บทคัดย่อ

เป็นที่ยอมรับว่า เชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคกระเพาะอาหาร อักเสบ และแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้นวิธีการวินิจฉัย เชื้อ *H.pylori* ควรจะต้องเป็นวิธีที่มีความไว และความจำเพาะสูง คณะวิจัยได้นำวิธี PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *H.pylori* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารโดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อ HpaA ยีน ที่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 375 bp สภาวะที่เหมาะสมของ reaction mixture ประกอบด้วย 0.25 uM primer แต่ละตัว, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate แต่ละตัว (dATP, dGTP, dTTP และ dCTP), 0.25 unit Taq DNA polymerase (QIAGEN, ประเทศเยอรมัน) ในสารละลาย 20 mM Tris(pH8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01%BSA และ 0.05% tween จำนวนรอบที่ใช้เพิ่มผลิตภัณฑ์ PCR คือ 35 รอบ และในแต่ละรอบจะประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 95 ^{o}C 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่ 56 ^{o}C 1 นาที และขั้นตอน extension ที่ 72 ^{o}C 1 นาที หลังจากครบ 35 รอบ จะทิ้งไว้ต่อไปอีกที่ 72 ^{o}C เป็นเวลา 7 นาที ความเข้มข้นของ DNA ของเชื้อ *H.pylori* ที่สามารถตรวจได้ต่ำสุด คือ 0.4 pg

ตัวอย่างเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ส่วน antrum ได้มาจากผู้ป่วยที่มาตรวจโดยการส่องกล้องตรงระบบทางเดินอาหารส่วนต้น และได้รับการตรวจเชื้อ *H.pylori* ทั้ง 3 วิธี คือ วิธี urease test วิธีทางพยาธิวิทยา โดยย้อมสีเนื้อเยื่อด้วยสี Giemsa และวิธี PCR เชื้อ *H.pylori* ตรวจพบโดยวิธีทางพยาธิวิทยา 58.3% วิธี urease test 44.4% และวิธี PCR 52.8% ความไวและความจำเพาะของวิธี PCR เมื่อเทียบกับวิธีทางพยาธิวิทยาจะได้ 73.8% และ 76.6% ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม หากการวินิจฉัยเชื้อใช้การยืนยันความถูกต้อง ทั้งสองวิธีคือ วิธีทางพยาธิวิทยาและวิธี urease test ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ให้ผลบวกทั้ง 2 วิธี วิธี PCR จะสามารถตรวจได้ถูกต้อง 92.6% ในตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ให้ผลลบทั้ง 2 วิธี วิธี PCR จะให้ผลลบ 23 ใน 25 ตัวอย่าง(92%)

ขั้นตอนที่สำคัญของเทคนิค PCR ก็คือการสกัด DNA ของเชื้อ *H.pylori* จากเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ในการศึกษานี้คณะวิจัยได้เปรียบเทียบวิธีการสกัด 2 วิธี คือวิธีที่ใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp® DNA Mini Kit และใช้ Chelex-100 chelating resin ความไวและความจำเพาะของการตรวจเชื้อ *H.pylori* ด้วยวิธี PCR ที่ใช้ DNA แม่แบบ จากการสกัดด้วย Chelex-100 คือ 89 % และ 81% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการสกัด โดยใช้ QIAamp® DNA Mini Kit

การศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าวิธี PCR ที่ได้สามารถนำมาใช้ยืนยันการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *H.pylori* ร่วมกับวิธีอื่น ความไวและความจำเพาะของวิธี PCR อาจสามารถแก้ไขให้ดีขึ้นได้โดยการออกแบบ primers ที่ต่างกัน และใช้วิธี nested PCR การนำ Chelex-100 chelating resin มาสกัด DNA จากเชื้อ *H.pylori* สามารถนำมาใช้เป็น DNA แม่แบบในการทำ PCR ได้ การสกัดด้วย Chelex-100 มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก รวดเร็ว และมีราคาถูก

Abstract

Helicobacter pylori has been recognized as an important role in the pathogenesis of gastritis and peptic ulcer disease. Therefore the diagnostic methods for detecting *H.pylori* should have high in both sensitivity and specificity. We have eatablished a PCR assay for the detection of *H.pylori* in gastric biopsy specimens with primers specific to HpaA gene which yielded PCR product of 375 bp. The optimal PCR reaction mixture contained 0.25 uM each primer, 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate(dATP, dGTP, dTTP and dCTP), 0.25 unit Taq DNA polymerase(QIAGEN, Germany) in 20 mM Tris pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% BSA and 0.05% tween. Thirty five cycles were employed and each cycle consisting of 30 second denaturation step at 95 ^{o}C , 1 minute annealing step at 56 ^{o}C and one minute extension step at 72 ^{o}C. After 35 cycles, the reaction mixture was further extended for 7 minutes at 72 ^{o}C . The minimum concentration of *H.pylori* DNA which could be detected was 0.4 pg.

Antral biopsy specimens were taken from 72 patients under going upper GI endoscopy and had completed 3 diagnostic tests for *H.pylori* (urease test, Giemsa staining of histological sections and PCR). *H.pylori* were found in 58.3%, 44.4% and 52.8% of patients according to the results of histology, urease test and PCR assay. The sensitivity and specificity of PCR assay compared to histology technique were 73.8% and 76.6% respectively. However, when the diagnosis of *H.pylori* was assessed by agreement with both histology and urease test, with positive samples, PCR detected correctly 92.6%. Whereas specimens had negative results of both tests, PCR gave negative results 23 in 25 specimens (92%).

The important step for PCR technique was the extraction of *H.pylori* DNA from gastric biopsy. In this study we compared two extraction methods namely, QIAamp® DNA Mini Kit and Chelex-100 chelating resin. The sensitivity and specificity of the detection of *H.pylori* by PCR using DNA template from Chelex-100 extraction were 89% and 81% respectively when compared to QIAamp® DNA Mini Kit.

Inconclusion, these findings indicate that the established PCR assay can be used to confirm with other diagnostic methods. The sensitivity and specificity of the PCR assay could be improved by designing different primers set and performing nested PCR. The use of

Chelex-100 chelating resin produced a suitable DNA template for *H.pylori* detection. The extraction method was simple, rapid and the cost of reagent was relatively cheap.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่