นที่การทดลอง (162)

การใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsaI* หรือวิธี LAMP-RFLP สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ที่มีการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ตำแหน่ง A2143G ได้ ซึ่งการตรวจวิเคราะห์นี้จะ เป็นประโยชน์ต่อการรักษาเป็นอย่างมากในการนำไปใช้ตรวจการดื้อยาคลาริโธรมัยซินในพื้นที่ที่พบอุบัติการณ์การดื้อยานี้มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยคัดกรองเชื้อดื้อยา ถ้าตรวจวิเคราะห์ LAMP-RFLP ได้บวก แสดงว่ามีการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง A2143G ดังนั้นเชื้อจะดื้อยาคลาริโธรมัยซิน ซึ่งอาจตรวจยืนยันด้วย วิธี Agar dilution หรือ วิธี E-Test เพื่อประโยชน์ในการปรับเปลี่ยนยาที่เหมาะสมในการรักษา นอกจากนี้วิธี LAMP-RFLP ที่พัฒนาขึ้นยังสามารถตรวจวิเคราะห์จากตัวอย่าง urease test ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีในงานประจำ โดยไม่ต้องเสียเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และสามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบที่รวดเร็ว ในการตรวจ ณ จุดดูแลผู้ป่วย และการศึกษาระบาดวิทยาในพื้นที่ต่างๆ ได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบหาความไว และความจำเพาะ ซึ่งควรจะทำ การทดสอบหาความไวและความจำเพาะและเปรียบเทียบกับเทคนิคทางอณูชีววิทยาอื่นๆ ในอนาคตต่อไป หากมีความไวและความจำเพาะเทียบเท่าหรือดีกว่าจะเป็นประโยชน์ในการนำเทคนิค LAMP-RFLP ไปใช้ตรวจวิเคราะห์ในงานประจำได้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้ พบการติดเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 101 ตัวอย่าง จากตัวอย่าง urease test ทั้งหมด 353 ตัวอย่าง ซึ่งพบการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA ที่ตำแหน่ง T2182C มากที่สุด คิดเป็น 48.3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ตำแหน่ง A2143G พบประมาณ 3.4 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีการหาลำดับเบส และคิดเป็น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี PCR-RFLP และจากการพัฒนาเทคนิค LAMP-RFLP เพื่อใช้ตรวจการกลายพันธุ์ยีน 23S rRNA พบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 23S rRNA ประกอบด้วย FIP/BIP ความเข้มข้น 1.6 ไมโครโมลาร์, F3/B3 ความเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ และ LF/LB ความเข้มข้น 0.8 ไมโครโมลาร์, เบตาอินความเข้มข้น 0.8 โมลาร์, ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟตความเข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเอนไซม์ *Bsa*I สามารถแยกความแตกต่างระหว่างผลผลิต LAMP ของ wild type และ A2143G mutant type ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ในอนาคตควรทดสอบหาความไวและความจำเพาะของวิธี LAMP-RFLP และศึกษาในระดับพีโนไทป์ควบคู่กันไปด้วย รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของการดื้อยาคลาริโทรรมัยซินที่ตำแหน่งการกลายพันธุ์ T2182C ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้ การศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ต่อการเริ่มการรักษาด้วยวิธี First line therapy โดยตรวจวิเคราะห์การดื้อยาคลาริโทรรมัยซิน จากตัวอย่าง urease test ได้โดยตรง ไม่ต้องเสียเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ และยังสามารถนำความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้ไปพัฒนาต่อยอดเป็นชุดทดสอบที่รวดเร็วในอนาคตได้ต่อไป

รายการอ้างอิง

1. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Rev 19 (2006): 449-90.
2. รัฐกร วิไลชนม์. ตำราอายุรศาสตร์ทางเดินอาหารในเวชปฏิบัติ. กรุงเทพมหานคร: หจก. โรงพิมพ์วีชรินทร์ พี.พี., 2551.
3. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter Pylori [Online]. 2014 [cited 2014 Nov 19]. Available from: https://www.google.co.th/gws_rd=cr,ssl&ei=KfW_VlahFoLpmAXe2YIg#q=IARC2C+Schistosomes+Liver+Fluke+and+Helicobacterpylori2C++Scientific+Publication+no.61.
4. Pounder RE, Ng D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 9 Suppl 2 (1995): 33-9.
5. Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. J Gastroenterol Hepatol 25 (2010): 479-86.
6. van Duynhoven YT, de Jonge R. Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? Bull World Health Organ 79 (2001): 455-60.
7. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 61 (2012): 646-64.
8. National Medicines Information Centre V, No. 4. Update on H. pylori infection [Online]. 2011 [cited 2014 Apr 19]. Available from: <http://www.stjames.ie/GPsHealthcareProfessionals/Newsletters/NMICBulletins/NMICBulletins2011/Final%20proof%20of%20H%20pylori.pdf>.
9. De Francesco V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, et al. Worldwide *H. pylori* antibiotic resistance: a systematic review. J Gastrointest Liver Dis 19 (2010): 409-14.
10. Vilaichone RK, Gumnarai P, Ratanachu-Ek T, Mahachai V. Nationwide survey of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis 77 (2013): 346-9.

11. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. Antimicrob Agents Chemother 41 (1997): 2621-8.
12. Goldman RC, Zakula D, Flamm R, Beyer J, Capobianco J. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite, and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 38 (1994): 1496-500.
13. Versalovic J, Osato MS, Spakovsky K, Dore MP, Reddy R, Stone GG, et al. Point mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. J Antimicrob Chemother 40 (1997): 283-6.
14. Agudo S, Perez-Perez G, Alarcon T, Lopez-Brea M. Rapid detection of clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* strains in Spanish patients by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Rev Esp Quimioter 24 (2011): 32-6.
15. Yamade M, Sugimoto M, Uotani T, Nishino M, Kodaira C, Furuta T. Resistance of *Helicobacter pylori* to quinolones and clarithromycin assessed by genetic testing in Japan. J Gastroenterol Hepatol 26 (2011): 1457-61.
16. Abadi A, Taghvaei T, Ghasemzadeh A, Mobarez A. High frequency of A2143G mutation in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolates recovered from dyspeptic patients in Iran. Saudi J Gastroenterol 17 (2011): 396-9.
17. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Troiani L, Burattini O, et al. Clarithromycin-resistant genotypes and eradication of *Helicobacter pylori*. Ann Intern Med 144 (2006): 94-100.
18. Liu G, Xu X, He L, Ding Z, Gu Y, Zhang J, et al. Primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated from Beijing children. Helicobacter 16 (2011): 356-62.
19. Sakinc T, Baars B, Wuppenhorst N, Kist M, Huebner J, Opferkuch W. Influence of a 23S ribosomal RNA mutation in *Helicobacter pylori* strains on the in vitro synergistic effect of clarithromycin and amoxicillin. BMC Res Notes 5 (2012): 603.

20. Gisbert JP, Calvet X. Review article: the effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough. Aliment Pharmacol Ther 34 (2011): 1255-68.
21. Wayne P. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated Fastidious Bacteria: Approved Guideline—Second Edition. CLSI document M45-A2, Vol. 30, No. 18. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
22. Caristo E, Parola A, Rapa A, Vivenza D, Raselli B, Dondi E, et al. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated from children' gastric antrum and fundus as assessed by fluorescent in-situ hybridization and culture on four-sector agar plates. Helicobacter 13 (2008): 557-63.
23. Prokhorenko IA, Astakhova IV, Momynaliev KT, Zatsepin TS, Korshun VA. Phenylethynylpyrene excimer forming hybridization probes for fluorescence SNP detection. Methods Mol Biol 578 (2009): 209-22.
24. Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. Gut 46 (2000): 608-14.
25. Chisholm SA, Owen RJ. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. Diagn Microbiol Infect Dis 61 (2008): 67-71.
26. Lehours P, Siffré E, Mégraud F. DPO multiplex PCR as an alternative to culture and susceptibility testing to detect *Helicobacter pylori* and its resistance to clarithromycin. BMC Gastroenterology 11 (2011): 112.
27. Chisholm SA, Owen RJ, Teare EL, Saverymuttu S. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. J Clin Microbiol 39 (2001): 1217-20.
28. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 22 (1997): 176-81.

29. Monstein H, Nikpour-Badr S, Jonasson J. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. FEMS Microbiol Lett 199 (2001): 103-7.
30. Moder KA, Layer F, Konig W, Konig B. Rapid screening of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by pyrosequencing. J Med Microbiol 56 (2007): 1370-6.
31. Notomi T, Okayama H, Masubushi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28 (2000): E63-e.
32. Liu X, Fang J, Zhang M, Wang X, Wang W, Gong Y, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). World J Microbiol Biotechnol 28 (2012): 1013-20.
33. Surabattula R, Vejandla MP, Mallepaddi PC, Faulstich K, Polavarapu R. Simple, rapid, inexpensive platform for the diagnosis of malaria by loop mediated isothermal amplification (LAMP). Exp Parasitol 134 (2013): 333-40.
34. Nago TT, Tokashiki YT, Kisanuki K, Nakasone I, Yamane N. Laboratory-based evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect *Cryptosporidium* oocyst and *Giardia lamblia* cyst in stool specimens. Rinsho Byori 58 (2010): 765-71.
35. Minami M, Ohta M, Ohkura T, Ando T, Torii K, Hasegawa T, et al. Use of a combination of brushing technique and the loop-mediated isothermal amplification method as a novel, rapid, and safe system for detection of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 44 (2006): 4032-7.
36. Shao Y, Zhu S, Jin C, Chen F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. Int J Food Microbiol 148 (2011): 75-9.
37. Ihira M, Ohta A, Sugata K, Suga S, Asano Y, Yoshikawa T. Loop-mediated isothermal amplification for discriminating between human herpesvirus 6 A and B. J Virol Methods 154 (2008): 223-5.

