

เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโดยตรงที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง และผู้ป่วยที่ติดเชืื่อนี้ส่วนหนึ่งจะพัฒนาเป็น gastric ulcer, duodenal ulcer, peptic ulcer และมะเร็งกระเพาะอาหาร ซึ่งการเพิ่มขึ้นของความรุนแรงของโรคนี้นี้มีปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับยีน 2 ชนิด คือ cytotoxin - associated (cagA) และ vaculation cytotoxin (vacA) การศึกษาครั้งนี้คณะวิจัยได้นำวิธี PCR มาตรวจหา cagA และ vacA genotype ในเชื้อ *H.pylori* จากตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหาร โดยใช้ cagAF-cagAR primers ที่จำเพาะต่อ cagA ยีน ที่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 349 bp และใช้ vacAF-vacAR primers ที่จำเพาะต่อ vacA ยีน ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 201 bp สภาวะที่เหมาะสมของภายในปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.5 uM primers แต่ละตัว, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dTTP และ dGTP) , 0.25 Unit Tag DNA polymerase ในสารละลาย 20 uM Tris (pH 8.4), 50 mM KCl , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% BSA และ 0.05% tween จำนวนรอบที่ใช้เพิ่มผลิตภัณฑ์ PCR คือ 40 รอบ และในแต่ละรอบจะประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95°C 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 50°C สำหรับ cagAF-cagAR primers และ 55°C สำหรับ vacAF-vacAR primers เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่ 72°C 1 นาที หลังจากครบ 40 รอบ ทิ้งไว้ต่อไปอีกที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่เพิ่มจำนวนทั้งในตำแหน่ง cagA และ vacA ยีน สามารถตรวจได้ต่ำสุดคือ 0.06 pg

การวิเคราะห์หา ยีน cagA และ vacA โดยวิธี PCR ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารที่ตรวจพบเชื้อ *H.pylori* โดยวิธีใดวิธีหนึ่ง คือ วิธีทางพยาธิวิทยา วิธี usease และวิธี PCR ในตำแหน่งยีนเป้าหมาย HpaA ยีน จำนวน 54 ตัวอย่าง ตรวจพบ cagA และ vacA ยีน 59.3% และ 88.9% ตามลำดับ

เชื้อ *H.pylori* ที่ตรวจพบโดยวิธีการทางพยาธิวิทยา 41 ตัวอย่าง ตรวจพบ cagA 58.5%, vacA 92.7% ตามลำดับ ในเชื้อ *H.pylori* ที่ตรวจพบโดยวิธี Usease 31 ตัวอย่าง ตรวจพบ cagA 80.6%, vacA 100% ตามลำดับ เชื้อ *H.pylori* ที่ตรวจพบโดยวิธี PCR ในตำแหน่งยีนเป้าหมาย HpaA 37 ตัวอย่าง ตรวจพบ cagA 73.0% , vacA 94.6% ตามลำดับ

สรุปได้ว่า cagA และ vacA gene เป็นยีนในสายพันธุ์ของเชื้อ *H.pylori* ที่พบได้ในผู้ป่วยโรคกระเพาะอาหารคนไทย

*Helicobacter pylori* is a major cause of chronic gastritis in which some of the patients infected with this bacterium develop peptic ulcer, gastric ulcer, duodenal ulcer and gastric cancer. There are specific virulence determinants in *H. pylori* strains that associated with a more severe clinical outcome of infection, namely the cytotoxin – associated protein (cagA) and the vacuolation cytotoxin (vacA). In this study, detection of cagA, vacA genotype of *H. pylori* in gastric biopsy specimens from gastritis patients by PCR technique were investigated. For detection of the cagA gene, primers cagAF-cagAR yielded a fragment of 349 bp and vacA gene, primers vacAF-VacAR yielded a fragment of 201 bp. The optimal PCR reaction mixture contained 0.5  $\mu$ M each primer, 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dTTP and dCTP), 0.25 Unit Tag DNA polymerase in 20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% BSA and 0.05% tween. PCR amplification was performed as under the following conditions : initial denaturation at 95°C for 2.30 min. followed by 40 cycle of denaturation at 95°C for 30 s., annealing and extension for 1 min and final extension at 72°C for 7 min. Annealing temperatures were set at 50°C for cagAF-cagAR, at 55°C for vacAF – vacAR, respectively. The minimum concentration of *H. pylori* DNA in both cagA and vacA were 0.06 pg.

Fifty-four *H. pylori* strains were isolated from biopsy specimens of dyspeptic patients, which positive from either diagnostic test (histology, urease test, PCR HpaA gene) were analysed for cagA and vacA gene by PCR technique. It was found that cagA and vacA were positive in 59.3% and 88.9% of the samples respectively.

Forty-one *H. pylori* strains were diagnosed by histology test and found the cagA 58.5%, vacA 92.7% of the sample respectively. Thirty-one *H. pylori* strains were diagnosed by urease test and found the cagA 80.6%, vacA 100% of the sample respectively. Thirty-seven *H. pylori* strains were diagnosed by PCR (HpaA gene) and found the cagA 72.9% and vacA 94.5% of the sample respectively.

Conclusions, the cagA-positive and the vacA-positive *H. pylori* strains can be found in Thai patients with gastroduodenal diseases.