

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิธี Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR)

นางสาวกริพิthy บุตรลพ



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของกรังการศึกษาคณะที่หลักสูตรปริญญาโทศึกษาศาสตร์มหาบัณฑิต

The abstract and full text of theses from the academic year 2014 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF *RDXA* AND *FRXA* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH  
METRONIDAZOLE RESISTANCE IN *HELICOBACTER PYLORI* BY MULTIPLEX ALLELE-  
SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION (MAS-PCR)

Miss Therapit Butlop



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 2015  
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> โดยวิธี Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR)
โดย	นางสาวอิทธิพิทย์ บุตรลพ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประวิตร เจนวรรณระกูล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

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

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิทักษ์ สันตนิรันดร์)

ถิรพิทย์ บุตรลพ : การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *Helicobacter pylori* โดยวิธี Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) (DETECTION OF *RDXA* AND *FRXA* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH METRONIDAZOLE RESISTANCE IN *HELICOBACTER PYLORI* BY MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION (MAS-PCR)) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์, 133 หน้า.

การดื้อยา metronidazole (Mtz) ในเชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นปัญหาใหญ่ที่พบได้ทั่วโลก RdxA และ FrxA เป็นเอนไซม์ที่ช่วยให้ยา Mtz อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์มีผลต่อการดื้อยา Mtz การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ที่พบบนยีน *rdxA* และ *frxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา Mtz และพัฒนาเทคนิค Multiplex allele specific-polymerase chain reaction (MAS-PCR) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่พบได้สูงสุดในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา Mtz จากการวิเคราะห์การกลายพันธุ์บนยีน *rdxA* และ *frxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา Mtz จำนวน 34 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน ATCC 26695 พบการกลายพันธุ์แบบ missense สูงถึง 97.1 และ 78.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบการกลายพันธุ์แบบ frameshift 20.6 และ 32.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบการกลายพันธุ์แบบ nonsense 8.8 และ 10.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงสุดใน RdxA เป็นแบบ missense ได้แก่ D 59 N 94.1 เปอร์เซ็นต์, T 31 E 88.2 เปอร์เซ็นต์ และ R 131 K 85.3 เปอร์เซ็นต์ ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงสุดใน FrxA เป็นแบบ missense ได้แก่ F 72 S และ G 73 S 57.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา C 193 S 53.6 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิค MAS-PCR ที่มีไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบสที่ 175 และ 392 ของยีน *rdxA* ได้สำเร็จ เมื่อนำมาตรวจหาการกลายพันธุ์ในเชื้อ *H. pylori* 35 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลตรงกับเทคนิค Sequencing ยกเว้น 2 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ เทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับใช้ศึกษาทางระบาดวิทยาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์ของยีนที่สัมพันธ์กับการดื้อยา Mtz

ภาควิชา เวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุล ปลายมือเขียนนิติต .....  
 ชีววิทยาคคลินิก ปลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุล

ชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยา

ภูมิคุ้มกัน

ปีการศึกษา 2558

# # 5576671537 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORDS:

THERAPIT BUTLOP: DETECTION OF *RDXA* AND *FRXA* GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH METRONIDAZOLE RESISTANCE IN *HELICOBACTER PYLORI* BY MULTIPLEX ALLELE-SPECIFIC POLYMERASE CHAIN REACTION (MAS-PCR).  
 ADVISOR: ASST. PROF. NUNTAREE CHAICHANAWONGSAROJ, Ph.D., 133 pp.

Resistance to metronidazole (Mtz) in *Helicobacter pylori* has been a major problem worldwide. Alteration in Mtz nitroreductase enzymes are the major contributing factors, mainly including RdxA and FrxA. Objectives of this research were to study type of RdxA and FrxA mutations and develop Multiplex allele specific-polymerase chain reaction (MAS-PCR) for detection of the most common genotypes in Mtz-resistant *H. pylori*. The *rdxA* and *frxA* genes of *H. pylori* were amplified and sequenced from 34 Mtz-resistant *H. pylori* isolates. Sequence alignments were compared to *H. pylori* ATCC 26695 reference strains. A large number of point mutations were displayed in the RdxA and FrxA with highest percentage of missense mutations (97.1% and 78.6%, respectively). The rate of frameshift and nonsense mutations in RdxA were 20.6% and 8.8% and FrxA were 32.1% and 10.7%, respectively. The most common missense mutations in RdxA were D 59 N (94.1%), T 31 E (88.2%) and R 131 K (85.3%). While, the most common missense mutations in FrxA were F 72 S (57.1%), G 73 S (57.1%) and C 193 S (53.6%). The developed MAS primers specific to position 175 and 392 of *rdxA* gene, successfully amplified the common alleles. Overall the results of MAS-PCR assay were in good concordance with sequencing but only two is discordant couples. Thus the developed MAS-PCR could be a useful tool for epidemiological studies of *H. pylori* associated with Mtz-resistance.

Department: Transfusion Medicine and Student's Signature .....

Clinical Microbiology                      Advisor's Signature .....

Field of Study: Molecular Science of  
 Medical Microbiology and  
 Immunology

Academic Year: 2015

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี จากการให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจาก ผศ. ดร. นันทรี ชัยชนะวงศาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ซึ่งท่านได้กรุณาทุ่มเทสละเวลา เพื่อให้คำแนะนำ และข้อคิดในทุกๆ เรื่องมาโดยตลอด ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สอนและถ่ายทอดวิชาความรู้ต่างๆ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. พิทักษ์ สันตนิรันดร์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. นพ. รัฐกร วิไลชนม์ หน่วยโรคทางเดินอาหารและตับ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ และ แผนกทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห่มอบเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และ บุคลากรทุกท่านในภาควิชาวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่ให้คำปรึกษาช่วยเหลือต่างๆ ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ นางนันทนัช เมืองโคตร, นางธนภร จำปาไทย และ นางสาวศิริรัตน์ สีขุนทด ที่ให้คำปรึกษาช่วยเหลือต่างๆ ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ทุนเพชรชมพูเข้มแข็ง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
2. วัตถุประสงค์การวิจัย.....	4
3. ขอบเขตของงานวิจัย.....	5
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> .....	7
2. พยาธิภาพ และปัจจัยการก่อโรค.....	8
3. ระบาดวิทยา.....	10
4. วิธีการตรวจหาเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	11
4.1 Invasive tests.....	11
4.2 Non-invasive tests.....	12
5. การรักษา.....	14
6. ยา Metronidazole.....	16
7. การตรวจหาการดื้อยา (Susceptibility testing) ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	18
7.1 การตรวจหาการดื้อยาตามลักษณะที่เชื้อแสดงออกมา (Phenotypic).....	18

7.2 การตรวจหาการดื้อยา ตามรูปแบบของยีน (Genotypic).....	19
8. ยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> .....	19
9. Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR).....	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์.....	27
2. วิธีการทดลอง.....	28
2.1 เชื้อ <i>H. pylori</i> .....	28
2.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	29
2.3 การเพิ่มปริมาณยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain Reaction).....	31
2.4 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis).....	33
2.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> จากผลผลิตในปฏิกิริยา PCR.....	33
2.6 การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> และจัดทำ phylogenetic tree.....	34
2.7 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	34
2.8 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	38
2.9 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค MAS-PCR.....	46
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	47
1. การสกัดดีเอ็นเอ.....	47
2. การเพิ่มปริมาณยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ด้วยเทคนิค PCR.....	48



3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ด้วยเทคนิค Sequencing.....	51
3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole.....	51
3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests.....	60
4. การวิเคราะห์วิวัฒนาการของยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> จาก phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม BioEdit.....	65
5. การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	69
5.1 การออกแบบไพรเมอร์.....	70
5.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	71
6. การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	75
6.1 การออกแบบไพรเมอร์.....	75
6.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	77
7. การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 และ 392 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	89
บทที่ 5 อภิปรายผล.....	91
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	103
รายการอ้างอิง.....	105
ภาคผนวก.....	114
1. วิธีเตรียม Tris EDTA บัฟเฟอร์.....	114
2. วิธีเตรียม tryptic soy broth.....	114

3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน <i>rdxA</i> และ <i>fixA</i> .....	114
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	133



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รายละเอียดการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> และ <i>frxA</i> ในเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole.....	23
ตารางที่ 2 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>rdxA</i> .....	32
ตารางที่ 3 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน <i>frxA</i> .....	33
ตารางที่ 4 ตารางแสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	35
ตารางที่ 5 ตารางแสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 91, 92, 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	39
ตารางที่ 6 กรดอะมิโนของโปรตีน RdxA ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	53
ตารางที่ 7 กรดอะมิโนของโปรตีน RdxA ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 51932 จัดกลุ่มตามความเหมือนของกรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 31, 59 และ 131.....	55
ตารางที่ 8 กรดอะมิโนของโปรตีน FrxA ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	58
ตารางที่ 9 กรดอะมิโนของโปรตีน RdxA ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	61
ตารางที่ 10 กรดอะมิโนของโปรตีน FrxA ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	64
ตารางที่ 11 ตารางแสดงรายละเอียดของ AS-primers (AS97-R) ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบสที่ 291 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	71
ตารางที่ 12 ตารางแสดงรายละเอียดของ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	77

ตารางที่ 13 ตารางแสดงรายละเอียดของ AS-primers (AS31-R) ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบสที่ 91 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	84
ตารางที่ 14 การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 และ 392 บนยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ด้วยเทคนิค Sequencing เปรียบเทียบกับเทคนิค MAS-PCR .....	90
ตารางที่ 15 ลำดับเบสยีน <i>rdxA</i> ของ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 .....	115
ตารางที่ 16 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695....	117
ตารางที่ 17 ลำดับเบสยีน <i>frxA</i> ของ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	120
ตารางที่ 18 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับ เชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	122
ตารางที่ 19 ลำดับเบสของยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับ เชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 .....	125
ตารางที่ 20 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับ เชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 ....	127
ตารางที่ 21 ลำดับเบสยีน <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 .....	130
ตารางที่ 22 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน <i>frxA</i> ของ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับ เชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 ....	131

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 รูปแสดงลักษณะของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	8
รูปที่ 2 สูตรเคมีของยา metronidazole .....	16
รูปที่ 3 metronidazole ที่ถูก reduce ให้อยู่ในรูป active form.....	17
รูปที่ 4 แบบจำลองโปรตีนของยีน <i>rdxA</i> และ แบบจำลอง functional dimer ของโปรตีน RdxA .....	20
รูปที่ 5 แบบจำลองกลไกการทำงานของยา metronidazole .....	21
รูปที่ 6 หลักการของ MAS-PCR .....	26
รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งทิศทางของ AS-primer ที่ตำแหน่งเบส 291.....	36
รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งทิศทางของ AS-primer ที่ตำแหน่งเบส 91, 92, 175 และ 392.....	39
รูปที่ 9 ดีเอ็นเอจากเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่สกัดได้ .....	48
รูปที่ 10 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	50
รูปที่ 11 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	50
รูปที่ 12 phylogenetic tree ของยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อยา metronidazole และเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 .....	66
รูปที่ 13 phylogenetic tree ของยีน <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ดื้อยา metronidazole และเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695 .....	67
รูปที่ 14 phylogenetic tree ของยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests และเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	68
รูปที่ 15 phylogenetic tree ของยีน <i>frxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests และเชื้อ <i>H. pylori</i> ATCC 26695.....	69
รูปที่ 16 ตำแหน่ง และทิศทางการทำงานที่ AS-primers (AS97-R).....	71
รูปที่ 17 ผลผลิต PCR จาก AS-primers (AS97-R) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา ( <i>rdxA</i> -F).....	73

รูปที่ 18 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	74
รูปที่ 19 ตำแหน่ง และทิศทางการทำงานที่ AS-primers (AS31-F, AS59-F, AS131-F).....	76
รูปที่ 20 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	79
รูปที่ 21 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	81
รูปที่ 22 ผลผลิต PCR โดยใช้ AS-primers (AS31-F) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา ( <i>rdxA</i> -F).....	82
รูปที่ 23 ตำแหน่ง และทิศทางการทำงานที่ AS-primers (AS31-R).....	83
รูปที่ 24 ผลผลิต PCR โดยใช้ AS-primers (AS31-R) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา ( <i>rdxA</i> -F).....	85
รูปที่ 25 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน <i>rdxA</i> ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ <i>H. pylori</i> .....	87
รูปที่ 26 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน <i>rdxA</i> ของเชื้อ <i>H. pylori</i> เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 .....	88

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

*Helicobacter pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นเกลียว (spiral) ความยาว 2 ถึง 4 ไมโครเมตร เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophilic) เชื้อ *H. pylori* สามารถอยู่ในร่างกายมนุษย์ได้นานหลายสิบปี การติดเชื้อสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้นของมนุษย์ เช่น แผลในกระเพาะอาหาร (peptic ulcers, gastric ulcers), โรคกระเพาะอาหาร (gastritis) และอาจนำไปสู่โรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร (gastric cancer, gastric MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma) ได้ [1] อุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* พบว่ามีสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรทั่วโลก [2] ในประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อพบสูงถึง 40.2 ถึง 45.9 เปอร์เซ็นต์ ของประชากร [3, 4]

การรักษาขั้นพื้นฐานของการติดเชื้อ *H. pylori* (First line treatment) คือการรักษาที่เรียกว่า Triple therapy เป็นการรักษาโดยใช้ยา 3 ชนิดร่วมกันคือ ยาที่ใช้ลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร (Proton-pump inhibitor หรือ PPI) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ อีก 2 ชนิด ได้แก่ amoxicillin, clarithromycin, metronidazole

metronidazole (2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol หรือ  $C_6H_9N_3O_3$ ) เป็นยาชนิดหนึ่งที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *H. pylori* จัดอยู่ในกลุ่ม nitroimidazole antibiotic ยา metronidazole จะถูก reduce โดยเอนไซม์ของเชื้อตรงหมู่ไนโตรเจน (nitro group) ตำแหน่งที่ 5

ทำให้ได้สารซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีที่สามารถทำลายสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสายดีเอ็นเอ จึงทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ สร้างโปรตีนได้ และตายในที่สุด [5] ในปัจจุบันพบอัตราการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* ทั่วโลก 26.7เปอร์เซ็นต์ โดยจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ [6] ในประเทศไทยพบอัตราการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* สูงถึง 35 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ [7] การดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* จัดเป็นปัญหาใหญ่ที่มีส่วนทำให้การรักษาล้มเหลว และก่อให้เกิดความเสียหายทั้งด้านสาธารณสุข และด้านเศรษฐกิจ

การตรวจหาการดื้อยา (Susceptibility testing) metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* ตามลักษณะทางกายภาพ (Phenotypic) มีด้วยกันหลายวิธี เช่น Agar dilution method, Broth dilution method, E-test [8, 9] ข้อเสียของวิธีเหล่านี้คือ การเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ใช้เวลานาน และทำได้ยากเนื่องจากเชื้อตายง่าย ในปัจจุบันจึงมีงานวิจัยที่ศึกษาการพัฒนาการตรวจหาการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ลักษณะทางจีโนไทป์ (Genotypic) อย่างแพร่หลาย โดยมีการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยา ที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาใช้เช่น PCR และ DNA sequencing [10]

ยีน *rdxA* และ *frxA* เป็นยีนที่พบในเชื้อ *H. pylori* สามารถถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่มีชื่อ ว่า oxygen-insensitive NADPH nitroreductase และ NADPH flavin oxidoreductase ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 ชนิด จัดเป็นเอนไซม์ ที่สามารถ reduce หมู่ไนโตรเจน ของยา metronidazole เพื่อกระตุ้นให้ยาทำงานได้ [5, 11] เมื่อยีน *rdxA* และ *frxA* เกิดการกลายพันธุ์ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ผลิตขึ้น ไม่สามารถทำงานได้ และส่งผลต่อการทำงานของยา metronidazole ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ต่างๆ เช่น PCR, RFLP, DNA sequencing, Cloning และ Molecular



replacement [12, 13] เพื่อศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* กับการดื้อยา metronidazole ใน *H. pylori* อย่างแพร่หลาย แต่ผลการศึกษามีความแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ตัวอย่างเช่น การศึกษาลำดับเบสของยีน *rdxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole พบว่า มีการเกิดการกลายพันธุ์ แบบ insertion, deletion และ substitution ในหลายตำแหน่ง [12, 14] ในการศึกษาลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole และเชื้อที่ไวต่อยา metronidazole ในได้หวั่น พบการกลายพันธุ์ ของยีน *rdxA* และ *frxA* สูงถึง 86 เปอร์เซ็นต์ และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตัวอย่างการกลายพันธุ์ที่พบได้แก่ การกลายพันธุ์แบบ frameshift ในยีน *rdxA* ทำให้เกิด stop codon ตำแหน่งเบสที่ 158 และ การกลายพันธุ์แบบ frameshift ในยีน *frxA* ทำให้เกิด stop codon ที่ตำแหน่งเบส 39 [15] ปัจจุบันยังไม่สามารถสรุปลักษณะกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ได้อย่างชัดเจน

Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) เป็นเทคนิคทางอณูวิทยา ที่มีความจำเพาะ และความไวสูง พัฒนามาจากเทคนิค Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) และ Multiplex polymerase chain reaction (MPCR) เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของเบสเพียงเบสเดียวบนดีเอ็นเอต้นแบบ โดยสามารถตรวจวัดพร้อมกันได้หลายตำแหน่ง หลักการของ MAS-PCR คือ เอนไซม์ *Thermus aquaticus* DNA polymerase ไม่สามารถทำปฏิกิริยาในขั้นตอน extension ได้ถ้าหากด้าน 3' ของ oligonucleotide primer ไม่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นจึงต้องออกแบบไพรเมอร์ ให้มีความเหมาะสมกับตำแหน่งเบสที่ต้องการตรวจสอบ ในปัจจุบันมีการนำเทคนิค MAS-PCR มาประยุกต์ใช้ในงานด้านพันธุกรรมต่างๆอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่น การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อหาชนิดของเชื้อ *Mycobacterium*

*tuberculosis* (MTB) ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์ของเบสดังนี้ *katG315*, *rpoB531*, *gyrA94*, *rrs1401* และผลที่ได้จากเทคนิค MAS-PCR สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์ กับ เทคนิค Sequencing [16]

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ว่ามีความแตกต่างจากที่เคยมีการศึกษาหรือไม่ อย่างไร และมุ่งที่จะพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยา เพื่อมาใช้ตรวจวิเคราะห์หาการกลายพันธุ์ ที่พบสูงสุดของยีน *rdxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole เทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้น มีข้อดีคือ มีความจำเพาะและความไวสูง ใช้เวลาในการทดสอบน้อย และไม่ต้องเพาะเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้ การพัฒนาเทคนิคดังกล่าวเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการศึกษาระบาดวิทยาของการกลายพันธุ์บนยีน *rdxA* ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *H. pylori*

## 2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole

2.2 เพื่อศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ Campylobacter-like organism test (CLO test)

2.3 เพื่อพัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำหรับใช้ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงสุดในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole

### 3. ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการศึกษาเชื้อ *H. pylori* จำนวนทั้งสิ้น 34 สายพันธุ์ ที่ดื้อต่อยา metronidazole ที่เพาะแยกจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นพ. รัฐกร วิไลชนม์ หน่วยโรคทางเดินอาหารและตับ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ ทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ด้วยเทคนิค Sequencing จากนั้นพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 97 และพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 59 และ 131 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงที่สุดในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole โดยการหาอุณหภูมิ ความเข้มข้นไพรเมอร์ ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR จากนั้นนำเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบกับ เชื้อ *H. pylori* ทั้ง 35 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างเทคนิค MAS-PCR และ Sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐาน (goal standard) นอกจากนั้นนำเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO test ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากแผนกทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาก่อนหน้านี้ [17] จำนวนทั้งสิ้น 30 สายพันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ด้วยเทคนิค Sequencing และนำมาทดสอบด้วยเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้น

### 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

4.1 ทราบลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole

4.2 สามารถนำเทคนิค MAS-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* เพื่อศึกษาชะตากรรมของการกลายพันธุ์ของยีน ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *H. pylori*

4.3 สามารถประยุกต์ใช้เทคนิค MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *fixA* ที่มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่างสิ่งตรวจอื่นๆ เช่น ชีนเนื้อ อุจจาระ น้ำลาย



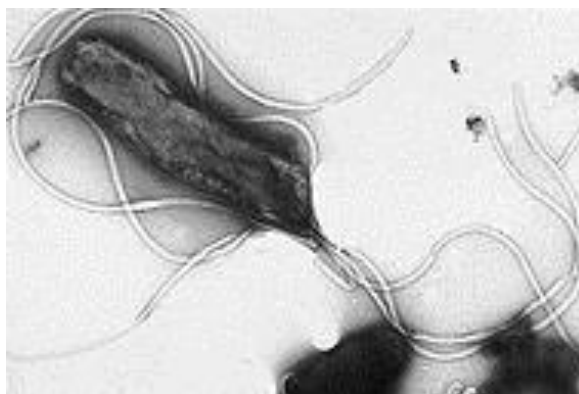
## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นเกลียว (spiral) ความยาว 2 ถึง 4 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 1.0 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 4 ถึง 6 อัน จากปลายด้านหนึ่ง (Lophotrichous flagella) จัดอยู่ในกลุ่ม microaerophilic เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต เยื่อหุ้มเซลล์ภายนอก (outer membrane) ของเชื้อ *H. pylori* ประกอบด้วย phospholipids และ lipopolysaccharide (LPS) เหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ นอกจากนั้นยังพบ cholesterol glucosides ซึ่งพบได้น้อยในเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอก ของแบคทีเรียแกรมลบทั่วไป [1] คุณสมบัติเพิ่มเติมของเชื้อ *H. pylori* คือสามารถเปลี่ยนรูปร่าง เป็น ทรงกลม (cocci form) [18] และสร้าง biofilms ได้ [19] เชื้อ *H. pylori* สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase, catalase และ urease เชื้อ *H. pylori* ถูกพบในปี 1982 โดย นักวิทยาศาสตร์ชาวออสเตรเลีย Barry Marshall และ Robin Warren เชื้อส่วนใหญ่พบที่บริเวณกระเพาะอาหาร และ ลำไส้เล็กส่วนต้นของมนุษย์ [20] เชื้อ *H. pylori* สามารถอาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด เช่น บริเวณกระเพาะอาหาร เนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้อย่างรวดเร็ว เพื่อไปย่อย urea ให้เป็น carbon dioxide และ ammonia สภาวะเบสที่เกิดขึ้นจะไป neutralize กรดบริเวณรอบๆตัวเชื้อ ทำให้บริเวณรอบๆตัวเชื้อมีค่าความเป็นกรดเบส (PH) ปกติเหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* [21] อีกทั้งเชื้อ *H. pylori* มี แฟลกเจลลาหลายอัน (multi-flagellate) ช่วยในการเคลื่อนที่

ผ่านชั้นเมือก และ เยื่อบุกระเพาะอาหาร เพื่อเคลื่อนที่ไปยังเซลล์ที่อยู่ด้านล่างของกระเพาะอาหาร ทำให้ป้องกันการสัมผัสโดยตรงกับกรดในกระเพาะอาหาร



รูปที่ 1 รูปแสดงลักษณะของเชื้อ *H. pylori*

ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กำลังขยาย 1 ไมครอน [22]

## 2. พยาธิภาพ และปัจจัยการก่อโรค

เชื้อ *H. pylori* สามารถอยู่ในร่างกายมนุษย์ได้นานหลายสิบปี การติดเชื้อสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างในกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กส่วนต้น ผู้ติดเชื้อมากถึง 85 เปอร์เซ็นต์ จะไม่แสดงอาการหรือภาวะแทรกซ้อนในตอนต้นของการติดเชื้อ [23] เช่น ปวดท้อง (acute gastritis with abdominal pain), คลื่นไส้ (nausea) [24] และเมื่อมีการติดเชื้อแบบเรื้อรังก็จะมีอาการต่างๆแสดงให้เห็นเช่น ปวดท้อง (stomach pains), คลื่นไส้ (nausea), ท้องบวม (bloating), เรอ (belching), บางครั้งอาเจียน (vomiting) และอุจจาระมีสีดำ (black stool) [25] ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcers) หรือแผลในลำไส้ส่วนต้น (peptic ulcers)

และ 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ มีความเสี่ยงที่จะพัฒนาไปเป็นมะเร็งกระเพาะอาหาร การติดเชื้อ *H. pylori* จัดเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหารสูงกว่าคนปกติ ประมาณ 6 เท่า [1]

การติดเชื้อ *H. pylori* ยังไม่ทราบแน่ชัด ในปัจจุบันคาดว่าเชื้อติดจากจากคนสู่คน โดยตัวเชื้อจะปนเปื้อนใน อาหาร น้ำดื่ม อุจจาระ น้ำลาย และ คราบแบคทีเรียที่ผิวฟัน [26] ระยะแรกของการติดเชื้อ *H. pylori* ส่วนใหญ่จะไม่มีอาการ บางรายอาจจะมีอาการเช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องบ่อยๆ เนื่องมาจาก *H. pylori* ใช้แฟลกเจลลา ไซไปในชั้นเมือก (mucus) ของกระเพาะอาหาร จนไปถึงชั้นเซลล์เยื่อบุของกระเพาะอาหาร (epithelial cell) ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้เชื้อยังสามารถสร้างสารหลายชนิดที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เช่น proteases, vacuolating cytotoxin A (VacA) (มีผลทำลาย epithelial cells และอาจก่อให้เกิด apoptosis), urease (ย่อย urea เป็น carbon dioxide และ ammonia ซึ่ง ammonia มีผลเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อบุของกระเพาะอาหาร), phospholipases, Cytotoxin Associated gene (CagA) (มีผลทำให้เกิดการอักเสบ และยังเป็นสารก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) [27] สารเหล่านี้ทำให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทำให้เม็ดเลือดขาว และสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบเกิดการรวมตัวในบริเวณเยื่อบุกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดการอักเสบ และเมื่อรวมเข้ากับกรดในกระเพาะอาหารที่หลั่งออกมา ทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcers) หรือแผลในลำไส้ส่วนต้น (peptic ulcers) ได้ [26] การติดเชื้อ *H. pylori* จะกระตุ้นให้ G cell ใน antrum ของกระเพาะอาหาร หลั่งฮอริโมน gastrin ซึ่งมีผลทำให้เกิดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารเพิ่มขึ้น กรดที่หลั่งออกมาในปริมาณมากขึ้นเป็นผลให้เกิดการอักเสบของกระเพาะอาหารเรื้อรัง (gastritis) หรือการอักเสบในลำไส้เล็กส่วนต้นเรื้อรัง (duodenitis) [27, 28] นอกจากนี้การติดเชื้อเป็นระยะเวลายาวนานอาจทำให้เซลล์บริเวณกระเพาะอาหารมีการกลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็งได้ ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกของเชื้อ *H. pylori* ที่ทำให้เกิดมะเร็งกระเพาะ

อาหาร (gastric cancer) และ มะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดก่อเกิดในกระเพาะอาหาร (gastric MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymphoma) อย่างแพร่หลาย แต่ก็ยังไม่มีข้อสรุปของเรื่องดังกล่าวอย่างชัดเจน

### 3. ระบาดวิทยา

อุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* พบว่ามีสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรทั่วโลก [2] และพบผู้ติดเชื้อได้ทุกประเทศทั่วโลก อุตติการณ์ของการติดเชื้อจะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พื้นที่ ภูมิสำเนา อายุ เชื้อชาติ สถานะทางสังคม และเศรษฐกิจ [29] เชื้อ *H. pylori* มีอยู่หลากหลายสายพันธุ์ แตกต่างกันไปตามแต่ละภูมิภาค การย้ายถิ่นมีผลต่อการกระจายสายพันธุ์ [30] อัตราการติดเชื้อ *H. pylori* เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา และอัตราการติดเชื้อลดต่ำลงในประเทศแถบตะวันตก [31] ในประเทศกำลังพัฒนาพบอุบัติการณ์การติดเชื้อรายใหม่เพิ่มขึ้น 3 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรในแต่ละปี ในขณะที่ประเทศที่พัฒนาแล้ว พบอุบัติการณ์การติดเชื้อรายใหม่เพิ่มขึ้นเพียงแค่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรในแต่ละปีเท่านั้น [32] อุตติการณ์การติดเชื้อในเด็กแรกเกิดพบได้น้อยมาก และพบว่ามีอัตราการติดเชื้อสูงขึ้นในผู้ที่อายุมากขึ้น [33] พบว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ที่ติดเชื้อมีอายุมากกว่า 60 ปี ไม่พบความแตกต่างของอุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* ใน เพศหญิง เพศชาย และความแตกต่างของแต่ละช่วงอายุในวัยผู้ใหญ่ [34] ในการศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* ในปีคริสต์ศักราช (ค.ศ.) 2013 ถึง 2014 พบอุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* มีอัตราที่สูงในหลายประเทศ ในยุโรปเหนือ และ อเมริกากลางเหนือ มีประชากร ประมาณหนึ่งในสามที่ติดเชื้อ *H. pylori* ในขณะที่ยุโรปตะวันออกเฉียงใต้, อเมริกาใต้ และเอเชีย ส่วนมากมีอุบัติการณ์การติดเชื้อ *H. pylori* สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของประชากร [34] ในเอเชียอุบัติการณ์ติดเชื้อ *H. pylori* จะมีความ



แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ในประเทศจีนมีอุบัติการณ์การติดเชื้อ 62 เปอร์เซ็นต์ ของประชากร [35] ในประเทศญี่ปุ่น 27.5 เปอร์เซ็นต์ ของประชากร [36] ในประเทศเวียดนาม 65.6 เปอร์เซ็นต์ ของประชากร [37] และ ในประเทศไทยพบผู้ติดเชื้อพบสูงถึง 40.2 ถึง 45.9 เปอร์เซ็นต์ ของประชากร [3, 4] อัตราการติดเชื้อมากที่สุดพบที่ภาคเหนือสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของผู้ติดเชื้อในประเทศไทย [38]

#### 4. วิธีการตรวจหาเชื้อ *H. pylori*

วิธีการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่

##### 4.1 Invasive tests

เป็นวิธีที่ต้องส่องกล้องระบบทางเดินอาหาร (endoscopy) เพื่อตัดชิ้นเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารแล้วจึงนำมาทดสอบหาเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธีจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ (histology), การเพาะเลี้ยง (culture), และการทดสอบการผลิตเอนไซม์ (rapid urease test) ของเชื้อ ดังนี้

4.1.1 Histology เป็นการตรวจหาตัวเชื้อโดยตรงด้วยการย้อมสี เช่น hematoxylin and eosin (H&E) staining, Giemsa stain, Warthin-Starry silver stain, Genta stain และ immunohistochemical (IHC) stain [39, 40]

Giemsa stain เป็นวิธีการย้อมสีเพื่อตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ที่นิยมมากในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ วิธี hematoxylin and eosin (H&E) staining รวมทั้ง สะดวก และค่าใช้จ่ายไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธีย้อมสี เช่น Warthin-Starry silver stain, Genta stain และ immunohistochemical (IHC) stain [41]

4.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) คือ เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion (BHI) agar ที่มีส่วนประกอบของ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของเลือดแกะ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ออกซิเจนเจือจาง (CO<sub>2</sub> 10 เปอร์เซ็นต์ และ O<sub>2</sub> 5 เปอร์เซ็นต์) แล้วนำไปทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อเพื่อบ่งชี้ว่าเป็น *H. pylori* โดยเชื้อจะให้ผลการทดสอบเป็นบวกต่อการทดสอบชีวเคมีที่สำคัญคือการผลิตเอนไซม์ oxidase, catalase, และ urease

4.1.3 Rapid urease test เป็นการทดสอบหาเชื้อ *H. pylori* โดยอาศัยคุณสมบัติของเชื้อ *H. pylori* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ urease เพื่อเปลี่ยน urea เป็น ammonia ทำให้ pH เพิ่มขึ้นส่งผลให้สีของ phenol red ซึ่งเป็น indicator เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง แสดงว่าชิ้นเนื้อที่ทดสอบมีเชื้อ *H. pylori* ในการทดสอบหาเชื้อ *H. pylori* ในกลุ่มทดลอง 1000 คน พบว่า Rapid urease test มีความไว และความจำเพาะ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาอ่านผลการทดสอบไม่กี่นาทีเท่านั้น [42]

## 4.2 Non-invasive tests

เป็นวิธีที่ไม่ต้องส่องกล้องระบบทางเดินอาหาร (endoscopy) เป็นการทดสอบหาเชื้อทางอ้อม ได้แก่ ตรวจทางซีรั่มวิทยา (serology), ตรวจยูเรียทางลมหายใจ (urea breath test), ตรวจแอนติเจนในอุจจาระ (stool antigen test), และเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular techniques) ต่างๆ

4.2.1 Serology ในปัจจุบันนิยมใช้ตรวจหา antibody ต่อเชื้อ *H. pylori* ชนิด IgG ในซีรั่ม และ IgA ในน้ำลายของผู้ป่วย เทคนิคที่นิยมคือ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ latex agglutination การทดสอบ antibody ต่อเชื้อ *H. pylori* ไม่สามารถแสดงถึงว่า

ณ ปัจจุบันมีการติดเชื้อ และไม่สามารถแสดงระยะเวลาที่ได้รับเชื้อ บอกได้เพียงว่ามี antibody ต่อเชื้อ *H. pylori* เท่านั้น

4.2.2 Urea breathe test เป็นการตรวจหาเชื้อทางลมหายใจ โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ urease ที่เชื้อ *H. pylori* ผลิตขึ้น โดยก่อนทำการทดสอบ 2 สัปดาห์ ควรงดยาที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *H. pylori*

4.2.3 Stool antigen test เป็นวิธีการตรวจหา antigen ของเชื้อ *H. pylori* ที่อาจปะปนมากับอุจจาระของผู้ป่วย เทคนิคที่นิยมได้แก่ enzymatic immunoassay (EIA) มักใช้ Stool antigen test ช่วยติดตามการรักษา [43]

4.2.4 Molecular techniques ในปัจจุบันนิยมใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถตรวจได้ทั้งตัวอย่างจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหาร, น้ำลาย, และ อุจจาระ โดยการตรวจหาชิ้นต่างๆของเชื้อ เช่น 16S rRNA, the random chromosome sequence, the 26-kDa species-specific antigen, the urease , the glmM

ในการทดสอบหาการติดเชื้อ *H. pylori* จากชิ้นเนื้อในการเพาะอาหาร (gastric biopsies) โดยเปรียบเทียบวิธีต่างๆ พบว่าการตรวจหาเชื้อ โดยใช้วิธี PCR ของยีน *ureC* มีความไวมากกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Culture) ส่วนวิธี the rapid-urease test และ histological examinations สามารถตรวจหาเชื้อ *H. pylori* ในคนไข้ไม่ก็ร้ายเท่านั้น [44]

ในการตรวจหาเชื้อ *H. pylori* จากตัวอย่างอุจจาระ โดยใช้วิธี PCR หา ยีน 23S rRNA พบว่ามีความไวสูง รวมทั้งสามารถหาการดื้อยา Clarithromycin โดยตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน 23S rRNA ในตัวอย่างที่มาจากอุจจาระได้เช่นเดียวกัน [45]

## 5. การรักษา

ในปัจจุบันการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* มีหลายวิธีด้วยกัน โดยนิยมใช้ยาหลายชนิดร่วมกันในการรักษา การเลือกใช้ยาขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง เช่น เชื้อมีการดื้อยา แพ้ยา การใช้ยานั้นเป็นเวลานานๆอาจเป็นพิษต่อร่างกาย

Triple therapy เป็นการรักษาขั้นพื้นฐาน ที่จัดเป็น First line treatment ของการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เป็นการรักษาโดยให้ยา 3 ชนิดพร้อมกันคือ Proton-pump inhibitor (PPI) เป็นยาที่ใช้ลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร ตัวอย่างเช่น lansoprazole, esomeprazole, omeprazole ร่วมกับยาปฏิชีวนะ อีก 2 ชนิดได้แก่ amoxicillin, clarithromycin หรือ metronidazole โดยผู้ป่วยจะได้รับยาต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน ถึง 2 อาทิตย์ ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้ออยู่ที่ประมาณ 70 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ [7, 46] หากพบ First line treatment ของ *H. pylori* มีอัตราการกำจัดเชื้อต่ำให้เปลี่ยนไปใช้วิธีอื่น ตัวอย่าง Triple therapy ได้แก่ รักษาโดยใช้ยา PPI ร่วมกับ amoxicillin 1 กรัม และ clarithromycin 500 มิลลิกรัม เป็นเวลา 14 วัน, รักษาโดยใช้ยา PPI ร่วมกับ metronidazole 400 มิลลิกรัม และ clarithromycin 250 มิลลิกรัม เป็นเวลา 14 วัน (PPI ได้แก่ esomeprazole 20 มิลลิกรัม, lansoprazole 30 มิลลิกรัม, omeprazole 20 มิลลิกรัม, pantoprazole 40 มิลลิกรัม หรือ rabeprazole 20 มิลลิกรัม ชนิดใดชนิดหนึ่ง)

Sequential therapy คือการเริ่มการรักษาด้วยยาตัวเดียว โดยเริ่มต้นจากการให้ amoxicillin ร่วมกับ PPI เป็นเวลา 5 วัน ซึ่ง amoxicillin จะป้องกันการ efflux ของยา clarithromycin ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และให้ clarithromycin ร่วมกับ PPI ต่ออีก 5 วัน [7, 46] แต่วิธี Sequential therapy ไม่สามารถใช้กับผู้ที่แพ้ยา penicillin ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้ออยู่ที่

ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ และจะเพิ่มขึ้นเป็น 98 เปอร์เซ็นต์ ถ้าผู้ป่วยไม่ดื้อยา clarithromycin จะลดลงเหลือ 65 เปอร์เซ็นต์ ถ้าผู้ป่วยดื้อยา clarithromycin [7] หากการรักษาไม่ได้ผล ให้เปลี่ยนไปใช้วิธีอื่น ตัวอย่าง Sequential therapy [47] ได้แก่ รักษาโดยใช้ยา lansoprazole 30 มิลลิกรัม ร่วมกับ amoxicillin 1.0 กรัม เป็นระยะเวลา 5 วัน ต่อจากนั้นรักษาโดยใช้ยา lansoprazole 30 มิลลิกรัม ร่วมกับ clarithromycin 500 มิลลิกรัม ร่วมกับ tinidazole 500 มิลลิกรัม เป็นระยะเวลา 5 วัน

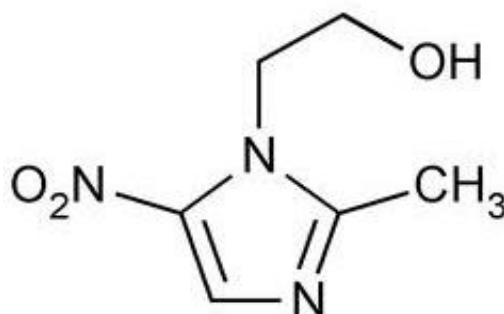
Bismuth Quadruple therapy คือการให้ยาในกลุ่ม bismuth (ยาเคลือบกระเพาะอาหาร) ร่วมกับยา PPI, และ ยาปฏิชีวนะ อีก 2 ชนิด Bismuth Quadruple therapy ไม่สามารถใช้รักษาเป็นระยะเวลานานได้ เนื่องจาก bismuth ที่ถูกดูดซึมอาจเกิดพิษ ต่อระบบประสาท ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้ออยู่ที่ประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ [7] หากการรักษาไม่ได้ผล ให้เปลี่ยนไปใช้วิธีอื่น ตัวอย่าง Bismuth Quadruple therapy [48] ได้แก่ รักษาโดยใช้ยา PPI ร่วมกับ bismuth ร่วมกับ tetracycline 500 มิลลิกรัม และ metronidazole 250 มิลลิกรัม เป็นระยะเวลา 14 วัน

Concomitant therapy เป็นการให้ยา พร้อมกัน 4 ชนิด ได้แก่ PPI, amoxicillin, clarithromycin, metronidazole ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้ออยู่ที่ประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ [7] หากการรักษาไม่ได้ผล ให้เปลี่ยนไปใช้วิธีอื่น ตัวอย่าง Concomitant therapy [48] ได้แก่ รักษาโดยใช้ยา PPI ร่วมกับ clarithromycin 500 มิลลิกรัม ร่วมกับ amoxicillin 1 กรัม และ metronidazole 500 มิลลิกรัม เป็นระยะเวลา 10 วัน

นอกจากนี้ยังมีแนวทางการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างมากมาย เช่น Levofloxacin-based triple therapy, Culture-guided therapy, Levofloxacin-based quadruple therapy ในปัจจุบันมีการปรับปรุงการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* อย่างแพร่หลาย เพื่อให้มีความเหมาะสม

และประสบความสำเร็จในการรักษา โดยพัฒนาให้เหมาะสมกับ การดื้อยาต่างๆที่เพิ่มขึ้น ลักษณะ ประชากร และปัจจัยต่างๆ โดยเริ่มจากการรักษาขั้นพื้นฐาน (Triple therapy) มาเป็นต้นแบบ และนำไปปรับใช้ให้เหมาะสม [48]

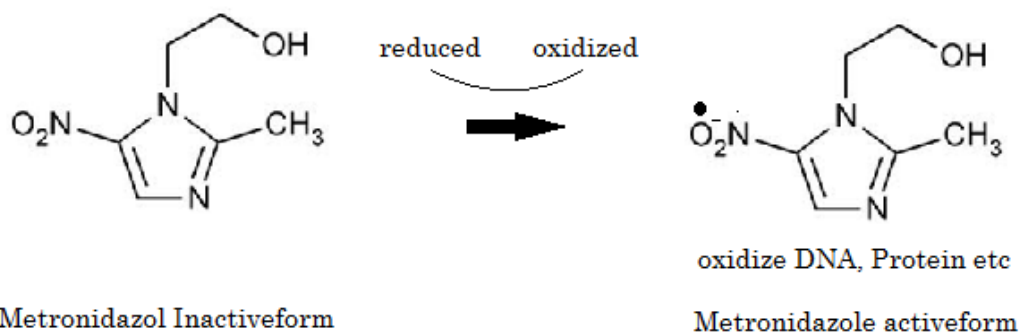
## 6. ยา Metronidazole



รูปที่ 2 สูตรเคมีของยา metronidazole [49]

Metronidazole (2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethanol หรือ  $C_6H_9N_3O_3$ ) เป็นยาชนิดหนึ่งที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *H. pylori* จัดเป็นยาในกลุ่ม nitroimidazole antibiotic ใช้รักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ anaerobic bacteria และ protozoa metronidazole เริ่มนำมาใช้ในปี 1960 ในประเทศฝรั่งเศส [50] ปัจจุบันของการองค์อนามัยโลกได้จัด metronidazole เป็นยาหลักที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งที่ใช้รักษาการติดเชื้อจุลชีพต่างๆ ยา metronidazole จะซึมเข้าผนังเซลล์ของเชื้อ และ ถูก reduce โดยโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อตรงตำแหน่ง nitro group ตำแหน่งที่ 5 ของยา ทำให้ได้สารซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาเคมีที่สามารถทำลายสายดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

โครงสร้างของสายดีเอ็นเอ ทำให้เกลียวของสายดีเอ็นเอ ไม่เสถียร ทำให้ดีเอ็นเอ ทั้งสายเดี่ยว และคู่ เกิดการแตกหัก จึงทำให้เชื้อไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และ สร้างโปรตีนได้ [51]



รูปที่ 3 metronidazole ที่ถูก reduce ให้อยู่ในรูป active form ซึ่งมีผลในการทำลายดีเอ็นเอ

ผลข้างเคียงของการใช้ยา metronidazole แตกต่างกันไป ที่พบบ่อย ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย น้ำหนักลด ปวดท้อง ปวดศีรษะ เวียนศีรษะ และ รู้สึกถึงรสชาติโลหะในปาก ผลข้างเคียงที่พบไม่บ่อย ได้แก่ ทำให้เกิดการแพ้ (มีอาการต่างไปตามบุคคล) ลึ้นบวม ลึ้มเปื่อย ปัสสาวะสีเข้ม และอาการชาตามร่างกาย และอื่นๆ [52]

ในปัจจุบันพบอัตราการติดอียา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* ทั่วโลกประมาณ 26.7 เปอร์เซ็นต์ [6] โดย จะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ในทวีปยุโรปพบอัตราการติดอียา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* 17 เปอร์เซ็นต์ ในทวีปอเมริกา 44.1 เปอร์เซ็นต์ ในทวีปแอฟริกา 92.4 เปอร์เซ็นต์ ในทวีปเอเชีย 37.1 เปอร์เซ็นต์ ในประเทศเกาหลี 49.6 เปอร์เซ็นต์ [53] ในอิตาลี 23.9 เปอร์เซ็นต์ (44) [54] และในประเทศไทยพบสูงถึง 35 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ [7] การติดอียา metronidazole ของ

เชื้อ *H. pylori* จึงจัดเป็นปัญหาใหญ่ที่มีส่วนทำให้การรักษาล้มเหลว และก่อให้เกิดความเสียหายทั้งด้านสาธารณสุข และด้านเศรษฐกิจ

## 7. การตรวจหาการดื้อยา (Susceptibility testing) ของเชื้อ *H. pylori*

วิธีการตรวจหาการดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีคือ

### 7.1 การตรวจหาการดื้อยาตามลักษณะที่เชื้อแสดงออกมา (Phenotypic)

โดยจะตรวจหาจากคุณสมบัติที่เชื้อแสดงออกมา ได้แก่

7.1.1 Agar dilution method เป็นวิธีที่ สถาบันห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ และการแพทย์ (Clinical and Laboratory Standards Institute หรือ CLSI) แนะนำ และจัดให้เป็นมาตรฐาน (gold standard) ในการตรวจหาการดื้อยาของ เชื้อ *H. pylori* โดยเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole จะมีค่าความเข้มข้นของยา metronidazole ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimum inhibitory concentration หรือ MIC) มากกว่า หรือเท่ากับ 8 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร

7.1.2 Broth dilution method เป็นวิธีประยุกต์มาจาก Agar dilution method เพื่อนำมาใช้กับเครื่อง automate แต่ในปัจจุบันยังได้รับความนิยมน้อยเนื่องจาก เชื้อจะเจริญเติบโตยากใน broth [8]

7.1.3 Breakpoint susceptibility testing เป็นวิธีแบบง่ายของเทคนิค Agar dilution โดยเลือกทำการทดสอบเฉพาะความเข้มข้นของยาที่สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น เชื้อที่ไวต่อยา (susceptible), เชื้อที่อยู่กึ่งกลางระหว่างเชื้อที่ดื้อเป็นไวต่อยา (intermediate) หรือเชื้อที่ดื้อยา



(resistant) จากการศึกษาเปรียบเทียบ ระหว่างวิธี breakpoint susceptibility กับ Agar dilution พบว่าผลที่ได้เหมือนกันถึง 94 เปอร์เซ็นต์ [9, 55]

7.1.4 Disk diffusion testing เป็นวิธีที่ง่าย และต้นทุนต่ำ แต่ไม่นิยมใช้เนื่องจาก เชื้อ *H. pylori* เจริญเติบโตช้า

7.1.5 E-test จัดเป็นวิธีที่ทันสมัย สามารถหาค่าความเข้มข้นของยา metronidazole ที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ แต่ไม่นิยมใช้เนื่องจากเชื้อ *H. pylori* เจริญเติบโตช้า มีการศึกษาเปรียบเทียบการตรวจหาการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* ระหว่าง E-test กับ Agar dilution method พบว่าผลการทดสอบที่ได้ให้ผลเหมือนกัน [56]

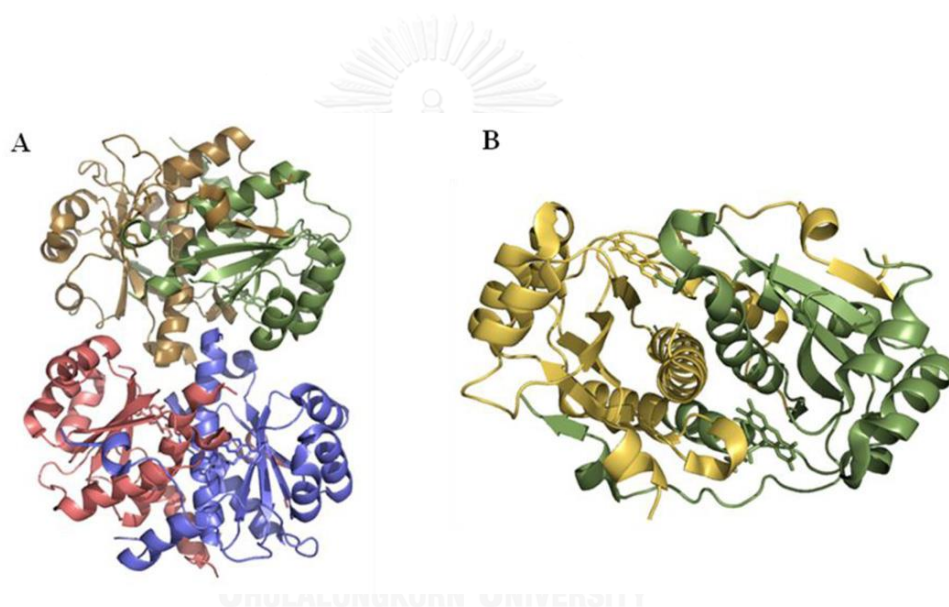
## 7.2 การตรวจหาการดื้อยา ตามรูปแบบของยีน (Genotypic)

เป็นการตรวจหาการดื้อยาตามรูปแบบของยีน เป็นการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีนที่ส่งผลต่อการดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* โดยจะใช้วิธีทางอณูชีววิทยา (molecular) ตัวอย่างเช่น การประยุกต์ใช้ PCR-RFLP มาตรวจหายีนดื้อยา clarithromycin ที่เกิดการกลายพันธุ์ ที่ยีน 23S rRNA ของเชื้อ *H. pylori* [17] การตรวจหาความสัมพันธ์ของการดื้อยา metronidazole กับการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* โดยใช้ PCR-RFLP และ Sequencing [10]

## 8. ยีน *rdxA* และ *frxA*

จีโนม (Genome) ของเชื้อ *H. pylori* จะมีความหลายหลากต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และแต่ละภูมิภาค [57] ตัวอย่างเช่น genome ของ strain "26695" ประกอบไปด้วย nucleotide 1.7 ล้าน base pairs (คู่เบส) มียีนทั้งหมด 1,550 ยีน [58]

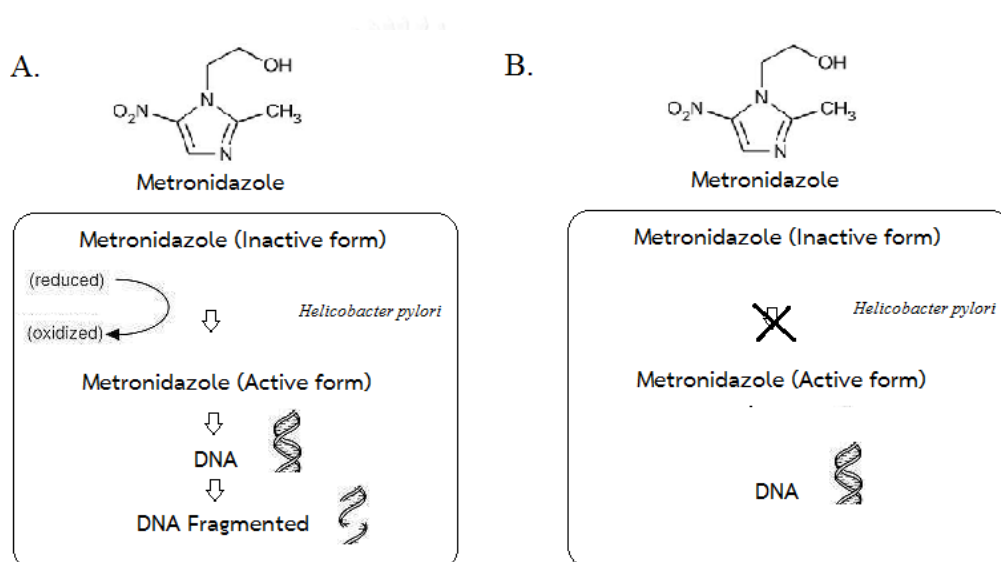
ยีน *rdxA* เป็นยีนหนึ่งที่พบใน *H. pylori* มีลักษณะเป็นเส้นตรง ความยาว 633 คู่เบส สามารถถอดรหัส ออกมาเป็นโปรตีนที่มีชื่อว่า oxygen-insensitive NADPH nitroreductase มีความยาว 210 amino acids (aa) oxygen-insensitive NADPH nitroreductase จัดเป็นเอนไซม์ ที่สามารถ reduce หมู่ nitro group เพื่อกระตุ้นยา metronidazole ให้สามารถทำงาน โครงสร้างของโปรตีนที่ถูกถอดรหัสมาจากยีน *rdxA* มีลักษณะเป็น homodimer exhibiting domain swapping โดยมีพันธะ FMN เชื่อมระหว่าง dimer ทั้งสองโมเลกุล [11]



รูปที่ 4 A แบบจำลองโปรตีนของยีน *rdxA* B แบบจำลอง functional dimer ของโปรตีน RdxA [11]

ยีน *frxA* เป็นยีนที่พบใน *H. pylori* มีลักษณะเป็นเส้นตรง ความยาว 654 คู่เบส สามารถถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่มีชื่อว่า NADPH flavin oxidoreductase มีความยาว 217 amino acids (aa) NADPH flavin oxidoreductase จัดเป็นเอนไซม์ ที่สามารถ reduce หมู่ nitro group เพื่อกระตุ้นยา metronidazole ให้ทำงาน [59]