38. Yoshida N, Fujino M, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Simple differentiation method of mumps Hoshino vaccine strain from wild strains by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Vaccine 25 (2007): 1281-6.
39. Harry L.T Mobley GLM, Stuart L. Hazell SL, ed. Helicobacter pylori Physiology and Genetics. ASM Press: Washington, United State, 2001.
40. James G. Fox FM. Manual of Clinical Microbiology: Helicobacter. ASM Press: Washington, United State, 2007.
41. Leite KR, Darini E, Canavez FC, Carvalho CM, Mitteldorf CA, Camara-Lopes LH. *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. Sao Paulo Med J 123 (2005): 113-8.
42. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cagA*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996): 14648-53.
43. Atherton JC, Peek RM, Jr., Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 112 (1997): 92-9.
44. Czinn SJ. *Helicobacter pylori* infection: detection, investigation, and management. J Pediatr 146 (2005): S21-6.
45. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. N Engl J Med 345 (2001): 784-9.
46. Dore MP, Leandro G, Realdi G, Sepulveda AR, Graham DY. Effect of pretreatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta-analytical approach. Dig Dis Sci 45 (2000): 68-76.
47. Suerbaum S, P.Michetti. *Helocobacter pylori* infection. N Engl J Med 347 (2002): 1175-86.
48. Yamaoka Y. Helicobacter pylori: Moleculla genetics and cellular biology [e-book]. Caister Academic Press: Norfolk, UK; 2008. Available from:

<https://books.google.co.th/books?id=4ev70dUb81IC&pg=PA60&lpq=PA60&dq=h.+pylori+virulence+factors,+Graham+DY+2006.#v=onepage&q=h.%20pylori%20virulence%20factors%2C%20Graham%20DY%202006.&f=false>.

49. Pathways PS. Components of *Helicobacter pylori* with biological activity [Online]. 2014 [cited 2014 Sep 27]. Available from: <http://www.polygenicpathways.co.uk/helicobacter.htm>.
50. Burgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, et al. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. Eur J Oral Sci 116 (2008): 297-304.
51. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev 22 (2000): 283-97.
52. Vale FF, Vitor JM. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: does food play a role in rural and urban areas? Int J Food Microbiol 138 (2010): 1-12.
53. Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. Gut 35 (1994): 742-5.
54. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, et al. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. Lancet 339 (1992): 896-7.
55. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, Tralka TS, McQuillan G. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. J Infect Dis 181 (2000): 1359-63.
56. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 19 Suppl 1 (2014): 1-5.
57. GLOBOCAN. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Online]. 2012 [cited 2014 Nov 19]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
58. Moore M, Sangrajang S, Bray F. Asian Cancer Registry Forum 2014 - Regional Cooperation for Cancer Registration: Priorities and Challenges Asian Pac J Cancer Prev 15 (2014): 1891-4.

59. Peleteiro B, Bastos A, Ferro A, Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. Dig Dis Sci 59 (2014): 1698-709.
60. Gokben O, Yasar D, Kaan D. Prevalence of *Helicobacter pylori* virulence genotypes among children in Eastern Turkey. World J Gastroenterol 19 (2013): 6585-9.
61. Chomvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. Int J Infect Dis 12 (2008): 30-6.
62. สืบตระกูล วิเศษสมบัติ. *Helicobacter pylori* [Online]. 2014 [cited 2014 Sep 19]. Available from: http://www.medtech.psu.ac.th/Files_Article/20140721YQ6LmHeTPjvg.pdf
63. Patel SK, Pratap CB, Jain AK, Gulati AK, Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori* : What should be the gold standard? World J Gastroenterol 20 (2014): 12847-59.
64. Kimberly-Clark. CLotest* Rapid Urease Test [Online]. 2014 [cited 2014 Sep 19]. Available from: http://nedcon.clindia.nl/_files/Brochures/Kimberly_Clark/US_H0023-06-01.pdf.
65. Kullavanijaya P, Thong-Ngam D, Hanvivatvong O, Nunthapisud P, Tangkijvanich P, Suwanagool P. Analysis of eight different methods for the detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia. J Gastroenterol Hepatol 19 (2004): 1392-6.
66. Basset C, Holton J, Gatta L, Ricci C, Bernabucci V, Liuzzi G, et al. *Helicobacter pylori* infection: anything new should we know? Aliment Pharmacol Ther 20 Suppl 2 (2004): 31-41.
67. สมาคมแพทย์ระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย. แนวทางเวชปฏิบัติในการวินิจฉัยและรักษาผู้ป่วย dyspepsia และผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ในประเทศไทย พ.ศ. 2553. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร, 2553.
68. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Capodicasa S, Marzio L. Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. Scand J Gastroenterol 41 (2006): 280-7.

