


ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cagA*, *vacA* และ *iceA* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* กับโรคแผลเปปติก



นางสาว จันทร์จิรา ทองเต็ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6625-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**THE ASSOCIATION BETWEEN GENES *cagA*, *vacA* and *iceA* OF
HELICOBACTER PYLORI AND PEPTIC ULCER DISEASES**



Miss Janjira Thongtem

**ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)**

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

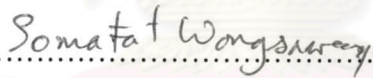
ISBN 974-17-6625-4

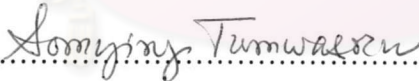
Thesis Title THE ASSOCIATION BETWEEN GENES *cagA*, *vacA* and *iceA*
OF *HELICOBACTER PYLORI* AND PEPTIC ULCER DISEASES
By Miss Janjira Thongtem
Field of Study Medical Microbiology
Thesis Advisor Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.
Thesis Co-advisor Ratha-korn Vilaichone, M.D., Ph.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of
the Requirements for the Master's Degree



..... Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Somying Tumwasorn, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Ratha-korn Vilaichone, M.D., Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Sasichai Kangsadalampai, Ph.D.)

จันทร์จิรา ทองเต็ม : ความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cagA* *vacA* และ *iceA* ของเชื้อ *Helicobacter pylori* กับโรคแผลเปปติก (THE ASSOCIATION BETWEEN GENES *cagA*, *vacA* and *iceA* OF *HELICOBACTER PYLORI* AND PEPTIC ULCER DISEASES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. สมหญิง ชัมวาสร, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อ. นพ. ดร. รัฐกร วิไลชนม์, 129 หน้า. ISBN 974-17-6625-4

การติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อบุกระเพาะอาหารและเป็นโรคกระเพาะอาหารอักเสบ ซึ่งทำให้เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคแผลเปปติกและมะเร็งกระเพาะอาหาร มีการประมาณการณ่ว่ามากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลกมีการติดเชื้อ *H. pylori* ปัจจัยที่มีผลต่ออาการแสดงออกทางคลินิกประกอบด้วย ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม ปัจจัยด้านพันธุกรรมของโฮสต์และปัจจัยก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* ยีนของเชื้อ *H. pylori* เช่น *cagA*, *vacA* และ *iceA* มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิด สายพันธุ์ของเชื้อ *H. pylori* ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในภูมิภาคต่างๆทั่วโลกมีความแตกต่างกันในด้านโครงสร้างของ genome อุบัติการณ์ของเชื้อ *H. pylori* ที่มีความรุนแรงมากในบางพื้นที่อาจมีผลที่สำคัญทางระบาดวิทยาและมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรคในภูมิภาคนั้น นอกจากนั้นการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรคของเชื้อ *H. pylori* กับอาการแสดงออกทางคลินิกยังคงมีความขัดแย้งและมีความแปรปรวนระหว่างแต่ละเชื้อชาติ เนื่องจากความแตกต่างของรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรคและอาการแสดงออกทางคลินิกจากภูมิภาคต่างๆทั่วโลก จึงมีความสำคัญที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *cagA*, *vacA* และ *iceA* กับอาการแสดงออกทางคลินิกในประเทศไทย การศึกษารุ่นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาอุบัติการณ์ของยีน *cagA*, *vacA* และ *iceA* ของเชื้อ *H. pylori* ในผู้ป่วยโรคแผลเปปติกเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่มีอาการปวดท้องแต่ตรวจไม่พบแผลและศึกษาความสัมพันธ์ของยีนเหล่านี้กับโรคแผลเปปติก ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อ *H. pylori* 40 isolates แยกได้จากผู้ป่วยโรคแผลเปปติกและอีก 40 isolates แยกได้จากผู้ป่วยที่มีอาการปวดท้องแต่ตรวจไม่พบแผล ส่วนการตรวจหาและจำแนกชนิดของยีน *cagA*, *vacA* และ *iceA* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยใช้เทคนิค PCR พบว่า *cagA* positive, *vacA* s1, m2 และ *iceA*2 เป็นยีนหลักของเชื้อ *H. pylori* ที่พบในประเทศไทย และพบว่ายีน *cagA*, *vacA* หรือ *iceA* ของเชื้อ *H. pylori* แต่ละยีนไม่สามารถบ่งชี้การเกิดโรคแผลเปปติก นอกจากนี้ พบ mixed *iceA* genotype มีอุบัติการณ์สูง (48.75%) ในผู้ป่วยไทย ทุกสายพันธุ์ที่พบ mixed *iceA* genotype มี *vacA* genotype เพียงชนิดเดียว ซึ่งบ่งชี้ว่ามี mixed *iceA* genotype ในเชื้อหนึ่งสายพันธุ์เช่นกัน จากการวิเคราะห์ผลพบ *vacA* s1a ร่วมกับ mixed *iceA* genotype มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคแผลเปปติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.04$, $OR=2.51$, $95\%CI=1.05-6.04$) ทำให้ทราบว่า การมี *vacA* s1a ร่วมกับ mixed *iceA* genotype สามารถพยากรณ์การเกิดโรคแผลเปปติกในผู้ป่วยไทยได้ ถ้าพิสูจน์ได้ว่ามี mixed *iceA* genotype จริง

