



รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

ผลของ Probiotics ในการรักษากระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ Helicobacter Pylori
(Effects of Probiotics on Triple Therapy for Helicobacter Pylori Eradication)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย

ผลของ Probiotics ในการรักษากระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *Helicobacter Pylori*
(Effects of Probiotics on Triple Therapy for *Helicobacter Pylori* Eradication)

ผู้รับผิดชอบโครงการ

อาจารย์นายแพทย์ทวีศักดิ์ ทองทวี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

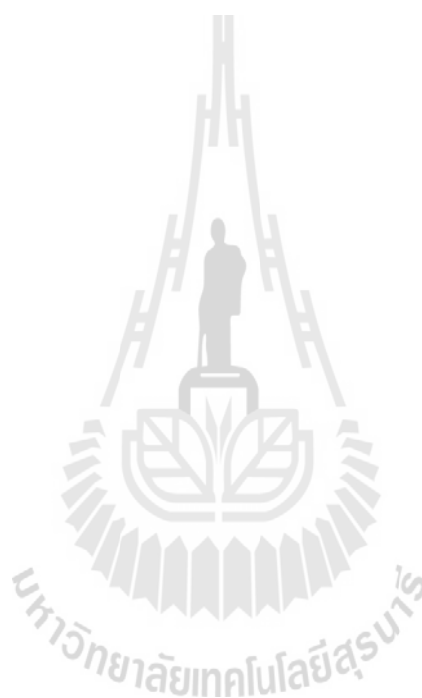
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในโครงการนักวิจัยหน้าใหม่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 ซึ่งงานวิจัยสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ก็ด้วยความกรุณาจาก อาจารย์ นายแพทย์ลิขิต มาตระกุล รักษาการผู้อำนวยการโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และรองคณะบดีฝ่ายบริการทางการแพทย์ ที่เอื้ออำนวยอุปกรณ์และสถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัย

มิถุนายน 2558



บทคัดย่อ

อุบัติการณ์ของการติดเชื้อยา Clarithromycin มีมากขึ้นและมีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย การทดสอบการติดต่อยาก่อนการให้การรักษาโรคกระเพาะอาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* พบว่าให้ผลการรักษาที่ดีพอสมควร แต่ในบางพื้นที่ที่มีการติดต่อยาตัวอื่นด้วย เช่น Amoxicillin หรือ metronidazole ซึ่งอยู่ในสูตรมาตรฐานที่ใช้รักษาผู้ป่วยโดยทั่วไป ทำให้ประสิทธิภาพของการรักษาด้วยยาในสูตรมาตรฐานยังต่ำอยู่ในบางพื้นที่ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อทดสอบการให้เชื้อจุลินทรีย์มีชีวิต หรือ “probiotic” ที่มีอยู่ในโยเกิร์ตว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อได้หรือไม่ โดยโยเกิร์ตที่ใช้ ได้มาจากการผลิตเพื่อจำหน่ายในท้องตลาดโดยฟาร์มของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีส่วนประกอบของ *Lactobacillus delbrueck subsp.bulgarius* และ *Streptococcus thermophilus* ใน ปริมาณที่เท่าๆกัน โดยผู้ทำการวิจัยจะทำการสุ่มผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อและแบ่งผู้ป่วยออกเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 รับประทานยาเชื้ออย่างเดียวจำนวน 100 ราย กลุ่มที่ 2 รับประทานโยเกิร์ตที่มีส่วนประกอบของ *Lactobacillus delbrueck subsp.bulgarius* และ *Streptococcus thermophilus* ก่อนให้ยาจำนวน 100 รายและกลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่กินโยเกิร์ตทั้งก่อนและหลังการให้ยาจำนวน 100 ราย และทดสอบการหายจากการติดเชื้อในสัปดาห์ที่ 4 ของการรักษา ผลการวิจัยพบว่า มีผู้ป่วย 292 คนในขั้นตอนสุดท้าย (PP) โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ 1 จำนวน 98 ราย กลุ่มที่ 2 จำนวน 97 ราย และกลุ่มที่ 3 จำนวน 97 ราย โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการกำจัดเชื้อในกลุ่มที่ได้รับยาร่วมกับการกินโยเกิร์ตทั้งแบบ IIT ($P < 0.01$ 95% CI; 0.72-0.87) และ PP ($P < 0.01$, 95% CI; 0.71-0.97) โดยไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการให้กินโยเกิร์ตก่อนหรือหลังการให้ยา และไม่มี ความแตกต่างเรื่องของภาวะข้างเคียงในการกินโยเกิร์ต ($P = 0.32$) โดยสรุปแล้ว การให้ยาฆ่าเชื้อร่วมกับการให้กินโยเกิร์ตที่มีส่วนประกอบของ *Lactobacillus delbrueck subsp.bulgarius* และ *Streptococcus thermophilus* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* ได้โดยที่ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของภาวะอันไม่พึงประสงค์ของการกินโยเกิร์ต

Abstract

Background and Aim: prevalence of Clarithromycin resistance geographically different including Thailand. Tailored triple therapy can improve eradication rate. Aim of our study was evaluating effect of *Lactobacillus delbrueck subsp.bullgaricus* and *Streptococcus thermophilus* to *Helicobacter pylori* eradication in different period of therapeutic protocol. **Methods:** This prospective single-center study was conducted in Suranaree University of Technology Hospital. Infected patient were randomized to one week tailored triple therapy (esomeprazole 20 mg bid, clarithromycin 500 mg bid /metronidazole 400 mg tid if clarithromycin resistant and amoxicillin 1000 mg bid) with placebo (yogurt without probiotic) ; **group1**, n = 100); one week of pre-treatment with probiotics (**group2**, n = 100); and one week of pre-treatment with probiotic followed by one weeks of the same probiotics after treatment (**group3**, n = 100). Successful eradication was defined as a negative both histology and rapid urease test at four weeks after treatment. **Result:** PP analysis involved 292 patients, 98 in the tailored triple therapy with placebo (**group1**), 97 in the pre-treatment with probiotic (**group2**) and 97 in the pre-treatment with probiotic then post-treatment with same probiotic (**group 3**). Successful eradication was observed in 229 patients; by PP analysis, the eradication rates were significantly higher ($P < 0.01$, 95% CI; 0.71-0.97) in the group 2 and group 3 than group1. ITT analysis also showed that eradication rates were significantly higher in group2 and group 3 than group1 ($P < 0.01$ 95% CI; 0.72-0.87). In probiotic group, the result show that, no significant between group 2 and group 3. In term of adverse event, the result showed that no significant between three groups ($P=0.32$). **Conclusion:** In our study, high prevalence of clarithromycin resistance strain in our area. Administration of probiotics before or before and after tailored triple therapy can improve *Helicobacter pylori* eradication rates. Adding probiotic cannot reduce advert event of medication.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญรูปภาพ.....	จ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย.....	2
1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	4
1.5 แผนการบริหารแผนงานวิจัยและแผนการดำเนินงาน พร้อมทั้งขั้นตอน การดำเนินงาน ตลอดแผนงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย.....	7
บทที่ 3 สรุปประมวลผลงานวิจัย.....	10
บรรณานุกรม.....	12
ประวัตินักวิจัย.....	15

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
ภาพที่ 1 การพยายามกำจัดเชื้อ <i>Helicobacter Pylori</i>	3
ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการทำการวิจัย (Flow chart of the study)	4
ภาพที่ 3 แสดงผู้ป่วยที่เข้าร่วมงานวิจัย	7
ภาพที่ 4 : แสดงรูปแบบของการดื้อต่อยา clarithromycin	8
ภาพที่ 5 : แสดงอัตราการกำจัดเชื้อ <i>Helicobacter pylori</i> ทั้งสามกลุ่มทดลอง	9



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Helicobacter pylori* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถอยู่ในกระเพาะอาหารมนุษย์และเป็นสาเหตุหลักของการเกิดกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง แผลในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก รวมทั้งมะเร็งกระเพาะอาหาร (Komoto K et al., 1998) การกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* สามารถป้องกันการเกิดโรคและภาวะดังกล่าวได้ (Chey WD et al., 2007) อย่างไรก็ตามการกำจัดเชื้อนี้ด้วยสูตรยามาตรฐานหรือ “standard triple therapy” ได้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อนี้น้อยลงเรื่อยๆรวมทั้งในประเทศไทย (Mahachai V et al., 2011) สาเหตุของการรักษาที่ได้ประสิทธิภาพน้อยลงนั้น อันเนื่องมาจากการดื้อยาฆ่าเชื้อในสูตรยามาตรฐานหรือ “standard triple therapy” และการไม่ร่วมมือในการรักษาของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการใช้ยาสูตรมาตรฐานที่มีส่วนประกอบของยา clarithromycin ยังคงมีการใช้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีอัตราการดื้อยา clarithromycin ต่ำหรือให้ยาโดยการดูการตอบสนองต่อยาก่อนการรักษา (Megraud F et al., 2013) ในสูตรยามาตรฐานนั้น การดื้อยา amoxicillin ค่อนข้างคงที่ แต่การดื้อยา clarithromycin มีอัตราที่สูงขึ้นเรื่อยๆ (Lee JW et al., 2013) จากการศึกษาเรื่อง “Nationwide survey of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance” ในประเทศไทยพบว่า อัตราการดื้อยาสูตรมาตรฐานมีประมาณ 50.3% อัตราการดื้อยา amoxicillin มีประมาณ 5.2% , clarithromycin มีประมาณ 3.7% และอัตราการดื้อยา metronidazole มีประมาณ 36% แต่ยังไม่ทราบการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ หรือ “mutation patterns” ของเชื้อ (R.-K. Vilaichone et al., 2013) ในเวชปฏิบัติประจำวันพบว่า สูตรยามาตรฐานให้ผลการรักษาที่ต่ำในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า การใช้ probiotic สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ประมาณ 5–10% (Wang ZH et al., 2013) อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่พบว่า การใช้ probiotic ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ จากการที่พบการดื้อยา Clarithromycin ที่สูงขึ้นเรื่อยๆ จึงมีการทดสอบการตอบสนองของยาก่อนให้ยาฆ่าเชื้อ เรียกว่า “tailored treatment” สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อได้ดี (Megraud F et al., 2013) ขึ้นแต่ยังมีบางส่วนที่ยังไม่ได้ผล ดังนั้น จึงเป็นที่มาของการใช้ probiotic เสริมเข้าไปในการรักษาแบบ “tailored treatment” โดย probiotic ที่ใช้คือ *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งมีในโยเกิร์ตของฟาร์มของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีว่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อได้หรือไม่

1.2 วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

- 1) ศึกษาผลของการใช้ probiotic ที่มีส่วนประกอบของ *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในการรักษากระเพาะอาหารอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในเขตพื้นที่รอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 2) ศึกษาอุบัติการณ์ของการดื้อต่อยา clarithromycin ในเขตพื้นที่รอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 ทฤษฎี สมมติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของแผนงานวิจัย

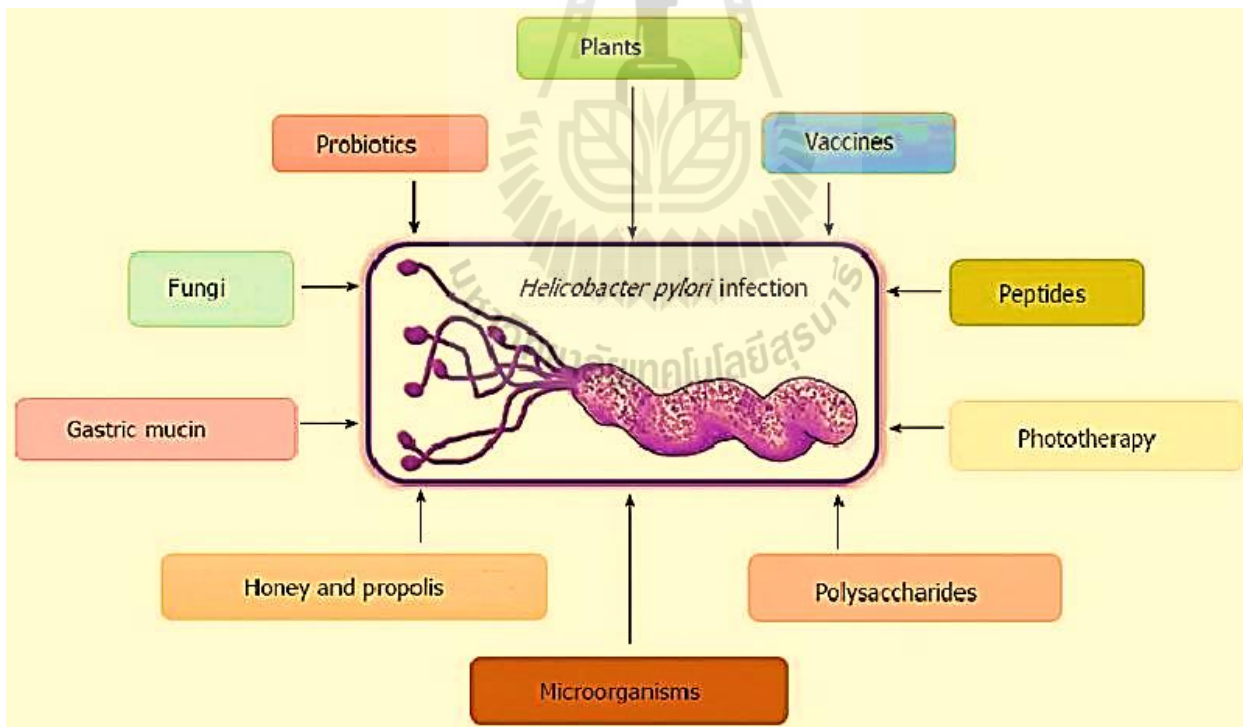
Probiotics คือจุลชีพมีชีวิตที่คัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีอยู่แล้วในลำไส้ของมนุษย์ที่แข็งแรงดี โดยจะให้เสริมเข้าไปจากภายนอกในร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ เพื่อไปสู่ระบบทางเดินอาหาร และเข้าไปเจริญตั้งรกรากในลำไส้ ทำหน้าที่เสมือนกับเป็นสมาชิกของ “gut micro biota” และก่อให้เกิด microbial activity อันจะเป็นผลดีต่อร่างกายหลายประการ ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะเป็นจุลชีพในกลุ่ม *Lactobacilli* หรือ *Bifidobacterium* ในปัจจุบันมีหลักฐานการศึกษาในคนหรือสัตว์ทดลองพบว่า probiotics มีบทบาทสำคัญก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายหลายประการ ดังนี้

1. การลดจำนวนหรือกำจัดจุลชีพก่อโรค
2. การลดหรือกำจัดสารพิษ หรือสารก่อมะเร็ง
3. การส่งเสริมให้เกิด apoptosis ของ premalignant cells
4. การสร้างสารต่างๆ เช่น สารอาหาร, vitamins (Vit K, Folic acid, Niacin, Thiamine, Riboflavin, B complex vitamins), antioxidants, growth factors, coagulation factors ให้แก่ร่างกาย และเสริมสร้างการดูดซึมสารอาหารบางชนิด เช่น เกลือแร่
5. การกระตุ้น innate และ adaptive immune response
6. การเปลี่ยนแปลงทาง metabolic อื่น ๆ เช่น ลด serum cholesterol เป็นต้น

ปัจจุบันการใช้ probiotics ในการรักษาทางคลินิก ยังเริ่มต้นมาได้ไม่นานนัก โรคที่มีการศึกษาผลการรักษาโดยใช้ probiotics มากที่สุดในปัจจุบัน คือ โรคท้องร่วงไม่ว่าจะเป็น infectious หรือ antibiotic-associated diarrhea คิดเป็นประมาณ 22 % ของการศึกษาเรื่อง probiotics ทั้งหมด ตั้งแต่ปี 1980 ถึงปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรค acute rotavirus diarrhea ในเด็ก แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่พบว่า probiotics มี immunomodulation potential ทำให้ปัจจุบันมีแนวทางการศึกษาใหม่ ๆ เกิดขึ้นมากมาย ในการที่จะนำ probiotics มาใช้ในการป้องกันและรักษาภาวะ allergic, infectious หรือ inflammatory condition ต่าง ๆ

การใช้ probiotic รักษา *Helicobacter pylori* ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของ probiotics ต่อการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหาร โดยใช้ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งสามารถทนต่อภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารได้ พบว่า สามารถลดอัตราการตรวจ breath test ได้ผลบวกและพบว่าความหนาแน่นของเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหารก็ลดลงอีกด้วย คาดว่าเป็นผลมาจากการหลั่ง short-chain fatty acids และ bacteriocins ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Helicobacter pylori* ตลอดจนการหลั่งสารบางชนิดที่ยับยั้งการอักเสบและ apoptosis ที่เกิดจากการติดเชื้อได้ (Tong JL et al., 2007) นอกจากนี้ ยังเชื่อว่า probiotics สามารถเสริมสร้างประสิทธิภาพของ gastric mucosal barrier function ทำให้พยาธิสภาพในกระเพาะอาหารลดลงได้อีกด้วย ในด้านประสิทธิภาพในการรักษา พบว่าการให้ probiotics ควบคู่ไปกับการให้ยาฆ่าเชื้อ จะทำให้อัตราการกำจัดเชื้อเพิ่มมากขึ้นและสามารถลดผลข้างเคียงของยาฆ่าเชื้อที่ใช้ได้อีกด้วย (Wang ZH et al., 2013)

การใช้ probiotic เป็นเพียงหนึ่งวิธีการมีการใช้เพื่อพยายามเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ (ดังแสดงในภาพที่ 1) ผู้ทำการวิจัยตั้งสมมุติฐานว่า การใช้ probiotic สามารถเพิ่มอัตราการฆ่าเชื้อ *Helicobacter pylori* ในผู้ป่วยกระเพาะอาหารอักเสบที่ติดเชื้อนี้ได้



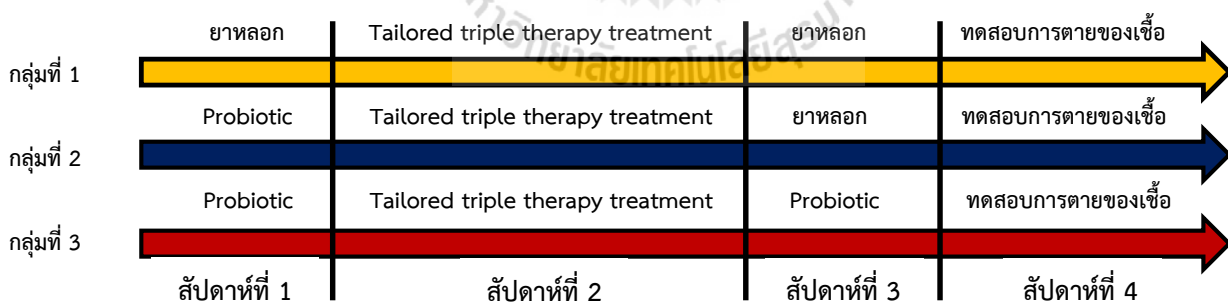
ภาพที่ 1 แสดงการพยายามกำจัดเชื้อ *Helicobacter Pylori* ด้วยกระบวนการรักษาต่างๆนอกจากการให้ยาฆ่าเชื้อ (Guadalupe Ayala et al., 2014)