69. Datta S, Chattopadhyay S, Balakrish Nair G, Mukhopadhyay AK, Hembram J, Berg DE, et al. Virulence genes and neutral DNA markers of *Helicobacter pylori* isolates from different ethnic communities of West Bengal, India. J Clin Microbiol 41 (2003): 3737-43.
70. Linpisarn S, Koosirirat C, Prommuangyong K, Suwan W, Lertprasertsuke N, Phornphutkul K. Use of different PCR primers and gastric biopsy tissue from CLO test for the detection of *Helicobacter pylori*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 36 (2005): 135-40.
71. Hirai I, Sasaki T, Fujimoto S, Moriyama T, Azuma T, Yamamoto Y. A method for assessment of *Helicobacter pylori* genotype using stool specimens. FEMS Immunol Med Microbiol 56 (2009): 63-6.
72. Smith SI FM, Otegbayo JA, Abdulkareem FB, Omonigbehin EA, Adegboyega A, Contreras M, Haas R. Comparison of PCR with other diagnostic techniques for the detection of *H. pylori* infection in patients presenting with gastroduodenal symptoms in Nigeria. Int J Mol Epidemiol Genet 2 (2011): 178-84.
73. Selgrad M MP. Treatment of *Helicobacter pylori*. Curr Opin Gastroenterol 27 (2011): 565-70.
74. Kongchayanun C, Vilaichone RK, Pornthisarn B, Amornsawadwattana S, Mahachai V. Pilot studies to identify the optimum duration of concomitant *Helicobacter pylori* eradication therapy in Thailand. Helicobacter 17 (2012): 282-5.
75. E. H. Treatment of *Helicobacter pylori* infections. Acta Med Austriaca 27 (2000): 104-7.
76. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut 59 (2010): 1143-53.
77. Li Y, Rimbara E, Thirumurthi S, Trespalacios A, Reddy R, Sabounchi S, et al. Detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* following noncryogenic storage of rapid urease tests for 30 days. J Dig Dis 13 (2012): 54-9.
78. Gisbert JP, Pajares R, Pajares JM. Evolution of *Helicobacter pylori* therapy from a meta-analytical perspective. Helicobacter 12 Suppl 2 (2007): 50-8.

79. Kulsuntiwong P, Chomvarin C, Chaicumpar K, Namwat W, Kaewkes W, Mairiang P, et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* isolated from gastric biopsies in dyspeptic patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 39 (2008): 1102-9.
80. Medlibrary. Clarithromycin [Online]. 2014 [cited 2014 Nov 19]. Available from: <http://medlibrary.org/lib/rx/meds/clarithromycin-25/>.
81. Kim JM, Kim JS, Kim N, Kim YJ, Kim IY, Chee YJ, et al. Gene mutations of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Korean patients. *J Microbiol Biotechnol* 18 (2008): 1584-9.
82. Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, Sasatsu M. Novel mutation in 23S rRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 52 (2008): 3465-6.
83. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. *J Korean Med Sci* 17 (2002): 599-603.
84. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 53 (2004): 1374-84.
85. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut* 50 (2002): 285-9.
86. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 20 (2007): 280-322.
87. Gibson JR, Saunders NA, Burke B, Owen RJ. Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 37 (1999): 3746-8.
88. Matsumura M, Hikiba Y, Ogura K, Togo G, Tsukuda I, Ushikawa K, et al. Rapid detection of mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* that confers resistance to clarithromycin treatment to the bacterium. *J Clin Microbiol* 39 (2001): 691-5.
89. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations

- conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 41 (2003): 397-402.
90. Seegene. Seeplex®: H. pylori-ClaR ACE Detection [Online]. 2014 [cited 2015 19 Feb]. Available from: http://www.seegene.com/neo/en/products/others/seeplex_HpyloriClar.php.
 91. Booka M, Okuda M, Shin K, Miyashiro E, Hayashi H, Yamauchi K, et al. Polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection in children using stool sample. Helicobacter 10 (2005): 205-13.
 92. Szczebara F, Dhaenens L, Vincent P, Husson MO. Evaluation of rapid molecular methods for detection of clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16 (1997): 162-4.
 93. Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Kanai F, Shiratori Y, Omata M. *Helicobacter pylori* specific nested PCR assay for the detection of 23S rRNA mutation associated with clarithromycin resistance. Gut 43 (1998): 317-21.
 94. Alarcon T, Domingo D, Prieto N, Lopez-Brea M. PCR using 3'-mismatched primers to detect A2142C mutation in 23S rRNA conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Clin Microbiol 38 (2000): 923-5.
 95. Schmitt BH, Regner M, Mangold KA, Thomson RB, Jr., Kaul KL. PCR detection of clarithromycin-susceptible and -resistant *Helicobacter pylori* from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies. Mod Pathol 26 (2013): 1222-7.
 96. Hansomburana P, Anantapanpong S, Sirinthornpunya S, Chuengyong K, Rojborwonwittaya J. Prevalence of single nucleotide mutation in clarithromycin resistant gene of *Helicobacter pylori*: a 32-months prospective study by using hybridization real time polymerase chain reaction. J Med Assoc Thai 95 Suppl 3 (2012): S28-35.
 97. Mitui M, Patel A, Leos NK, Doern CD, Park JY. Novel *Helicobacter pylori* sequencing test identifies high rate of clarithromycin resistance. J Pediatr Gastroenterol Nutr 59 (2014): 6-9.

98. Baba S, Oishi Y, Watanabe Y, Oikawa R, Morita R, Yoshida Y, et al. Gastric wash-based molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Digestion 84 (2011): 299-305.
99. Aliotta JM, Pelletier JJ, Ware JL, Moran LS, Benner JS, Kong H. Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. Genet Anal 12 (1996): 185-95.
100. Eiken chemical Co. L. About LAMP method [Online]. 2014 [cited 2014 Sep 09]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>.
101. Varga A, James D. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Plum pox virus. J Virol Methods 138 (2006): 184-90.
102. Eiken Chemical Co. L. Basic principle [Online]. 2014 [cited 2014 Nov 09]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>.
103. Eiken Chemical Co. L. A Guide to LAMP primer designing [Online]. 2014 [cited 2012 Nov 09]. Available from: http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1-3.pdf.
104. Eiken chemical Co. L. LAMP-based SNPs typing [Online]. 2014 [cited 2014 Sep 09]. Available from: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/snps_index.html.
105. Invitrogen. SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain [Online]. 2014 [cited 2014 Apr 19]. Available from: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp07567.pdf>.
106. Yang BC, Wang FX, Zhang SQ, Song N, Li JX, Yang ZQ, et al. Comparative evaluation of conventional polymerase chain reaction (PCR), with loop-mediated isothermal amplification and SYBR green I-based real-time PCR for the quantitation of porcine circovirus-1 DNA in contaminated samples destined for vaccine production. J Virol Methods 191 (2013): 1-8.
107. Nie K, Qi SX, Zhang Y, Luo L, Xie Y, Yang MJ, et al. Evaluation of a direct reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method without RNA extraction for the detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 in nasopharyngeal swab specimens. PloS one 7 (2012): e52486.

108. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 289 (2001): 150-4.
109. Mori YH, T.; and Notomi, T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnology 6 (2006): 3.
110. Watthanapanpituck K, Kiatpathomchai W, Chu E, Panvisavas N. Identification of human DNA in forensic evidence by loop-mediated isothermal amplification combined with a colorimetric gold nanoparticle hybridization probe. Int J Legal Med 128 (2014): 923-31.
111. Suebsing R, Prombun P, Kiatpathomchai W. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with colorimetric gold nanoparticle (AuNP) probe assay for visual detection of *Penaeus vannamei* nodavirus (PVNV). Lett Appl Microbiol 56 (2013): 428-35.
112. Gotoh K, Nishimura N, Takeuchi S, Hattori F, Horiba K, Isaji M, et al. Assessment of the loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric community-acquired pneumonia. Jpn J Infect Dis 66 (2013): 539-42.
113. Yang B, Wang X, Li H, Li G, Cao Z, Cheng X. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for the diagnosis of tuberculous pleurisy. Lett Appl Microbiol 53 (2011): 525-31.
114. Li Y, Jiang M, Liu W, Zhang L, Zhang S, Zhao X, et al. Loop-mediated isothermal amplification method targets to the phoP gene for detection of *Yersinia enterocolitica*. Mol Cell Probes 24 (2010): 68-71.
115. Thirapanmethee K, Pothisamutyothin K, Nathisuwan S, Chomnawang M, Wiwat C. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the blaCTX-M9 gene for detection of extended spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Immunol 58 (2014): 655-65.
116. Shijun F, Qu G, Guo S, Ma L, Zhang N, Zhang S, et al. Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. Appl Biochem Biotechnol 163 (2011): 845-50.

