

การตัดแยกเชื้อ *Helicobacter pylori* จากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย

กัณฑ์กนิษฐ์ สุริยะจันทร์¹
หทัยวรรณ ม่วงตาด²
ชญาณิชฐ์ ศิริไสย²
โสฬส อนุชปรีดา²

สมชาย ธนะสิทธิชัย¹
สายป่าน ขุนภักดี²
วรพงศ์ อนุพงศ์อนันต์²
ชินกร นารัตน์²

บทคัดย่อ เชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* เป็นเชื้อที่พบได้ในกระเพาะอาหารของประชากรทั่วโลกมากถึงร้อยละ 50 โดยร้อยละ 80-95 ของผู้ป่วยที่มีแผลในกระเพาะอาหารหรือลำไส้จะมีการติดเชื้อนี้ และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารด้วย ซึ่ง International Agency for Research on Cancer ได้จัดให้เชื้อนี้เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อ *H. pylori* ในห้องปฏิบัติการจากสิ่งส่งตรวจชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ในช่วงเดือน มีนาคม พ.ศ. 2560 ถึงเดือน มกราคม พ.ศ. 2561 จำนวน 205 ราย โดยทำการทดสอบด้วยวิธี rapid urease test เพื่อตรวจหาเชื้อ ผลการศึกษาพบว่าให้ผลบวกในการทดสอบ คือ พบเชื้อ *H. pylori* ในสิ่งส่งตรวจ จำนวน 83 ราย เมื่อนำตัวอย่างชิ้นเนื้อมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อจนสังเกตเห็นการเจริญของโคโลนีได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลท เมื่อทดสอบเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ตามคุณสมบัติของเชื้อ *H. pylori* พบว่าทั้ง 70 ไอโซเลทมีการติดสีของแบคทีเรียแกรมลบ และให้ผลบวกต่อการทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase, catalase และ urease แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 70 ไอโซเลทที่เพาะเลี้ยงได้เป็นเชื้อ *H. pylori* เนื่องจากเชื่อนี้ตายง่าย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปไม่เกิน 2 ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงเชื้อมีความจำเพาะ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ความไวค่อนข้างต่ำ โดยขึ้นอยู่กักระยะเวลาในการนำส่งตัวอย่าง สภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อ การปนเปื้อนด้วยเชื้ออื่น ตลอดจนประสิทธิภาพของผู้ทำการแยกเชื้อ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นวิธีเดียวที่ทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเลือกให้ยาปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมในการรักษาเพื่อช่วยลดปัญหาการดื้อยาของเชื้อ และศึกษาต่อยอดถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารประกอบในสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* (วารสารโรคมะเร็ง 2561;38:66-74)

คำสำคัญ: *Helicobacter pylori* แผลในกระเพาะอาหาร การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สิ่งส่งตรวจชิ้นเนื้อ

¹ กลุ่มงานวิจัย ² ศูนย์ส่งกล้องระบบทางเดินอาหาร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร 10400

Isolation of *Helicobacter pylori* from Biopsy Samples of Patients with Gastritis

by Kankanit Suriyachan¹, Somchai Thanasitthichai¹, Hathaiwan Mounghard², Saipan Khunpugdee², Chayanit Sirisai², Worapong Anuponganan², Soros Anuchapreeda², Chinnagone Narat²