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

- 1) มีรายงานการวิเคราะห์ปัญหาภาวะแพ้อาหารอักเสบที่เกิดจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในเขตพื้นที่รอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 2) ทราบอุบัติการณ์ของการดื้อต่อยา clarithromycin ในเขตพื้นที่รอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- 3) ผู้ป่วยและบุคลากรในท้องถิ่น นำความรู้ที่ได้รับไปเผยแพร่สู่ชุมชน
- 4) บุคลากรและคนในชุมชนมีความตระหนัก เข้าใจและสามารถนำไปใช้ในการป้องกันการป้องกันและรักษาโรคภาวะแพ้อาหารอักเสบจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ได้อย่างถูกต้อง
- 5) ส่งบทความเพื่อพิจารณาตีพิมพ์ในระดับนานาชาติ

1.5 แผนการบริหารแผนงานวิจัยและแผนการดำเนินงาน พร้อมทั้งขั้นตอน การดำเนินงาน

ผู้ป่วยที่มีข้อบ่งชี้ที่มีความจำเป็นต้องได้รับการตรวจวินิจฉัยด้วยการส่องกล้องทางเดินอาหารตามมาตรฐานของวิชาชีพในเขตพื้นที่รอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จะได้รับการตรวจด้วยการส่องกล้องทางเดินอาหารส่วนบนหรือ “gastroscopy” เพื่อทำการวินิจฉัยและเก็บชิ้นเนื้อและทำการตรวจเชื้อ bacteria ในภาวะแพ้อาหารด้วยชุดตรวจตามมาตรฐาน และส่งชิ้นเนื้อเพื่อตรวจทางพยาธิวิทยา เมื่อพบการติดเชื้อจากการตรวจด้วยชุดตรวจมาตรฐานหรือ “Rapid Urease Test” ชิ้นเนื้อจะถูกวิเคราะห์การดื้อต่อยาที่ห้องปฏิบัติการสำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและให้ยาตามการตอบสนองจากการตรวจด้วย real time PCR โดยขั้นตอนของการให้ยาและการให้ probiotic ได้แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการทำกรวิจัย (Flow chart of the study)

ผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Helicobacter pylori* จำนวน 300 ราย ตั้งแต่มีถุนายน 2557 จนถึงมีถุนายน 2558 โดยมีข้อบ่งชี้ในการคัดผู้ร่วมวิจัยออกหรือ Exclusion criteria ดังนี้คือ อายุต่ำกว่า 18 ปีหรือมากกว่า 70 ปี เคยได้รับการกำจัดเชื้อมาก่อน 2 เดือน มีแผลในภาวะแพ้อาหารหรือลำไส้เล็กส่วนต้น มะเร็งภาวะแพ้อาหาร เคยผ่าตัด

กระเพาะอาหารมาก่อน มีโรคประจำตัวรุนแรงจนไม่สามารถทำการส่องกล้องได้ ตั้งครรภ์หรืออยู่ระหว่างการให้นมบุตร เคยได้รับยาลดกรดมาก่อนในช่วง 2 เดือน เป็นโรคเบาหวาน หรือแพ้ยาลำไส้

การวินิจฉัยการติดเชื้อทำได้โดย ตรวจพบเชื้อในชิ้นเนื้อที่ทำการส่องตรวจหรือ “Histology positive” และการตรวจ “rapid urease test” ให้ผล positive โดยชิ้นเนื้อที่เก็บมาจากกระเพาะอาหารนั้น เก็บมาตามมาตรฐาน 5 ตำแหน่ง 8 ชิ้น ตาม “updated Sydney classification” โดยชิ้นเนื้อจะส่งไปตรวจที่บริษัท กรุงเทพมหานคร ภายนอกมหาวิทยาลัย โดยพยาธิแพทย์ 5 คน

การสกัด DNA ของเชื้อ (DNA Isolation) ทำได้โดย ชุดสกัด DNA ของเชื้อ *Helicobacter pylori* ชื่อ QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, USA) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำเนื้อเยื่อมาใส่ใน micro centrifuge tube แล้วใส่ buffer ATL (180 μ L) และ proteinase K (20 μ L) จากนั้นนำไปปั่นด้วย vortexing และอุ่นที่อุณหภูมิ 56°C เมื่อเนื้อเยื่อละลายแล้ว ใส่ Buffer AL (200 μ L) และอุ่นที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 minutes จากนั้นใส่ 240 μ L ของ 100% ethanol แล้วปั่นด้วย vortexing เป็นเวลา 15 วินาที นำของเหลวที่ได้ใส่ใน QIAamp spin column และ centrifuged ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำของเหลวที่ได้ใส่ด้วย AW1 buffer (500 μ L) แล้วนำไป centrifuged ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วใส่ AW2 buffer (500 μ L) แล้วนำไป centrifuged ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วใส่ Buffer AE (200 μ L) นำไปอุ่นเป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นต่อด้วย centrifugation ที่ 8000 rpm เป็นเวลา 1 minute เป็นอันสิ้นสุดการสกัด DNA

การตรวจการดื้อต่อยา clarithromycin โดยการตรวจ mutations ที่ 23S rRNA gene โดยวิธี real-time PCR นั้นทำได้โดย ชุดตรวจ real-time PCR ชื่อ LightCycler® 480 ของบริษัท Roche (Roche diagnostics, Neuilly sur Seine, France) โดยเทคนิค melting curve analyses โดยการตรวจสอบการ mutation A2142C ของ 23S rRNA gene ที่แสดงการดื้อต่อยา โดยมีลำดับของ gene คือ 5-GGCAAGACGGAAAGACC-3; nucleotides 2504 ถึง 2520 โดยมีลำดับ gene มาตรฐานคือ 5-TGTAGTGGAGGTGAAAATTCCTCCTACCC-3; nucleotides 2473 ถึง 2501 จาก GenBank หมายเลข U27270 โดยมีกระบวนการ PCR amplification เริ่ม cycle แรกที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้วทำซ้ำๆ กันจำนวน 50 รอบ หลังจากนั้นจะได้รูปแบบของการเกิด mutation 3 แบบ คือ wild type, mixed type และ mutation ตามลำดับ (Me´nard et al.,2002)

Probiotic ที่ใช้คือ โยเกิร์ตที่ประกอบด้วยหัวเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* ในอัตราส่วน 50u/250ml โดยมี *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ในปริมาณ $> 10^5$ CFU/serve และ *Streptococcus thermophilus* ในปริมาณ $> 10^8$ CFU/serve) ผลิตจากฟาร์มของมหาวิทยาลัยโดยมีปริมาณที่เท่ากันทุกกล่องและผ่านการตรวจสอบจากองค์การอาหารและยาแล้ว