117. Han F, Wang F, Ge B. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification. Appl Environ Microbiol 77 (2011): 2589-95.
118. Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Kitazato M, Nukina M, Misawa N, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Med Microbiol 57 (2008): 444-51.
119. Ziros PG, Kokkinos PA, Allard A, Vantarakis A. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for the Detection of Adenovirus 40 and 41. Food Environ Virol (2015): DOI 10.1007/s12560-015-9182-8.
120. Yamazaki W, Mioulet V, Murray L, Madi M, Haga T, Misawa N, et al. Development and evaluation of multiplex RT-LAMP assays for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. J Virol Methods 192 (2013): 18-24.
121. Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET, Bantuchai S, Buates S. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. J Clin Microbiol 52 (2014): 1471-7.
122. Hayama M, Chida M, Karube Y, Tamura M, Kobayashi S, Oyaizu T, et al. One-step nucleic acid amplification for detection of lymph node metastasis in lung cancer. Ann Thorac Cardiovasc Surg 20 (2014): 181-4.
123. Feng J, Tang S, Liu L, Kuang X, Wang X, Hu S, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and specific detection of common genetically modified organisms (GMOs). Int J Food Sci Nutr 13 (2015): 1-11.
124. Wang Y KZ, Gao H, Gao Y, Qin L, Lin H, Yu F, Qi X, Wang X. A one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection and discrimination of infectious bursal disease virus. ViroLJ 8 (2011): 108.
125. Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, et al. Comparison of five PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA in gastric tissues. J Clin Microbiol 37 (1999): 772-4.

126. Blast. Nucleotide blast [Online]. 2013 [cited 2013 Apr 19]. Available from: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
127. Agilent. StrataClone PCR Cloning Kit Instruction Manual [Online]. 2014 [cited 2014 Sep 19]. Available from: <http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/240205.pdf>.
128. Eiken Chemical Co. L. PrimerExplorer v4 [Online]. 2012 [cited 2012 Nov 09]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>.
129. Federico A, Gravina AG, Miranda A, Loguercio C, Romano M. Eradication of *Helicobacter pylori* infection: which regimen first? World J Gastroenterol 20 (2014): 665-72.
130. van Keeken N, van Hattum E, de Boer WA. Validation of a new, commercially available dry rapid urease test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric biopsies. Neth J Med 64 (2006): 329-33.
131. Chen T, Meng X, Zhang H, Tsang RW, Tsang TK. Comparing Multiplex PCR and Rapid Urease Test in the Detection of *H. pylori* in Patients on Proton Pump Inhibitors. Gastroenterol Res Pract 2012 (2012): 898276.
132. Diouf A, Martinez-Gomis J, Miquel M, Quesada M, Lario S, Sixou M. Comparison of four different primer sets for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies and oral samples by using real-time PCR. Patho Biol 57 (2009): 30-5.
133. Mahachai V, Sirimontaporn N, Tumwasorn S, Thong-Ngam D, Vilaichone RK. Sequential therapy in clarithromycin-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* based on polymerase chain reaction molecular test. J Gastroenterol Hepatol 26 (2011): 825-8.
134. Kim T, Song HJ, Shin SY, Kim JH, Na SY, Boo SJ, et al. Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* associated with 23S rRNA point mutations in Jeju Island. Korean J Gastroenterol 61 (2013): 252-8.
135. Sezgin O, Aslan G, Altintas E, Tezcan S, Serin MS, Emekdas G. Detection of point mutations on 23S rRNA of *Helicobacter pylori* and resistance to clarithromycin with PCR-RFLP in gastric biopsy specimens in Mersin, Turkey. Turk J Gastroenterol 19 (2008): 163-7.

