บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationality)

ปัจจุบันนี้มีหลักฐานต่างๆ มากมายที่สนับสนุนว่า เชื้อ Helicobacter pylori (H.pylori) เป็นสาเหตุสำคัญในพยาธิกำเนิดของการอับเสบของชั้นเยื่อบุกระเพาะอาหาร (gastritis)[1-6] โรคแผลเป็ปติค (peptic ulcer diseases)[6-9] รวมทั้งกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารส่วนต้น เช่น อาหารไม่ย่อย เสียดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน (non-ulcer dyspepsia หรือ NUD)[10-12] และถ้าทำการรักษาโรคหรืออาการดังกล่าวให้หายได้แล้ว แต่ยังไม่สามารถทำลายเชื้อนี้ได้ อาการของโรคก็จะกลับเป็นใหม่ได้อีกในภายหลัง[13-16] ดังนั้นการตรวจเชื้อ H.pylori จึงมีความสำคัญและมีความจำเป็นต่อการวินิจฉัยถึงสาเหตุของโรคที่แท้จริง

หลักการตรวจแยกเชื้อ H.pylori แบ่งออกเป็น 2 วิธีคือ

1. การตรวจทางอ้อม (Indirect methods)
2. การตรวจทางตรง (Direct methods)

การตรวจทางอ้อม (Indirect methods)

เป็นวิธีการตรวจหาผลิตภัณฑ์ (product) ที่เกิดจากตัวเชื้อ ได้แก่

1. การตรวจทางน้ำเหลืองวิทยา (serological test) วิธีนี้เป็นการตรวจหา H.pylori specific antibodies[17-20]

2. การตรวจโดยวิธี breath test (^{13}C urea or ^{14}C urea breath tests) วิธีนี้เป็นการตรวจหา CO_2 ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ urease ที่ผลิตจากตัวเชื้อ[21-24]

3. <u>การตรวจโดยวิธี $^{15}NH_4^+$ excretion test</u> วิธีนี้เป็นการตรวจหาแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในปัสสาวะ[25]

4. <u>การตรวจโดยวิธี rapid urease test</u> ซึ่งเป็นการตรวจหาแอมโมเนียที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่ใส่ชิ้นเนื้อเยื่อ (biopsy) ลงไป[26-29]

การตรวจทางตรง (Direct methods)

เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อโดยตรง ซึ่งได้แก่

1. <u>การตรวจทางจุลชีววิทยา</u> (microbiology) มี 2 วิธีคือ

1.1 การเพาะเชื้อ (culture)[30-33] วิธีนี้สามารถนำไปใช้ศึกษาถึงลักษณะเฉพาะของเชื้อและนำไปสู่การพัฒนาทางคุณภาพวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ วิธีนี้เริ่มขึ้นตั้งแต่มีรายงานการศึกษาค้นพบเชื้อ[1] แต่เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีคุณลักษณะพิเศษที่แตกต่างไปจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ[34-37] การเพาะเชื้อนี้ในระยะแรกๆจึงไม่ประสบผลสำเร็จ ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆขึ้นมา แต่ก็ยังให้ผลได้ไม่ดีเท่าที่ควร[31] กล่าวคือ ยังไม่สามารถนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพบรรยากาศ อุณหภูมิ เป็นต้น ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาปรับปรุงเทคนิคในการเพาะเชื้อ ซึ่งขณะนี้ในภาควิชาจุลชีววิทยา รพ.จุฬาลงกรณ์ กำลังดำเนินการพัฒนาปรับปรุงเทคนิคอยู่ เพื่อจะได้นำผลมาศึกษาและวิเคราะห์ต่อไป

1.2 การย้อมสีกรัมจากชิ้นเนื้อเยื่อ (Gram's stain)[86] วิธีนี้เป็นการนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำไบอ๊อบซี่ (biopsy) มาถูบนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว จากนั้นนำไปทำการย้อมสีกรัม เพื่อตรวจดูเชื้อ <u>H.pylori</u> ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. <u>การตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ</u> (histology) เป็นการนำชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากการทำไบอ๊อบซี่ (biopsy) มาตัดให้เป็นแผ่นบางๆ มีความหนาประมาณ 3-5 μm แล้วทำการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อนั้น การย้อมสียังแบ่งออกเป็นการย้อมสีแบบธรรมดา (haematoxylin and eosin stain)[33,38,40] และการย้อมพิเศษ (special stains) ซึ่งได้แก่ modified Giemsa stain,[41-44], Gimenez stain[3], Warthin-starry stain[42,45-46] ฯ ในทางปฏิบัติทั่วไปที่นิยมใช้ในการตรวจแยกเชื้อ <u>H.pylori</u> นี้คือ การย้อมพิเศษโดยวิธี modified Giemsa stain เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ได้ผลเร็วภายใน 48 ชม. สามารถมองเห็นได้ชัดเจน เสียค่าใช้จ่ายน้อย นอกจากนั้นการย้อมด้วยวิธีนี้สามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ <u>H.pylori</u> กับลักษณะของเยื่อบุกระ