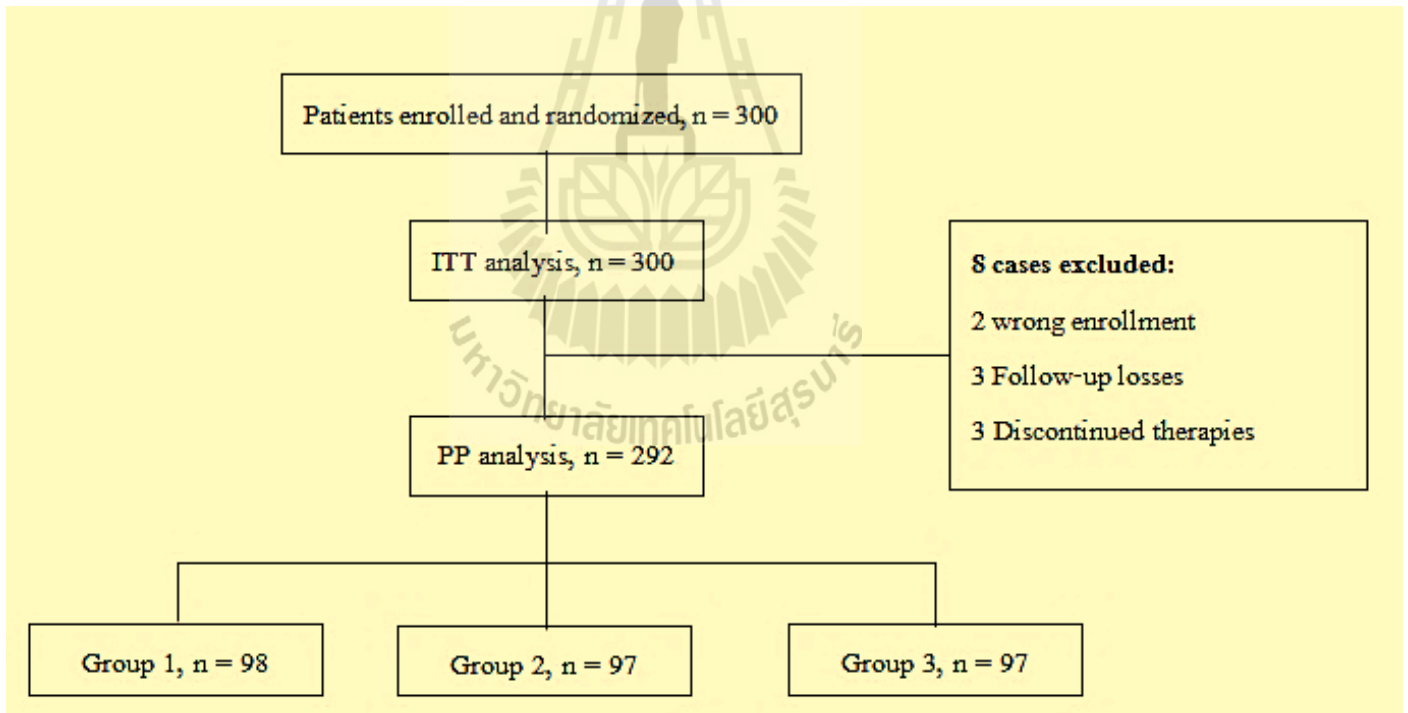
การออกแบบงานวิจัย มีขั้นตอนดังนี้ มีการสุ่มผู้ป่วยโดยใช้ Random Number Generator โดยโปรแกรม SPSS for Windows (version 16.0; SPSS, Chicago, IL, USA) แบ่งผู้ป่วยออกเป็นสามกลุ่ม ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 จะได้รับยาฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียว (esomeprazole 20 mg bid, clarithromycin 500 mg bid หรือ metronidazole 400 mg tid ถ้าพบการดื้อยา clarithromycin และ amoxicillin 1000 mg bid จำนวน 100 คน กลุ่มที่ 2 ให้ probiotic 1 สัปดาห์ก่อนการให้ยาจำนวน 100 คน และกลุ่มที่ 3 ให้ probiotic ก่อนและหลังการให้ยาจำนวน 100 คน หลังจากนั้นจะมีการตรวจที่เวลา 4 สัปดาห์ ความร่วมมือของผู้ป่วยทำโดยการสอบถามจำนวนเม็ดยา และการกินโยเกิร์ตเกิน 90%

ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อจะถูกคำนวณทั้งแบบ ITT และ PP โดยการใช้โปรแกรม SPSS for Windows (version 16.0; SPSS, Chicago, IL, USA) โดยอัตราการกำจัดเชื้อ ข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย อัตราการดื้อยา จะถูกคำนวณโดยใช้ Student's t tests และหาความน่าเชื่อถือของข้อมูลด้วย (95% confidence intervals) ในแต่ละกลุ่ม โดยค่าที่ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติคือถ้าค่า P น้อยกว่า 0.05

บทที่ 2

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

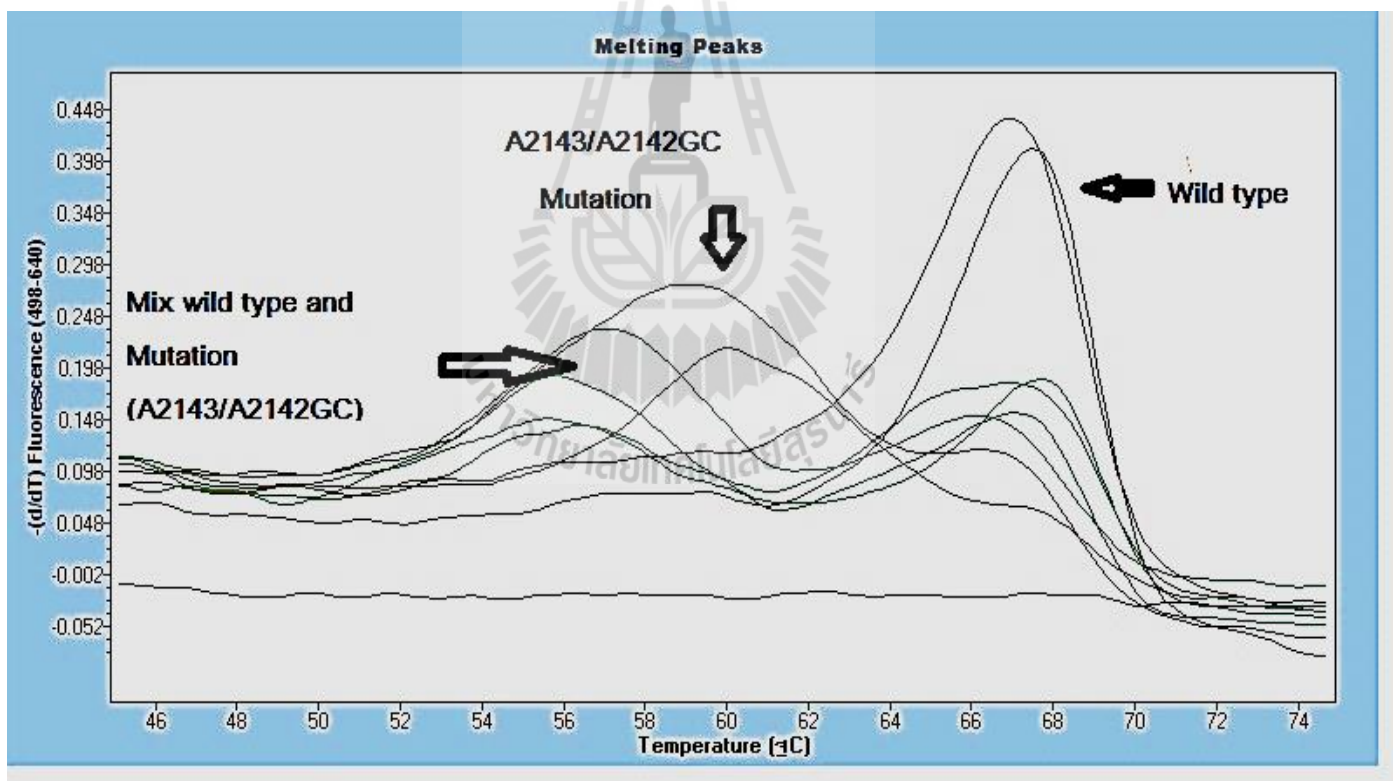
ผู้เข้าร่วมวิจัยทั้งหมด 300 คน ที่ได้รับการวินิจฉัยกระเพาะอักเสบจากการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ในจำนวนนี้ได้สุ่มผู้ป่วย 100 ราย เป็นกลุ่มที่ 1 ซึ่งจะได้รับยาฆ่าเชื้อร่วมกับการได้ยาหลอก และ 100 คน เป็นกลุ่มที่ 2 ซึ่งจะได้รับ probiotic ก่อนให้ยาฆ่าเชื้อ และกลุ่มที่ 3 ได้รับ probiotic ก่อนและหลังการได้รับยาฆ่าเชื้ออีกจำนวน 100 คน หลังจากการติดตามผู้ป่วยเมื่อสิ้นสุดการวิจัย พบว่า มีผู้ป่วยจำนวน 8 รายที่ต้องออกจากการศึกษา เนื่องจาก การสุ่มมาผิดพลาด 2 ราย ขาดการติดตามการรักษา 3 ราย และกินยาไม่ครบอีก 3 ราย ดังสรุปในภาพที่ 3 โดยคุณสมบัติของผู้ป่วยทั้ง 3 กลุ่ม ได้สรุปในตารางที่ 1 โดยข้อมูลเพศ อายุเฉลี่ย และระยะเวลาในการติดตามผู้ป่วย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ รูปแบบของการดื้อต่อยา Clarithromycin จากการทำ real time PCR ได้แสดงในภาพที่ 4 โดยทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพที่ 3 : แสดงผู้ป่วยที่เข้าร่วมงานวิจัย

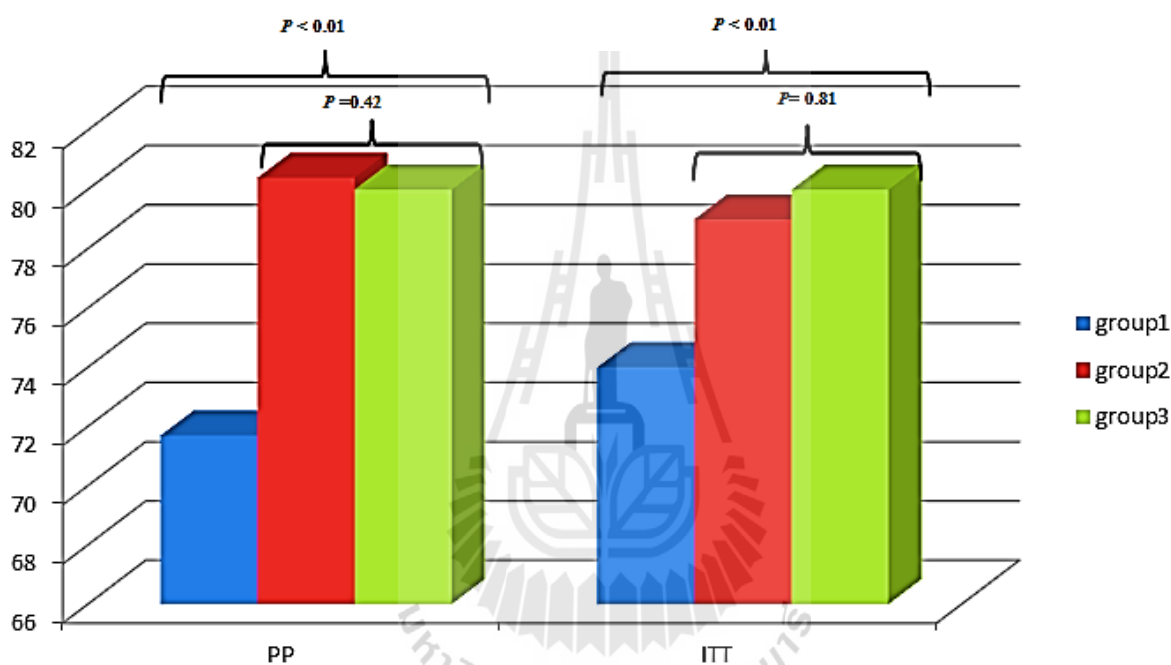
Patient baseline demographics	Tailored triple therapy with placebo (n =98)	Probiotic before tailored triple therapy (n =97)	Probiotic before and after tailored Triple therapy (n =97)	P-value
Male/female (n)	48/50	49/48	50/47	0.71
Mean age (years)	46.2	55.9	34.1	0.92
Mean follow-up time,(day)	33±4	35±2	34±3	0.98
Mutation pattern				
-Wild type A2143/2142A (Susceptible)	23	21	24	0.18
-Mutation, A2143/2142CG (Resistance)	15	18	12	0.14
-Mixed Wild type +Mutation,A2143/A2142GC (Susceptible + Resistance)	60	58	61	0.23

ตารางที่ 1: แสดงข้อมูลพื้นฐานผู้ป่วย



ภาพที่ 4 : แสดงรูปแบบของการดื้อต่อยา clarithromycin

จากการทดสอบการตายของเชื้อ *Helicobacter pylori* หลังจาก 4 สัปดาห์ พบว่า ในแบบ PP analysis มีการตายของเชื้อ *Helicobacter pylori* จำนวน 229 คน คิดเป็น 78.42% จากจำนวนผู้ป่วย 292 คน โดยพบว่า อัตราการตายของเชื้อสูงขึ้นในกลุ่มที่ 2 (75/97, 77.3%) และกลุ่มที่ 3 (78/97, 80.4%) มากกว่ากลุ่มที่ 1 (78/98, 74.5%) โดยมีค่า $P < 0.01$ และค่า 95% CI 0.72-0.87 **ดังแสดงในภาพที่ 5** และในแบบ ITT analysis พบว่า มีอัตราการตายของเชื้อสูงขึ้นในกลุ่มที่ 2(79/100, 79%) และกลุ่มที่ 3 (80/100, 80%) มากกว่าในกลุ่มที่ 1($P < 0.01$, 95% CI 0.71-0.97)



ภาพที่ 5 : แสดงอัตราการกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* ทั้งสามกลุ่มทดลอง

ในด้านภาวะอันไม่พึงประสงค์นั้น พบว่า มีผู้ป่วยที่มีภาวะอันไม่พึงประสงค์ในกลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 จำนวน 11.82%, 9.78% และ 10.92 % ตามลำดับ และทั้งสามกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และผู้ป่วยที่มีภาวะอันไม่พึงประสงค์ พบเฉพาะภาวะอันไม่พึงประสงค์แบบอ่อนเท่านั้น ไม่พบชนิดรุนแรงแต่อย่างใด

บทที่ 3

สรุปรวมผลงานวิจัย

3.1 สรุปรวมผลงานวิจัย

ผลของการใช้ Probiotic ที่มีต่อการกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* ได้มีการศึกษาทดลองครั้งแรกในหนู โดยพบว่าการใช้เชื้อ *Lactobacillus* สามารถลดจำนวนของเชื้อ *Helicobacter pylori* ในหนูทดลองได้ (Kabir AMA et al.,1997) รายงานวิจัยแบบ meta-analysis (Tong et al.,2007) ได้รวบรวมผลงานวิจัยแบบ randomized control trials จำนวน 14 เรื่อง พบว่า การใช้ Probiotic สามารถเพิ่มอัตราการกำจัดเชื้อ *Helicobacter pylori* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้น พบรายงานการวิจัยที่มีการใช้ Probiotic ก่อนให้การรักษาหรือ “pre-treatment” พบว่า สามารถเพิ่มอัตราการกำจัดเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ (Sheu et al,2006 .Wang ZH et al.,2013)

ผู้ทำวิจัยได้ทำการศึกษาด้วยวิธี real-time PCR hybridization probe พบว่า พบอัตราการดื้อต่อยา clarithromycin ในกลุ่มผู้ติดเชื้อจำนวน 76.71% และเมื่อมีการศึกษารูปแบบของพันธุกรรมพบว่า กลุ่มแรก มีรูปแบบของพันธุกรรมชนิด wild type genotype ของ 23S rRNA gene จำนวน 23.28% ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่พบการดื้อต่อยา clarithromycin กลุ่มที่สอง มีการผ่าเหล่า หรือ mutation ของ 23S rRNA gene จำนวน 15.41 % ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบว่าดื้อต่อยา clarithromycin และกลุ่มสุดท้าย มีรูปแบบของพันธุกรรมแบบผสม mixed wild type genotype และ mutant genotype จำนวน 61.30% ซึ่งกลุ่มนี้พบทั้งเชื้อที่ตอบสนองต่อยาและดื้อต่อยา clarithromycin ดังนั้น จากผลการตรวจนี้พบว่า ส่วนใหญ่เชื้อจะมีการดื้อต่อยา clarithromycin อย่างไรก็ตาม จากผลการรักษาพบว่า ผู้ป่วยส่วนใหญ่ยังตอบสนองได้ดีต่อการกำจัดเชื้อด้วยสูตรยามาตรฐาน และการใช้ probiotic ร่วมในการรักษา ผู้ทำวิจัยตั้งสมมุติฐาน 2 ประการที่จะอธิบายสิ่งที่เกิดขึ้น ประการแรกคือ แม้จะดื้อต่อยา clarithromycin แต่ยังตอบสนองต่อยาฆ่าเชื้ออีกตัว คือ amoxicillin ทำให้ผู้ป่วยยังสามารถหายจากการติดเชื้อได้ และประการที่ 2 คือ probiotic สามารถเพิ่มอัตราการกำจัดเชื้อได้และพบว่าจริงๆแล้ว ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีการติดเชื้อที่มีพันธุกรรมแบบ mixed genotype ทำให้ยังตอบสนองต่อการรักษาได้ดี

โดยสรุปแล้ว ในพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา มีอัตราการดื้อต่อยา clarithromycin ในปริมาณที่สูง และส่วนใหญ่มีพันธุกรรมแบบ mixed genotype การทดสอบ genotypic analyses จะสามารถตอบคำถามได้ว่า มีการเปลี่ยนแปลงของหน่วยพันธุกรรมอย่างไร ดังนั้นจึงสรุปว่า การให้ probiotic สามารถเพิ่มอัตราการกำจัดเชื้อได้ทั้งแบบ PP และ ITT analysis อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างระหว่างการให้ probiotic ก่อนหรือหลังการให้

ยาฆ่าเชื้อ ดังนั้น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* สามารถเพิ่มอัตราการกำจัดเชื้อได้

3.2 การศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

จากการศึกษาวิจัยในโครงการนี้ ผู้วิจัยพิจารณาเห็นว่ายังมีประเด็นสำคัญอื่นๆ ที่จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

- 1) เพราะเหตุใดในผู้ป่วยรายเดียวกัน จึงพบการติดเชื้อได้ทั้งแบบดื้อต่อยา และตอบสนองต่อยา clarithromycin อาจเป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยได้รับเชื้อเข้าสู่ร่างกายทั้งสองชนิดจริงๆ หรือเชื้อที่รับเข้าไปมีการผ่าเหล่า หรือ mutation ภายหลังจากที่ได้รับเชื้อ การตรวจพันธุกรรมดูการผ่าเหล่า หรือ mutation analysis จะสามารถตอบข้อสงสัยนี้ได้
- 2) เนื่องจากการทำวิจัยครั้งนี้ มีข้อจำกัดในเรื่องงบประมาณ การติดเชื้อนี้มีจำนวนมากในประเทศไทย ถ้าสามารถทราบรูปแบบของการดื้อต่อยา clarithromycin ในพื้นที่อื่นๆ จะสามารถทราบอุบัติการณ์และทราบรูปแบบของการดื้อต่อยา clarithromycin ในทุกพื้นที่ในประเทศ ซึ่งแต่ละพื้นที่ อาจมีความแตกต่างกันหรือเหมือนกับพื้นที่ที่ผู้ทำวิจัยทำการศึกษายู่ก็ได้ การจะทำแบบนั้นได้ ต้องอาศัยความร่วมมือของนักวิจัยในแต่ละพื้นที่ ในรูปแบบของ multicenter แล้วมีการนำข้อมูลต่างๆมารวมวิเคราะห์ น่าจะให้คำตอบในภาพรวมทั้งประเทศ ข้อมูลเหล่านี้ มีประโยชน์อย่างมากในการเลือกใช้ยาฆ่าเชื้อ ให้มีความเหมาะสมในแต่ละพื้นที่ต่อไป