136. Trespalacios AA, Otero W, Caminos JE, Mercado MM, Avila J, Rosero LE, et al. Phenotypic and genotypic analysis of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from Bogota D.C., Colombia. J Microbiol 51 (2013): 448-52.
137. Ben Mansour K, Burucoa C, Zribi M, Masmoudi A, Karoui S, Kallel L, et al. Primary resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin of *Helicobacter pylori* isolated from Tunisian patients with peptic ulcers and gastritis: a prospective multicentre study. Ann Clin Microbiol Antimicrob 9 (2010): 22.
138. De Francesco V, Giorgio F, Ierardi E, Zotti M, Neri M, Milano A, et al. Primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*: the Multicentric Italian Clarithromycin Resistance Observational (MICRO) study. J Gastrointestin Liver Dis 20 (2011): 235-9.
139. Pina M, Occhialini A, Monteiro L, Doermann HP, Megraud F. Detection of point mutations associated with resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin by hybridization in liquid phase. J Clin Microbiol 36 (1998): 3285-90.
140. Zhen-Hua Z, De-Qiang H, Yong X, Lin-Lin L, Nong-Hua L. Characterization of 23S rRNA gene mutation in primary and secondary clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains from East China. Turk J Gastroenterol 24 (2013): 5-9.
141. Abdollahi H, Savari M, Zahedi MJ, Moghadam SD, Hayatbakhsh Abasi M. Detection of A2142C, A2142G, and A2143G Mutations in 23s rRNA Gene Conferring Resistance to Clarithromycin among *Helicobacter pylori* Isolates in Kerman, Iran. Iran J Med Sci 36 (2011): 104-10.
142. Versalovic J SD, Kibler K, et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 40 (1996): 477-80.
143. Barile KA, Silva AL, Xavier JN, Assumpcao MB, Corvelo TC. Characterization of 23S rRNA domain V mutations in gastric biopsy patients from the eastern Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 105 (2010): 314-7.
144. Ahmad N, Zakaria WR, Abdullah SA, Mohamed R. Characterization of clarithromycin resistance in Malaysian isolates of *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 15 (2009): 3161-5.

145. Agudo S, Perez-Perez G, Alarcon T, Lopez-Brea M. High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. J Clin Microbiol 48 (2010): 3703-7.
146. HPA. National standard methods for identification of *Helicobacter* species: Reference no: BSOP ID26i2, no. 2 [Online]. 2008 [cited 2015 19 Mar]. Available from: <http://hemltd.ru/export/sites/HemLtd/publications/sections/Normativ/foreign/Infections/medicine/NHS040/article.pdf>.
147. Surajit D, Hirak RD. Microbial Biotechnology- A Laboratory Manual for Bacterial Systems: Guildlines for Primer Design. New Delhi, India: Springer, 2014.
148. Yuan Y, Jiang C, Liu L, Yu S, Cui Z, Chen M, et al. Convenient, sensitive and high-throughput method for screening botanic origin. Sci Rep 4 (2014): 5395.
149. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol 18 (2008): 407-21.
150. Luo Y, Sahin O, Dai L, Sippy R, Wu Z, Zhang Q. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid, sensitive and specific detection of a *Campylobacter jejuni* clone. J Vet Med Sci 74 (2012): 591-6.
151. Ravan H, Yazdanparast R. Development of a new loop-mediated isothermal amplification assay for prt (rfbS) gene to improve the identification of *Salmonella* serogroup D. World J Microbiol Biotechnol 28 (2012): 2101-6.
152. Lau YL, Fong MY, Mahmud R, Chang PY, Palaeya V, Cheong FW, et al. Specific, sensitive and rapid detection of human *plasmodium knowlesi* infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples. Malar J 10 (2011): 197.
153. Yeh HYS, C. A.; and Klesius, P.H. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. J Microbiol Methods 63 (2005): 36-44.

154. Abu Al-Soud W, Radstrom P. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J Clin Microbiol 38 (2000): 4463-70.
155. Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. Nucleic Acids Res 25 (1997): 3957-8.
156. Wei QW, Yu C, Zhang SY, Yang CY, Miriam K, Zhang WN, et al. One-step detection of Bean pod mottle virus in soybean seeds by the reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. ViroL J 9 (2012): 187.
157. Ji J, Xie QM, Chen CY, Bai SW, Zou LS, Zuo KJ, et al. Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop-mediated isothermal amplification assay. Poult Sci 89 (2010): 477-83.
158. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 85 (1988): 9436-40.
159. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239 (1988): 487-91.
160. Mao Z, Qiu Y, Zheng L, Chen J, Yang J. Development of a visual loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the bacterial pathogen *Pseudomonas putida* of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). J Microbiol Methods 89 (2012): 179-84.
161. Bhat AI SA, Deeshma KP. Rapid detection of Piper yellow mottle virus and Cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). J Virol Methods 193 (2013): 190-6.
162. Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, Thiruvengadam G, Nissapatorn V, Chen Y. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. J Clin Microbiol 48 (2010): 3698-702.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. บัฟเฟอร์ TE (10 มิลลิโมลาร์ Tris – HCl, 0.1 มิลลิโมลาร์ EDTA, pH 8.8)

ทำการละลายทริสเบส (Tris base) จำนวน 1.21 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปรับค่า pH โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ pH เท่ากับ 8.8 จากนั้นเติม EDTA ที่มี pH เท่ากับ 8 มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

2. อีดีทีเอ EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทำการละลาย $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 136.1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีโดยการใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) แล้วปรับค่า pH ด้วยการเติมเกล็ดโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ลงไป จนกระทั่งได้ pH เท่ากับ 8.0 ซึ่งเป็นค่า pH ที่ EDTA จะละลายหมด หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3. บัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10 เท่า (10X TBE buffer)