¹Research Division, ²Endoscopy Center, National Cancer Institute, Bangkok 10400

Abstract Over 50% of the world's population is infected with *Helicobacter pylori*. Initial reports from all over the world indicate that ~ 95% of duodenal ulcers and 85% of gastric ulcers occur in the presence of *H. pylori* infection. Chronic infection with this pathogen is associated with the development of peptic ulcers and is linked to an increased risk of gastric cancer. The role of *H. pylori* in gastric cancer was first announced by the International Agency for Research on Cancer (IARC), when they labeled *H. pylori* a class I carcinogen. The present study was conducted to isolate *H. pylori* from tissue biopsies. Samples were collected from the stomach antrum or corpus during the period March 2017 to January 2018. Biopsy samples were confirmed by rapid urease test (RUT). The results showed that 83 samples were positive for *H. pylori*. Biopsies (n = 83) collected during endoscopic examinations were cultivated for 3-7 days using a growth medium selective for *H. pylori*. About 70 bacterial cultures from the biopsy samples were isolated as positive cultures. All isolates were stained with Gram-negative bacteria. The bacterial culture isolates also showed positive results using oxidase, catalase, and urease tests. *H. pylori* are fastidious microorganisms. The culture is 100% specific, but sensitivity is low. Several factors are involved in successful *H. pylori* cultivation, including method, time, procedure for tissue processing, composition of culture media, contamination of biopsy forceps, and the requirement of specific microbiological expertise. However, this method is currently the only way to obtain pure cultures for selecting antibiotics and biological compounds to reduce drug resistance. Further investigations should focus on developing biological compounds for the treatment of *H. pylori* infection. (*Thai Cancer J* 2018;38:66-74)

Keywords: *Helicobacter pylori*, peptic ulcer, culture of bacteria, tissue biopsies

บทนำ

โรคกระเพาะอาหาร ทางกรแพทย์หมายถึง โรคแผลเปปติค (peptic ulcer) จะเกิดบริเวณชั้น mucosa ในกระเพาะอาหารหรือลำไส้เล็กส่วนต้น แผลอาจจะมีลักษณะไปถึงชั้น muscularis mucosa และมีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้นตามมา ซึ่งมักจะเป็นผลจากการสูญเสียสมดุลระหว่างปัจจัยที่ทำให้เกิดแผล (aggressive factors) กับปัจจัยในการป้องกัน (defensive factors) ในทางเดินอาหาร โดยปัจจัยที่ทำให้เกิดแผลเป็นปัจจัยที่จะส่งเสริมให้เกิดการทำลายเยื่อกระเพาะอาหาร เช่น กรด (HCl) เอนไซม์เปปซิน ความเครียด การติดเชื้อ

H. pylori การดื่มสุรา การสูบบุหรี่ และยาในกลุ่มต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ ส่วนปัจจัยในการป้องกันเป็นปัจจัยที่ซ่อมแซมหรือป้องกันเยื่อกระเพาะอาหารจากการถูกทำลาย เช่น การหลั่งเมือกต่าง ๆ การหลั่งไบคาร์บอเนต โดยพบว่าร้อยละ 80 ของผู้ป่วยส่วนใหญ่จะประสบปัญหาการเป็น ๆ หาย ๆ คือ หลังจากรักษาแผลให้หายแล้วมักจะกลับมาเป็นแผลซ้ำอีก ในอดีตมีความเชื่อว่าโรคกระเพาะเป็นผลมาจากการที่กระเพาะอาหารมีกรดมากหรือเยื่อกระเพาะอาหารไม่แข็งแรง แต่ปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่าเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร

และลำไส้เล็กส่วนต้น โดยเชื้อนี้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1979 จนกระทั่งปี ค.ศ. 1982 จึงสามารถแยกเชื้อได้เป็นครั้งแรกจากชิ้นเนื้อในกระเพาะอาหารของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง¹ *H. pylori* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียว หรือรูปคล้ายตัว S จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามีความยาว 2-4 ไมโครเมตร กว้าง 0.5-1 ไมโครเมตร มี flagella ประมาณ 2-6 เส้น พบเพียงข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ (lophotrichous flagella) เชื้อเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic)²