บรรณานุกรม

- Komoto K, Haruma K, Kamada T, et al (1998). *Helicobacter pylori* infection and gastric neoplasia: correlations with histological gastritis and tumor histology. *Am J Gastroenterol*, **93**, 1271- 6.
- Mihara M, Haruma K, Kamada T, et al (1999). The role of endoscopic findings for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: evaluation in a country with high prevalence of atrophic gastritis. *Helicobacter*, **4**, 40-8.
- V, Sirimontaporn N, Tumwasorn S (2011). Sequential therapy in clarithromycin Sensitive and Chey WD, Wong BC, et al (2007). American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol*, **102**, 1808-25.
- Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al (2013). *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*, **62**, 34-42.
- Su P, Li Y, Li H, et al (2013). Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* isolated in the Southeast Coastal Region of China. *Helicobacter*, **18**, 274-9.
- Lee JW, Kim N, Kim JM, et al (2013). Prevalence of primary and secondary antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Korea from 2003 through 2012. *Helicobacter*, **18**, 206-14.
- De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, et al (2007). Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. *J Antimicrob Chemother*, **59**, 783-5.
- Megraud F (2007). *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut*, **56**, 1502.
- Wang ZH, Gao QY, Fang JY, et al (2013). Meta-analysis of the efficacy and safety of *Lactobacillus*-containing and *Bifidobacterium* containing probiotic compound preparation in *Helicobacter pylori* eradication therapy. *J Clin Gastroenterol*, **47**, 25-32.
- Occhialini A, Urdaci M, Doucet-Populaire F, et al (1997). Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**, 2724-8.
- Kato S, Konno M, Maisawa S, et al (2004). Results of triple eradication therapy in Japanese children: a retrospective multicenter study. *J Gastroenterol*, **39**, 838-43.

- Claudia Schabereiter-Gurtner, Alexander M. Hirschl, Brigitte Dragosics, et al (2004). Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing in stool and biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol*, 42,4512-8.
- Aiba Y, Suzuki N, Kabir AMA, et al (1998). Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am. J. Gastroenterol*, **93**, 2097–101.
- Johnson-Henry KC, Mitchell DJ, Avitzur Y, et al (2004). Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig Dis Sci*, **49**, 1095-1102.
- Tong JL, Ran ZH, Shen J, et al (2007). Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment.Pharmacol. Ther*, **25**, 155–68.
- Sheu B-S, Cheng H-C, Kao A-W et al (2006). Pretreatment with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *Am. J. Clin. Nutr*, **83**, 864–9.
- Patel SK, Pratap CB, Jain AK, et al (2014). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: What should be the gold standard? *World J Gastroenterol*, 20,12847-59.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH et al (1996).Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am, J. Surg. Pathol*, **20**, 1161–81.
- Wittwer, C. T., K. M. Ririe, R. V. Andrew, D. A,et al (1997). The Lightcycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control, *BioTechniques*, **22**,176–181.
- Johnson-Henry KC, Mitchell DJ, Avitzur Y, et al (2004). Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig Dis Sci*, **49**, 1095-1102.
- Tong JL, Ran ZH, Shen J, et al (2007). Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment.Pharmacol Ther*, **25**,155–68.

- Sheu B-S, Cheng H-C, Kao A-W et al (2006). Pretreatment with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *Am. J. Clin. Nutr*, **83**, 864–9.
- Me´nard, A., M. Oleastro, A. Santos, and F. Me´graud (2002). PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Can Also Detect Point Mutation A2142C in the 23S rRNA Gene, Associated with *Helicobacter pylori* Resistance to Clarithromycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 1156–7.
- Chanagune Srinarong , Sith Siramolpiwat, Arti Wongcha-um (2014). Improved Eradication Rate of Standard Triple Therapy by Adding Bismuth and Probiotic Supplement for *Helicobacter pylori* Treatment in Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 9909-13.
- Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* (1994). IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994, *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, **61**, 1-241.
- Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*, **23**,713-39.
- Dussadee Sakonlaya, Anucha Apisarntharak, Nobutaka Yamada (2014). Modified Toluidine Blue: an Alternative Stain for *Helicobacter pylori* Detection in Routine Diagnostic Use and Post-eradication Confirmation for Gastric Cancer Prevention. *Asian Pac J Cancer Prev*, **15**, 6983-7.
- R.-K. Vilaichone, P. Gumnarai, T. Ratanachu-ek, and V. Mahachai (2013): Nationwide survey of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Thailand. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **77**, 346–9.
- Guadalupe Ayala, Wendy Itzel Escobedo-Hinojosa, Carlos Felipe de la Cruz-Herrera et al (2014). Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*, **20**,1450-69.

ประวัตินักวิจัย

อาจารย์ นายแพทย์ทวีศักดิ์ ทองทวี เกิดเมื่อวันที่ 14 มีนาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดสุรินทร์ จบการศึกษาแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะแพทยศาสตร์ สถาบันพระบรมชนก มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปี พ.ศ. 2547 เป็นแพทย์ใช้ทุนปี พ.ศ. 2547 - 2548 ณ โรงพยาบาลสุรินทร์ และโรงพยาบาลลำโรงทาบ จังหวัดสุรินทร์ เมื่อปี พ.ศ. 2548 - 2550 จากนั้น ได้ไปศึกษาต่อแพทย์ประจำบ้าน ภาควิชาศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี กรมการแพทย์ ในปี พ.ศ. 2550 - 2554 และได้ไปศึกษาต่อเป็นแพทย์ประจำบ้านต่อยอด ในสาขาผ่าตัดทางกล้องและส่องกล้องทางเดินอาหาร ในปี พ.ศ. 2555 - 2556 ณ ศูนย์ผ่าตัดทางกล้องและส่องกล้องทางเดินอาหาร ภาควิชาศัลยศาสตร์ โรงพยาบาลราชวิถี กรมการแพทย์ และศึกษาต่อที่ Korea University Medical Center ,Soul, South Korea ในสาขาผ่าตัดทางกล้องและหุ่นยนต์ผ่าตัด เมื่อปี พ.ศ. 2556 - 2557 ปัจจุบัน ดำรงตำแหน่ง อาจารย์ประจำสาขาวิชาศัลยศาสตร์ สำนักวิชาแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มีความเชี่ยวชาญด้านการผ่าตัดทางกล้องและส่องกล้องทางเดินอาหาร