ยีน *rdxA* และ *frxA* สามารถถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่สามารถ reduce ยา metronidazole ตรงหมู่ไนโตรเจน (nitro group) ตำแหน่งที่ 5 ทำให้ยา metronidazole อยู่ใน รูปแบบที่สามารถทำงานได้ กลไกการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *H. pylori* เกิดขึ้นเมื่อยีน *rdxA* และ *frxA* เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนรูปไป ส่งผลกับความสามารถ reduce ยา metronidazole และทำให้เชื้อดื้อต่อยา metronidazole ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 A แบบจำลองกลไกการทำงานของยา metronidazole

B แบบจำลองยา metronidazole ที่ไม่สามารถทำงานได้

เนื่องจากยีน *rdxA* และ *frxA* สามารถถอดรหัสออกมาเป็นเอนไซม์ที่สามารถกระตุ้นให้ยา metronidazole ทำงานได้ จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีทาง molecular ต่างๆ เช่น PCR, RFLP, DNA sequencing, Cloning และ Molecular replacement (59,60,61,62) เพื่อศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* กับการดื้อยา metronidazole ใน *H.*

*pylori* อย่างแพร่หลาย แต่ผลการศึกษามีความแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ปัจจุบันจึงยังไม่สามารถสรุปลักษณะกลายพันธุ์ที่สัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole ได้อย่างชัดเจน พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และยีน *rdxA* ร่วมกับ *frxA* ส่งผลให้มีการดื้อยา metronidazole ในปริมาณที่สูงขึ้น แต่มีความแตกต่างกันไปของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ [59] การศึกษาลำดับเบสของยีน *rdxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole พบว่า มีการเกิดการกลายพันธุ์ แบบ missence, frameshift และ nonsense ในหลายตำแหน่ง [12, 13] *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole เกิดการกลายพันธุ์แบบ substitution ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 148 ของยีน *rdxA* ทำให้เกิดเป็นรหัสที่หยุดสังเคราะห์โปรตีน (stop codon) ขึ้น insertion ที่กรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 141 ทำให้เกิดเป็นรหัสที่หยุดสังเคราะห์โปรตีน [60] และในการศึกษาลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole และเชื้อที่ไวต่อยา metronidazole ในได้หวั่นพบการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* สูงถึง 86 เปอร์เซ็นต์ และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นมีทั้งแบบ insertion , deletion และ substitution และพบในตำแหน่งที่ต่างกันไป เช่นในยีน *rdxA* พบการกลายพันธุ์แบบ frameshift ทำให้เกิดรหัสที่หยุดสังเคราะห์โปรตีน ตำแหน่งเบสที่ 158 และในยีน *frxA* พบการกลายพันธุ์แบบ frameshift ทำให้เกิดรหัสที่หยุดสังเคราะห์โปรตีน ที่ตำแหน่งเบส 39 [15] จากการวิเคราะห์ยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อที่ดื้อยา metronidazole กับการเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift พบว่าการเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift ในยีน *rdxA* น่าจะเกี่ยวข้องกับ การดื้อยา metronidazole เนื่องจากพบการกลายพันธุ์แบบ frameshift ของยีน *rdxA* สูงถึง 44 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างเชื้อ 132 ตัวอย่างที่ดื้อต่อยา metronidazole แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของการเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift ในยีน *frxA* [61] พบว่าการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนที่ 16 ของ RdxA เป็น Histidine มีผลต่อการดื้อยา metronidazole [62] พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* มีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole และการกลายพันธุ์ของยีน *frxA* มีส่วนช่วยให้มีการดื้อยา

ที่ปริมาณสูงขึ้น [63] แต่ในหลายงานวิจัยกลับพบว่าไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* กับการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* หรืออาจส่งผลน้อยมาก เนื่องจากการกลายพันธุ์ที่พบเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อ และไวต่อยา metronidazole ไม่มีความแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์เปรียบเทียบยีน *rdxA* และ *frxA* ระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole และไวต่อยา metronidazole ในสหราชอาณาจักร พบว่า มีอัตราการกลายพันธุ์ของยีน *frxA* แบบ frameshift สูง ทั้งในเชื้อที่ดื้อ และไวต่อยา metronidazole จึงสรุปได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีน *frxA* ไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา metronidazole เชื้อ *H. pylori* [64] งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายีน *rdxA* ในเชื้อที่ดื้อยา metronidazole และเชื้อที่ไวต่อยา metronidazole ของคนไข้ 11 ใน 15 คน ไม่พบความแตกต่างกัน จึงสรุปได้ว่า การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ในเชื้อ *H. pylori* ไม่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา metronidazole [65]

ตารางที่ 1 รายละเอียดการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole [15]

Strains	MIC <sup>a</sup> (µg/ml)	Change in amino acid	
		RdxA	FrxA
954	8	Arg (16)→His	No significant change
956	8	Arg (16)→His, Ser (29)→Thr	Asp (20)→Asn
1055	16	Met (21)→Ala, Gly (163)→Asp	Gln (10)→Arg, Asp (167)→Asn, Glu (169)→Lys
934	32	Ala (82)→Val	Val (89)→Ile, Thr (110)→Ala
1107	32	Ser (81)→Leu	Frameshift, a stop codon at position 39 <sup>b</sup>
932	64	Gly (163)→Asp	Frameshift, a stop codon at position 99 <sup>b</sup>
1062	64	Arg (16)→His	Failure to amplify
951	8	Frameshift, a stop codon at position 158	Thr (110)→Ala
970	32	Frameshift, a stop codon at position 158	Frameshift, a stop codon at 159
973	64	Frameshift, a stop codon at position 57	No significant change
1003	64	Gln (50)→Stop	Frameshift, a stop codon at position 39 <sup>b</sup>
1012	64	Arg (10)→Lys Frameshift, a stop codon at position 221	Frameshift, a stop codon at position 39 <sup>b</sup>
1030	64	Gln (50)→Stop	Frameshift, a stop codon at position 39 <sup>b</sup>
1039	64	Gln (65)→Stop	Frameshift, a stop codon at position 167
1054	64	Glu (32)→Stop	Failure to amplify
1120	128	Arg (10)→Lys, Gln (65)→Stop	Frameshift, a stop codon at position 211
1029	16	No significant change	Frameshift, a stop codon at position 34
1124	32	No significant change	Thr (110)→Ala

<sup>a</sup>Agar dilution method.

<sup>b</sup>These mutational patterns were found in Mtz-sensitive *H. pylori* showing in Tables 1 and 2.

## 9. Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR)

MAS-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของเบสเพียงเบสเดียวบนดีเอ็นเอต้นแบบ โดยพัฒนาให้สามารถตรวจวัดพร้อมกันได้หลายตำแหน่ง และสามารถนำผลผลิต PCR ที่ได้ ไปตรวจวัดโดยวิธี ethidium bromide-stained agarose หรือ polyacrylamide gel

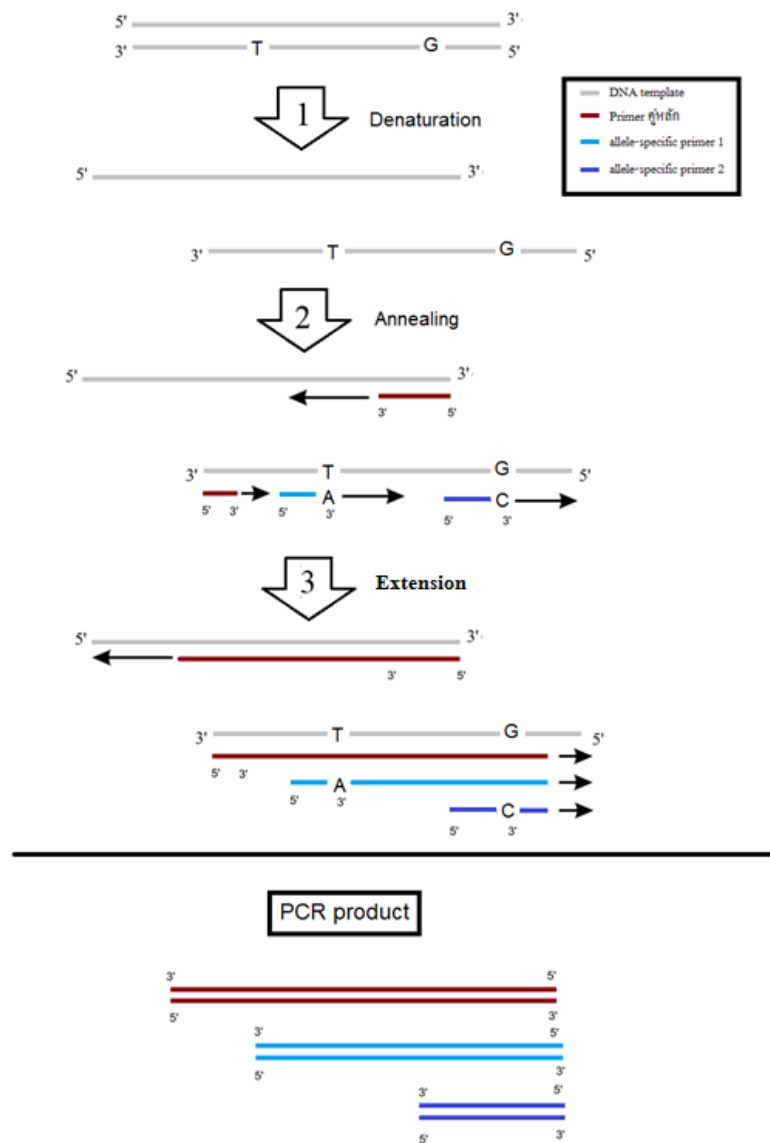
MAS-PCR พัฒนามาจากเทคนิค Allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) และ Multiplex polymerase chain reaction (MPCR) หลักการของ MAS-PCR คือ เอนไซม์ *Thermus aquaticus* DNA polymerase ไม่สามารถทำปฏิกิริยาในขั้นตอน extension ได้ถ้าหาก ด้าน 3' ของ oligonucleotide primer ไม่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ ให้มีความเหมาะสมกับตำแหน่งเบสที่ต้องการตรวจสอบ ดังรูปที่ 6

ในงานวิจัยปัจจุบันมีการนำเทคนิค MAS-PCR มาประยุกต์ใช้ในงานด้านพันธุศาสตร์ต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่นการพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อหาชนิดยีนดื้อยาของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์ของเบสดังนี้ *katG315*, *rpoB531*, *gyrA94* และ *rrs1401* ผลที่ได้สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์ กับเทคนิค DNA sequencing [16] , การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหา Multidrug-Resistant Tuberculosis ในปานามา เนื่องจากเชื้อ *M. tuberculosis* มียีนดื้อยาหลายตำแหน่งที่ต่างกันไป จึงมีการพัฒนา MAS-PCR มาตรวจหาชนิดยีนดื้อยา ในตำแหน่งต่างๆพร้อมกัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ [66] การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *GyrAD94G* และ *rrsA1401G* ซึ่งมีความสัมพันธ์ต่อการดื้อยาที่เป็น second-line ของ *M. tuberculosis* พบว่า เทคนิค MAS-PCR มีความไวในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของ ยีน *GyrAD94G* และ *rrsA1401G* สูงถึง 54.5 เปอร์เซ็นต์ และ 90.0 เปอร์เซ็นต์ ทั้งยังมีความจำเพาะสูงถึง 100

เปอร์เซ็นต์ [67] , การพัฒนา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์การดื้อยา rifampicin (RMP) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 516, 526 และ 531 ของยีน *rpoB* ในเชื้อ *M. tuberculosis* เมื่อเปรียบเทียบวิธี MAS-PCR กับ GenoType MTBDR assay พบว่ามีความไว 83.7 เปอร์เซ็นต์ และ 93.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบความจำเพาะของทั้งสองวิธีสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้วิธี GenoType MTBDR assay จะมีความไวที่มากกว่าวิธี MAS-PCR แต่เนื่องจากมีราคาของการทดสอบสูงกว่ามาก ทำให้วิธี MAS-PCR น่าจะเป็นตัวเลือกในการใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rpoB* ที่มีผลต่อการดื้อยา rifampicin ในประเทศกำลังพัฒนา [67]



### Multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR)



รูปที่ 6 แสดงหลักการของ MAS-PCR ขั้นตอนที่ 1 Denaturation: เพิ่มอุณหภูมิ เพื่อให้ DNA ต้นแบบแยกออกจากกัน ขั้นตอนที่ 2 Annealing: อุณหภูมิลดลง เพื่อให้ไพรเมอร์คู่หลัก และ ไพรเมอร์ที่เป็น allele-specific ที่ตำแหน่งต่างๆ เข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบโดยที่ไพรเมอร์ที่เป็น allele-specific ที่เข้าไปจับดีเอ็นเอ ต้นแบบได้ต้องมี ด้าน 3' จำเพาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนที่ 3 Extension: เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง



### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้งานวิจัย มีรายละเอียด ดังนี้

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. pylori* ประกอบด้วย brain heart infusion (BHI) agar ซื้อจากบริษัท Oxoid จำกัด สหราชอาณาจักร

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol ซื้อจากบริษัท Promaga จำกัด สหรัฐอเมริกา

สารเคมี น้ำยา วัสดุทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้ใน เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ เทคนิค Multiplex allele specific-polymerase chain reaction (MAS-PCR) ประกอบไปด้วย 1XPCR buffer, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และ deoxynucleotide (dNTPs) ซื้อจากบริษัท New England Biolabs จำกัด สหรัฐอเมริกา

Boric acid, Etylenediaminetetraacetic acid และ Agarose ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldirich จำกัด สหรัฐอเมริกา

Tris base ซื้อจากบริษัท Promaga จำกัด สหรัฐอเมริกา

ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ซื้อจากบริษัท fermentas life sciences จำกัด สหรัฐอเมริกา

ไพรเมอร์สั่งจากบริษัท BioDesign จำกัด ประเทศไทย

Ethidium bromide ซื้จากบริษัท Plus One™ จำกัด สหรัฐอเมริกา

## 2. วิธีการทดลอง

### 2.1 เชื้อ *H. pylori*

#### 2.1.1 เชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole

เชื้อ *H. pylori* จำนวน 34 สายพันธุ์ เพาะแยกจากชิ้นเนื้อกระเพาะอาหารของผู้ป่วย และผ่านการทดสอบหาความเข้มข้นยาที่น้อยที่สุดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *H. pylori* (Minimum inhibitory concentration หรือ MIC) ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) ปี 2007 ว่าเป็นเชื้อที่ดื้อต่อยา metronidazole โดยมีค่า MIC มากกว่า หรือ เท่ากับ 8 กรัมต่อมิลลิลิตร ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นพ. รัฐกร วิไลชนม์ หน่วยโรคทางเดินอาหาร และตบ คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ปทุมธานี ประเทศไทย เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion (BHI) agar ที่มีส่วนประกอบของ เลือดคน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ออกซิเจนเจือจาง ประกอบด้วย คาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และ ออกซิเจน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ Anaero Pack จากบริษัท Mitsubishi gas chemical ประเทศญี่ปุ่น บ่มใน anaerobic jar เป็นระยะเวลา 5 วัน เก็บรักษาใน 1 มิลลิลิตร ของ tryptic soy broth ที่มีส่วนประกอบของ กลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

#### 2.1.2 Campylobacter-like organism test (CLO test) หรือ Rapid urease test ที่

ให้ผลบวก 30 ตัวอย่าง

เชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO test ที่ให้ผลบวก จำนวน 30 ตัวอย่าง ได้รับความอนุเคราะห์จากแผนกทางเดินอาหาร โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นเชื้อ *H. pylori* จากการศึกษาก่อนหน้านี้ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2.1.3 เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 51932

เชื้อ *H. pylori* มาตรฐานสายพันธุ์ ATCC 51932 ใช้เป็นตัวควบคุมบวกในปฏิกิริยา PCR เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion (BHI) agar ที่มีส่วนประกอบของ เลือดคน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ออกซิเจนเจือจาง เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 เป็นระยะเวลา 5 วัน

## 2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole และเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932

ทำการสกัดแยกดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole จำนวน 34 สายพันธุ์ และเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 โดยใช้ชุดทดสอบ Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison,WI) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อที่เก็บรักษาใน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 12,000 g โดยใช้เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Micro high speed refrigerated centrifuge) จากบริษัท Vision จำกัด ประเทศเกาหลี เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส และนำเฉพาะส่วนตะกอนมาละลายในบัฟเฟอร์ Cell Lysis Solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายข้างต้นให้เข้ากัน โดยใช้ เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) จากบริษัท Genie 2 จำกัด สหรัฐอเมริกา และ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เย็นจนอุณหภูมิของสารละลายมีค่าเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติม RNase Solution ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน และบ่ม

ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม Protein Precipitation Solution ผสมสารละลายให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 g เป็นเวลา 3 นาที ปิดสารละลายที่เป็นส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด 1.5 ไมโครลิตร ที่มี Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่น ด้วยความเร็ว 13000 g เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใส เติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 13000 g เป็นเวลา 2 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติม Rehydration Solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวัดปริมาณ DNA (Nanodroptm 1000 spectrometer หรือ Nano Drop) ของบริษัท Thermo scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

### 2.2.2 สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO test

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* จาก CLO test ที่ให้ผลบวก จำนวน 30 ตัวอย่างโดยนำวุ้นจาก CLO test ที่ให้ผลบวกใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร บดด้วยที่บดให้ละเอียด เติมน้ำที่ปราศจากเชื้อ (deionized water) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายข้างต้นให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) จากบริษัท Genie 2 จำกัด สหรัฐอเมริกา จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และปั่นที่ความเร็ว 7000 g โดยใช้เครื่องปั่นตกตะกอนความเร็วสูง (Micro high speed refrigerated centrifuge) จากบริษัท Vision จำกัด ประเทศเกาหลี เป็นเวลา 5 นาที ปิดส่วนใสด้านบนปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม ethanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ และปั่นด้วยความเร็ว 7000 g เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้ง และปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็น

เวลา 30 นาที เติม Tris-EDTA buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วย เครื่องวัดปริมาณ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

### 2.3 การเพิ่มปริมาณยีน *rdxA* และ *frxA* ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain Reaction)

#### 2.3.1 การเพิ่มปริมาณของยีน *rdxA* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค PCR โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้ดังข้อ 2.2 มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer (ประกอบด้วย Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์, KCl 50 มิลลิโมลาร์ และ MgCl<sub>2</sub> 1.5 มิลลิโมลาร์), dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *rdxA*-F 0.5 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-R 0.5 ไมโครโมลาร์ (รายละเอียดไพรเมอร์แต่ละชนิดดังแสดงใน ตารางที่ 2) *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม โดยหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และหลอดควบคุมบวกใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก *H. pylori* ATCC 51932 ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo cycler ของบริษัท Biorad จำกัด สหรัฐอเมริกา ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 2 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน *rdxA*

Primer name	Primer sequences (5'-3')	position	Product sizes (bp)	Ref
rdxA-R	GCAGGAGCATCAGATAGTTCT	7092 – 7112	886	[10]
rdxA-F	GGGATTTTATTGTATGCTACAA	7978 – 7957		

### 2.3.2 การเพิ่มปริมาณของยีน *frxA* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค PCR โดยนำดีเอ็นเอ ของเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้ตั้งข้อ 2.2 มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *frxA*-F 0.5 ไมโครโมลาร์, *frxA*-R 0.5 ไมโครโมลาร์ (รายละเอียดไพรเมอร์แต่ละชนิดถูกแสดงใน ตารางที่ 3) *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม โดยหลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ และหลอดควบคุมบวกใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจาก *H. pylori* ATCC 51932 ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo cycler ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ ในการเพิ่มจำนวนยีน *frxA*

Primer name	Primer sequences (5'-3')	position	Product sizes (bp)	Ref
frxA-F	GGATATGGCAGCCGTTTATCATT	4233 – 4255	780	[10]
frxA-R	GAATAGGCATCATTTAAGAGATTA	5013 – 4990		

#### 2.4 การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis)

นำผลผลิต PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ได้จากข้อ 2.3 ผสมกับ loading dyes ความเข้มข้น 6 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำไปผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) Mupid-EXU Gel Electrophoresis จากบริษัท Mupid จำกัด ประเทศญี่ปุ่น สังกัดแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator G:BOX) จากบริษัท SynGene จำกัด สหรัฐอเมริกา เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

#### 2.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *rdxA* และ *frxA* จากผลผลิตในปฏิกิริยา PCR

นำผลผลิตในปฏิกิริยา PCR ในข้อ 2.3 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของผลผลิต PCR มีค่ามากกว่า หรือ เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ไพรเมอร์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ยีน *rdxA* มีลำดับเบสดังนี้ 5'GGGATTTTATTGTATGCTACAA3' และไพรเมอร์ยีน *frxA* มีลำดับเบสดังนี้ 5'GGATATGGCAGCCGTTTATCATT3' ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท Bioneer จำกัด ประเทศเกาหลีใต้ นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับ ยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 (ยีน *rdxA* = accession number HP0954 และ *frxA* = accession number HP0642) โดยโปรแกรม Basic local alignment search tool (BLAST : <http://blast.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>)

## 2.6 การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* และจัดทำ phylogenetic tree

นำลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ติดต่อยา metronidazole จำนวน 34 สายพันธุ์ และ ตัวอย่าง CLO tests จำนวน 30 ตัวอย่าง ที่ได้จากข้อ 2.5 มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 (ยีน *rdxA* = accession number HP0954 และ *frxA* = accession number HP0642) เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสตำแหน่งต่างๆ จัดทำ และจัดทำ phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)

## 2.7 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ *H. pylori*

### 2.7.1 การออกแบบไพรเมอร์

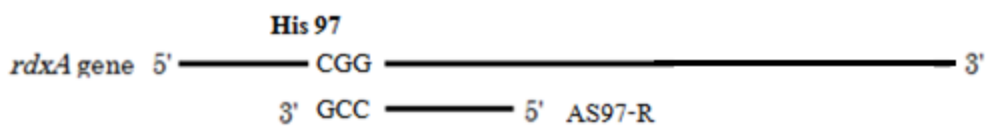
ออกแบบไพรเมอร์ที่เป็น Allele specific กับตำแหน่งเบสที่ 291 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 97) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบต้องมีด้าน 3' ของ oligonucleotide เป็นคู่สมกับเบสของยีน *rdxA* ที่



ตำแหน่งเบส 291 เมื่อทำงานร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยาตามข้อ 2.3.1 ได้ผลผลิต MAS-PCR ขนาดต่างกัน รายละเอียดของ Allele specific primer (AS-primer) ที่ออกแบบ และ ไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 4 ตำแหน่งทิศทางของ AS-primer ดังรูปที่ 7 ตรวจสอบความจำเพาะของ AS-primer ด้วยโปรแกรม BLAST

ตารางที่ 4 ตารางแสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ *H. pylori*

Primer name	Sequence(5'-3')	TM (degree Celsius)	Product length (bp)
rdxA-F	GGGATTTTATTGTATGCTACAA	58	886
rdxA-R	GCAGGAGCATCAGATAGTTCT	62	
Sequence (Allele specific primer)			
AS97-R	TTTTGCATGTAGTGGCCG	54	358



รูปที่ 7 แสดงตำแหน่งทิศทางของ AS-primer ที่ตำแหน่งเบส 291

2.7.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ใช้ทดสอบหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291

2.7.2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ใช้ทดสอบหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291

ทำปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิ ในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของ AS-primer ที่ออกแบบได้ในข้อ 2.7.1 หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 (เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, AS97-R 0.5 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-F 0.5 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกันในแต่ละหลอด ดังนี้ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น

1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจล ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบ ที่อ่านได้ เลือกอุณหภูมิจที่สามารถสังเกตเห็นขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่ คาดหวังไว้คือ 358 คู่เบส ได้ชัดเจนที่สุด และไม่พบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant

2.7.2.2 การความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ใช้ทดสอบหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291

ทำการทดสอบ MAS-PCR หาความเข้มข้นของ AS-primer ที่เหมาะสมโดย ทดสอบที่ความเข้มข้นของ AS-primer ต่างๆกันดังนี้ 0.125, 0.25 และ 0.5 ไมโครโมลาร์ หลอด ควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 (เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 291 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *rdxA*-F 1 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-R 0.5 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้ กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสง

อัตราไวโอลิต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ เลือกความเข้มข้นที่สามารถสังเกตเห็นขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่คาดหวังไว้ คือ 886 และ 358 คู่เบส ได้อย่างชัดเจนที่สุด และพบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886 คู่เบส เท่านั้น

## 2.8 การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori*

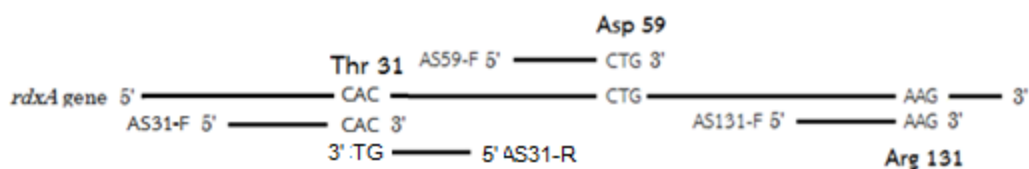
### 2.8.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่เป็น Allele specific ที่ตำแหน่งเบส 91 และ 92 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31), 175 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59) และ 392 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบต้องมีด้าน 3' ของ oligonucleotide เป็นคู่สมกับเบสของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 91, 92, 175 และ 392 ทำงานร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยาตามข้อ 2.3.1 ได้ผลผลิต MAS-PCR ขนาดต่างกัน รายละเอียดของ AS-primer ที่ออกแบบ และไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 5 ตำแหน่งทิศทางของ AS-primer ดังรูปที่ 8 ตรวจสอบความจำเพาะของ AS-primer ด้วยโปรแกรม BLAST

ตารางที่ 5 ตารางแสดงรายละเอียดของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลาย

พันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 91, 92, 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori*

Primer name	Sequence	TM (degree Celsius)	Product length (bp)
rdxA-R	5' GCAGGAGCATCAGATAGTTCT 3'	62	886
rdxA-F	5' GGGATTTTATTGTATGCTACAA 3'	58	
Sequence (Allele specific primer)			
AS31-F	5' CATTATGAGTTTTCTAGCAC 3'	54	765
AS31-R	5' AGCGATTTCTTCTAATTCTGT 3'	56	161
AS59-F	5' GCATTTTGTGATGGTTACTG 3'	56	681
AS131-F	5' TCAACCACAGCATGCAAAG 3'	56	463



รูปที่ 8 แสดงตำแหน่งทิศทางของ AS-primer ที่ตำแหน่งเบส 91, 92, 175 และ 392

2.8.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อทดสอบหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392