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....จันทร์จิรา ทองเต็ม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4589071920 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD : *Helicobacter pylori* / *cagA*, *vacA* and *iceA* genes / peptic ulcer disease

JANJIRA THONGTEM : THE ASSOCIATION BETWEEN GENES

cagA, *vacA* and *iceA* OF *HELICOBACTER PYLORI* AND PEPTIC ULCER

DISEASES. THESIS AIVISOR : ASSOC. PROF. SOMYING

TUMWASORN, Ph.D. THESIS CO- ADVISOR : RATHA-KORN

VILAICHONE, MD.,Ph.D.,129 pp. ISBN 974-17-6625-4

Helicobacter pylori infection causes gastric inflammation and gastritis which increase the risk for peptic ulcer disease (PUD) and gastric cancer. It is estimated that more than half of the world's population is infected with *H. pylori*. The etiologic factors contributing to clinical outcome include environmental factors, genetic factors of host and virulence factors of *H. pylori*. Several genes of *H. pylori* play a key role in pathogenesis such as *cagA*, *vacA* and *iceA* genes. The predominant *H. pylori* strains circulating among geographic locations differ in regard to genomic structure. The prevalence of more pathogenic bacterial genotype in certain areas may have important epidemiological consequences and be associated with the severity of *H. pylori*-related diseases in such regions. In addition, previous studies demonstrated that the relationship between virulence genes of *H. pylori* and clinical outcome is still controversial and varies between each ethnic group. Because of this diversity of reports associating the virulence genes with the clinical outcome from different geographic regions, it is important to analyze the association between genes *cagA*, *vacA* and *iceA* of *H. pylori* and clinical outcome in Thai setting. The aim of this study was to examine the prevalence of genes *cagA*, *vacA* and *iceA* of *H. pylori* in patients with PUD compared with patients with non-ulcer dyspepsia (NUD) and to determine the association of these genes with PUD. In this study, 40 *H. pylori* isolates were obtained from PUD patients and 40 isolates from NUD patients. Genes *cagA*, *vacA* and *iceA* of *H. pylori* were identified by using polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. The result of this study demonstrated that *cagA* positive, *vacA* s1, m2 and *iceA2* genotypes were found predominantly in *H. pylori* in Thailand. The presence of either *cagA*, allelic variant *vacA* and *iceA* alone does not have a predictive value as a risk marker for clinical outcome of *H. pylori* infection. In addition, high prevalence of mixed *iceA* isolates (48.75%) was found in Thai patients. All of these isolates contained single *vacA* genotype which suggests the presence of mixed *iceA* genotype in one strain. From analysis, *vacA* s1a, mixed *iceA* genotype was found to be significantly associated with PUD ($P=0.04$, $OR=2.51$, $95\%CI=1.05-6.04$). Therefore, *vacA* s1a, mixed *iceA* genotype may be regarded as marker for predicting the peptic ulcer disease in Thai setting if the mixed *iceA* genotype has been proven to be really existed.

Field of study Medical Microbiology

Academic year 2004

Student's signature.....Janjira Thongtem

Advisor's signature.....Somying Tumwasorn

Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Somying Tumwasorn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her excellent instruction, advice, indispensable help, encouragement and criticism throughout the period of this study. I also would like to thank my co-advisor, Dr. Ratha-korn Vilaichone, Gastroenterology Unit, Department of Medicine, Thammasat University Hospital, for his kindness, suggestion and help in collecting samples and clinical information of patients.

I would like to thank Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, the chairman of this thesis committee and Assistant Professor Dr. Sasichai Kangsadalampai, Faculty of Medicine, Thammasat University, the member of thesis committee for their constructive criticisms.