จากการศึกษาพบว่าการเป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบชนิดเรื้อรัง (chronic gastritis) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในกระเพาะอาหาร³ ซึ่งองค์การอนามัยโลกโดยผู้แทนนานาชาติสำหรับการวิจัยโรค มะเร็ง หรือ International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดเชื้อ *H. pylori* เป็น group I carcinogen หรือสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (carcinogenic to humans) เชื้อ *H. pylori* สามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพทางคลินิกได้หลายรูปแบบ ปัจจัยทางความรุนแรงของโรคที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ urease ซึ่งจะเปลี่ยนยูเรียไปเป็นแอมโมเนียและคาร์บาเนต เมื่อคาร์บาเนตเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสได้เป็นแอมโมเนีย (NH_3) กับคาร์บอนิกแอซิด (H_2CO_3) ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) ที่เกิดจากการเปลี่ยนแอมโมเนียเป็นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตอน (proton; H^+) ที่เกิดจากการดในกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดเป็นน้ำ และไปเพิ่ม pH ภายในกระเพาะอาหารให้เหมาะสมต่อการอยู่รอดและเจริญของเชื้อ ทำให้เชื้อไม่ถูกทำลาย พยาธิสภาพที่เกิดตามมา คือ

เชื้อจะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ มารวมกันบริเวณเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะหลั่งสารไซโตไคน์ ทำให้เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารเกิดการอักเสบ เมื่อผ่านไประยะหนึ่งเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารที่เกิดการอักเสบจะเกิดการตาย ทำให้พยาธิสภาพพัฒนาไปเป็นโรคแผลในกระเพาะอาหาร ในคนไข้ที่เป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรังที่มีปัจจัยทั้งภายในและภายนอกที่เหมาะสม พยาธิสภาพสามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งในกระเพาะอาหารได้⁴

การรักษาการติดเชื้อหรือการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* สามารถลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ โดยการกำจัดเชื้อก่อนที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเยื่อบุกระเพาะอาหาร ส่งผลให้การรักษามะเร็งกระเพาะอาหารได้ผลดีและรักษาหายขาด^{5,6} แต่ในประเทศไทยยังไม่เป็นนโยบายการตรวจคัดกรองหรือตรวจค้นหามะเร็งกระเพาะอาหารในประชากร เนื่องจากประเทศไทยมีอัตราการติดเชื้อ *H. pylori* ค่อนข้างสูงแต่มีอุบัติการณ์การเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารต่ำ การรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *H. pylori* ที่ทำกันอยู่ในปัจจุบันจะใช้ยาลดกรดร่วมกับยาปฏิชีวนะซึ่งมีราคาแพง และบางครั้งพบว่ามีฤทธิ์ยาของเชื้อเกิดขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดที่ทำให้การรักษาล้มเหลว นอกจากนั้นองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้ประกาศรายชื่อเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ โดยได้มีการจัดแบ่งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาออกเป็น 3 กลุ่ม ตามระดับความเร่งด่วนของความต้องการยาใหม่ และได้จัดให้เชื้อ *H. pylori* อยู่ในกลุ่มความเร่งด่วน "สูง" ของความต้องการยาใหม่⁷ การศึกษาวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการเพาะเลี้ยง

และจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *H. pylori* ในห้องปฏิบัติการ จากสิ่งส่งตรวจชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยเพื่อ คัดแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถนำไปศึกษาต่อยด ในการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการ และใช้ศึกษาความเป็นไปได้ ในการพัฒนาสารประกอบในสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ใน การรักษาภาวะการติดเชื้อ *H. pylori* ในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ได้รับมาจากคลีพยาบาลที่ทำ การผ่าตัดส่องกล้อง โดยตัดชิ้นเนื้อบริเวณกระเพาะอาหาร หรือบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นของผู้ป่วยที่เข้ารับการ รักษาที่ศูนย์ส่องกล้องระบบทางเดินอาหาร สถาบัน มะเร็งแห่งชาติ ระหว่างเดือน มีนาคม พ.ศ. 2560 ถึง เดือน มกราคม พ.ศ. 2561 จำนวน 205 ราย ซึ่งกลุ่ม ตัวอย่างที่ได้รับมานั้นจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ชิ้นเนื้อส่วนแรกนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ (rapid urease test) และชิ้นเนื้อส่วนที่สองจะนำไปเพาะเลี้ยง บนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษในห้องปฏิบัติการ

ผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้ที่มีอายุ 20 ปี บริบูรณ์ขึ้นไป มีการตรวจโรคแผลในกระเพาะอาหาร ไม่เคยได้รับการรักษาหรือกำจัดเชื้อ *H. pylori* มาก่อน และไม่เคยได้รับยาที่อาจมีผลต่อการรักษาในรอบ 4 สัปดาห์ก่อนการศึกษา เช่น ยาปฏิชีวนะต่าง ๆ ยากลุ่ม ด้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (NSAIDs) ยากลุ่ม glucocorticoids ยากลุ่ม proton pump inhibitors ยา กลุ่ม H_2 -blocker รวมถึงยาสมุนไพรชนิดต่าง ๆ

การวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการ จริยธรรมการวิจัยในคน สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

การทดสอบการผลิตเอนไซม์ (rapid urease test)

Rapid urease test (RUT) คือ การตรวจหา เอนไซม์ urease ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *H. pylori* ในชิ้นเนื้อที่ ส่งตรวจ ด้วยการใช้ชุดทดสอบ Campylobacter-like organism test (CLO test) โดยการนำชิ้นเนื้อที่สะกิด จากผิวกระเพาะของผู้ป่วย หยดลงไปหลุมของชุด ทดสอบ CLO test ที่มีสารยูเรียอยู่ จากนั้นเอนไซม์ urease ของเชื้อจะทำการย่อยยูเรียให้เป็นแอมโมเนีย กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยแอมโมเนียจะมีความ เป็นด่างและทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของชุดทดสอบจาก สีเหลืองเป็นสีชมพูอมแดง เป็นการบ่งชี้ว่าการติดเชื้อ *H. pylori* ในกระเพาะอาหาร

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากชิ้นเนื้อสด

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ในห้องปฏิบัติการ จากสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ถูกตัดออก มาจากผู้ป่วย นำชิ้นเนื้อมาบด และเกลี่ยลงบนผิวหน้า อาหารแข็ง Columbia agar base ที่มีการเติมสาร พิเศษและเติมสารต้านจุลชีพชนิดอื่น ๆ และมีเลือดแกะ ผสมอยู่ 7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปใส่ลงใน anaerobic jar ที่บรรจุ CampyGen™ 2.5L® เพื่อให้ได้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย แล้วนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-7 วัน จนสังเกตเห็น การเจริญของเชื้อเป็นโคโลนีได้

การย้อมสีแบบแกรม

การย้อมสีแบบแกรมเป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) และแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative bacteria) ขั้นตอนการย้อมสีแกรม โดยหยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยเช็บบนสไลด์แก้ว ทิ้งไว้นาน 30 วินาที แล้วล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด จากนั้นหยด gram iodine 30 วินาที แล้วล้างน้ำ จากนั้นล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% โดยเช็ดแผ่นกระจกไปมาประมาณ 5-10 วินาที แล้วล้างน้ำ จากนั้นย้อมทับด้วยสี safranin-o ทิ้งไว้ 15 วินาที เทสีทิ้งแล้วล้างน้ำและซับให้แห้งก่อนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x แบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *H. pylori*

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase

ผู้วิจัยใช้ลูปแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบมาป้ายลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้น แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ catalase

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase

การทดสอบเริ่มด้วยการหยด 1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ลงบนกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ แล้วใช้ลูปแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบมาขีดลงบนกระดาษกรองนั้น

ถ้ามีสีม่วงหรือสีน้ำเงินเข้มเกิดขึ้นตามรอยขีด แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ oxidase

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ urease

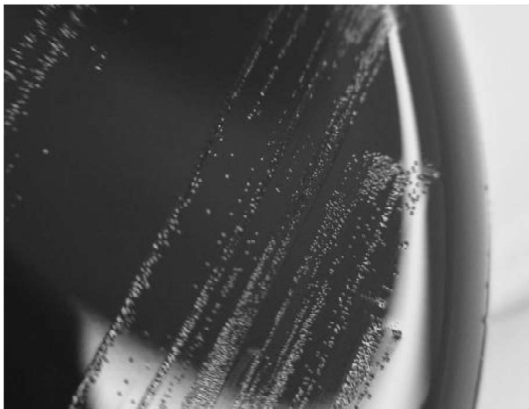
ผู้วิจัยใช้ลูปแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบไปเลี้ยงบน slant ของ urea agar ในหลอดแก้ว ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีชมพู แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ urease