2.8.2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยให้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ของปฏิกิริยาต่างกันไปได้แก่ 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอ เชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์ ที่ทั้ง 3 ตำแหน่ง หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *rdxA*-F 0.2 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-R 0.4 ไมโครโมลาร์, AS31-F 0.2 ไมโครโมลาร์, AS59-F 0.2 ไมโครโมลาร์, AS131-F 0.2 ไมโครโมลาร์ (รายละเอียดไพรเมอร์แต่ละชนิดถูกแสดงใน ตารางที่ 5), *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo cycler ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 40 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing มีอุณหภูมิแตกต่างกันไปในแต่ละรูปแบบได้แก่ 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ เลือกอุณหภูมิที่สามารถสังเกตเห็นขนาดผลผลิต

PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886, 765, 681 และ 463 คู่เบส ได้อย่างชัดเจนที่สุด และพบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886 คู่เบส เท่านั้น

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยให้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ทั้ง 3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาต่างกันไป 4 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 ให้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ทั้ง 3 ขั้นตอนเป็น 55, 60, 51 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 2 เป็น 58, 62, 53 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 3 เป็น 60, 64, 55 องศาเซลเซียส และ รูปแบบที่ 4 เป็น 62, 66, 58 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 91-92, 175 และ 392 หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอที่มีการกลายพันธุ์ ที่ทั้ง 3 ตำแหน่ง หลอดควบคุมใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา MAS-PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *rdxA-F* 0.2 ไมโครโมลาร์, *rdxA-R* 0.4 ไมโครโมลาร์, AS31-F 0.2 ไมโครโมลาร์, AS59-F 0.2 ไมโครโมลาร์, AS131-F 0.2 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo cycler ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 10 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing ที่ 1 มีอุณหภูมิแตกต่างกันไปในแต่ละรูปแบบได้แก่ 55, 58, 60, 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing ที่ 2 (มีอุณหภูมิแตกต่างกันไปในแต่ละรูปแบบได้แก่ 60, 62, 64, 66 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing ที่ 3 (มีอุณหภูมิแตกต่างกันไปในแต่ละรูปแบบได้แก่ 51, 53, 55, 58 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ เลือกอุณหภูมิจที่สามารถสังเกตเห็นขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886, 765, 681 และ 463 คู่เบส ได้อย่างชัดเจนที่สุด และพบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886 คู่เบส เท่านั้น

ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของ AS-primer ที่ตำแหน่งเบสที่ 92 โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92 หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, AS31-F 0.5 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-R 0.5 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกันในแต่ละหลอด ดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45



นาที่ สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ เลือกอุณหภูมิที่สามารถสังเกตเห็นขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่คาดหวังไว้คือ 765 คู่เบส ได้ชัดเจนที่สุด และไม่พบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant

ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของ AS-primer ที่ตำแหน่งเบสที่ 91 โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิ ในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 91 หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 91 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, AS31-R 0.5 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-F หรือ 0.5 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที, อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกันในแต่ละหลอด ได้แก่ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ เลือกอุณหภูมิที่สามารถ

สังเกตเห็นขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 161 คู่เบส ได้อย่างชัดเจนที่สุด และไม่พบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant

2.8.2.2 การหาความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392

ทำการทดสอบ MAS-PCR หาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เป็น AS-primer ที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เป็น Allele specific ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของยีน *rdxA* (AS131-F) ให้เป็น 0.025 , 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ มาทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *rdxA*-F 0.2 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-R 0.4 ไมโครโมลาร์, AS59-F 0.2 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo cycler ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 10 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้

กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ เลือกความเข้มข้นที่สามารถสังเกตเห็นขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ wild type ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886, 681 และ 463 คู่เบส ได้อย่างชัดเจนที่สุด และพบขนาดผลผลิต PCR ของดีเอ็นเอ mutant ตามที่คาดหวังไว้ได้แก่ 886 คู่เบส เท่านั้น

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อทดสอบสถานะที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ตัวแทนเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่สกัดได้จากขั้นตอน 2.2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ที่มีและไม่มี การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ต่างกันไป ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1X thermobuffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, *rdxA*-F 0.2 ไมโครโมลาร์, *rdxA*-R 0.4 ไมโครโมลาร์, AS59-F 0.2 ไมโครโมลาร์, AS131-F 0.1 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1.25 ยูนิต และ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม ตั้งโปรแกรมเครื่อง Thermo cycler ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 10 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า

100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้ โดยผลผลิตที่อ่านได้ ต้องสามารถเห็นได้ชัดเจนไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมาย

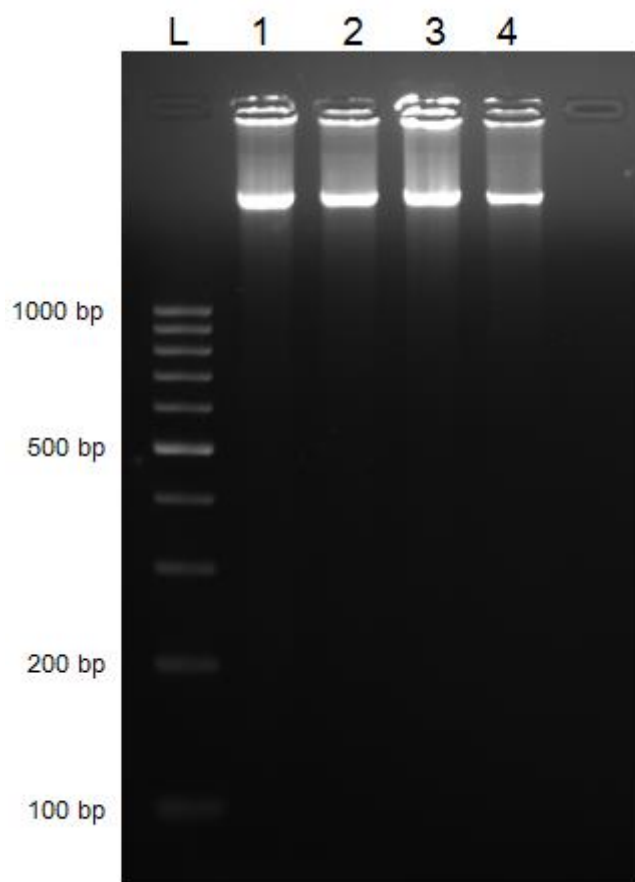
## 2.9 การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 กับเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ และเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จาก CLO tests ที่ให้ผลบวก จำนวน 30 สายพันธุ์ โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อที่สกัดได้จากขั้นตอน 2.2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา MAS-PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบ และสภาวะเหมือนข้อ 2.8 หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ตรวจสอบผลผลิต MAS-PCR ที่เกิดขึ้นด้วยการผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีส่วนผสมของ Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที สังเกตแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่องบันทึกภาพเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส และบันทึกภาพผลการทดสอบที่อ่านได้

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### 1. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจาก เชื้อ *H. pylori* ที่ติดต่อยา metronidazole จำนวน 34 สายพันธุ์, เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 และเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests ที่ให้ผลบวก 30 ตัวอย่าง พบว่าแถบดีเอ็นเอเมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดใหญ่ และพบสเมียร์เล็กน้อยในบางสายพันธุ์ ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพในเกณฑ์ดี ดังตัวอย่างในภาพที่ 9 ผลการวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ Nanodroptm 1000 spectrometer หรือ Nano Drop ของบริษัท Thermo scientific จำกัด สหรัฐอเมริกา ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วงระหว่าง 54 ถึง 957 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณเพียงพอที่นำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 9 ดีเอ็นเอจากเชื้อ *H. pylori* ที่สกัดได้ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบน  
 วุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1 เชื้อ *H. pylori*  
 ATCC 51932 แถว 2 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 แถว 3 เชื้อ *H. pylori* รหัส AY61 แถว 4 เชื้อ *H.*  
*pylori* รหัส BM33

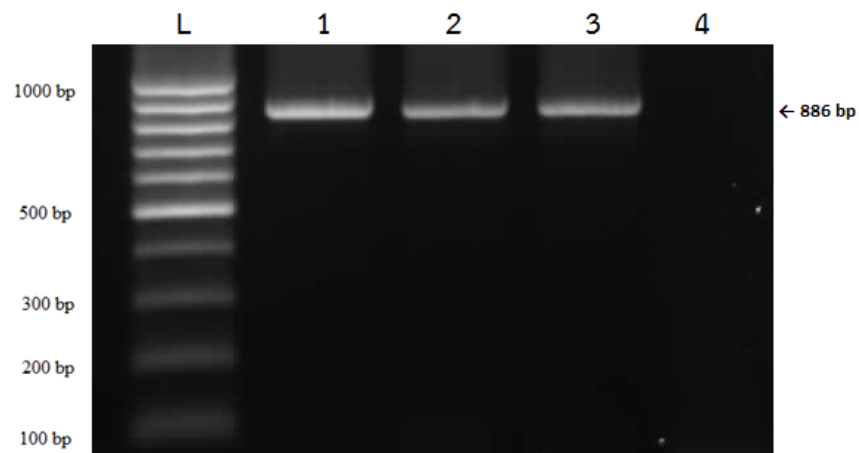
## 2. การเพิ่มปริมาณยีน *rdxA* และ *frxA* ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ได้ 34  
 และ 28 สายพันธุ์ ตามลำดับ สายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rdxA* และ *frxA* ได้แก่ รหัส PT12,  
 PT32, PT66, PT14, Y263, PT96, PT70, PT54, PT45, PT34, Y127, PT19, BM64, BM35, AY61,

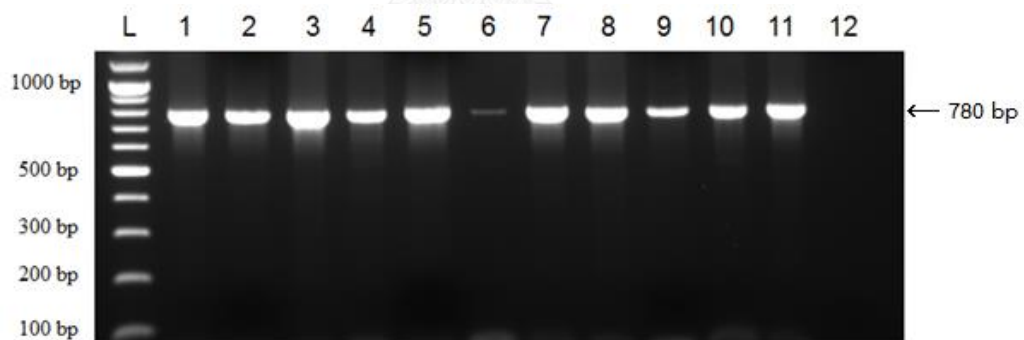
AY69, BG25, BM32, BM33, BM34, Y22, BM31, BM45, MS248, MS251, PT15, Y121, A49 สายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rdxA* ได้เพียงยีนเดียว ได้แก่ รหัส PT46, PT27, Y32, MS265, MS175, MS118

เพิ่มปริมาณของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests ที่ให้ผลบวกได้ 30 และ 14 สายพันธุ์ ตามลำดับ สายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rdxA* และ *frxA* ได้แก่ รหัส 10, 15B, 28B, 29B, 30B, 2BR, 3BR, 6BR, 301, 305, 308, 309, 314, 1CR สายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *rdxA* ได้เพียงยีนเดียว ได้แก่ รหัส 1BR, 4BR, 5BR, 302, 303, 304, 306, 307, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 2CR, 3CR

เพิ่มปริมาณของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยมียีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 51932 เป็นตัวควบคุมบวก และมีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อเป็นตัวควบคุมลบ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอของยีน *rdxA* และ *frxA* ขนาด 886 และ 780 คู่เบส ตามลำดับ ดังตัวอย่างแสดงในรูป 10 และ 11 วัดปริมาณผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ Nano Drop พบว่าปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในช่วงระหว่าง 47 ถึง 1247 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ผลผลิต PCR ที่ได้มีปริมาณเพียงพอที่นำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป



รูปที่ 10 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1 *H. pylori* ATCC 51932 แถวที่ 2 เชื้อ *H. pylori* รหัส MS248 แถวที่ 3 เชื้อ *H. pylori* รหัส MS251 แถว 4 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



รูปที่ 11 ผลผลิต PCR จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส, แถว 1 *H. pylori* ATCC 51932, แถวที่ 2 ถึง 11 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12, PT32, PT66, PT14, Y263, PT96, PT70, PT54, PT45, PT34 แถว 12 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



### 3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA* ด้วยเทคนิค Sequencing

ศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole จำนวน 34 สายพันธุ์ และเชื้อ *H. pylori* จาก CLO tests ที่ให้ผลบวก 30 ตัวอย่าง โดยวิเคราะห์ความเหมือนของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* จากลำดับเบสของผลผลิต PCR ที่ได้ทั้งหมดกับฐานข้อมูลในธนาคารยีนของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าทั้งหมดมีลำดับเบสคล้ายกับยีนของเชื้อ *H. pylori* ในฐานข้อมูลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

#### 3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole

##### 3.1.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rdxA*

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสกับ ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 (accession number HP0954) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่หลากหลายรูปแบบ ทั้งแบบ insertion , deletion และ substitution และพบได้ในหลายตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน RdxA แสดงดังตารางที่ 6 พบการกลายพันธุ์แบบ missense, frameshift และ nonsense สูงถึง 33 ตัวอย่าง (97.1 เปอร์เซ็นต์), 7 ตัวอย่าง (20.6 เปอร์เซ็นต์) และ 3 ตัวอย่าง (8.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ 3 ตำแหน่งที่พบมากที่สุดของกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ส่งผลกับการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนได้แก่ ตำแหน่งเบสที่ 175 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น A ส่งผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59 เปลี่ยนจาก Asp เป็น Asn พบสูงถึง 94.1 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาพบการเปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งที่ 91 และ 92

จาก AC เป็น GA ส่งผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31 เปลี่ยนจาก Thr เป็น Glu พบสูงถึง 88.2 เปอร์เซ็นต์ และ พบการเปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งที่ 392 จาก G เป็น A มีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131 เปลี่ยนจาก Arg เป็น Lys พบสูงถึง 85.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามี 1 สายพันธุ์ (2.9 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้นที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ และพบว่ามี 26 สายพันธุ์ (76.5 เปอร์เซ็นต์) ที่เกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่งพร้อมกัน ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31, 59 และ 131

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสกับ ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ซึ่งเป็นเชื้อที่ไวต่อยา metronidazole [68] พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ไวต่อยา metronidazole ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์หลากหลายรูปแบบ และพบได้ในหลายตำแหน่ง แสดงดังตารางที่ 7 และเชื้อทั้ง 34 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่ส่งผลให้กรดอะมิโนของโปรตีน RdxA มีลักษณะต่างกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 นอกจากนั้นยังพบว่ามีเชื้อ *H. pylori* 4 สายพันธุ์ ที่มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31, 59 และ 131 ตรงกันกับ เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932

ตารางที่ 6 กรดอะมิโนของโปรตีน RdxA ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole

เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

strain	Amino acid position																												
	1	2	4	6	7	9	10	16	21	27	31	37	41	50	52	53	56	59	62	64	68	71	72	74	79	80	88	90	91
26695	M	K	L	Q	E	R	R	R	M	E	T	A	R	Q	W	H	M	D	L	K	A	Y	F	E	S	A	S	R	P
51932	.	.	.	H	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	I	N	V	N	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PT66	I	.	.	.	.	.	.	C	.	.	E	.	.	.	R	.	N	V	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	
PT27	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	K	.
Y263	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Y32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	T	.	.	.	<	.	.	.	.	
PT96	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	E	.	.	.	R	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	P	S	
PT70	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	V	.	T	.	.	.	.	.	P	.	.	
PT54	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	.	N	V	.	.	.	.	.	.	.	.	
MS265	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	V	.	T	.	.	.	.	.	P	.	.	
MS175	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	E	S	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Y127	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT19	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	
BM64	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BG25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	V	.	V	.	.	.	.	.	P	.	.	
BM32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM33	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
AY22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	E	.	.	.	.	.	N	V	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	
BM31	.	.	.	.	.	>	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
MS118	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	V	.	.	>	.	.	.	.	P	S		
MS248	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	K	.	.	R	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	
MS251	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	*	.	R	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	
Y121	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	S	.	>	.	.	.	.	.	.	
PT14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	R	.	N	.	.	.	.	.	.	.	P	.	.	
AY67	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	R	.	N	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM45	.	* W	.	.	K	.	S	C	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT15	.	.	.	>	.	.	.	C	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	N	V	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	.	V	.	.	.	.	.	T	.	.	
A49	.	<	.	.	<	.	.	.	.	.	E	.	.	.	*	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

. = อะมิโนชนิดเดียวกับ *H. pylori* ATCC 26695, \* = กลายพันธุ์แบบ nonsense,

<, > = กลายพันธุ์แบบ frameshift (deletion, insertion ตามลำดับ),   = ตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงสุด,

  = การกลายพันธุ์ที่ส่งผลต่อการดื้อยา metronidazole,   = การกลายพันธุ์ที่พบใหม่ในงานวิจัยนี้





strain	Amino acid position																								
	92	97	98	104	106	111	113	115	116	118	131	163	172	175	176	179	180	182	183	193	203	204	205	206	
51932	S	H	G	L	P	V	V	P	S	A	R	G	V	E	R	K	P	I	A	A	K	V	D	A	
PT14	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	
AY67	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	I	Q	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
BM45	.	T	.	.	S	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT15	.	T	.	.	S	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT66	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
PT27	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Y263	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	K	D	I	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
Y32	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
PT96	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
PT70	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
PT54	.	.	S	.	T	.	.	L	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT45	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	Q	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	
PT34	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
MS265	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	R	S	.	.	.	.	.	.	.	.	
MS175	.	Y	.	.	S	A	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
Y127	.	.	S	.	S	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
PT19	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM64	.	T	.	.	L	.	.	.	T	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM35	.	T	.	.	L	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
AY61	.	T	.	.	L	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.
BG25	R	.	S	F	.	.	.	F	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
BM32	.	T	.	.	L	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
BM33	.	T	.	.	L	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
BM34	.	T	.	.	L	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
AY22	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	K	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
BM31	.	T	.	.	L	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.	
MS118	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	T	.	.	.	I	.	T	
MS248	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
MS251	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	T	
Y121	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.
PT46	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	K	.	I	.	.	.	.	.	.	R	.	I	A	.	
A49	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	A	.
PT12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
PT32	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	.	.	<	.	.	.	I	A	.	

### 3.1.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *frxA*

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสกับ ยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 (*frxA* = accession number HP0642) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่หลากหลายรูปแบบ ทั้งแบบ insertion , deletion และ substitution และพบได้ในหลายตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน FrxA แสดงดังตารางที่ 8 พบการกลายพันธุ์แบบ missense, frameshift และ nonsense สูงถึง 22 ตัวอย่าง (78.6 เปอร์เซ็นต์), 9 ตัวอย่าง (32.1เปอร์เซ็นต์) และ 3 ตัวอย่าง (10.7 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับตำแหน่งที่พบมากที่สุดของกลายพันธุ์ของยีน *frxA* ที่ส่งผลกับการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนได้แก่ ตำแหน่งเบสที่ 215 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก T เป็น C ส่งผลทำให้โคดอนที่ 72 เปลี่ยนจาก Phe เป็น Ser พบสูงถึง 57.1 เปอร์เซ็นต์ และ ตำแหน่งเบสที่ 217 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น A ส่งผลทำให้โคดอนที่ 73 เปลี่ยนจาก Gly เป็น Ser พบสูงถึง 57.1 เปอร์เซ็นต์ และ รองมาพบการเปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งที่ 577 จาก T เป็น A ส่งผลทำให้โคดอนที่ 193 เปลี่ยนจาก Cys เป็น Ser พบสูงถึง 53.6 เปอร์เซ็นต์







### 3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ

#### CLO tests

##### 3.2.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rdxA*

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสกับ ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 (accession number HP0954) ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests ทั้งหมด 30 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่หลากหลายรูปแบบ ทั้งแบบ insertion , deletion และ substitution และพบได้ในหลายตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน RdxA แสดงดังตารางที่ 9 พบการกลายพันธุ์แบบ missense, frameshift และ nonsense สูงถึง 30 ตัวอย่าง (100 เปอร์เซ็นต์), 1 ตัวอย่าง (3.3 เปอร์เซ็นต์) และ 4 ตัวอย่าง (13.3 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ตำแหน่งกลายพันธุ์สูงสุด ของยีน *rdxA* 3 ลำดับแรก คือ ตำแหน่งเบสที่ 175, 91 ถึง 92 และ 392 คิดเป็น 96.7, 80 และ 76.7 ตามลำดับ เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อที่ดื้อยา metronidazole และพบว่า มี 20 สายพันธุ์ (66.7 เปอร์เซ็นต์) ที่เกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่งพร้อมกันได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31, 59 และ 131

ตารางที่ 9 กรดอะมิโนของโปรตีน RdxA ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests

เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

strain	Amino acid position																					
	6	7	8	10	14	20	26	30	31	32	36	38	49	51	53	56	59	62	64	68	88	90
26695	Q	E	K	R	N	K	Y	S	T	E	I	E	T	P	H	M	D	L	K	A	S	R
29B	H	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.
30B	.	.	.	.	.	.	.	N	E	*	.	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
3BR	R	*	H	K	K	G	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	.
4BR	.	<	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	.
5BR	R	.	.	K	K	.	.	.	E	.	D	.	.	.	.	I	N	.	N	.	.	.
6BR	.	.	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	.
301	.	.	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	N	.	.	K
302	R	*	L	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	N	.	.	.
303	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
305	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
307	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	R	.	N	.	.	.	P	.
308	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.
310	R	.	.	K	K	.	.	.	E	.	D	.	.	.	.	I	N	.	N	.	.	.
311	R	.	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	N	.	.	K
312	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
314	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	R	.	N	.	.	.	P	.
316	R	.	.	K	.	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	.
1CR	R	*	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	.
2CR	R	.	.	K	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	.
3CR	.	.	.	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	R	.	N	V	.	V	P	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	V	.	.
15B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	N	.	.	K
309	.	K	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	Q	.	.	N	.	.	.	P	.
2BR	.	K	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	K
304	.	.	.	.	G	.	.	.	E	.	.	.	.	.	R	.	N	.	.	V	P	.
306	.	K	.	K	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	N	.	.	.	.	K
1BR	.	D	N	Q	K	.	.	.	E	.	V	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.
28B	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	V	.	.	.	K
313	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.
315	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	N	.	.	.	.	K



### 3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *frxA*

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสกับ ยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 (*frxA* = accession number HP0642) ด้วย โปรแกรม BioEdit พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่หลากหลายรูปแบบ ทั้งแบบ insertion , deletion และ substitution และพบได้ในหลายตำแหน่ง การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน FrxA แสดงดังตารางที่ 10 พบการกลายพันธุ์แบบ missense, frameshift และ nonsense สูงถึง 13 ตัวอย่าง (92.8 เปอร์เซ็นต์), 1 ตัวอย่าง (7.1เปอร์เซ็นต์) และ 1 ตัวอย่าง (7.1 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ตำแหน่งที่พบมากที่สุดของกลายพันธุ์ของยีน *frxA* ที่ส่งผลกับการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเป็นเช่นเดียวกับ กลายพันธุ์ที่พบในยีน *frxA* ของเชื้อที่ดื้อยา metronidazole ได้แก่ ตำแหน่งเบสที่ 217, 215 และ 577 คิดเป็น 57.1, 50 และ 42.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตารางที่ 10 กรดอะมิโนของโปรตีน FrxA ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests

เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

Amino acid position																	
strain	5	7	16	27	43	44	67	68	72	73	87	95	96	101	111	117	119
26695	Q	V	A	Q	S	I	A	W	F	G	K	Y	V	H	N	I	K
10	R	I	.	.	.	.	.	.	S	S	.	.	.	.	H	.	.
15B	.	.	T	.	.	.	.	.	S	S	.	.	.	.	H	.	.
28B	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.
29B	.	.	.	H	A	F	.	.	S	S	E	N	.	.	.	M	S
30B	.	.	T	.	A	F	.	.	P	S	.	.	.	.	D	M	.
2BR	.	I	.	.	.	V	.	.	S	S	.	.	.	.	.	.	.
3BR	.	I	.	.	.	V	.	.	S	S	.	.	.	.	D	M	.
6BR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.
301	.	.	T	.	.	V	V	G	S	S	.	.	.	.	.	.	.
305	.	I	T	.	.	>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
308	.	I	.	.	.	V	.	.	S	S	.	.	.	.	.	.	.
309	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
314	.	.	T	.	.	V	.	.	S	S	.	D	F	Q	.	.	.
1CR	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

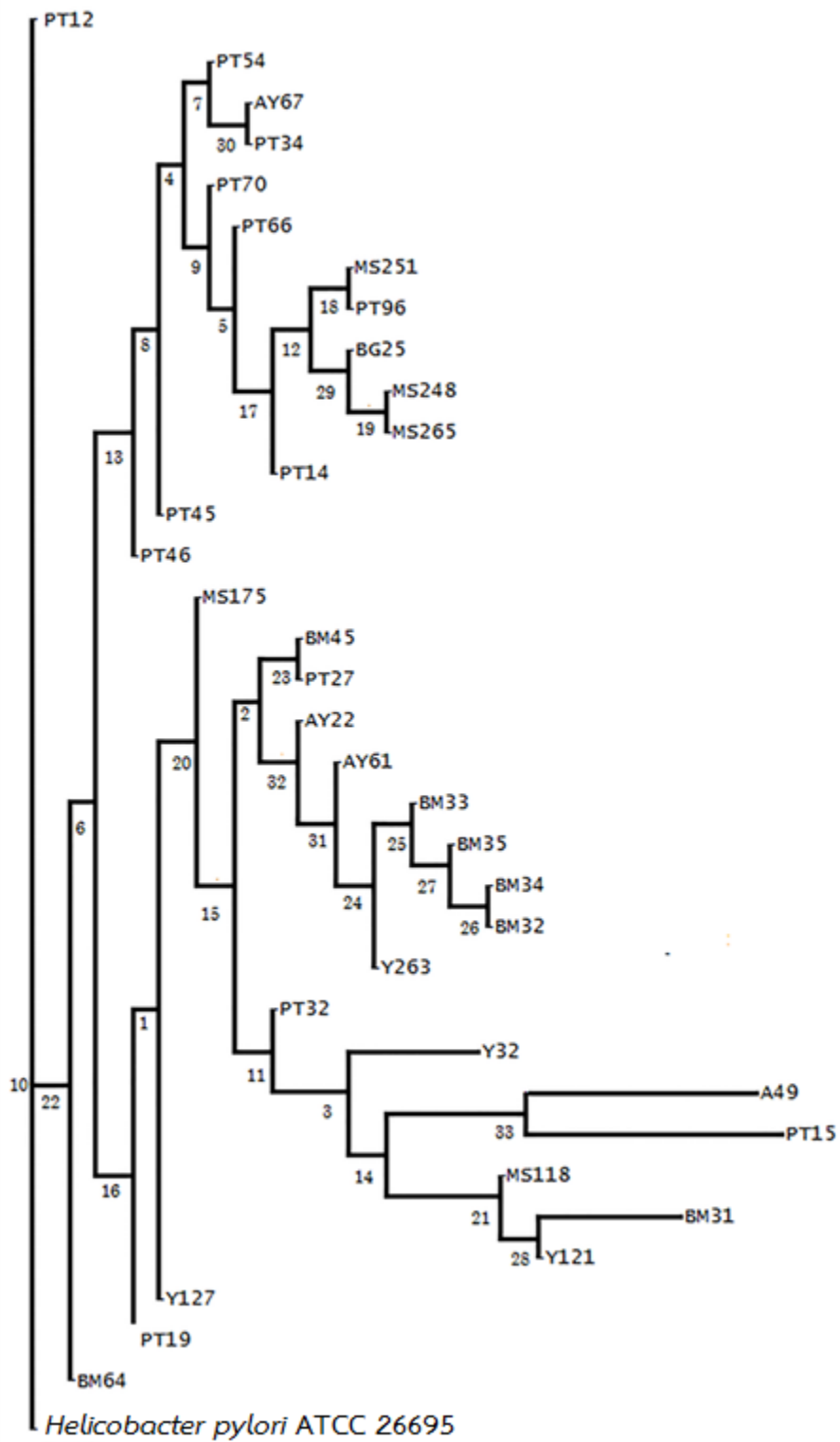
  

Amino acid position													
strain	122	124	129	130	131	132	145	153	156	163	176	188	193
26695	Q	N	N	S	E	R	Q	A	L	I	E	C	C
10	.	.	.	.	.	*	.	.	.	.	.	.	.
15B	.	.	T	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28B	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S
29B	.	S	.	.	.	.	.	S	.	M	K	.	S
30B	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	K	S	.
2BR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3BR	.	S	.	.	G	.	.	.	.	.	K	.	S
6BR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
301	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
305	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
308	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S
309	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
314	L	.	.	.	.	.	P	.	I	.	.	.	S
1CR	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	S

#### 4. การวิเคราะห์วิวัฒนาการของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* จาก phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม BioEdit

จัดทำ phylogenetic tree ของลำดับเบสที่ได้มาโดยใช้โปรแกรม BioEdit เพื่อวิเคราะห์จัดกลุ่ม ศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* phylogenetic tree ของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole จำนวน 34 ตัวอย่าง เป็นดังภาพที่ 12 และ 13 และ phylogenetic tree ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่มาจากสิ่งส่งตรวจ CLO test เป็นดังภาพที่ 14 และ 15 พบว่าเชื้อมีความหลากหลายของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่ต่างกันไป ไม่สามารถจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อเป็นกลุ่มได้

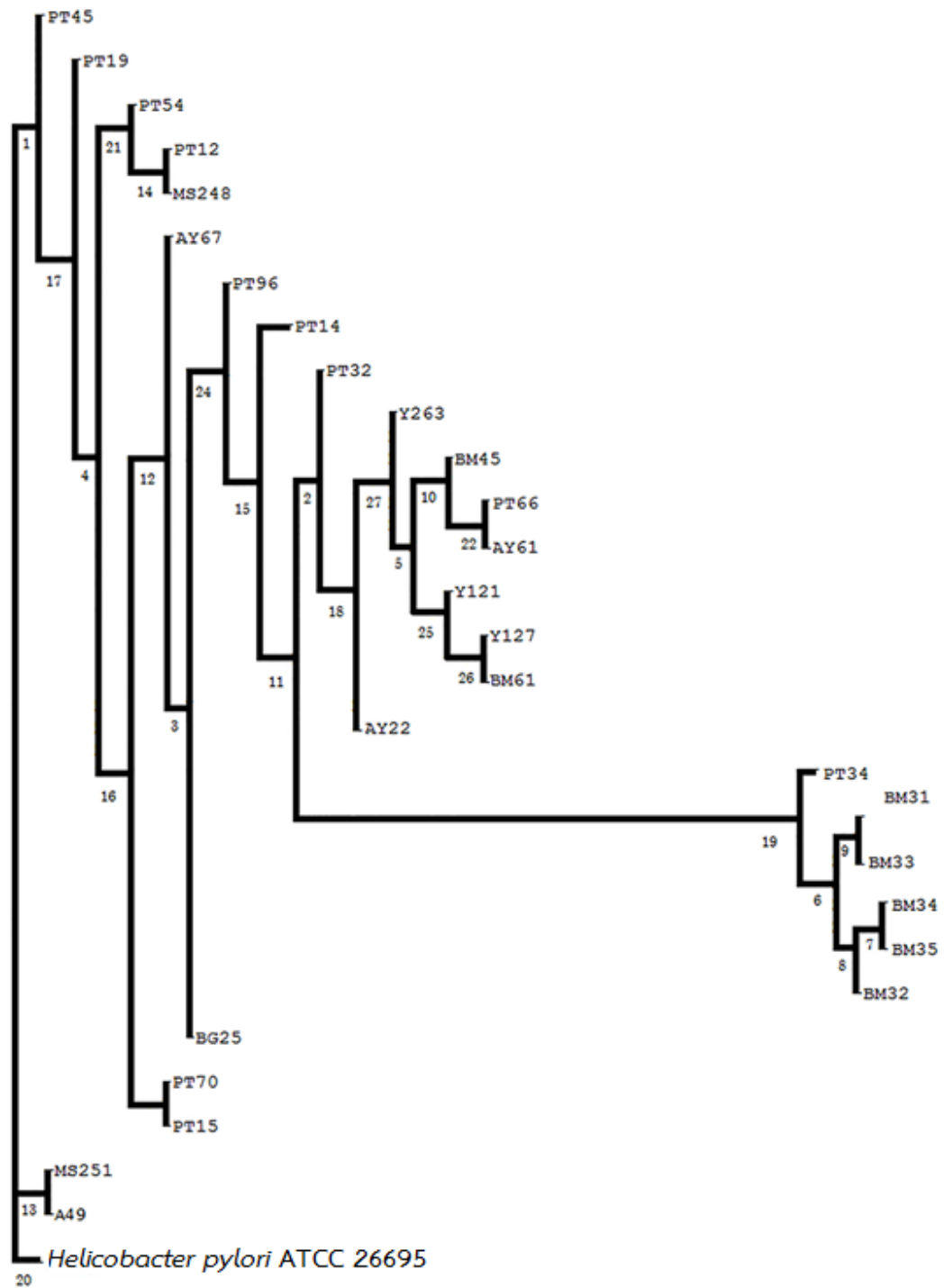




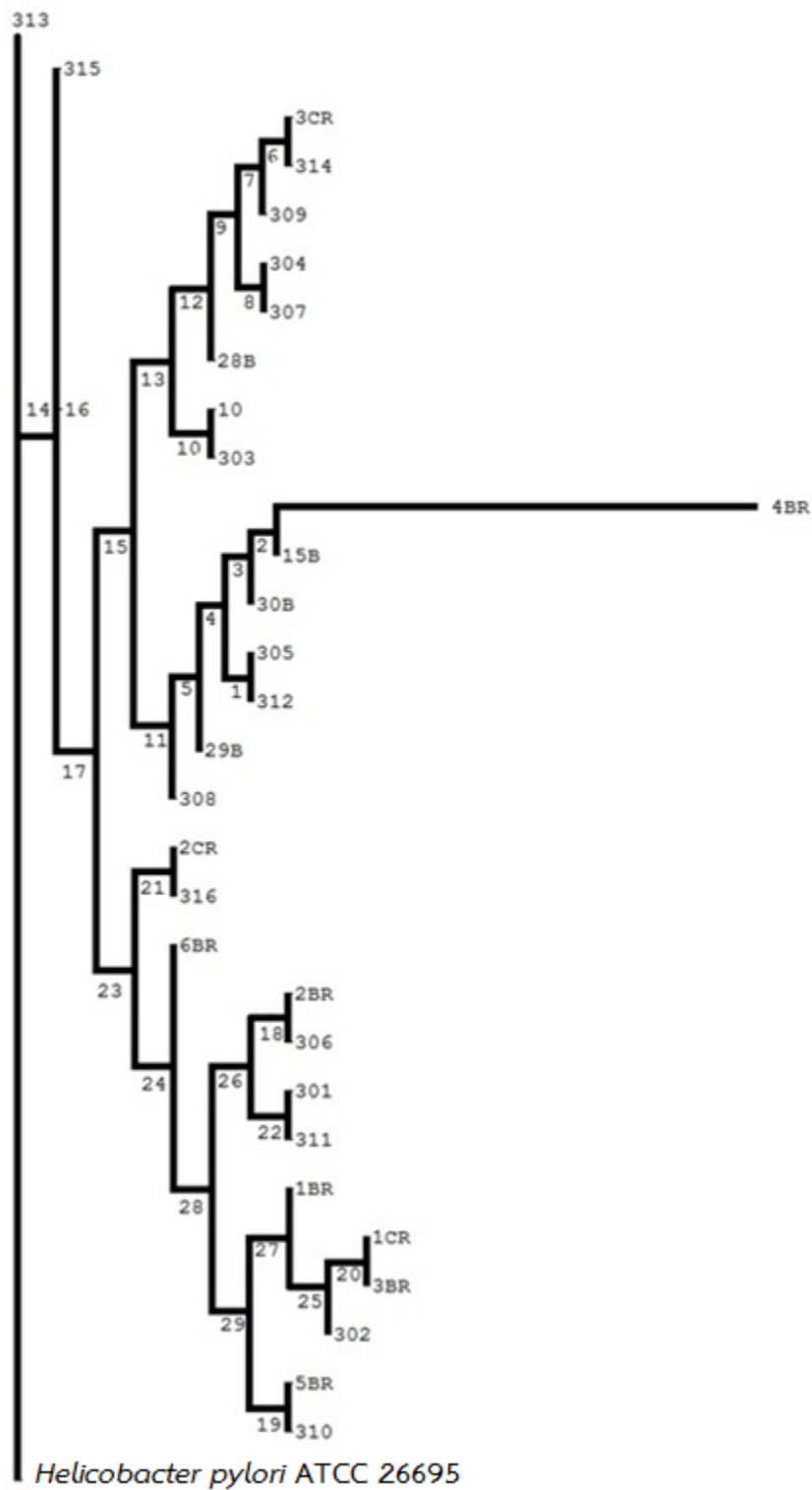
รูปที่ 12 phylogenetic tree ของยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole

จำนวน 34 ตัวอย่าง และเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

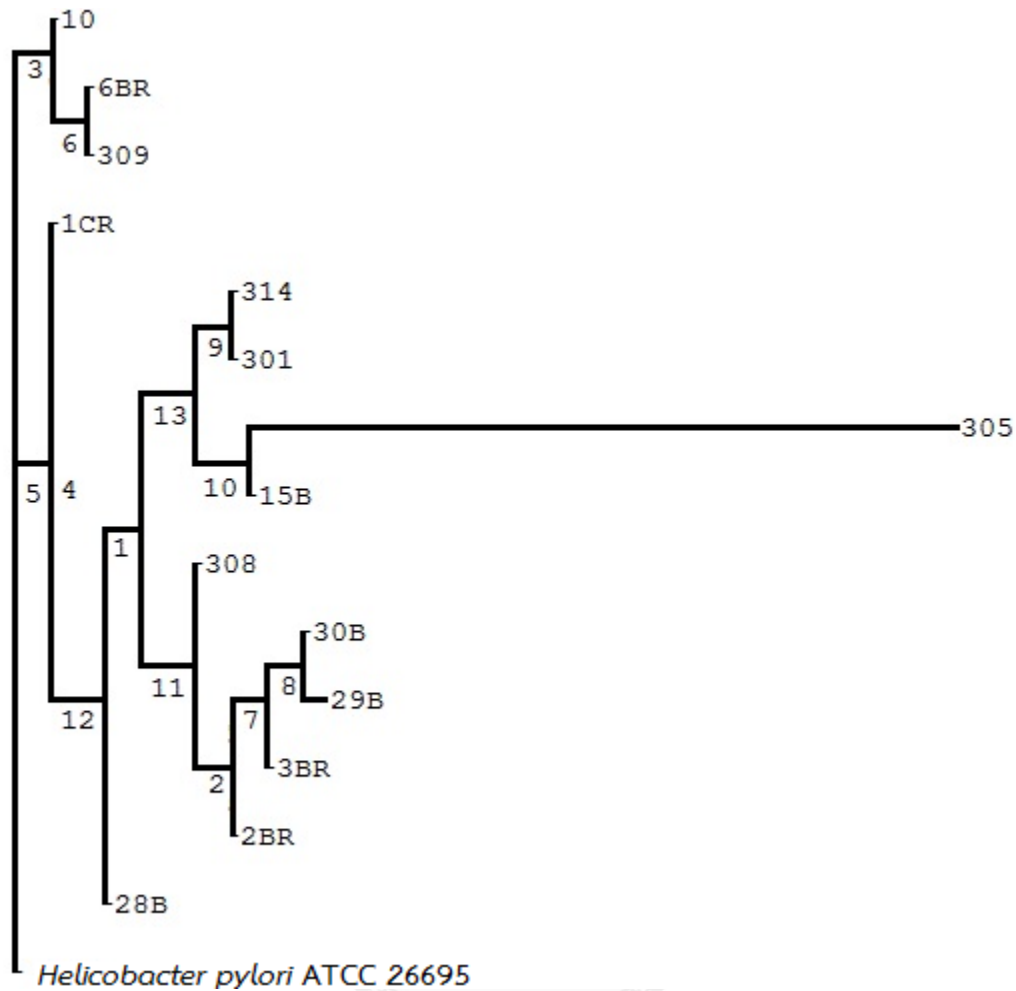




รูปที่ 13 phylogenetic tree ของยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole จำนวน 28 ตัวอย่าง และเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695



รูปที่ 14 phylogenetic tree ของยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests จำนวน 30 ตัวอย่าง และเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695



รูปที่ 15 phylogenetic tree ของยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests จำนวน 14 ตัวอย่าง และเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

##### 5. การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ *H. pylori*

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 (กรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 97) บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* 2 สายพันธุ์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ดังนี้ ดีเอ็นเอ wild type

ที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 291 ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 51932 และ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 ได้แก่ เชื้อ *H. pylori* รหัส AY61

### 5.1 การออกแบบไพรเมอร์

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 97) บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงถึง 46.1 เปอร์เซ็นต์ และสูงเป็นอันดับที่ 5 ของการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อที่ดื้อยา metronidazole โดยออกแบบ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 291 ของยีน *rdxA* โดย AS-primers ที่ถูกออกแบบขึ้นในการศึกษานี้ ใช้ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 เป็นต้นแบบ ออกแบบด้าน 3' ของ oligonucleotide ให้เป็นเบส G ซึ่งเป็นคู่สมกับตำแหน่งเบส 291 (โคดอนที่ 97) ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 โดยออกแบบให้เป็นด้าน reward เพื่อให้ได้ผลผลิต MAS-PCR ที่มีขนาดต่างกันเมื่อทำงานร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยา ตำแหน่งที่เข้าจับบนยีน *rdxA* และทิศทางการทำงานของ AS-primers เพื่อทำปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 16 ลำดับเบส, ค่า Tm (melting temperature) และขนาดของผลผลิตที่ได้จาก AS-primer แสดงในตารางที่ 11

*rdxA* gene ATCC 26695 : accession number HP0954

ORIGIN

```

1 atgaaat tttt tggatcaaga aaaaagaaga caattattaa acgagcgcca ttcttgcaag
61 atgtttgata gccattatga gttttctagc acagaattag aagaaatcgc tgaatcgc
121 aggctatcgc caagctetta caacacgcag ccatggcatt ttgtgatggt tactgataag
181 gatttaaaaa aacaaattgc agcgcacagc tatttcaatg aagagatgat taaaagcgt
241 tcagcgttaa tgggtgatat ctctttaaga cccagcgagt tgttaccaca cggccactac
301 atgcaaaatc tctatccqqa gtcttataaa gtttagtgta tcccctcttt tgctcaaatg
361 cttggcctga gattcaacca caqcatqcaa adattagaaa gctatatatt agagcaatgc
421 tatatcgctg tggggcaaat ttgcatgggc gtgagcttaa tgggattgga tagttgcatt
481 attggaggct ttgatccttt aaagggtgggc gaagttag aagagcgtat caataagcct
541 aaaatcgcag gcttgatcgc ttggggcaag aggggtggcag aagcaggtca aaaatcaaga
601 aaatcaaaag ttgatgcat tacttggttg tga

```

รูปที่ 16 ตำแหน่ง และทิศทางการทำงานที่ AS-primers (AS97-R) เข้าจับบนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 ที่ออกแบบได้

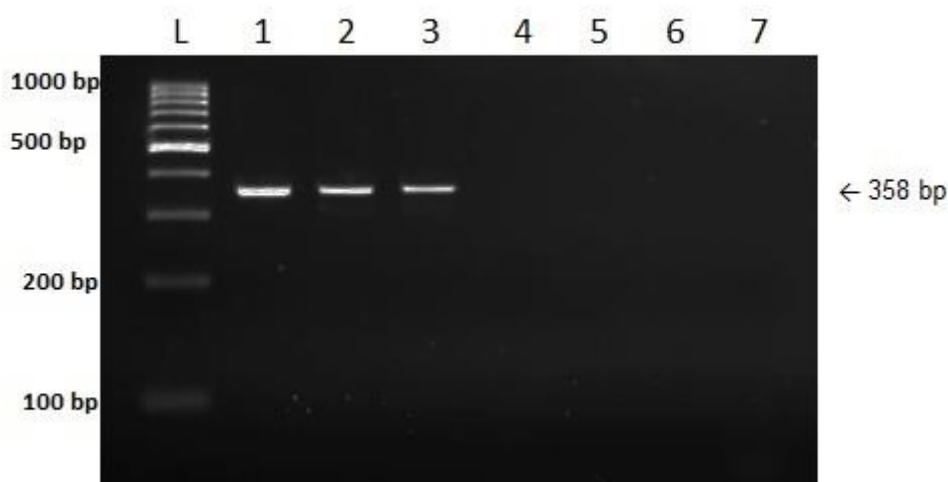
ตารางที่ 11 ตารางแสดงรายละเอียดของ AS-primers (AS97-R) ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบสที่ 291 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori*

Primer name	Sequence(5'-3')	TM (degree Celsius)	Product length (bp)
AS97-R	TTTTGCATGTAGTGGCCG	54	358

5.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori*

5.2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ AS-primers (AS97-R) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา (rdxA-F) โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของ AS-primers (AS97-R) หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 (เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 (รหัส AY61) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพที่ 17 พบว่า ทั้ง 3 อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type พบผลผลิตขนาด 358 คู่เบส และไม่พบผลผลิตในหลอดควบคุม mutant เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส เพราะเป็นอุณหภูมิที่สูง และเห็นผลผลิตที่ชัดเจน

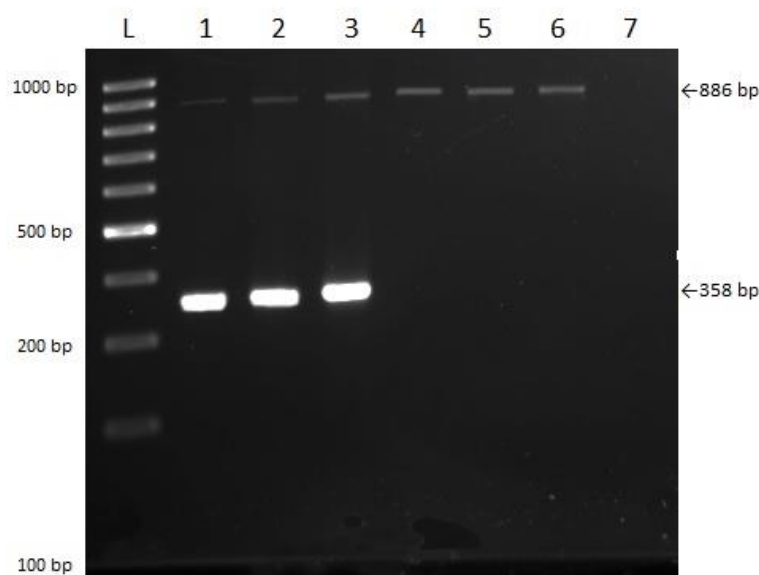


รูปที่ 17 ผลผลิต PCR จาก AS-primers (AS97-R) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา (rdxA-F) ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1, 2, 3 เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 4,5,6 เชื้อ *H. pylori* รหัส AY61 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing แตกต่างกัน ดังนี้ 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 7 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

### 5.2.2 การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR

ทำการทดสอบ MAS-PCR หาความเข้มข้นของ AS-primers ที่เหมาะสมโดยกำหนดความเข้มข้นของ AS-primers (AS97-R) ให้แตกต่างกันได้แก่ 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครโมลาร์ หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 (เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 (รหัส AY61) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอ

มาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพที่ 18 พบว่าทุกความเข้มข้นของ AS-primers (AS97-R) คือ 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครโมลาร์ พบผลผลิตของการทดสอบ MAS-PCR โดยหลอดควบคุม wild type มีขนาด 886 คู่เบส และ 358 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจากไพรเมอร์คู่หลักในปฏิกิริยา และผลผลิตจาก AS-primers (AS97-R) ขณะที่หลอดควบคุม mutant พบผลผลิตที่ได้จากไพรเมอร์คู่หลักขนาด 886 คู่เบส เท่านั้น พบว่าความเข้มข้นของ AS-primers (AS97-R) ที่ 0.125 ไมโครโมลาร์ ให้ผลผลิตแยกออกจากกัน และมีขนาดชัดเจนที่สุด



รูปที่ 18 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 291 ของเชื้อ *H. pylori* ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1, 2, 3 เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ที่มีความเข้มข้นของ AS-primers (AS97-R) ให้แตกต่างกันได้แก่ 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แถว 4, 5, 6 เชื้อ *H. pylori* รหัส AY61 ที่มีความเข้มข้นของ AS-primers (AS97-R) แตกต่างกันดังนี้ 0.5, 0.25 และ 0.125 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แถว 7 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



## 6. การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori*

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของยีน *rdxA* เชื้อ *H. pylori* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงสุด และสูงเป็นอันดับที่ 3 ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* 4 สายพันธุ์ เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR ดังนี้ เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 เป็นดีเอ็นเอ wild type ที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59) และ 392 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131) , เชื้อ *H. pylori* รหัส PT32 เป็นดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 392, เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 เป็นดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 392 และเชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 เป็นดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ที่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392

### 6.1 การออกแบบไพรเมอร์

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจวิเคราะห์การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของยีน *rdxA* เชื้อ *H. pylori* ซึ่งเป็นตำแหน่งการกลายพันธุ์ที่พบสูงสุด 3 ตำแหน่งในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole โดยออกแบบ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของยีน *rdxA* โดย AS-primers ที่ถูกออกแบบขึ้นในการศึกษานี้ ใช้ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 เป็นต้นแบบ โดยออกแบบด้าน 3' ของ oligonucleotide ให้เป็นเบส C ซึ่งเป็นคู่สมกับตำแหน่งเบส 92 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31) และออกแบบด้าน 3' ของ oligonucleotide ให้เป็นเบส G ซึ่งเป็นคู่สมกับตำแหน่งเบส 175 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59) และ 392 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131) ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 โดยออกแบบให้เป็นด้าน forward เพื่อให้ได้ผลผลิต

MAS-PCR ที่มีขนาดต่างกันเมื่อทำงานร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยา ตำแหน่งที่เข้าจับบนยีน *rdxA* และทิศทางการทำงานของ AS-primers เพื่อทำปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 19 ลำดับเบส, ค่า Tm (melting temperature) และขนาดของผลผลิตที่ได้จาก AS-primer แสดงในตารางที่ 12

*rdxA* gene ATCC 26695 : accession number HP0954

ORIGIN

```

1 atgaaatctt tggatcaaga aaaaagaaga caattattaa acgagcgcca ttcttgcaag
61 atgtttgata gocattatga gttttctagc acagaattag aagaaatcgc tgaaatcgcc
121 aggcctatcgc caagctotta caaacgcgag ccatggcatt ttgtgatggt tactgataag
181 gatttaaaaa aacaaattgc agcgcacagc tatttcaatg aagagatgat taaaagcgct
241 tcagcgttaa tgggtgatg ctctttaaga cccagcgagt tgettaccaca cggccactac
301 atgcaaaatc tctatccgga gtcttataaa gtttagagtga tccctcttt tgcctcaaatg
361 cttggcctca gattcaacca cagcatgcaa agattagaaa gctatatttt agagcaatgc
421 tatatcgctg tggggcaaat ttgcatgggc gtgagcttaa tgggattgga tagttgcatt
481 attggaggct ttgatccttt aaaggtgggc gaagttttag aagagcgtat caataagcct
541 aaaatcgcct gcttgatcgc tttgggcaag aggggtggcag aagcaggtca aaaatcaaga
601 aaatcaaaaag ttgatgcgat tacttgggttg tga

```

รูปที่ 19 ตำแหน่ง และทิศทางการทำงานที่ AS-primers (AS31-F, AS59-F, AS131-F) เข้าจับ

บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 ที่ออกแบบได้

ตารางที่ 12 ตารางแสดงรายละเอียดของ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori*

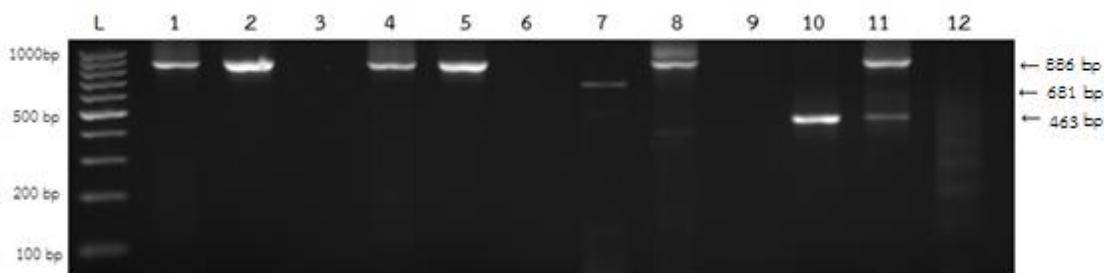
Primer name	Sequence(5'-3')	TM (degree Celsius)	Product length (bp)
AS31-F	5' CATTATGAGTTTTCTAGCAC 3'	54	765
AS59-F	5' GCATTTTGTGATGGTTACTG 3'	56	681
AS131-F	5' TCAACCACAGCATGCAAAG 3'	56	463

## 6.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori*

### 6.2.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของยีน *rdxA* ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 (รหัส PT12) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 (รหัส BM64) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพที่ 20 จากการทดสอบพบว่าไม่มี อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ใดที่สามารถใช้ตรวจหา