I would like to thank Dr. Tanittha Chatsuwan for her kindness and guidance for culture technique. I am grateful to Miss Ajcharaporn Sawatpanich, Miss Kamoltata Naweewitpadung, and Mrs. Panarat Thaimai for suggestion and help in laboratories. Most sincerely I would like to express my deepest appreciation to my parents and friends for their love, supporting, encouragement and understanding during this study.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIVE.....	4
III. LITERATURE REVIEWS.....	5
General characteristics.....	5
Classification.....	7
Culture and identification.....	9
Diagnostic testing.....	15
Epidemiology and transmission.....	20
Clinical manifestations.....	25
Virulence factors of <i>H. pylori</i>	30
Association between genes and clinical outcome.....	38
IV. MATERIALS AND METHODS.....	45
V. RESULTS.....	55
VI. DISCUSSION.....	79
VII. CONCLUSION.....	82
REFERENCES.....	83
APPENDICES.....	109
APPENDIX I.....	110
APPENDIX II.....	113
APPENDIX III.....	115
BIOGRAPHY.....	117

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. Characteristics of member in genus <i>Helicobacter</i>	8
2. Comparison of culture media and atmospheric conditions for growth of <i>H. pylori</i>	12
3. Summary of tests for detection of <i>H. pylori</i>	19
4. <i>H. pylori</i> virulence factors in gastroduodenal pathogenesis.....	30
5. Positive association between genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> of <i>H. pylori</i> and clinical outcome.....	43
6. Positive association between genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> of <i>H. pylori</i> and clinical outcome.....	44
7. PCR primers for amplification of genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> in <i>H. pylori</i>	53
8. Demographic data of patients with PUD and NUD	56
9. <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> genotypes of <i>H. pylori</i> isolates from 80 patients.....	66
10. Prevalence of genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> in <i>H. pylori</i> isolated from patients in Thai setting.....	67
11. Univariate analysis of the association between genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> and clinical outcome.....	69
12. Multivariate analysis of the association between genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> and clinical outcome.....	71
13. Multivariate analysis of genes <i>vacA</i> , other allelic variants and <i>iceA</i> in <i>H. pylori</i> and clinical outcome by comparison between diseases.....	73
14. Multivariate analysis of interaction of <i>vacA</i> s1, <i>vacA</i> m and <i>iceA</i> subtypes in <i>H. pylori</i> and clinical outcome.....	74
15. Multivariate analysis of interaction of <i>vacA</i> s2, <i>vacA</i> m and <i>iceA</i> subtypes <i>H. pylori</i> and clinical outcome.....	75

16. Multivariate analysis of interaction of *vacA* s1a, *vacA* m and *iceA* subtypes
in *H. pylori* and clinical outcome..... 76
17. Multivariate analysis of interaction of *vacA* s1c, *vacA* m and *iceA* subtypes
H. pylori and clinical outcome.....77



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURES	PAGE
1. Schematic representation of the <i>cag</i> region.....	33
2. Schematic representation of the vacuolating cytotoxin gene, <i>vacA</i> and protein, VacA.....	35
3. Schematic representation of <i>iceA</i> genes.....	37
4. DNA amplification of genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> and <i>iceA</i> in <i>H. pylori</i>	49
5. Diagram present target gene for amplification <i>cagA</i> gene.....	50
6. Mosaic structure of the <i>vacA</i> genes comprising the variable s and m regions....	51
7. Diagram present target gene for amplification <i>iceA</i> gene.....	52
8. PCR analysis of <i>cagA</i> genotype.....	57
9. PCR analysis of <i>vacA</i> s region.....	58
10. PCR analysis of <i>vacA</i> s1a subtype.....	59
11. PCR analysis of <i>vacA</i> s1c subtype.....	60
12. PCR analysis of <i>vacA</i> m region.....	61
13. PCR analysis of <i>vacA</i> m1b subtype.....	62
14. PCR analysis of <i>iceA1</i> genotype.....	63
15. PCR analysis of <i>iceA2</i> genotype.....	64

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

bp	base pair
CO ₂	carbon dioxide
95 % CI	95 % confidence interval
°C	degree celsius
DNA	deoxynucleic acid
DU	duodenal ulcer
dNTPs	deoxynucleotide - tri - phosphate
DW	distilled water
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
et al.	et alii
g	gram
GU	gastric ulcer
HCl	hydrochloric acid
hr	hour
i.e.	id est
KCl	potassium chloride
M	molar
mg	milligram
MgCl ₂	magnesium chloride
min	minute (s)
ml	millilitre
mM	millimolar
NaCl	sodium chloride
NUD	non-ulcer dyspepsis
OR	odd ratio
PCR	polymerase chain reaction
PUD	peptic ulcer disease
pmol	picomol
Sec	second
TBE	Tris-borate buffer

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris - (Hydroxymethyl) - aminoethane
U	Unit
μg	microgram
μl	microliter
μm	micromolar
UV	ultraviolet



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย