

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра  
\_\_\_\_\_ Е.Н.Кроткова  
\_\_\_\_\_ 2021 г.  
Регистрационный № 139 – 1121



**Метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса  
*Helicobacter pylori* с определением концентрации цитокинов  
интерлейкина-6 и интерлейкина-10  
(инструкция по применению)**

**УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ:** учреждение образования  
«Гомельский государственный медицинский университет», учреждение  
здравоохранения «Гомельский областной клинический онкологический  
диспансер»

**АВТОРЫ:** к.м.н., доцент Воропаев Е.В., д.м.н., доцент Стома И.О.,  
Осипкина О.В., Ковалев А.А., к.м.н., доцент Ачинович С.Л., Зятков  
А.А., Шафорост А.С., Назарчук Ю.А.

Гомель, 2021

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Е. Н. Кроткова

24.12.2021

Регистрационный № 139-1121

**МЕТОД ОЦЕНКИ ОНКОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА САГА-СТАТУСА  
*HELICOBACTER PYLORI* С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ КОНЦЕНТРАЦИИ  
ЦИТОКИНОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 И ИНТЕРЛЕЙКИНА-10**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Гомельский государственный  
медицинский университет», УЗ «Гомельский областной клинический  
онкологический диспансер»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Е. В. Воропаев, д-р мед. наук, доц. И. О. Стома,  
О. В. Осипкина О.В, А. А. Ковалев, канд. мед. наук, доц. С. Л. Ачинович,  
А. А. Зяцьков, А. С. Шафорост, Ю. А. Назарчук

Гомель 2021

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *Helicobacter pylori* с определением концентрации цитокинов (интерлейкина-6 и интерлейкина-10) в сыворотке (плазме) крови у пациентов с болезнями желудка и двенадцатиперстной кишки, который может быть использован в качестве дополнительного диагностического критерия.

Метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *Helicobacter pylori* с определением концентрации цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-10 может быть использован в комплексе медицинских услуг, с целью медицинской профилактики развития злокачественных новообразований желудка, связанных с инфекционным процессом, вызванным доминирующими в Республике Беларусь штаммами *Helicobacter pylori*.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-онкологов, врачей-гастроэнтерологов и врачей иных специальностей, оказывающих медицинскую помощь профильным пациентам в стационарных и амбулаторных условиях.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для молекулярно-генетического анализа (набор оборудования для молекулярно-генетического и иммуноферментного анализа)

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная центрифуга (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до 25 °С
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
УФ-стерилизатор или его аналог
<i>ПЦР-реакция</i>
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10; 5-50; 20-200; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С

Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
<i>Электорофоретическая детекция</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
УФ-трансиллюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером
<i>Иммуноферментный анализ</i>
Микропланшетный фотометр
Термошейкер
Промыватель планшетов автоматический с комплектующими
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10; 10-100; 100-1000 мкл)
Комплект пипеточных дозаторов восьмиканальных (5-50; 30-300; 100-1000 мкл)

Также необходимы следующие изделия медицинского назначения: ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера); микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; наконечники с фильтром объемом 10, 20, 200, 1000 мкл; наконечники без фильтра; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок и др.

Для молекулярно-генетических исследований необходимы: наборы реагентов для экстракции и очистки ДНК, для амплификации и электрофоретической детекции. Для иммуноферментного анализа необходимы соответствующие наборы реагентов.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (МКБ-10: К25-К28); гастрит и дуоденит (К29); другие болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (К31); злокачественное новообразование желудка (С16-С16.9).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

**Этап 1. Получение и транспортировка биологического материала** (биоптаты слизистой оболочки желудка, сыворотка (плазма) крови) проводится в соответствии с правилами для молекулярно-биологических и иммунологических исследований.

## Этап 2. Экстракция ДНК

Выделение ДНК можно проводить с использованием готовых коммерческих наборов.

## Этап 3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori* использованы праймеры, структура которых приведена в таблице 2.

Таблица 2. — Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
CagA-прямой	gataacaggcaagcttttgaggga	349 пар нуклеотидов (п.н.)
CagA-обратный	ctgcaaaagattgtttggcaga	

Программа для проведения ПЦР: денатурация 1 цикл — 95 °С, 3 мин; 42 цикла (95 °С – 20 с, 55 °С – 20 с, 72 °С – 20 с); финальная элонгация 1 цикл 72 °С – 2 мин.

## Этап 4. Электрофоретическая детекция

В результате ПЦР в образцах амплифицируется специфический фрагмент размером 349 п.н. гена *CagA Helicobacter pylori*. Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 1.