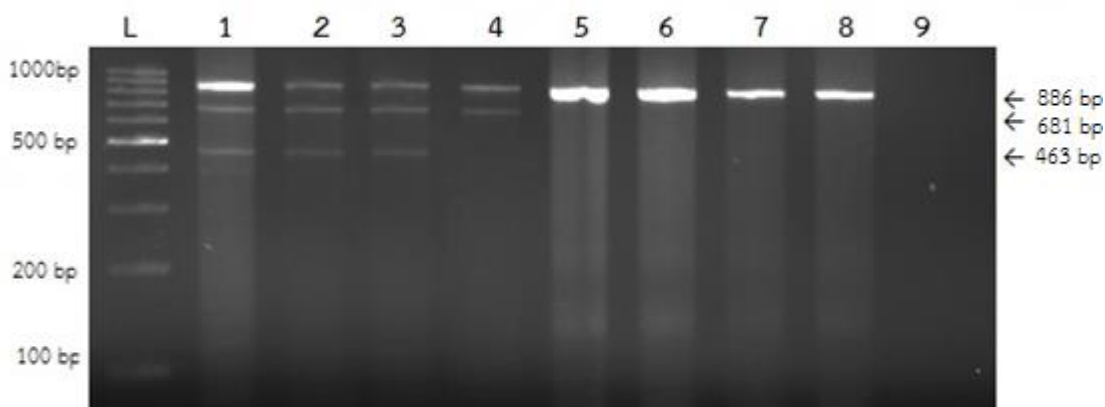
การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของยีน *rdxA* ในปฏิกิริยา MAS-PCR พบว่าที่อุณหภูมิ Annealing ที่ 58 และ 60 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type และ หลอดควบคุม mutant พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ที่อุณหภูมิ Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type พบผลผลิตขนาด 681 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจาก AS59-F ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 ของยีน *rdxA* เท่านั้น และหลอดควบคุม mutant พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจากไพรเมอร์คู่หลัก และพบผลผลิตที่ไม่ได้คาดหวังที่ 400 คู่เบส ที่อุณหภูมิ Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส หลอดควบคุม wild type พบผลผลิตขนาด 463 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจาก AS131-F ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 392 ของยีน *rdxA* เท่านั้น และหลอดควบคุม mutant พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบส และ 392 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจากไพรเมอร์คู่หลัก และผลผลิตจาก AS131-F ซึ่งใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 392 ของยีน *rdxA*



รูปที่ 20 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori* ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1, 4, 7, 10 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 60, 58, 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 2,5,8,11 เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 60, 58, 55 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 3, 6, 9, 12 คือน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ทำปฏิกิริยา MAS-PCR โดยใช้ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของยีน *rdxA* ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกันทั้ง 3 ขั้นตอนของปฏิกิริยาต่างกันไป 4 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 ให้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ทั้ง 3 ขั้นตอนเป็น 55, 60, 51 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 2 เป็น 58, 62, 53 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 3 เป็น 60, 64, 55 องศาเซลเซียส และ รูปแบบที่ 4 เป็น 62, 66, 58 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา MAS-PCR หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 (รหัส PT12) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 (รหัส BM64) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพ

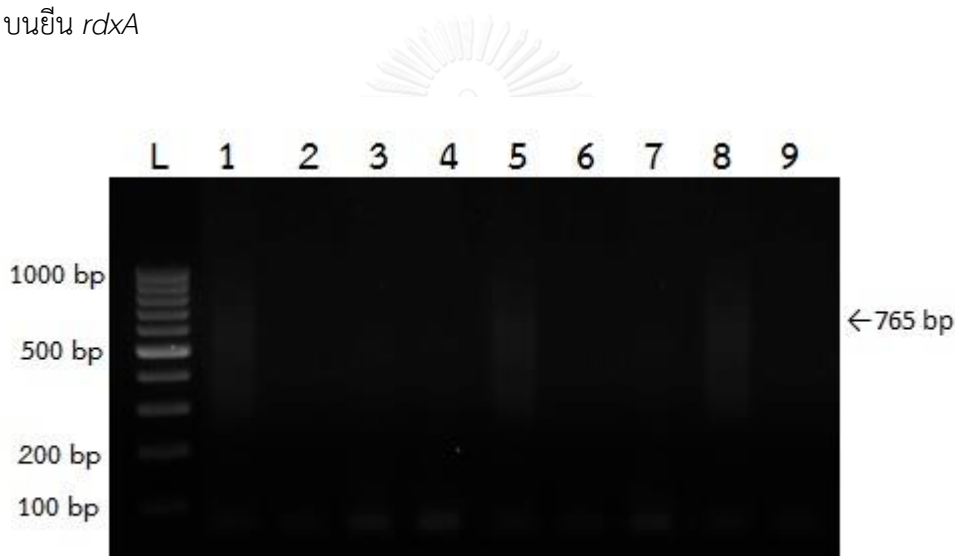
ที่ 21 พบว่าหลอดควบคุม wild type ที่ขั้นตอน Annealing รูปแบบที่ 2 และรูปแบบที่ 3 พบผลผลิตขนาดขนาด 886 คู่เบส, 681 คู่เบส และ 463 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตของไพรเมอร์คู่หลัก AS59-F ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 บนยีน *rdxA* และ AS131-F ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 392 บนยีน *rdxA* ซึ่งขนาดผลผลิตเป็นไปตามที่คาดหวังไว้ ขณะที่ขั้นตอน Annealing รูปแบบที่ 4 พบผลผลิตขนาดขนาด 886 คู่เบส, 681 คู่เบส เท่านั้น และ Annealing รูปแบบที่ 1 พบผลผลิตขนาดขนาด 886 คู่เบส, 681 คู่เบส ,463 คู่เบส และผลผลิตที่ไม่ได้คาดหวังขนาด 400 คู่เบส อย่างไรก็ตามไม่พบผลผลิตขนาด 765 คู่เบส AS31-F ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 92 บนยีน *rdxA* ที่อุณหภูมิทุกรูปแบบ หลอดควบคุม mutant ของทุกรูปแบบพบผลผลิตขนาด 886 คู่เบส จากไพรเมอร์คู่หลักเท่านั้น ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหวังไว้ พบว่าที่อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่ รูปแบบที่ 3 คือ 60, 64, 55 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตที่ชัดเจนที่สุด



รูปที่ 21 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92, 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori* ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1, 2, 3, 4 เชื้อ *H. pylori* ที่ รหัส PT12 โดยกำหนดให้ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 ให้ อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ทั้ง 3 ขั้นตอนเป็น 55, 60, 51 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 2 เป็น 58, 62, 53 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 3 เป็น 60, 64, 55 องศาเซลเซียส และ รูปแบบที่ 4 เป็น 62, 66, 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 4, 5, 6 เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 โดยกำหนดให้ที่มีอุณหภูมิใน ขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ รูปแบบที่ 1 ให้อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ทั้ง 3 ขั้นตอนเป็น 55, 60, 51 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 2 เป็น 58, 62, 53 องศาเซลเซียส รูปแบบที่ 3 เป็น 60, 64, 55 องศาเซลเซียส และ รูปแบบที่ 4 เป็น 62, 66, 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 9 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ AS-primers (AS31-F) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักใน ปฏิกิริยา (*rdxA*-R) โดยกำหนดให้ที่มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของ AS-primers (AS31-F) ที่ใช้

ตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่งเบสที่ 92 บนยีน *rdxA* หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92 (เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 92 (รหัส BM64) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพที่ 22 พบว่าไม่พบผลผลิตขนาด 765 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจาก AS31-F ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 92 บนยีน *rdxA*



รูปที่ 22 ผลผลิต PCR โดยใช้ AS-primers (AS31-F) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา (*rdxA*-F) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 92 ของเชื้อ *H. pylori* ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1, 2, 3, 4 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกันดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 4, 5, 6 เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 โดยกำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน คือ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 9 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ



## 6.2.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 91 และการหาอุณหภูมิที่

เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR ในการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งเบส 91 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31) บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* โดยออกแบบ AS-primers ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบส 91 ของยีน *rdxA* โดย AS-primers ที่ถูกออกแบบขึ้นในการศึกษานี้ ใช้ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 เป็นต้นแบบ ออกแบบด้าน 3' ของ oligonucleotide ให้เป็นเบส T ซึ่งเป็นคู่สมกับตำแหน่งเบส 91 ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 โดยออกแบบให้เป็นด้าน reward ตำแหน่งที่เข้าจับบนยีน *rdxA* และทิศทางการทำงานของ AS-primers เพื่อทำปฏิกิริยาแสดงดังภาพที่ 23 ลำดับเบส, ค่า  $T_m$  (melting temperature) และขนาดของผลผลิตที่ได้จาก AS-primer แสดงในตารางที่ 13

*rdxA* gene ATCC 26695: accession number HP0954

ORIGIN

```

1 atgaattttt tggatcaaga aaaaagaaga caattattaa acgagcgcca ttcttgcaag
61 atgtttgata gccattatga gttttctagc acagaattag aagaaatcgc tgaaatcgcc ← AS31-R
121 aggctatcgc caagctctta caacacgcag ccatggcatt ttgtgatggt tactgataag
181 gatttaaaaa aacaaattgc agcgcacagc tatttcaatg aagagatgat taaaagcgct
241 tcagcgttaa tgggtgatg ctctttaaga cccagcaggt tgettaccaca cggccactac
301 atgcaaaatc tctatccgga gtcttataaa gtttagtgta tcccctcttt tgotcaaatg
361 cttggcctga gattcaacca caqcatqcaa adattagaaa gctatatttt agagcaatgc
421 tataatcgctg tggggcaaat ttgcatgggc gtgagcttaa tgggattgga tagttgcatt
481 attggaggct ttgatccttt aaaggtgggc gaagttttag aagagcgtat caataagcct
541 aaaatcgcat gcttgatcgc tttgggcaag aggggtggcag aagcgagtca aaaatcaaga
601 aaatcaaaaag ttgatgcgat tactttggttg tga

```

รูปที่ 23 ตำแหน่ง และทิศทางการทำงานที่ AS-primers (AS31-R) ที่เข้าจับบนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 ที่ออกแบบได้

ตารางที่ 13 ตารางแสดงรายละเอียดของ AS-primers (AS31-R) ที่จำเพาะกับตำแหน่งเบสที่ 91 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori*

Primer name	Sequence(5'-3')	TM (degree Celsius)	Product length (bp)
AS31-R	5' AGCGATTTCTTCTAATTCTGT 3'	56	161

ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ AS-primers (AS31-R) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา (*rdxA-F*) โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการทำงานของ AS-primers (AS31-R) ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของตำแหน่งเบสที่ 91 บนยีน *rdxA* หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 91 (เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 91 (รหัส BM64) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพที่ 24 พบว่าไม่พบผลผลิตขนาด 161 คู่เบส ซึ่งเป็นผลผลิตจาก AS31-R ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 91 บนยีน *rdxA*



รูปที่ 24 ผลผลิต PCR โดยใช้ AS-primers (AS31-R) ที่ออกแบบร่วมกับไพรเมอร์หลักในปฏิกิริยา (*rdxA*-F) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 91 ของเชื้อ *H. pylori* ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1,2,3,4 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 โดยกำหนดให้มีอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกันดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 4, 5, 6 เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 โดยกำหนดอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน คือ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แถว 9 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

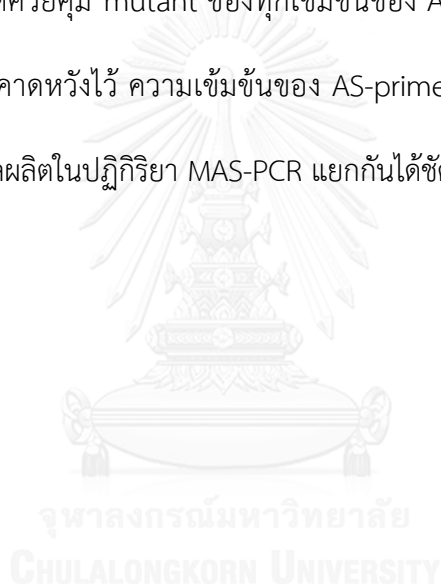
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

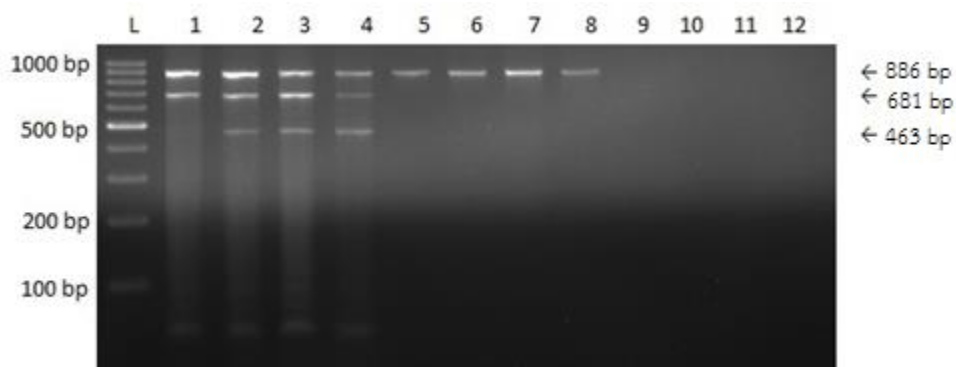
### 6.2.3 การหาความเข้มข้นไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา MAS-PCR ที่ใช้

ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392

ทำการทดสอบ MAS-PCR เพื่อหาความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) ที่เหมาะสมที่ใช้ในปฏิกิริยา MAS-PCR ในหาการตรวจกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 โดยกำหนดความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) ให้แตกต่างกันดังนี้ 0.025 , 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ หลอดควบคุม wild type ใช้ดีเอ็นเอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 (เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 ) หลอดควบคุม mutant ใช้ดีเอ็นเอ

เอตัวแทนเชื้อ *H. pylori* ที่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 (เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64) หลอดควบคุมลบใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผลการตรวจสอบผลผลิต PCR บนฐานอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส เป็นดังภาพที่ 25 พบว่าหลอดควบคุม wild type ที่ความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบส, 681 คู่เบส และ 463 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ หลอดควบคุม wild type ที่ความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) 0.025 ไมโครโมลาร์ พบผลผลิตขนาดขนาด 886 คู่เบส และ 681 คู่เบส เท่านั้น หลอดควบคุม mutant ของทุกเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบส ตามที่คาดหวังไว้ ความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) ที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.1 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้ผลผลิตในปฏิกิริยา MAS-PCR แยกกันได้ชัดเจนที่สุด

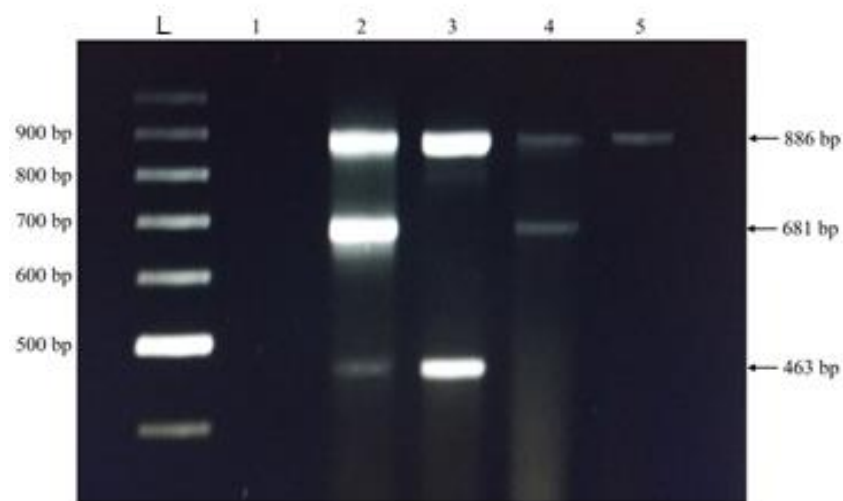




รูปที่ 25 ผลผลิต MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของเชื้อ *H. pylori* ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1, 2, 3, 4 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 โดยกำหนดความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) ให้แตกต่างกันดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แถว 4, 5, 6 เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 โดยกำหนดความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) ให้แตกต่างกันดังนี้ 0.025, 0.05, 0.1 และ 0.2 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ แถว 9, 10, 11, 12 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

นำสภาวะที่เหมาะสมที่ได้มาทดสอบกับดีเอ็นเอ 4 ตัวอย่าง ที่ไม่กลายพันธุ์ และ กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 แตกต่างกัน ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ดังนี้ เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 เป็นดีเอ็นเอ wild type ที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 , เชื้อ *H. pylori* รหัส PT32 เป็นดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 392 , เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 เป็นดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 392 และเชื้อ *H. pylori* รหัส BM64 เป็น ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 พบว่าเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถแยกการกลายพันธุ์ทั้ง 4 แบบได้ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 26 ยีน *rdxA* ที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของตำแหน่งเบส 175 และ 392

จะพบผลผลิต MAS-PCR ทั้งสามขนาด ได้แก่ 886, 681 และ 463 คู่เบส ขณะที่ยีน *rdxA* ที่กลายพันธุ์ตำแหน่งเบส 175 แต่ไม่กลายพันธุ์ที่เบส 392 จะพบผลผลิต MAS-PCR สองขนาด คือ 886 และ 463 คู่เบส และยีน *rdxA* ที่ไม่กลายพันธุ์ตำแหน่งเบส 175 แต่พบกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 392 จะพบผลผลิต MAS-PCR สองขนาด คือ 886 และ 681 คู่เบส และ ยีน *rdxA* ที่กลายพันธุ์ทั้งตำแหน่งเบส 175 และ 392 จะพบผลผลิต MAS-PCR เพียงขนาดเดียว คือ 886 คู่เบส



รูปที่ 26 ผลผลิต MAS-PCR ของยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* เพื่อตรวจหากลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ตรวจสอบด้วยการเคลื่อนที่ผ่านกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ L คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส แถว 1 น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แถว 2 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT12 แถว 3 เชื้อ *H. pylori* รหัส PT32 แถว 4 เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 แถว 5 เชื้อ *H. pylori* รหัส BM64

## 7. การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 และ 392 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori*

ตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีน *rdxA* ของดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ื้อ metronidazole ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ และ เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ด้วยเทคนิค MAS-PCR เปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing ผลดังตารางที่ 14 พบว่า การกลายพันธุ์บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ สอดคล้องกับผลจากเทคนิค Sequencing 33 สายพันธุ์ คิดเป็น 94.3 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 คิดเป็น 2.9 เปอร์เซ็นต์ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 392 คิดเป็น 2.9 เปอร์เซ็นต์ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 392 คิดเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์ และ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 คิดเป็น 74.3 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 2 สายพันธุ์ที่เทคนิค MAS-PCR ไม่สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากไม่พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบสที่เป็น internal control ในปฏิกิริยา ขณะที่วิธี Sequencing ตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392

ตารางที่ 14 การตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 และ 392 บนยีน *rdxA* ของเชื้อ

*H. pylori* ด้วยเทคนิค Sequencing เปรียบเทียบกับเทคนิค MAS-PCR

<i>rdxA</i> gene	Type of mutation Amino acid change	Sequencing	MAS-PCR
		Number of mutation (%)	Number of mutation (%)
Wild type	G(175) /Asp (59) G(392)/Arg(131)	1/35(2.9)	1/35 (2.9)
Mutate Codon 131	G(175) /Asp (59) A(392)/Lys(131)	1/35 (2.9)	1/35 (2.9)
Mutate Codon 59	A(175)/Asn(59) G(392)/Arg(131)	5/35 (14.3)	5/35 (14.3)
Mutate Codon 59 Mutate Codon 131	A(175)/Asn(59) A(392)/Lys(131)	28/35 (80)	26/35 (74.3)



ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ในดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* จาก CLO test ที่ให้ผลบวก

30 ตัวอย่าง ด้วยวิธี MAS-PCR พบว่าเกิด smear หนา และไม่พบผลผลิตขนาด 886 คู่เบสที่เป็น

internal control ในปฏิกิริยา



## บทที่ 5

### อภิปรายผล

การดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *H. pylori* เป็นปัญหาหลักในการรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ให้ประสบความสำเร็จ ยา metronidazole ถูกนำมาใช้ในการโรคติดเชื้อต่างๆ อย่างแพร่หลาย รวมถึงใช้รักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ด้วย การใช้อย่างแพร่หลายส่งผลให้เชื้อมีการพัฒนาความต้านทานต่อยา metronidazole ที่สูงขึ้นด้วย [69] พบว่าอัตราการดื้อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* สูงที่สุดในหลายประเทศโดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา เมื่อเทียบกับ ยา clarithromycin และ amoxicillin ซึ่งเป็นยาหลักที่ใช้รักษาการติดเชื้อ *H. pylori* เช่นเดียวกัน [6] จากรายงานที่ผ่านมา อัตราการดื้อยาของเชื้อ *H. pylori* ทั่วโลก พบว่า ดื้อยา metronidazole, clarithromycin และ amoxicillin เป็น 26.7, 17.2 และ 11.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในทวีปเอเชียพบอัตราการดื้อยา metronidazole, clarithromycin และ amoxicillin ของเชื้อ *H. pylori* เป็น 37.1, 18.9 และ 11.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ [6] ดังนั้นการดื้อยา metronidazole เชื้อ *H. pylori* มีบทบาทสำคัญในการรักษาการติดเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ

การดื้อต่อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* มีความสัมพันธ์กับการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* [10] โครงสร้าง RdxA ประกอบด้วย homodimer exhibiting domain swapping โดยมีพันธะ FMN เชื่อมระหว่าง dimer ทั้งสองโมเลกุล นอกจากนี้ยังมีตำแหน่งของ cysteine ใกล้เคียงกับพันธะ FMN เพื่อช่วยในปฏิกิริยา reducing activity เพื่อ reduce ยา metronidazole ให้อยู่ในรูปแบบที่ทำงานได้ [11] ในการศึกษานี้ได้ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ในยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole พบว่ามีการกลายพันธุ์ในหลายตำแหน่ง โดยพบการการกลายพันธุ์แบบ

missense 97.1 เปอร์เซ็นต์ แบบ frameshift 20.6 เปอร์เซ็นต์ และ แบบ nonsense 8.8 เปอร์เซ็นต์ รูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในเรื่อง *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา Metronidazole ในการศึกษาครั้งนี้ มีด้วยกัน 3 ตำแหน่ง คือ เบส A (adenine) ตำแหน่งที่ 175 (กรดอะมิโนชนิด Asn ตำแหน่งที่ 59) พบสูงถึง 94.1 เปอร์เซ็นต์, เบส G (guanine) และ A ตำแหน่งที่ 91 และ 92 (กรดอะมิโนชนิด Glu ตำแหน่งที่ 31) พบสูงถึง 88.2 เปอร์เซ็นต์ และ เบส A ตำแหน่งที่ 392 (กรดอะมิโนชนิด Lys ตำแหน่งที่ 131) พบสูงถึง 85.3 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 3 ตำแหน่งที่พบนั้นตรงกับตำแหน่งที่พบในการกลายพันธุ์สูงที่สุดของ CLO tests ที่ให้ผลบวก เช่นกันดังนี้ เบส A ที่ตำแหน่ง 175 พบ 96.7 เปอร์เซ็นต์, เบส G และ A ตำแหน่งที่ 91 และ 92 พบ 80 เปอร์เซ็นต์ และ เบส A ตำแหน่งที่ 392 พบ 76.7 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ กับการศึกษาวิจัยในเรื่อง *H. pylori* ที่ไว และดื้อต่อยา metronidazole ก่อนหน้านั้น พบการกลายพันธุ์แบบ missense ในหลายตำแหน่งมีลักษณะเหมือนกัน ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์การกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ในปี 2014 จำนวน 7 สายพันธุ์พบว่า เชื้อ *H. pylori* 6 สายพันธุ์มีการกลายพันธุ์ในรูปแบบแตกต่างกันไป การเปลี่ยนแปลงที่พบมากที่สุดคือ มีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59 สูงถึง 85.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบสูงที่สุดในงานวิจัยนี้เช่นกัน รองมาคือ เกิดการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131 สูงถึง 57.1 เปอร์เซ็นต์ และยังพบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 79 จำนวน 3 สายพันธุ์ [70]

ในการศึกษารูปแบบการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ครั้งนี้ พบว่ากรดอะมิโนบางตัวเกิดการกลายพันธุ์แบบ missense เหมือนกับงานวิจัยที่ผ่านมา ตัวอย่างเช่น Arg16His (พบในการศึกษานี้เป็นจำนวน 4 ตัวอย่าง), His53Arg (พบในการศึกษานี้เป็นจำนวน 12

ตัวอย่าง), Gly163Asp (พบในการศึกษานี้เป็นจำนวน 1 ตัวอย่าง), Val204Ile (พบในการศึกษานี้เป็นจำนวน 17 ตัวอย่าง), Ala206Thr (พบในการศึกษานี้เป็นจำนวน 6 ตัวอย่าง) [12, 15, 60, 71] รูปแบบการกลายพันธุ์แบบ missense ใหม่ที่พบได้ในงานวิจัยนี้ คือตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 1, 4, 10, 21, 37, 41, 74, 79, 91, 92, 104, 106, 113, 115, 116, 176, 183, 193 และ 203

การกลายพันธุ์แบบ missense ใน RdxA ที่นำไปสู่การสูญเสียความสามารถของเอนไซม์ reductase และส่งผลต่อการเพิ่มความต้านทานต่อยา metronidazole ของเชื้อ *H. pylori* มีดังต่อไปนี้

รูปแบบที่คาดว่าจะมีผลต่อการลดพลังงานการดึงดูดกันของพันธะ FMN ที่เชื่อมระหว่างโปรตีน ได้แก่การเปลี่ยนแปลงของ กรดอะมิโน Arg ที่ตำแหน่ง 16 , กรดอะมิโน Ser ที่ตำแหน่ง 18 , กรดอะมิโน Lys ที่ตำแหน่ง 20 , กรดอะมิโน Asn ที่ตำแหน่ง 73 , กรดอะมิโน Ile ที่ตำแหน่ง 142 , กรดอะมิโน Gly ที่ตำแหน่ง 162 และ กรดอะมิโน Lys ที่ตำแหน่ง 200

รูปแบบที่คาดว่าจะมีผลกับความเสถียรระหว่าง dimer ของโปรตีน ได้แก่การเปลี่ยนแปลงของ กรดอะมิโน Leu ที่ตำแหน่ง 42, กรดอะมิโน Ser ที่ตำแหน่ง 43, กรดอะมิโน Arg ที่ตำแหน่ง 41, กรดอะมิโน Gln ที่ตำแหน่ง 50, กรดอะมิโน Val ที่ตำแหน่ง 55, กรดอะมิโน Ile ที่ตำแหน่ง 142, กรดอะมิโน Gly ที่ตำแหน่ง 145, กรดอะมิโน Lys ที่ตำแหน่ง 202, และ กรดอะมิโน Leu ที่ตำแหน่ง 209

รูปแบบที่คาดว่าจะมีผลต่อความสัมพันธ์กับปฏิกิริยา redox ของเอนไซม์ ได้แก่การเปลี่ยนแปลงของ กรดอะมิโน Cys ที่ตำแหน่ง 19, กรดอะมิโน Tyr ที่ตำแหน่ง 47 และ กรดอะมิโน Cys ที่ตำแหน่ง 159

รูปแบบที่คาดว่าสาเหตุให้เกิดความไม่เสถียรของ dimer ได้แก่ กรดอะมิโน Gly ที่ตำแหน่ง 149 และ กรดอะมิโน His ที่ตำแหน่ง 17 [11] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole 7 สายพันธุ์ (20.6 เปอร์เซ็นต์) ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 16, 1 สายพันธุ์ (2.9 เปอร์เซ็นต์) ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 41 และ 1 สายพันธุ์ (2.9 เปอร์เซ็นต์) ที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 50 ของโปรตีน RdxA ซึ่งการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งดังกล่าวส่งผลต่อการดื้อ metronidazole

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole สูงถึง 26 สายพันธุ์ (76.5 เปอร์เซ็นต์) เกิดการกลายพันธุ์แบบ missense ที่กรดอะมิโน 3 ตำแหน่งพร้อมกัน ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31, 59 และ 131 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole ก่อนหน้า พบการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ตำแหน่งดังกล่าวพร้อมกันคิดเป็น 59.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อ *H. pylori* ที่ไวต่อยา metronidazole พบการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ตำแหน่งดังกล่าวพร้อมกันเพียงแค่ 22 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น [10, 15, 72-74] ในศึกษานี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ที่มีความไว และความจำเพาะสูง มาตรวจหาการกลายพันธุ์ของทั้ง 3 ตำแหน่ง ได้แก่ตำแหน่งเบสที่ 91-92, 175 และ 392 บนยีน *rdxA*

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ stop codons ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 2, 50, และ 52 โดยการกลายพันธุ์แบบ stop codons ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 50 พบในงานวิจัยของ Yang และคณะ ในปี 2004 เช่นกัน

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเชื้อที่มีการดื้อต่อยา metronidazole เท่านั้นที่จะพบการกลายพันธุ์แบบ frameshift ตัวอย่างเช่น การศึกษาการกลายพันธุ์แบบ frameshift ที่ส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีน และสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่มีการกลายพันธุ์แบบ

frameshift สามารถทนต่อยา metronidazole ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 64 ถึง 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยตำแหน่งที่เกิด frameshift มีดังนี้ เกิด deletion ที่ตำแหน่งเบสที่ 63 ถึง 66, เกิด Insertion เบส G ที่ตำแหน่งเบสที่ 332, เกิด Insertion เบส G ที่ตำแหน่งเบสที่ 240, เกิด deletion ที่ตำแหน่งเบสที่ 112 ถึง 120, เกิด Insertion เบส T ที่ตำแหน่งเบสที่ 430, เกิด Insertion เบส G ที่ตำแหน่งเบสที่ 467 และ เกิด Insertion เบส T ที่ตำแหน่งเบสที่ 459 [15, 75] การศึกษาการเกิดการกลายพันธุ์แบบ deletion ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อและไวต่อยา metronidazole ในประเทศอิหร่านจำนวน 63 สายพันธุ์ พบว่า 22.9 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อที่ดื้อต่อยา metronidazole พบการกลายพันธุ์แบบ deletion ที่ยีน *rdxA* ในขณะที่เชื้อที่ไวต่อยา metronidazole ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ deletion และการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* เปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อและไวต่อยา metronidazole พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ไวต่อยา metronidazole ไม่พบการกลายพันธุ์แบบ frameshift ทั้ง 10 สายพันธุ์ แต่พบการกลายพันธุ์แบบ frameshift 5 สายพันธุ์ จากจำนวนเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole 11 สายพันธุ์ คิดเป็น 45.5 เปอร์เซ็นต์ [76] ในการศึกษาพบว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบ frameshift ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole สูงถึง 20.6 เปอร์เซ็นต์ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่พบการกลายพันธุ์แบบ frameshift ได้แก่ 4, 6, 9, 71, 72, 79, 182 ซึ่งพบในการศึกษานี้เท่านั้น

ในการศึกษารั้งนี้พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole ทั้ง 34 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของโปรตีน RdxA แตกต่างกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อยา metronidazole เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 31, 59 และ 131 ของโปรตีน RdxA พบว่ามีเชื้อจำนวน 4 สายพันธุ์ (11.8 เปอร์เซ็นต์) ที่มีกรดอะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่งเหมือนกันกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ได้แก่ Glu, Asn และ Arg ตามลำดับ และ

พบว่าเชื้อ 2 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 4 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 16 ซึ่งได้รับการยืนยันว่าเป็นตำแหน่งที่ส่งผลกับการดื้อยา metronidazole นอกจากนี้เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มีการกลายพันธุ์ที่กรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ ได้แก่ 2, 4, 6, 7, 10, 53, 56, 62, 64, 68, 88, 97, 98, 106, 111, 172, 175, 205, 206 แตกต่างกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 51932

ในการศึกษานี้ได้ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ในยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อยา metronidazole พบการกลายพันธุ์แบบ missense, frameshift และ nonsense ทั้งหมด 78.6 เปอร์เซ็นต์, 32.1 เปอร์เซ็นต์ และ 10.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตำแหน่งที่พบมากที่สุดของกลายพันธุ์ของยีน *frxA* ที่ส่งผลกับการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนได้แก่ ตำแหน่งเบสที่ 215 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก T เป็น C ส่งผลทำให้กรดอะมิโนที่ 72 เปลี่ยนจาก Phe เป็น Ser พบสูงถึง 57.1 เปอร์เซ็นต์ และ ตำแหน่งเบสที่ 217 มีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น A ส่งผลทำให้กรดอะมิโนที่ 73 เปลี่ยนจาก Gly เป็น Ser พบสูงถึง 57.1 เปอร์เซ็นต์ และ รongมาพบการเปลี่ยนแปลงเบสตำแหน่งเบสที่ 577 จาก T เป็น A ส่งผลทำให้กรดอะมิโนที่ 193 เปลี่ยนจาก Cys เป็น Ser พบสูงถึง 53.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทั้ง 3 รูปแบบ พบสูงที่สุดในยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* จาก CLO test ที่ให้ผลบวก เช่นกัน ได้แก่ ตำแหน่งเบสที่ 217, 215 และ 577 คิดเป็น 57.1, 50 และ 42.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตำแหน่งการกลายพันธุ์ใหม่ที่พบเฉพาะในการวิจัยนี้ได้แก่ การกลายพันธุ์แบบ missense ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 1, 27, 35, 37, 39, 60, 65, 66, 67, 70, 94, 131, 154, 177, 200 และ 206 การกลายพันธุ์แบบ frameshift ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 109 และการกลายพันธุ์แบบ nonsense ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 30 ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถสรุปลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *frxA* มีสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ผ่านมา แต่จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การกลายพันธุ์ของยีน *frxA* อาจไม่ได้สัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole โดยตรง แต่พบว่ามีส่วนช่วยเพิ่มระดับ

การดื้อยา metronidazole ในเชื้อที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ร่วมด้วย [15, 75] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อที่ดื้อยา metronidazole 1 สายพันธุ์ ได้แก่ รหัส PT 12 มีลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RdxA เหมือนกับ เชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 แต่พบว่าเกิดการกลายพันธุ์แบบ nonsense ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 32 และเกิดการกลายพันธุ์แบบ missense ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 7 ของโปรตีน FrxA ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการดื้อยา metronidazole ของสายพันธุ์ดังกล่าว

การศึกษา phylogenetic tree เพื่อดูวิวัฒนาการ ความสัมพันธ์ของยีน *rdxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole จำนวน 34 ตัวอย่าง และ เชื้อ *H. pylori* จาก CLO test ที่ให้ผลบวก 30 ตัวอย่าง ในครั้งนี้ พบว่าเชื้อมีพันธุกรรมที่หลากหลายไม่สามารถจำแนกกลุ่มได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Solca และคณะ ในปี 2000 ที่วิเคราะห์ phylogenetic tree ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* จำนวน 30 สายพันธุ์ ทั้งที่ดื้อ และ ไว ต่อยา metronidazole พบว่า dendrogram มีการกระจายแบบสุ่ม และ ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ ที่ดื้อ และไวต่อยา metronidazole ได้ ทั้งนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *rdxA* อาจเกิดจากกลไก frequent recombination structure ของเชื้อ *H. pylori* เช่นเดียวกับกับ housekeeping ยีนทั้ง 4 (*atpD*, *scoB*, *glnA*, and *recA*) ที่ได้มีการศึกษาไว้ในงานวิจัยของคุณ Matteo [12]

การศึกษา phylogenetic tree เพื่อดูวิวัฒนาการ ความสัมพันธ์ของยีน *frxA* ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา Metronidazole จำนวน 28 ตัวอย่าง และ เชื้อ *H. pylori* จาก CLO test ที่ให้ผลบวก 14 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นการศึกษาแรก พบว่าเชื้อมีพันธุกรรมที่หลากหลายไม่สามารถจำแนกกลุ่มได้เช่นกัน

การศึกษาจีโนไทป์ (genotype) ของเชื้อจุลชีพต่างๆ มีความสำคัญทางระบาดวิทยาอย่างมาก เพื่อศึกษาลักษณะจีโนไทป์ของเชื้อว่ามีการแพร่ระบาดแบบไหน และมีความสัมพันธ์กับการดื้อยาชนิดต่างๆอย่างไร เพื่อนำไปพัฒนาการรักษาการติดเชื้อจุลชีพต่างๆ ให้ประสบความสำเร็จ ในปัจจุบันมี

การศึกษาระบาดวิทยาของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole พบได้อย่างแพร่หลาย โดยได้นำวิธีทางอณูชีววิทยาต่างๆมาใช้ วิธีทางอณูชีววิทยาที่พบมากที่สุดได้แก่ เทคนิค Sequencing ตัวอย่างเช่น การตรวจหาความสัมพันธ์ของการดื้อยา metronidazole กับการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* โดยใช้ PCR-RFLP และ Sequencing [77]

เทคนิค MAS-PCR เป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะ ความไว และความเร็วในการทดสอบสูง สามารถใช้งานกับเครื่อง basic thermal cycler ที่หาได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ และสามารถใช้ในการศึกษาการกลายพันธุ์ของเบสเดียว ในหลายตำแหน่งได้ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค MAS-PCR มาใช้ในงานอณูพันธุศาสตร์ การตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และศึกษาระบาดวิทยาในรูปแบบจีโนมไทป์ ของเชื้ออย่างแพร่หลาย ผลที่ได้แม่นยำ และสอดคล้องกับเทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้หาลำดับเบสของยีนในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อหายีนดื้อยาของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ที่มีตำแหน่งการกลายพันธุ์ของเบสดังนี้ *katG315*, *rpoB531*, *gyrA94* และ *rrs1401* ผลที่ได้สอดคล้อง 100 เปอร์เซ็นต์ กับ เทคนิค DNA sequencing [16], การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหา Multidrug-Resistant Tuberculosis ในปานามา เนื่องจากเชื้อ *M. tuberculosis* มียีนดื้อยาหลายตำแหน่งที่ต่างกันไป จึงมีการพัฒนา MAS-PCR มาตรวจหายีนดื้อยาในตำแหน่งต่างพร้อมกัน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค Sequencing พบว่ามีความไวและความจำเพาะสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ [66]

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนาเทคนิค MAS-PCR มาใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่พบได้สูงในเชื้อที่ดื้อยา metronidazole ซึ่งมีความจำเพาะ และความไวสูง รวมทั้งราคาไม่แพง ใช้เวลาในการทดสอบไม่มาก และสามารถทดสอบพร้อมๆกันได้หลายตัวอย่าง มาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ในการศึกษาาระบาดวิทยา (epidemiological) เพื่อ



ศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน กับการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *H. pylori* เพื่อพัฒนารักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดความสูญเสียทางด้านสุขภาพ เศรษฐกิจ ของประชากรในอนาคต

ในการศึกษานี้ได้พัฒนาเทคนิค MAS-PCR สำเร็จ 2 ชุดการทดสอบ ชุดแรกคือ พัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบสที่ 291 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 97) และ ชุดสองคือ พัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59) และ 392 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131)

การพัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบสที่ 291 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 97) ของเชื้อ *H. pylori* ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงถึง 46.1 เปอร์เซ็นต์ และสูงเป็นอันดับที่ 5 ของการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อที่ดื้อยา Metronidazole ใน การศึกษานี้ โดย AS-primers (AS97-R) ที่ถูกออกแบบขึ้นในการศึกษานี้ใช้ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 เป็นต้นแบบ ออกแบบด้าน 3' ของ oligonucleotide ให้เป็นเบส G ซึ่งเป็นคู่สมกับตำแหน่งเบส 291 (โคดอนที่ 97) ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 โดยออกแบบให้เป็นด้าน reward เพื่อให้ได้ผลผลิต MAS-PCR ที่มีขนาดต่างกันเมื่อทำงานร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยา ทำการทดสอบหาอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing และความเข้มข้นของ AS-primers (AS97-R) ที่เหมาะสมที่สุด ของปฏิกิริยา MAS-PCR พบว่าที่อุณหภูมิ Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส และ AS-primers (AS97-R) ความเข้มข้น 0.125 ไมโครโมลาร์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ได้ผลผลิต MAS-PCR ขนาด 886 และ 358 คู่เบส

พัฒนาเทคนิค MAS-PCR เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59) และ 392 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลาย

พันธุ์สูงสุด (94.1 เปอร์เซ็นต์) และสูงเป็นอันดับที่ 3 (85.3 เปอร์เซ็นต์) ของการกลายพันธุ์ที่พบในเชื้อที่ดื้อยา metronidazole โดยออกแบบ AS-primers ให้จำเพาะกับตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์สูงสุด 3 ตำแหน่งที่พบในเชื้อที่ดื้อยา metronidazole ได้แก่ ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59), ตำแหน่งเบสที่ 92 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 31) และ ตำแหน่งเบสที่ 392 (กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 131) โดยใช้ยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 เป็นต้นแบบ ออกแบบด้าน 3' ของ oligonucleotide ให้เป็นเบส G, C และ G ซึ่งเป็นคู่สมกับตำแหน่งเบสที่ 175, 92 และ 131 ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 ตามลำดับ โดยออกแบบให้เป็นด้าน forward เพื่อให้ได้ผลผลิต MAS-PCR ที่มีขนาดต่างกันเมื่อทำงานร่วมกับไพรเมอร์คู่หลักที่ใช้ในปฏิกิริยา ทำการทดสอบหาอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน ได้แก่ 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมขั้นตอน Annealing ใดที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ในตำแหน่งดังกล่าวได้ จึงได้ทดสอบอุณหภูมิในขั้นตอน Annealing ที่แตกต่างกัน 3 รอบของอุณหภูมิ พบว่าที่อุณหภูมิ 60, 64 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด การทดสอบหาความเข้มข้นของ AS-primers (AS131-F) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ให้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบสที่ 392 พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.1 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ AS-primers (AS59-F) เท่ากับ 0.2 ไมโครโมลาร์

สำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์ของเบสตำแหน่งที่ 91 และ 92 ของยีน *rdxA* นั้น ได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด คือ AS-primers (AS31-F) และ AS-primers (AS31-R) โดยนำมาทดสอบ PCR โดยกำหนดอุณหภูมิ Annealing ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 50, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส จากการทดสอบพบว่าไม่มีอุณหภูมิใดที่เหมาะสม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจหาการกลายพันธุ์บนยีน *rdxA* ที่ตำแหน่งเบสที่ 175 และ 392 ของ ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อ metronidazole ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ และ เชื้อ *H. pylori* ATCC 51932 ด้วยวิธี MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบกับ วิธี Sequencing ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ในปัจจุบัน พบว่าการกลายพันธุ์บนยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ สอดคล้องกับผลจากวิธี Sequencing 33 สายพันธุ์ คิดเป็น 94.3 เปอร์เซ็นต์ ดังนี้ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 คิดเป็น 2.9 เปอร์เซ็นต์ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 392 คิดเป็น 2.9 เปอร์เซ็นต์ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 แต่ไม่กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 392 คิดเป็น 14.3 เปอร์เซ็นต์ และ ดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 คิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ในการทดสอบนี้พบเพียง 2 สายพันธุ์ของดีเอ็นเอที่ยีน *rdxA* กลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ที่เทคนิค MAS-PCR ไม่สามารถตรวจวัดได้ เนื่องจากไม่พบผลผลิตของ MAS-PCR อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีปริมาณที่น้อยเกินไป และในปฏิกิริยา MAS-PCR จะใช้อุณหภูมิสูง อาจส่งผลต่อการทำงานในปฏิกิริยา MAS-PCR ได้ [78]

การตรวจหาการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* กับ ดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จาก CLO test ที่ให้ผลบวก 30 ตัวอย่าง ด้วยวิธี MAS-PCR พบว่าเกิด smear หนา และไม่พบผลผลิตของไพรเมอร์คู่หลักที่เป็นตัวควบคุมบวกในปฏิกิริยา เนื่องมาจากดีเอ็นเอของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จาก CLO test มีความเป็นต่างสูง มีดีเอ็นเอของเชื้อผสมอยู่น้อย อาจมีดีเอ็นเอที่มาจาก gastric biopsy ของคนรอบกวนปฏิกิริยา และในปฏิกิริยา MAS-PCR จะใช้อุณหภูมิสูง อาจส่งผลต่อการทำงานในปฏิกิริยา MAS-PCR ได้ [17, 78, 79]

เทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นนี้หวังอย่างยิ่งว่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการใช้ศึกษาระบาดวิทยา (epidemiological) หาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน กับการดื้อยา metronidazole ในเชื้อ *H. pylori* และการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาในอนาคต เพื่ออำนวยความสะดวกในการจำแนกสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อ *H. pylori* และการคาดการณ์ของ ความไวต่อยาปฏิชีวนะ เพื่อการป้องกันและ ฝ้าระวัง สุขภาพของประชากรต่อไป



## บทที่ 6

### สรุปผลการทดลอง

การศึกษารุ่นนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole จำนวน 34 ตัวอย่าง และเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO test จำนวน 30 ตัวอย่าง รวมทั้งพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะ และความไวสูง ราคาไม่แพง ใช้เวลาในการทดสอบไม่มาก และสามารถทดสอบพร้อมกันได้หลายตัวอย่าง มาตรฐานการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ที่พบได้สูงสุดในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาระบาดวิทยา (epidemiological) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* กับการดื้อยา metronidazole เพื่อพัฒนารักษาการติดเชื้อ *H. pylori* ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดความสูญเสียทางด้านสุขภาพ เศรษฐกิจ ของประชากรในอนาคต

การศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่พบในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole และ เชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO test พบว่ามีการกลายพันธุ์แตกต่างกันออกไป ในหลายตำแหน่ง รูปแบบการกลายพันธุ์มีทั้งแบบ missence, frameshift และ nonsense ในการวิเคราะห์ phylogenetic ของเชื้อ *H. pylori* พบว่าเชื้อมีความหลากหลายของยีน *rdxA* และ *frxA* ที่ต่างกันไป ไม่สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ที่ชัดเจน

การศึกษารุ่นนี้ได้พัฒนาเทคนิค MAS-PCR มาตรฐานการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* ทั้งหมด 2 ชุดทดสอบ ได้แก่ MAS-PCR ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 291 และ MAS-PCR ที่ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบการกลายพันธุ์สูงที่สุด

และสูงเป็นอันดับที่ 3 ในเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole โดยออกแบบด้าน 3' ของไพรเมอร์ที่เป็น AS-primer ให้มีเบสเหมือนกับเชื้อที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ในปฏิกิริยา MAS-PCR จากนั้นนำเทคนิค MAS-PCR ที่พัฒนาขึ้นมาตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 175 และ 392 ของยีน *rdxA* กับเชื้อ *H. pylori* ทั้งหมด 35 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลตรงกับเทคนิค Sequencing ซึ่งเป็นเทคนิคมาตรฐานที่ใช้ในปัจจุบันสูงถึง 94.3 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อ *H. pylori* ที่มาจากสิ่งส่งตรวจ CLO test พบว่าไม่สามารถอ่านผลได้ เนื่องจากไม่พบผลผลิตในตำแหน่งที่คาดหวัง

การศึกษาที่น่าจะทำในอนาคตคือ ศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ของยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อที่ไวต่อยา metronidazole มาเปรียบเทียบ รวมทั้งศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ตำแหน่งต่างๆ ที่พบในเชื้อที่ดื้อยาว่ามีความสัมพันธ์กับการดื้อยา metronidazole หรือไม่ รวมทั้งพัฒนาเทคนิค MAS-PCR ให้ใช้ตรวจหาการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆ เพิ่มขึ้น และพัฒนาให้สามารถใช้ได้กับเชื้อ *H. pylori* ที่มาจากสิ่งส่งตรวจ CLO test หรือสิ่งส่งตรวจอื่นๆ

## รายการอ้างอิง

1. Kusters, J.G. and Van Vliet, A.H.M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Clinical Microbiology Reviews 19(3) (2006): 449-490.
2. Sachs, G. and Scott, D.R. *Helicobacter pylori*: Eradication or Preservation. Medicine Reports 4 (2012): 7.
3. Uchida, T., Miftahussurur, M., et al. *Helicobacter pylori* Infection in Thailand: A Nationwide Study of the CagA Phenotype. PLOS One 10(9) (2015): e0136775.
4. Thong-Ngam, D., Tangkijvanich, P., et al. Current status of gastric cancer in Thai patients. Journal of the Medical Association of Thailand 84(4) (2001): 475-482.
5. Van Der Wouden, E.J., Thijs, J.C., et al. Mechanism and clinical significance of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Scandinavian Journal of Gastroenterology 234 (2001): 10-14.
6. De Francesco, V., Giorgio, F., et al. Worldwide *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: a systematic review. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases 19(4) (2010): 409-414.
7. สมาคมแพทย์ระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย. แนวทางเวชปฏิบัติในการวินิจฉัย และรักษาผู้ป่วยดิสเปปเซีย (Dyspepsia) และผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อเฮลิโคแบคเตอร์ ไพโลไร (*Helicobacter pylori*) ในประเทศไทย. จุลสารสมาคมแพทย์ระบบทางเดินอาหารแห่งประเทศไทย (2010): 22-40.
8. Coudron, P.E. and Stratton, C.W. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. Journal of Clinical Microbiology 33(4) (1995): 1028-1030.
9. Boyanova, L. Comparative evaluation of two methods for testing metronidazole susceptibility of *Helicobacter pylori* in routine practice. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 35(1) (1999): 33-36.

10. Bereswill, S., Krainick, C., et al. Analysis of the *rdxA* gene in high-level metronidazole-resistant clinical isolates confirms a limited use of *rdxA* mutations as a marker for prediction of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 36(3) (2003): 193-198.
11. Martinez-Julvez, M., Rojas, A.L., et al. Structure of RdxA--an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *Helicobacter pylori*. The FEBS Journal 279(23) (2012): 4306-4317.
12. Matteo, M.J., Perez, C.V., et al. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with heteroresistance. International Journal of Antimicrobial Agents 27(2) (2006): 152-158.
13. Mohammadi, M., Doroud, D., et al. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Iran. World Journal of Gastroenterology 11(38) (2005): 6009-6013.
14. Debets-Ossenkopp, Y.J., Pot, R.G., et al. Insertion of *mini-IS605* and deletion of adjacent sequences in the *nitroreductase (rdxA)* gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCTC11637. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(11) (1999): 2657-2662.
15. Yang, Y.J., Wu, J.J., et al. The *rdxA* gene plays a more major role than *frxA* gene mutation in high-level metronidazole resistance of *Helicobacter pylori* in Taiwan. Helicobacter 9(5) (2004): 400-407.
16. Vadwai, V., Shetty, A., and Rodrigues, C. Multiplex allele specific PCR for rapid detection of extensively drug resistant tuberculosis. Tuberculosis 92(3) (2012): 236-242.
17. Champathai, T., Chaichanawongsaroj, N. Detection of A2143G mutation in 23S *rRNA* gene associated with clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* by Loop mediated isothermal amplification. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 6(11) (2014): 148-155.



18. Andersen, L.P. and Rasmussen, L. *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation. FEMS Immunology and Medical Microbiology 56(2) (2009): 112-115.
19. Stark, R.M., Gerwig, G.J., et al. Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. Letters in Applied Microbiology 28(2) (1999): 121-126.
20. Marshall, B.J. and Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1(8390) (1984): 1311-1315.
21. Dorrell, N., Crabtree J.E., and Wren B.W.. Host-bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Trends in Microbiology 6(10) (1998): 379-382.
22. Goodwin, K.D., Wheeler J., et al. Production of bromoform and dibromomethane by Giant Kelp: Factors affecting release and comparison to anthropogenic bromine sources. California Institute of Technology, Environmental Engineering Science 42 (1997), 1725-1734.
23. Bytzer, P., Dahlerup, J.F., et al. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection. Danish Medical Association 58(4) (2011): C4271.
24. Butcher, G.P. Gastroenterology. Elsevier Health Sciences (2003): 25.
25. Ryan, K. Sherris Medical Microbiology. McGraw-Hill (2010): 573-576.
26. Warren JR, M.B., Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. The Lancet 1(8336) (1983): 1273-1275.
27. Blaser, M.J. and Atherton, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. Journal of Clinical Investigation, 113(3) (2004): 321-333.
28. Schubert, M.L. and Peura, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. Gastroenterology 134(7) (2008): 1842-1860.
29. Brown, L.M. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiologic Reviews 22(2) (2000): 283-297.

30. Yamaoka, Y., Kato, M. and Asaka, M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. Internal Medicine Journal 47(12) (2008): 1077-1083.
31. Pounder, R.E. and Ng, D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 9 (1995): 33-39.
32. Rosenberg, J.J. *Helicobacter pylori*. Pediatrics in Review 31(2) (2010): 85-86.
33. Rajindrajith, S., Devanarayana, N.M. and de Silva, H.J. *Helicobacter Pylori* Infection in Children. Saudi Journal of Gastroenterology 15(2) (2009): 86-94.
34. Eusebi, L.H., Zagari, R.M. and Bazzoli, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter, 19 (2014): 1-5.
35. Shi, R., Xu, S., et al. Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in Chinese populations. Helicobacter, 13(2) (2008): 157-165.
36. Hirayama, Y., Kawai, T., et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection with healthy subjects in Japan. Journal of Gastroenterology and Hepatology (29) (2014): 16-19.
37. Nguyen, T.L., Uchida, T., et al., *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases in Vietnam: a cross-sectional, hospital-based study. BMC Gastroenterology 10 (2010): 114.
38. Vilaichone, M.V.A.R., Current status of *helicobater pylori* infection in Thailand. Helicobacter Research 15 (2011): 15.
39. Laine, L., Lewin, D.N., et al. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. Gastrointestinal Endoscopy 45(6) (1997): 463-467.
40. Fallone, C.A., Loo, V.G., et al. Hematoxylin and eosin staining of gastric tissue for the detection of *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2(1) (1997): 32-35.