ผลการศึกษา

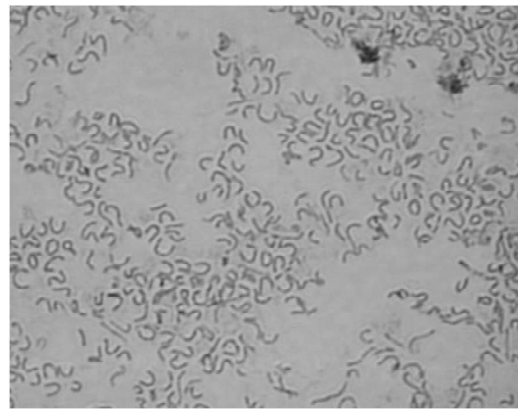
จากการศึกษาที่ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างชิ้นเนื้อบริเวณกระเพาะอาหารหรือบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่ศูนย์ส่องกล้องระบบทางเดินอาหาร จำนวน 205 ราย มาทดสอบ โดยการตรวจหาเอนไซม์ urease ที่ผลิตขึ้นโดย *H. pylori* ในชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจ ซึ่งทดสอบได้ด้วยชุดทดสอบ CLO test จากผลการทดสอบ พบเชื้อ *H. pylori* ในสิ่งส่งตรวจชิ้นเนื้อ จำนวน 83 ราย โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงอายุ 41-60 ปี และพบว่าร้อยละ 62 เป็นเพศหญิง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนและร้อยละของผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษา แบ่งตามเพศและอายุ

ผู้ป่วย	จำนวน (ราย)	ร้อยละ
เพศ		
ชาย	77	38
หญิง	126	62
อายุ (ปี)		
<40	25	12
41-60	109	54
>60	70	34



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *H. pylori* บนอาหารเลี้ยงเชื้อโคโลนีมีขนาดเล็ก โปร่งแสง



รูปที่ 2 ลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ gram-negative curved rods

จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อที่แสดงผลการทดสอบ CLO test พบว่ามีเชื้อ *H. pylori* อยู่ในชิ้นเนื้อจำนวน 83 ราย นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษ พบว่าเห็นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจนเป็นโคโลนีได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลท (รูปที่ 1)

เมื่อย้อมสีแกรมและดูลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทั้ง 70 ไอโซเลทที่แยกได้จากเพาะเลี้ยงเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีรูปร่างเกลียวหรือคล้ายตัวเอส (รูปที่ 2) และเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ oxidase, catalase และ urease เพื่อบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *H. pylori* จากผลการทดสอบพบว่าทั้ง 70 ไอโซเลทที่แยกได้ให้ผลบวกต่อการทดสอบทางชีวเคมีดังกล่าว

วิจารณ์และสรุป

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้นำชิ้นเนื้อที่ตัดมาจากระบอบกระเพาะอาหารหรือบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นของ

ผู้ป่วยที่เข้ามารับการรักษาที่ศูนย์ส่องกล้องระบบทางเดินอาหาร สถาบันมะเร็งแห่งชาติ เมื่อนำชิ้นเนื้อไปทดสอบด้วยชุดทดสอบ CLO test เพื่อตรวจหาเอนไซม์ urease ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *H. pylori* ในชิ้นเนื้อที่ส่งตรวจจำนวน 205 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อ *H. pylori* ในสิ่งส่งตรวจชิ้นเนื้อจำนวน 83 ตัวอย่าง ซึ่งการทดสอบการผลิตเอนไซม์ urease นี้เป็นการใช้คุณสมบัติของเอนไซม์ urease ที่เชื้อ *H. pylori* ผลิตขึ้นโดยเอนไซม์ urease จะย่อยสลายยูเรียได้เป็นแอมโมเนีย ตรวจพบได้โดยการทำปฏิกิริยาการสลายยูเรียและเปลี่ยนสีของ phenol red ซึ่งเป็น indicator จากสีเหลืองเป็นสีแดง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าชิ้นเนื้อนั้นมีเชื้อ *H. pylori*⁸ โดยเมื่อผู้ป่วยต้องทำการส่องกล้องอยู่แล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด สามารถแสดงผลได้รวดเร็วภายใน 1-2 ชั่วโมง และยังเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วกว่าวิธีการตรวจหาเชื้อด้วยการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อ (histology) และวิธีการเพาะเลี้ยง (culture)⁹ วิธีการทดสอบการผลิตเอนไซม์ urease นี้มีความจำเพาะสูงร้อยละ 95-100 แต่มีความไวเพียงร้อยละ 85-95 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวน

เชื้อบนชิ้นเนื้อนั้น โดยทั่วไปจะให้ผลบวกเมื่อมีจำนวนเชื้อ 104 cells ขึ้นไป¹⁰⁻¹²

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ในห้องปฏิบัติการจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารที่ถูกตัดมาจากผู้ป่วย ในการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารพิเศษ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลทจากสิ่งส่งตรวจชิ้นเนื้อจำนวน 83 ตัวอย่าง เชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อที่ตายได้ง่าย จึงจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปไม่เกิน 2 ชั่วโมง เชื้อต้องการออกซิเจนน้อยในการเจริญเติบโต สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ต้องเป็นสภาวะที่มีอากาศน้อย (80-90% N₂, 5-10% CO₂ และ 5-10% O₂) หากเป็นสภาวะที่มีอากาศเชื้อจะไม่เจริญและตาย¹³ เชื้อ *Helicobacter* จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *H. pylori* มีการเคลื่อนที่คล้ายเกลียวสว่าน แต่ถ้าหากเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน พบว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น coccoid forms คือ จะเห็นรูปร่างเป็นตัว U ที่เกิดจากการจับกันของปลายทั้งสองข้างของเชื้อ *H. pylori*¹⁴

ผลที่ได้จากการเพาะเชื้อและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะช่วยในการจำแนกเชื้อเบื้องต้นได้ แต่ต้องทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันความถูกต้อง ซึ่งวิธีทางชีวเคมีนี้ช่วยจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ถึงระดับจีนัสหรือสปีชีส์ เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายอาหารและสร้างชีวโมเลกุลที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายอาหารและชีวโมเลกุลที่แบคทีเรียสร้างขึ้นจึงไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงให้ผลการทดสอบกับปฏิกิริยาชีวเคมีที่ใช้ทดสอบแตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่ใช้ในการ

จำแนกและพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรียที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *H. pylori* พบว่าการสลายน้ำตาล (sugar catabolism) ไม่สามารถทำได้ทั้งการ oxidation และ fermentation แต่พบการ oxidation ได้บ้างในเชื้อ *H. pylori* บางสายพันธุ์¹⁵ ซึ่งจากการทดสอบการจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาทางชีวเคมี เพื่อบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *H. pylori* พบว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase เอนไซม์ catalase และเอนไซม์ urease¹⁶ การทดสอบการผลิตเอนไซม์ oxidase เป็นการทดสอบการมีเอนไซม์ cytochrome oxidase โดยปกติจะใช้รีเอเจนต์ที่ไม่มีสี แต่จะมีสีเมื่อถูกออกซิไดซ์ เมื่อถูกออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้จะมีสีม่วงหรือน้ำเงินเข้ม ดังนั้นแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ oxidase จะสามารถออกซิไดซ์รีเอเจนต์เหล่านี้ให้เห็นเป็นสีน้ำเงินเข้ม ส่วนการทดสอบการผลิตเอนไซม์ catalase เป็นการทดสอบเพื่อจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase ซึ่งปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน อะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ catalase เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกเป็นก๊าซออกซิเจนและน้ำ ดังนั้นการทดสอบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ชนิดนี้หรือไม่ ทำได้โดยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนโคโลนี ถ้าเกิดฟองอากาศแสดงว่าให้ผลบวก ส่วนการทดสอบการผลิตเอนไซม์ urease เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ urease เพื่อย่อยสลายยูเรียให้เป็นแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยอาหารที่ใช้ทดสอบจะมียูเรียเป็นส่วนประกอบและ

มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ ถ้าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ได้ จะสลายยูเรียทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพู การตรวจเพาะเชื้อจากชิ้นเนื้อของกระเพาะอาหาร (culture) เป็นวิธีมาตรฐานและมีความจำเพาะสูงสุด (specificity 100%) ที่ป้องกันการติดเชื้อ *H. pylori* แต่วิธีการนี้จัดเป็นวิธีที่มีความไวต่ำในการตรวจหาเชื้อโดยมีความไว (sensitivity) เพียงร้อยละ 24-85 ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงยาก อาศัยเวลานาน ต้องใช้ห้องปฏิบัติการ และผู้เชี่ยวชาญพิเศษ¹⁷ โดยเชื้อจะเจริญอยู่ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำเท่านั้น อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นวิธีการเดียวที่ทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ที่สามารถนำไปทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้^{18,19} นอกจากนี้ยังสามารถนำเชื้อ *H. pylori* ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการนำมาต่อยอดงานวิจัย เช่น ใช้ศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาสารประกอบในสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ในการรักษาภาวะการติดเชื้อ *H. pylori*

เอกสารอ้างอิง

- Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983;1:1273-5.
- Owen RJ. Helicobacter-species classification and identification. *Br Med Bull* 1998;54:17-30.
- Costa AC, Figueiredo C, Touati E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2009;14:15-20.
- Johannes GK, Arnoud HMV, Ernst JK. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:449-90.
- Ford AC, Forman D, Hunt RH, Yuan Y, Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2014;348:g3174.
- Fuccio L, Zagari RM, Eusebi LH, Laterza L, Cennamo V, Ceroni L, et al. Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? *Ann Intern Med* 2009;151:121-8.
- WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Available at: <http://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed March 31, 2018.
- Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1986;153:658-63.
- Di Bonaventura G, Neri M, Angelucci D, Rosini S, Piccolomini M, Piccolomini R. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR on gastric biopsy specimens taken for CP test: comparison with histopathological analysis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:77-82.
- Bermejo F, Boixeda D, Gisbert JP, Defarges V, Sanz JM, Redondo C, et al. Rapid urease test utility for *Helicobacter pylori* infection diagnosis in gastric ulcer disease. *Hepatogastroenterol* 2002;49:572-5.
- Monteiro L, de Mascarel A, Sarraqueta AM, Bergey B, Barberis C, Talby P, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *Am J Gastroenterol* 2001;96:353-8.
- Tseng CA, Wang WM, Wu DC. Comparison of the clinical feasibility of three rapid urease tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2005;50:449-52.
- Zheng PY, Jones NL. *Helicobacter pylori* strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *J Cell Microbiol* 2003;5:25-40.
- Nilius M, Strohle A, Bode G, Malfertheiner P. Cocoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *Zentralbl Bakteriol* 1993;280:259-72.

15. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-47.
16. Wang YK, Kuo FC, Liu CJ, Wu MC, Shin HY, Wang SS, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World J Gastroenterol* 2015;21:11221-35.
17. Ricci C, Holton J, Vaira D. 2 Diagnosis of *Helicobacter pylori*: invasive and non-invasive tests. *Best Pract. Res Clin Gastroenterol* 2007;21:299-313.
18. Dore MP, Leandro G, Realdi G, Sepulveda AR, Graham DY. Effect of pre-treatment antibiotic resistance to metronidazole and clarithromycin on outcome of *Helicobacter pylori* therapy: a meta analytical approach. *Dig Dis Sci* 2000;45:68-76.
19. Romano M, Marmo R, Cuomo A, De Simone T, Mucherino C, Iovene MR, et al. Pretreatment antimicrobial susceptibility testing is cost saving in the eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003;1:273.