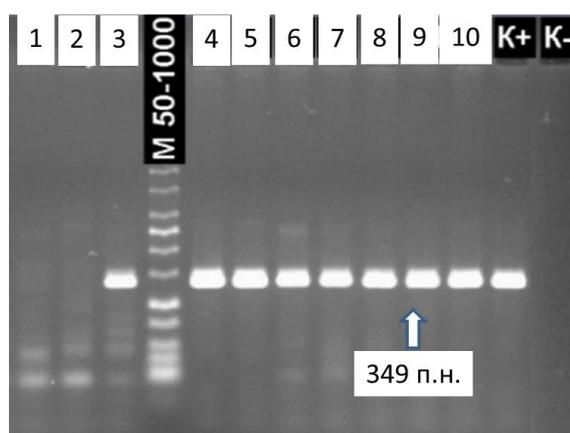


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР, амплифицирован фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*

Как видно на рисунке 1, в образцах № 3-10 выявлен фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*, в образцах 1, 2 — не выявлен. Для верификации используется положительный K+ и отрицательный контроли K-, представляющие образцы, в которых доказано наличие или отсутствие фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*. При корректной работе контролей делают вывод о наличии или отсутствии фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori* в каждом из тестируемых образцов.

## Этап 5. Иммуноферментный анализ

Концентрацию интерлейкина-6 и интерлейкина-10 в сыворотке (плазме) крови пациентов определяют с применением микропланшетного фотометра, используя коммерческие наборы реагентов согласно инструкции производителя.

## Этап 6. Интерпретация результатов

Для интерпретации результатов используется модель логистической регрессии и ROC-анализ, показавшие статистическую значимость при обработке результатов. Диагностическая модель логистической регрессии имеет вид (формула):

$$p = e^{-3,25 + 1,14 \text{ CagA} + 0,073 * \text{ИЛ-6} + 0,06 * \text{ИЛ-10}} / (1 + e^{-3,25 + 1,14 \text{ CagA} + 0,073 * \text{ИЛ-6} + 0,06 * \text{ИЛ-10}})$$

где  $p$  — вероятность наличия у пациента злокачественных новообразований желудка;

CagA — наличие или отсутствие фрагмента гена CagA *Helicobacter pylori*, обозначаемое, соответственно, «1» или «0»;

ИЛ-6 — значение концентрации интерлейкина-6, выраженное в пг/мл;

ИЛ-10 — значение концентрации концентрации интерлейкина-10, выраженное в пг/мл.

По формуле необходимо рассчитать значение  $p$  для каждого пациента, используя переменные CagA, ИЛ-6, ИЛ-10, полученные при проведении анализа.

Значение  $p$ , полученное при расчете по формуле, необходимо сравнить с пороговым значением, равным 0,263 (согласно ROC-кривой полученной модели, представлено на рисунке 2).

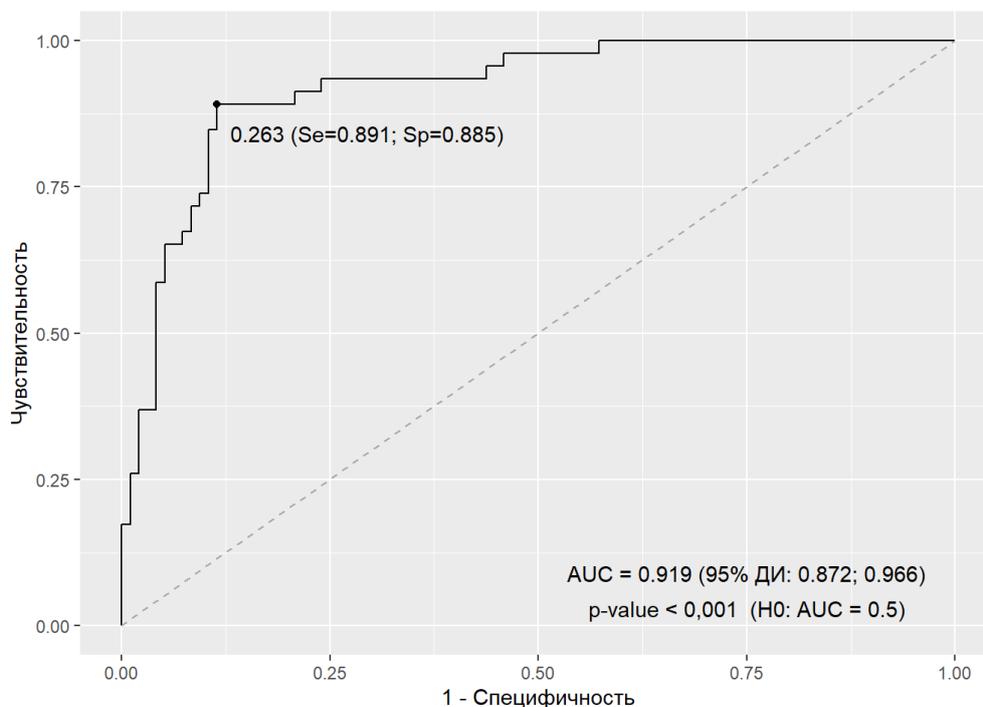


Рисунок 2. — ROC-кривая оценки модели логистической регрессии

Для интерпретации результатов использовать таблицу 3.

Таблица 3. — Интерпретация результатов

Сравнение расчетного и порогового значения p	Интерпретация
Расчетное значение p >0,263	Онконастороженность. Пациент нуждается в обязательном углубленном обследовании и дополнительном диспансерном наблюдении (Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль. МКБ-10: Z03.1)
Расчетное значение p <0,263	Другие заболевания желудочно-кишечного тракта (МКБ-10: K25-K28, K29, K31), не являющиеся злокачественными новообразованиями желудка

Согласно ROC-кривой (видно из рисунка 2), полученная модель имеет высокую прогностическую способность. Специфичность составляет 88,5 %, чувствительность — 89,1 %.

#### **Заключение**

Метод оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *Helicobacter pylori* с определением концентрации цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 может быть применен в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику заболеваний желудочно-кишечного тракта.

При получении расчетного значения p>0,263 делают вывод о высокой онконастороженности и необходимости обязательного углубленного обследования и дополнительного диспансерного наблюдения пациента (МКБ-10: Z03.1).

#### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Для правильной организации высококачественных молекулярно-генетических исследований необходимо строгое соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Нарушение этих правил будет являться причиной появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Одновременно с опытными образцами в каждом эксперименте должны использоваться специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты. Для обеспечения получения правильных результатов иммуноферментного анализа необходимо строгое соблюдение инструкции производителя и выполнение основных правил при проведении анализа, обеспечивающих достоверность и воспроизводимость.

## **Обоснование целесообразности практического использования метода оценки онкогенного потенциала CagA-статуса *Helicobacter pylori* с определением концентрации цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-10**

Рак желудка возникает в результате ряда генетических, эпигенетических и метаболических изменений в продуцирующих слизь клетках на внутренней поверхности слизистой оболочки желудка. Клетки рака желудка экспрессируют множество факторов роста и систем рецепторов цитокинов, которые образуют очень сложную сеть взаимодействия между раковыми клетками и стромальными клетками в микроокружении опухоли и придают опухолям желудка терапевтически устойчивый фенотип. Хотя кратковременная колонизация *Helicobacter pylori* слизистой оболочки желудка протекает бессимптомно, примерно у 10 % пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*, развиваются пептические язвы, и не более чем у 3 % — онкологические заболевания. Стойкая колонизация слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* значительно увеличивает вероятность развития патологических процессов в желудке. Примечательно, что предраковые поражения, опосредованные инфекцией *Helicobacter pylori*, имеют иммунопатологическое происхождение.

Одним из ключевых генов, являющихся значимыми предикторами неблагоприятных клинических исходов, связанных с онкогенным потенциалом *Helicobacter pylori* является цитотоксин-ассоциированный ген А (CagA). Взаимодействие факторов вирулентности, генетических факторов хозяина и факторов окружающей среды способствует патогенезу, связанному с *Helicobacter pylori*. Хотя гастрит вызывается всеми штаммами *Helicobacter pylori*, но не все штаммы *Helicobacter pylori* способны вызывать карциному желудка. Только штаммы *Helicobacter pylori*, содержащие CAG PAI (CagA+) увеличивает вероятность развития рака желудка. Ген CagA, *Helicobacter pylori*, вызывает генетическую нестабильность в клетках слизистой оболочки желудка, обычно модулируя активность различных генов.

Иммунный ответ на инфекцию *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке желудка обычно связан с высвобождением воспалительных и противовоспалительных цитокинов из различных типов иммунных клеток, таких как Th1, Th2, Th17, макрофаги, моноциты, тучные клетки и нейтрофилы. Многие из этих цитокинов, такие как интерлейкин (ИЛ)1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-17, ИЛ-23, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL12 и CXCL4, секретируются как в очаге инфекции, так и в общем кровообращении. Специфические мембранные рецепторы экспрессируются эпителиальными клетками желудка, которые помогают передавать сигнал, переносимый различными цитокинами, внутрь клетки. Цитокины действуют на широкий спектр типов клеток, где они связываются со своими родственными мембранными рецепторами и модулируют нижестоящие эффекторы в сигнальном каскаде.

Механизм действия цитокинов в онкогенезе может быть связан с действием определенных киназ, запускающих фосфорилирование активаторов транскрипции, например STAT3, который после фосфорилирования проникает в ядро и связывается со специфическими регуляторными последовательностями для активации или репрессии транскрипции генов-мишеней. В то же время, помимо

действия в качестве фактора транскрипции, STAT3 действует как маркер прогрессирования карциномы желудка.

Таким образом, разработка дополнительного критерия на оценки онкогенного потенциала *Helicobacter pylori* для формирования целевой группы с использованием доступных лабораторных методов диагностики, представляет значимый интерес для практической медицины.