ทำการละลายทริสเบส (Tris base) จำนวน 108 กรัม, กรดบอริก (Boric acid) จำนวน 55 กรัม และ EDTA ที่มีค่า pH เท่ากับ 8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบตามจำนวน 1000 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) จากนั้นทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งก่อนใช้งานสามารถนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 เท่า เพื่อใช้สำหรับการเตรียมวุ้นอะกาโรส และใช้ในวิธีการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าในวุ้นอะกาโรส

4. เอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide)

ทำการละลายเอทิดียมโบรไมด์จำนวน 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บให้พ้นแสงด้วยเก็บใส่ขวดสีชาหรือการห่อด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

5. ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris – HCl) ความเข้มข้น 10 โมลาร์

ทำการละลายทริสเบส (Tris base) 121.14 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ pH ที่ต้องการ คือ ประมาณ 7 – 8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

6. อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar จำนวน 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

- Brain infusion solids 12.5 กรัม
- Beef heart infusion solids 5 กรัม
- Proteose peptone 10 กรัม
- Sodium chloride 5 กรัม
- Glucose 5 กรัม
- Disodium phosphate 2.5 กรัม
- Agar 20 กรัม

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar จำนวน 47 กรัม ลงในขวด และเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการปรับ pH ให้ได้ 7.0 จากนั้นทำการ Autoclave แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ผสมเลือดแกะ 7 เปอร์เซ็นต์ให้เข้ากันดี จากนั้นเทอาหารลงจานอาหาร จานละ 25 มิลลิลิตร

7. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ผสม glycerol 15 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บรักษาเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จำนวน 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

- Pancreatic Digest of Casein 17 กรัม
- Sodium Chloride 5 กรัม
- Papaic Digest of Soybean Meal 3 กรัม
- Dextrose 2.5 กรัม
- Dipotassium Phosphate 2.5 กรัม

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB จำนวน 2.55 กรัม ลงในขวด เติมน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร และเติม glycerol 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทำการปรับ pH ให้ได้ 7.0 จากนั้นทำการ Autoclave แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อลงใน Cryo vial หลอดละ 1 มิลลิลิตร

8. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Agar จำนวน 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

- NaCl 10 กรัม
- Tryptone 10 กรัม
- Yeast extract 5 กรัม

- Agar 20 กรัม

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth จำนวน 25 กรัม, Agar จำนวน 20 กรัม ลงในขวด และเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการปรับ pH ให้ได้ 7.0 จากนั้นทำการ Autoclave แล้วทำให้เย็นลงที่ อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเทอาหารลงจานอาหาร จานละ 25 มิลลิลิตร

ในกรณีเติมยาแอมพิซิลลิน ให้เติมยาแอมพิซิลลินความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร LB Agar จำนวน 1 ลิตร โดยเติมขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้ออุณหภูมิ ประมาณ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเทอาหารลงจานอาหาร จานละ 25 มิลลิลิตร

9. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth จำนวน 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

- NaCl 10 กรัม
- Tryptone 10 กรัม
- Yeast extract 5 กรัม

ทำการชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Broth จำนวน 25 กรัม ลงในขวด และเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำการปรับ pH ให้ได้ 7.0 จากนั้นทำการ Autoclave

10. X-Gal ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร

ทำการชั่งสาร 5 - bromo -4 - chloro -3- indolyl - β -D- galactopyranoside (X-Gal) จำนวน 0.2 กรัม ลงในขวด จากนั้นทำให้ละลายด้วยการเติม dimethylformamide (DMF) จำนวน 10 มิลลิลิตร หลังจากการเตรียมเสร็จ เก็บรักษาไว้ -20 องศาเซลเซียส เวลาใช้งานนำมา Spread บนอาหารแข็ง LB จำนวน 40 ไมโครลิตร ให้ทั่วก่อนใช้งาน

11. วุ้นอะกาโรส (Agarose gel) 1.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการชั่งวุ้นอะกาโรส จำนวน 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดจนวุ้นละลายหมด ทิ้งไว้ให้อุ่นประมาณ 5 นาที หรือพอที่จะจับด้วยมือแบบ อุ่นๆ จากนั้นเติมเอทีเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร เทลงในภาชนะที่มี ทีวีเสียบอยู่ รอจนวุ้นแข็งตัวแล้วค่อยดึงหรือออก

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธนภร จำปาไทย เกิดวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ.2523 ที่ อำเภอหนองหงส์ จังหวัดบุรีรัมย์ สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เมื่อปีการศึกษา 2546 และในปี 2554 ได้เข้าศึกษา ต่อในระดับ บัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา ภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