41. MS, C. Comparative analysis of histochemical stains about detection of *H. pylori* in gastric mucosa. Korean Journal of Clinical Laboratory Science 39 (2007): 223-230.
42. Vaira, D., Vakil, N., et al. Accuracy of a new ultrafast rapid urease test to diagnose *Helicobacter pylori* infection in 1000 consecutive dyspeptic patients. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 31(2) (2010): 331-338.
43. Braden, B. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. British Medical Journal 344 (2012):e828.
44. Lage, A.P., Godfroid, E., et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. Journal of Clinical Microbiology 33(10) (1995): 2752-2756.
45. Rimbara, E., Sasatsu, M. and Graham, D.Y. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. Methods in Molecular Biology 943 (2013): 279-287.
46. Nishizawa, T., Suzuki, H., et al. Proton pump inhibitor-amoxicillin-clarithromycin versus proton pump inhibitor-amoxicillin-metronidazole as first-line *Helicobacter pylori* eradication therapy. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 51(2) (2012): 114-116.
47. Jaime N.E., Tomás, N.R., et al. Standard Triple Therapy versus Sequential Therapy in *Helicobacter pylori* Eradication: A Double-Blind, Randomized, and Controlled Trial. Gastroenterology Research and Practice 2015 (2015): 818043.
48. Urgesi, R., Cianci, R., and Riccioni, M.E. Update on triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*: current status of the art. Clinical and Experimental Gastroenterology 5 (2012): 151-157.
49. Behnam, D. Metronidazole. Monograph Development-Antivirals and Antimicrobials 29(6) (2007):1933
50. Jie Jack Li, E.J.C. Drug Discovery: Practices, Processes, and Perspectives. John Wiley & Sons (2013): 27.

51. Lindmark, D.G. and Müller, M. Antitrichomonad Action, Mutagenicity, and Reduction of Metronidazole and Other Nitroimidazoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 10(3) (1976): 476-482.
52. Rossi, S. Australian Medicines Handbook. The Australian Medicines Handbook Unit Trust (2013): 90-93.
53. Kim, N., Kim, J. M., et al. Institutional difference of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Korea. Journal of Clinical Gastroenterology 40(8) (2006): 683-687.
54. Vaira, D., Zullo, A., et al. Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a randomized trial. Annals of Internal Medicine 146(8) (2007): 556-563.
55. Van Der Wouden, E.J., Thijs, J. C., et al. The influence of in vitro nitroimidazole resistance on the efficacy of nitroimidazole-containing anti-*Helicobacter pylori* regimens: a meta-analysis. The American Journal of Gastroenterology 94(7) (1999): 1751-1759.
56. Lubber, P., Bartelt, E., et al. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Clinical Microbiology 41(3) (2003): 1062-1068.
57. Tomb, J.F., White, O., et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 388(6642) (1997): 539-547.
58. Momynaliev, K., Chelysheva, V., et al. Complete Genome Sequences of *Helicobacter pylori* Rifampin-Resistant Strains. Genome Announcements, 1(4) (2013): e00446-13.
59. Jeong, J.Y., Mukhopadhyay, A.K., et al. Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. Journal of Bacteriology 183(17) (2001): 5155-5162.

60. Solcà, N.M., Bernasconi, M.V. and Piffaretti, J.C. Mechanism of Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori*: Comparison of the *rdxA* Gene Sequences in 30 Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44(8) (2000): 2207-2210.
61. Masaoka, T., Suzuki, H., et al. Could frameshift mutations in the *frxA* and *rdxA* genes of *Helicobacter pylori* be a marker for metronidazole resistance. Alimentary Pharmacology & Therapeutics 24 (2007): 81-87.
62. Tankovic, J., Lamarque, D., et al. Frequent Association between Alteration of the *rdxA* Gene and Metronidazole Resistance in French and North African Isolates of *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44(3) (2000): 608-613.
63. Kwon, D.H., Hulten, K., et al. DNA Sequence Analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 Pairs of Metronidazole-Sensitive and -Resistant Clinical *Helicobacter pylori* Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(9) (2001): 2609-2615.
64. Chisholm, S.A. and Owen, R.J. Frameshift mutations in *frxA* occur frequently and do not provide a reliable marker for metronidazole resistance in UK isolates of *Helicobacter pylori*. Journal of Medical Microbiology 53(Pt2) (2004): 135-140.
65. Chisholm, S.A. and Owen, R.J. Mutations in *Helicobacter pylori rdxA* gene sequences may not contribute to metronidazole resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51(4) (2003): 995-999.
66. Chia, B.S., Lanzas, F., et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multidrug-resistant tuberculosis in Panama. PLOS One 7(7) (2012): e40456.
67. Evans, J. and Segal, H. Novel multiplex allele-specific PCR assays for the detection of resistance to second-line drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65(5) (2010): 897-900.
68. Zhu, D., Muramatsu, M., et al., Methods and compositions for treating or preventing bacterial infection. United States Patent (2004): B2

69. Megraud, F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 53(9) (2004): 1374-1384.
70. Mirzaei, N., Poursina, F., et al. The mutation of the *rdxA* gene in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. Advanced Biomedical Research 3 (2014): 90.
71. Jeong, J.Y., Mukhopadhyay, A.K., et al. Sequential Inactivation of *rdxA* (HP0954) and *frxA* (HP0642) Nitroreductase Genes Causes Moderate and High-Level Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori*. Journal of Bacteriology 182(18) (2000): 5082-5090.
72. Paul, R. Mutations of the *Helicobacter pylori* Genes *rdxA* and *pbp1* Cause Resistance against Metronidazole and Amoxicillin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(3) (2001): 962-965.
73. Han, F., Liu, S., and et al. Alterations in *rdxA* and *frxA* genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* isolates. Research in Microbiology 158(1) (2007): 38-44.
74. Kwon, D.H., El-Zaatari, F.A., and et al., Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44(8) (2000): 2133-2142.
75. Binh, T.T., Suzuki, R., et al. Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* using next-generation sequencing. Antimicrob Agents Chemother, 59(4) (2015): 2343-2348.
76. Hamid A. A study of *rdxA* gene deletion in metronidazole resistant and sensitive *Helicobacter pylori* isolates in Kerman, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 4(2) (2011): 99-104.
77. Owen, R.J. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Gut 50(3) (2002): 285-289.

78. Linda, M. M.M., Richard, N. M. Pathobiology of Human Disease bridges traditional morphologic and clinical pathology. Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms. 1 (2014): 4069.
79. Mattar, R. and Laudanna, A.A. *Helicobacter pylori* genotyping from positive CLO tests in patients with duodenal ulcer. Revista do Hospital das Clínicas 55(5) (2000): 155-160.



## ภาคผนวก

### 1. วิธีเตรียม Tris EDTA บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10x TE buffer)

ผสม Tris-HCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เข้ากับ EDTA ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 197.6 มิลลิลิตร

### 2. วิธีเตรียม tryptic soy broth

ชั่ง tryptic soy broth ปริมาณ 6 กรัม เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตรนำมาต้มจนเดือดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดใส่หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร ปิดฝาและนำไป autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 3. การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *rdxA* และ *frxA*

วิเคราะห์การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ได้โดยเปรียบเทียบตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสกับ ยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695 พบว่าเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole มีการกลายพันธุ์ที่หลากหลายรูปแบบ ดังตารางที่ 15 และ 17 ตามลำดับ และมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนดังตารางที่ 16 และ 18 ตามลำดับ วิเคราะห์การกลายพันธุ์ยีน *rdxA* และ *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO test พบการกลายพันธุ์ที่หลากหลายรูปแบบ ดังตารางที่ 19 และ 21 ตามลำดับ และมีอัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนดังตารางที่ 20 และ 22 ตามลำดับ







ตารางที่ 16 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

<i>rdxA</i> gene		Number of Mtz-resistant <i>H. pylori</i> (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
G(175)→A	Asp(59) → Asn	94.1
AC(91,92)→GA	Thr(31)→Glu	88.2
G(392)→A	Arg(131)→Lys	85.3
A(614)→C	Asp(205)→Ala	50
G(610)→A	Val(204)→Ile	50
A(192)→T	Lys(64)→Asn	47.1
CAC(289,290,291)→ACG	His(97)→Thr	47.1
G(514)→A	Val(172)→Ile	44.1
G(292)→A	Gly(98)→Ser	38.2
A(158)→G	His(53)→Arg	35.3
C(316)→T	Pro(106)→Ser	29.4
T(262)→C	Ser(88)→Pro	23.5
CC(316,317)→TT	Pro(106)→Leu	20.6
G(616)→A	Ala(206)→Thr	17.6
T(184)→G	Leu(62)→Val	17.6
C(203)→T	Ala(68→Val),	14.7
G(47)→A	Arg(16)→His	11.8
C(316)→A	Pro(106)→Thr	8.8
T(332)→C	Val(111)→Ala	8.8
C(46)→T	Arg(16)→Cys	8.8

<i>rdxA</i> gene		Number of Mtz-resistant <i>H. pylori</i> (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
G(202)→A	Ala(68)→Ser	8.8
G(269)→A	Arg(90)→Lys	5.9
G(352)→A	Ser(118)→Ala	5.9
G(523)→C	Glu(175)→Gln	5.9
CC(271,273)→TT	Pro(91)→Ser	5.9
G(3)→A	Met(1)→Ile	2.9
T(11)→G	Leu(4)→Trp	2.9
A(30)→T	Arg(10)→Ser	2.9
G(19)→A	Glu(7)→Lys	2.9
A(61)→G	A(61)→Gly	2.9
G(79)→A	Glu(27)→Lys	2.9
G(109)→T	Ala(37)→Ser	2.9
GG(122,123)→AA	Arg(41)→Lys	2.9
G(202)→T	Ala(68)→Ser	2.9
A(221)→G	Glu(74)→Gly	2.9
G(236)→A	Ser(79)→Asn	2.9
G(238)→A	Ala(80)→Thr	2.9
C(276)→G	Ser(92)→Arg	2.9
C(289)→T	His(97)→Tyr	2.9
CC(310,312)→TT	Leu(104)→Phe	2.9
G(337)→A	Val(113)→Met	2.9
C(344)→T	Pro(115)→Leu	2.9
C(347)→T	Ser(116)→Phe	2.9

<i>rdxA</i> gene		Number of Mtz-resistant <i>H. pylori</i> (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
G(448)→A	Gly(163)→Asp	2.9
G(527)→A	Arg(176)→His	2.9
A(536)→G	Lys(179)→Arg	2.9
C(538)→T	Pro(180)→Ser	2.9
G(547)→A	Ala(183)→Thr	2.9
G(577)→A	Ala(193)→Thr	2.9
AA(608,609)→GG	Lys(203)→Arg	2.9
<b>Frame shift</b>		
Deletion T(11)	Leu(4) →Frame shift	2.9
Insertion GGATCA(18)	Gln (6) →Frame shift	2.9
Deletion A(25)	Arg(9) →Frame shift	2.9
Insertion A(25)	Arg(9) →Frame shift	2.9
Insertion T(212)	Tyr(71) →Frame shift	2.9
Insertion G(214)	Phe(72) →Frame shift	2.9
Deletion A(235)	Ser (79) →Frame shift	2.9
Deletion A(544)	Ile (182) →Frame shift	2.9
<b>Nonsense</b>		
A→T(4)	Lys(2)→ Stop codon	2.9
C→T(148)	Gln(50)→ Stop codon	2.9
G→A(156)	W(52)→ Stop codon	2.9



	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	
26695	A	T	T	C	T	A	G	G	T	T	C	G
AY9	C											
AY22	C			G	A				C			
AY61	G		G	T	G	A		C				
AY67	C					T						
BG25	C											
BM31	G											
BM32	G											
BM33	G											
BM34	G											
BM35	G											
EM45	G		G	T	G			C		A		
EM61	C				G				C			
MS248	C											
MS251	C											
PT12	C											
PT14	C	A			T	T	G	C	G	A		
PT15	C											
PT19	C											
PT32	C				G				C			
PT34	C				A					A		
PT45	C											
PT54	C											
PT66	G		G	T	G		T	G		C	A	
PT70	C											
PT96	C											
Y121	C									C		
Y127	C				G					C		
Y263	C					T				C		

	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
26695	G	A	C	A	T	G	A	T	G	C	G
AY9							A				
AY22									A		
AY61									A		A
AY67		C		C							
BG25		T		C						G	
BM31		A		C					A	G	
BM32		A		C					A	G	
BM33		A		C					A	G	
BM34		A		C					A	G	
BM35		A		C					A	G	
EM45									A		A
EM61											
MS248				C							T
MS251											
PT12				C							T
PT14										A	
PT15				C							
PT19											
PT32											
PT34						A	G				
PT45											
PT54				C					A	G	A
PT66									A		A
PT70				C						G	
PT96				C						G	A
Y121									A		
Y127											
Y263		A									

	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
26695	C	G	G	A	A	T	T	G	G	T
AY9		A	A			C				
AY22		G	A		A					
AY61		G	A		A			A		
AY67										
BG25		G	A		A					
BM31		G	A		A		T			
BM32		G	A		A		T			
BM33		G	A		A		T			
BM34		G	A		A		T			
BM35		G	A		A		T			
EM45		G	A		A		C	T		T
EM61		G	A		A				A	
MS248									A	
MS251		A	A							
PT12									A	
PT14	A					C	T			
PT15										
PT19									A	
PT32				A					A	
PT34										
PT45										
PT54										
PT66		G	A		A					
PT70										
PT96										C
Y121		G	A		A					C
Y127		G	A		A					C
Y263		G	A		A					C

ตารางที่ 18 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ดื้อต่อยา metronidazole เปรียบเทียบกับ เชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

<i>frxA</i> gene		Number of Mtz-resistant <i>H. pylori</i> (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
T(215)→C	Phe(72) → Ser	57.1
G(217)→A	Gly (73)→ Ser	57.1
T(577)→A	Cys(193) → Ser	53.6
V(7)→I	Gly (19) →Ala	42.9
GA(46,48) →AG	Ala(16)→Thr	35.7
G(526)→A	Glu(176)→Lys	35.7
A(130)→G	Ile(44) →Val	28.6
A(331)→G	Asn(111)→Asp	28.6
A(371)→G	Asn(124)→ Ser	25
G(198)→T	Met(66) →Ile	21.4
G(286)→A	Val(96)→Ile	17.9
A(331)→C	Asn(111)→His	17.9
A(130)→T	Ile(44) →Phe	10.7
C(209)→T	Ala(70) →Val	10.7
C(351)→G	Ile(117)→Met	10.7
T(127) →G	Ser(43) →Ala	7.1
M(1) →V	Ala(1) → Gly	3.6
A(81) →C	Gln(27) →His	3.6
G(100) →A	Val(34)→Ile	3.6
A(105) →C	Gly(35)→Asp	3.6



<i>frxA</i> gene		Number of Mtz-resistant <i>H. pylori</i> (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
GG(109,111) →TC	Gly (37) →Cys	3.6
A(117) →C	Leu(39) →Phe	3.6
GC(118,119) →CA	Ala(40) →His	3.6
A(179)→G	Lys(60)→Arg	3.6
C(193)→T	Pro(65) → Ser	3.6
C(194)→A	Pro(65) →Gln	3.6
C(200)→T	Ala(67)→Val	3.6
A(281)→G	Asp(94) → Gly	3.6
G(378)→A	Met(126) →Ile	3.6
A(386)→C	Asn (129) →Thr	3.6
G(389)→A	Ser(130) → Asn	3.6
AG(388,389)→GA	Ser(130)→Asp	3.6
G(392)→A	Gly(131)→ Gly	3.6
C(461)→T	Ala(154) →Val	3.6
G(505)→A	Glu(169) → Lys	3.6
G(528)→A	Glu (177) → Lys	3.6
G(598)→A	Glu (200) →Lys	3.6
G(617)→T	Arg(206) →Leu	3.6
G(624)→T	Cys(208)→Asn	3.6
<b>Frame shift</b>		
Insertion A(317)	Asp(109)	21.4
Deletion A(54)	Lys(18)	10.7

<i>frxA</i> gene		Number of Mtz-resistant <i>H. pylori</i> (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Nonsense</b>		
G(89) → A	Trp (30) → Stop codon	3.6
G(203) → A	Trp(68) → Stop codon	3.6
C(394) → T	Arg(132) → Stop codon	3.6





```

26695 ATGCAAAATCICATCCGGAGCTTATAAAGITAGAGTATCCCCCTTTTIGCTCAAATGCTTGGCGTGAGATTCAACCACAGCATGCAAAGATTAGAAAGCTATATTTT
1BR .....
1CR .....
2BR .....
2CR .....
3BR .....
3CR .....
4BR .....
4CR .....
5BR .....
5CR .....
6BR .....
6CR .....
10 .....
15B .....
15B .....
28B .....
29B .....
30B .....
301 .....
302 .....
303 .....
304 .....
305 .....
306 .....
307 .....
308 .....
309 .....
310 .....
311 .....
312 .....
313 .....
314 .....
315 .....
316 .....
26695 AGACCAATGCTATATCCGCTGTGGGGCAAATTTGCATGGCGTGAGCTTAAATGGGATGGATAGTTGCATTATGGAGGCTTTGATCCTTTAAAGTTGGCCGAAGTTTAG
1BR .....
1CR .....
2BR .....
2CR .....
3BR .....
3CR .....
4BR .....
4CR .....
5BR .....
5CR .....
6BR .....
6CR .....
10 .....
15B .....
15B .....
28B .....
29B .....
30B .....
301 .....
302 .....
303 .....
304 .....
305 .....
306 .....
307 .....
308 .....
309 .....
310 .....
311 .....
312 .....
313 .....
314 .....
315 .....
316 .....
26695 AAGAGCGTATCAATAAGCCTAAAATCGCATGCTTGTATCGCTTTGGGCAAGAGGGTGGCAGAGCGAGTCAAAAATCAAGAAAATCAAAGTTGATGGCATTACTTGGTTGTGA
1BR .....
1CR .....
2BR .....
2CR .....
3BR .....
3CR .....
4BR .....
4CR .....
5BR .....
5CR .....
6BR .....
6CR .....
10 .....
15B .....
15B .....
28B .....
29B .....
30B .....
301 .....
302 .....
303 .....
304 .....
305 .....
306 .....
307 .....
308 .....
309 .....
310 .....
311 .....
312 .....
313 .....
314 .....
315 .....
316 .....

```

ตารางที่ 20 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน *rdxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับ เชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

<i>rdxA</i> gene		Number of positive CLO test samples (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
G(175)→A	Asp(59) → Asn	96.7
AC(91,92)→GA	Thr(31)→Glu	80
G(392)→A	Arg(131)→Lys	76.7
G(42)→C	Asn(14) →Lys	46.7
G(168)→A	Met(56) →Ile	43.3
G(29)→A	Arg(10) →Lys	36.7
A(106)→G	Ile(36) →Val	36.7
A(192)→T	Lys(64)→Asn	36.7
G(514)→A	Val(172)→Ile	33.3
A(614)→C	Asp(205)→Ala	33.3
A(17)→G	Gln(6) →Arg	26.7
G(616)→A	Ala(206)→Thr	26.7
G(269)→A	Arg(90)→Lys	23.3
G(610)→A	Val(204)→Ile	23.3
CAC(289,290,291)→ACG	His(97)→Thr,	20
G(292)→A	Gly(98)→Ser	20
A(158)→G	His(53)→Arg	16.7
T(262)→C	Ser(88)→Pro	16.7
G(19)→A	Glu(7) →Lys	10

<i>rdxA</i> gene		Number of positive CLO test samples (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
C(203)→T	Ala(68)→Val	10
CC(316,317)→TT	Pro(106)→Leu	10
C(316)→T	Pro(106)→Ser	10
C(548)→T	Ala(183) →Ver	10
C(60)→G	Lys(20) →Gly	6.7
AT(106,107)→GA	Ile(36) →Asp	6.7
T(184)→G	Leu(62)→Val	6.7
C(316)→A	Pro(106)→Thr	6.7
A(18)→C	Gln(6) →His	3.3
A(21)→C	Glu(7) →Asp	3.3
A(24)→C	Lys (8) →Asn	3.3
AA(22,24)→CC	Lys 8)→His	3.3
AAA(22,23,24)→CTC	Lys(8) →Leu	3.3
AG(28,29)→CA	Rrg(10) →Gln	3.3
A(77)→G	Yyr(26) →Cys	3.3
G(89)→A	Ser(30) →Asn	3.3
C(117)→T	Glu(38) →Asp	3.3
CG(114,145)→TA	Thr(49) →Ile	3.3
C(152)→A	Pro(51) →Gln	3.3
CC(271,273)→TT	Pro(91)→Ser	3.3

<i>rdxA</i> gene		Number of positive CLO test samples (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
C(289)→T	His(97)→Tyr	3.3
AT(308,309)→CG	Asn(103) →Ser	3.3
C(316)→G	Pro(106) →Ala	3.3
T(332)→C	Val(111)→Ala	3.3
G(352)→A	Ser(118)→Ala	3.3
G(367)→A	Val(123) →Met	3.3
G(427,429)→T	Ala(143) →Thr	3.3
T(479)→G	Ile(160) →Ser	3.3
G(514,516)→T	Val(172) →Met	3.3
G(525)→A	Glu(175) →Lys	3.3
G(523)→C	Glu(175)→Gln	3.3
G(547)→A	Ala(183)→Thr	3.3
<b>Frame shift</b>		
Deletion A(19)	Glu(7) →Frame shift	3.3
<b>Nonsense</b>		
GA→TG(19,21)	Glu(7) → Stop codon	3.3
G→T(94)	Glu(32) → Stop codon	3.3

ตารางที่ 21 ลำดับเบสยีน *frxA* ของเชื้อ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests

เปรียบเทียบกับเชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	
.26695	ATGGACAGAGAACAAGTGGTTGCTTTACAGCACCAACGATTTCGTGCAAAAAATACGATCCCTAATCGTCGTATTTCCCAAAAGGATGGGAAGCTTTGGTTGAAGTGGG											
1CR	.....											
2BR	.....											
3BR	.....											
6BR	.....											
10	.....											
15B	.....											
28B	.....											
29B	.....											
30B	.....											
301	.....											
305	.....											
308	.....											
309	.....											
314	.....											
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	
.26695	GAGATTAGCCCCCTTCTTCAATCGGGCTTGAACCATGGAAAATGCTTTTATTGAAAAATGAACGCATGAAAGAAGATTTAAAACCGATGGCCTGGGGGGCGCTTTTGGTT											
1CR	.....											
2BR	.....											
3BR	.....											
6BR	.....											
10	.....											
15B	.....											
28B	.....											
29B	.....											
30B	.....											
301	.....											
305	.....											
308	.....											
309	.....											
314	.....											
	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	
.26695	TGGAGGGAGCGAGCCATTTTGTGTCATTTCTTTCGCGGAAAAGGCGTTACTTAIGACAGCGATTACGTTAAAAAGTGATGCATGAGGTTAAAAAAGGGATTATGACACT											
1CR	.....											
2BR	.....											
3BR	.....											
6BR	.....											
10	.....											
15B	.....											
28B	.....											
29B	.....											
30B	.....											
301	.....											
305	.....											
308	.....											
309	.....											
314	.....											
	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	
.26695	AATTCATAGGTTTCGCTCAATCATCAAAAATTTCCAGAGAACGATATGAAACTCAATAGCGAAGCATCTTTGTTGATTGGGCTAGCAAGCAGACTTATATCCAAATGGC											
1CR	.....											
2BR	.....											
3BR	.....											
6BR	.....											
10	.....											
15B	.....											
28B	.....											
29B	.....											
30B	.....											
301	.....											
305	.....											
308	.....											
309	.....											
314	.....											
	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	
.26695	GAACATGATGATGGCAGCGGCCATGTTAGGGATTGATTCITGGCCGATTGAAGGGTATGATCAAGAAAAAGTGGAGGCTTATTAGAGGAAAAAGGCTATCTGAACACGG											
1CR	.....											
2BR	.....											
3BR	.....											
6BR	.....											
10	.....											
15B	.....											
28B	.....											
29B	.....											
30B	.....											
301	.....											
305	.....											
308	.....											
309	.....											
314	.....											
	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650		
.26695	CGGAATTTGGCGTTCGGTAATGGCTTTGTTTGGTTATCGTAACCAAGAAATCACCCCTAAAACCCGCTGGGAGACAGAAGTTATTTAGAGTGAATGAATAA											
1CR	.....											
2BR	.....											
3BR	.....											
6BR	.....											
10	.....											
15B	.....											
28B	.....											
29B	.....											
30B	.....											
301	.....											
305	.....											
308	.....											
309	.....											
314	.....											



ตารางที่ 22 อัตราการกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในยีน *frxA* ของ *H. pylori* ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจ CLO tests เปรียบเทียบกับ เชื้อ *H. pylori* ATCC 26695

<i>frxA</i> gene		Number of positive CLO test samples (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
G(217)→A	Gly(73)→Ser	57.1
T(215)→C	Phe(72)→ Ser	50
GA(46,48) →AG	Ala(16)→Thr	42.9
T(577)→A	Cys(193)→ Ser	42.9
G(19)→A	Val(7) →Ile	35.7
A(130)→G	Ile(44) →Val	35.7
A(371)→G	Asn (124)→ Ser	35.7
C(351)→G	Ile(117)→Met	21.4
G(526)→A	Glu(176)→Lys	21.4
T(127) →G	Ser (43) →Ala	14.3
A(130)→T	Ile(44) →Phe	14.3
G(286)→A	Val(96)→Ile	14.3
G(286)→A	Val(96)→Ile	14.3
A(331)→G	Asn(111)→Asp	14.3
GG(457,459)→TA	Ala(153)→ Ser	14.3
A(14)→G	Gln (5)→Arg	7.1
A(81) →C	Gln(27) →His	7.1
C(200)→T	Ala(67)→Val	7.1
T(202)→G	Trp(68)→ Gly	7.1

<i>frxA</i> gene		Number of positive CLO test samples (%)
Change in nucleotide sequence	Change in amino acid sequence	
<b>Missense</b>		
TT(214,215)→CC	Phe(72)→Pro	7.1
A(259)→G	Lys(87)→Glu	7.1
TC(283,285)→AT	Tyr (95)→Asn	7.1
TC(283,285)→GT	Tyr(95)→Asp	7.1
G(286)→T	Val(96)→Phe	7.1
T(303)→G	His(101)→Gln	7.1
A(331)→C	Asn(111)→His	7.1
AAA(355-357)→TCC	Lys(119)→ Ser	7.1
A(365)→T	Gln(122)→Leu	7.1
A(386)→C	Asn(129)→Thr	7.1
AG(388,389)→GA	Ser (130)→Asp	7.1
G(392)→A	Glu(131)→ Gly	7.1
A(434)→C	Gln(145)→Pro	7.1
T(466)→A	Leu(156)→Ile	7.1
T(489)→G	Ile(163)→Met	7.1
G(564)→A	Cys(188)→ Ser	7.1
<b>Frame shift</b>		
Insertion A(131)	Ile(44) →Frame shift	7.1
<b>Nonsense</b>		
C(394)→T	Arg(132) → Stop codon	7.1

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ถิรพิทย์ บุตรลพ เกิดวันที่ 8 กันยายน พ.ศ. 2530 แขวงศิริราช เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี จากคณะเทคนิคการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 และในปี 2555 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