เพาะอาหาร (nature of the gastric mucosa) ได้เป็นอย่างดี[47]มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ติดตามผลการรักษาหลังจากที่มีการทำลายเชื้อแล้ว อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติของวิธีนี้เพื่อการวินิจฉัย (diagnostic test) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีทดสอบมาตรฐาน (gold standard)[31,48-50] ใน รพ.จุฬาลงกรณ์ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาถึงคุณสมบัติต่างๆของวิธี modified Giemsa stain เพื่อการวินิจฉัยเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเชื้อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

เพื่อเปรียบเทียบผลการตรวจเชื้อ H. pylori โดยวิธีการย้อมสี modified Giemsa กับวิธีการเพาะเชื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

1) ประชากรตัวอย่าง

คนไข้ที่เข้ารับการตรวจในสาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ รพ.จุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่เดือนมีนาคม-ธันวาคม พศ. 2538

2) เกณฑ์การเลือกตัวอย่าง

เป็นผู้ป่วยที่มีอาการปวด จุกเสียดหรือแน่นท้องและได้รับการตรวจด้วยกล้องส่องทางเดินอาหาร (endoscope) พร้อมกับได้รับการตัดชิ้นเนื่อเยื่อจำนวน 2 ชิ้น ที่อยู่ใกล้เคียงกันบริเวณตำแหน่งแอนทรัมของกระเพาะอาหาร

3. จำนวนตัวอย่าง (sample size) = 100 ตัวอย่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

การเพาะเชื้อ (Culture)[51]

1. การเก็บ specimen

1.1 endoscopic biopsy 1 ชิ้น

1.2 ใส่ใน sterile normal saline solution (2 ml.)

1.3 ส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการทันที หรือภายใน 5 ชม. โดยเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°C

2. บด specimen ในเครื่องบด (ground glass grinder) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว (sterilization)

3. ทำการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (selective medium)

4. นำ plate ใส่ใน anaerobic jar ที่มี mixture gas ดังนี้

- 5% O_2
- 10% CO_2
- 10% H_2
- 75% N_2

5. incubate ที่อุณหภูมิ 37°C

6. ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้อในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 หากไม่มีการเจริญของเชื้อให้ทิ้ง plate ในวันที่ 7

7. นำ colony ที่ได้มาทำ Gram's stain และทำ biochemical test เพื่อตรวจสอบเอนไซม์ oxidase, catalase และ urease

8. ถ้ามีเชื้อขึ้นจำนวนน้อยให้ทำ subculture

การย้อมสี modified Giemsa (modified Giemsa stain)[41]

1. การเก็บ specimen

1.1 endoscopic biopsy จำนวน 1 ชิ้น

1.2 ใส่ใน 10% neutral buffered formalin

2. นำ specimens เข้าเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ (Automatic Tissue Processer)

3. ฝังชิ้นเนื้อเยื่อลงใน paraffin block (embedding)

4. ตัดชิ้นเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางๆ ขนาด 3-5 μm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. นำไปแผ่ขยายบนกระจกสไลด์

6. ละลาย paraffin ออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น

7. จุ่ม slide ใน Zenker's solution และ Lugol's solution ประมาณ 1 ชั่วโมง และ 5-10 นาทีตามลำดับ

8. ล้าง slide ด้วยน้ำประปา

9. จุ่ม slide ใน 5% sodium thiosulphate ประมาณ 3 นาที ล้างด้วยน้ำประปาไหล 10-20 นาที แล้วต่อด้วยน้ำกลั่น

10. ย้อม slide ด้วยสี Giemsa ประมาณ 45-60 นาที จากนั้นแช่ slide ต่อใน resin working solution, 95% alcohol, isopropyl alcohol และ xylene ตามลำดับ

11. ปิด slide ด้วย cover glass

12. ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย (Benefit of research)

การตรวจเชื้อ H.pylori โดยวิธี modified Giemsa stain เป็นวิธีการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ง่าย สามารถมองเห็นเชื้อได้ชัดเจน ช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังสามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับลักษณะของเยื่อบุกระเพาะอาหารได้เป็นอย่างดี มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ติดตามผลการรักษาหลังจากที่มีการทำลายเชื้อแล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย