

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

«26» 03 20 20 г.

Регистрационный №153-1219



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАРИАНТА

ГЕНА ЧЕЛОВЕКА СУР2С19\*2

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение  
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и  
микробиологии»

АВТОРЫ: чл.-кор. НАН Беларуси, д-р мед. наук, профессор Титов Л.П.,  
канд. биол. наук Янович О.О.

Минск, 2019

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневич  
26.03.2020

Регистрационный №153-1219

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАРИАНТА  
ГЕНА ЧЕЛОВЕКА СYР2С19\*2**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси Л. П. Титов, канд. биол.  
наук О. О. Янович

Минск 2019

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод определения варианта гена человека CYP2C19\*2 цитохрома P450 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (модификация FRET), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение *H. pylori* — ассоциированного гастрита и язвы двенадцатиперстной кишки.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гастроэнтерологов, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарах и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

1. Гастрит и дуоденит (МКБ-10: K29).
2. Язва двенадцатиперстной кишки (МКБ-10: K26).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

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

**Изделия медицинской техники для молекулярно-генетического анализа**  
*Экстракция дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)*

1. ПЦР-бокс.
2. Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» (10 000-15 000xg).
3. Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (диапазон рабочих температур от 25 до 99 °С).
4. Микроцентрифуга-вортекс.
5. Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10; 20-200; 200-1000 мкл).
6. Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С.
7. Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С.
8. Бактерицидная УФ-лампа.

*Проведение FRET-реакции*

1. ПЦР-бокс.
2. Термоциклер для ПЦР в режиме реального времени.
3. Микроцентрифуга-вортекс.
4. Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10; 20-200 мкл).
5. Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С.
6. Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С.
7. Бактерицидная УФ-лампа.

### **Реактивы для FRET-реакции**

*Пробоподготовка и выделение ДНК*

Набор реагентов для выделения ДНК из крови.

*Проведение FRET-реакции*

1. 10x буфер для Taq-полимеразы.
2. Taq-полимераза 5 ед/мкл.
2. Хлорид магния 50 мМ.

3. Смесь дНТФ 25 мМ.
4. Олигонуклеотидные праймеры 10 пМ.
5. Флуоресцентно-меченые зонды 10 пМ.
6. Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз.

Необходимы следующие изделия медицинского назначения: пробирки пластиковые типа «эппендорф» (0,5 и 1,5 мл); наконечники полимерные с фильтром объемом 10, 200, 1000 мкл; халаты, резиновые перчатки, штативы для пробирок.

Качество используемых реактивов должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-биологических исследований.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Материалом для исследования является цельная периферическая кровь. Возможно использование других биологических жидкостей и тканей, в т. ч. биоптатов слизистой оболочки желудка.

#### **Взятие и транспортировка биологического материала**

Забор цельной периферической крови производится в пробирку с 3 %-м раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) из расчета 1:20. Закрытую пробирку с цельной периферической кровью несколько раз переворачивают для равномерного перемешивания с ЭДТА. Доставка в лабораторию осуществляется в течение 2 ч при температуре 20-25 °С, 12 ч — 2-8°С.

Взятие биоптатов слизистой оболочки желудка осуществляют во время фиброгастроуденоскопии из антрального отдела желудка. Биопсийный материал помещают в стерильные пробирки объемом 1,5 мл, содержащие 100 мкл стерильного физиологического раствора хлорида натрия, маркируют и доставляют в лабораторию на холоде в течение 1 ч. При необходимости пробы могут храниться при температуре -20 °С в течение недели.

#### **Экстракция ДНК из биологического материала**

Выделение тотальной ДНК производят с использованием коммерческого набора, предназначенного для выделения ДНК из соответствующего биологического материала. Выделенные образцы ДНК хранят при -20 °С не более 1 года. Не допускается повторное размораживание-оттаивание образцов.

#### **Определение точечной мутации в гене CYP2C19**

Метод определения точечных мутаций FRET включает амплификацию фрагмента гена человека CYP2C19 с одновременным определением продукта в реакции гибридизации и анализом кривых плавления с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Последовательность праймеров и программа амплификации приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. — Олигонуклеотидная последовательность праймеров выявления точечной мутации в гене CYP19C2

| Название праймера | Последовательность, 5' - 3'         |
|-------------------|-------------------------------------|
| Прямой праймер    | AATTACAACCAGAGCTTGGC                |
| Обратный праймер  | TATCACTTTCCATAAAAGCAAG              |
| Зонд 1            | Cy5-TGATTATTTCCAGGAACCC-Phos        |
| Зонд 2            | CTCTTAGATATGCAATAATTTTCCCACTATC-FAM |

Таблица 2. — Условия амплификации с целью выявления точечной мутации в гене CYP19C2

| Шаг             | Температура                | Время |
|-----------------|----------------------------|-------|
| Денатурация     | 95 °C                      | 30 с  |
| 35 циклов       | 95 °C                      | 10 с  |
|                 | 48 °C                      | 10 с  |
|                 | 72 °C                      | 14 с  |
|                 | 95 °C                      | 15 с  |
| Инактивирование | 95 °C                      | 15 с  |
| Плавнение       | От 40 до 90 °C<br>Шаг 1 °C |       |

Анализ полученных данных проводят по кривым плавления продуктов ПЦР реакции (рисунок).

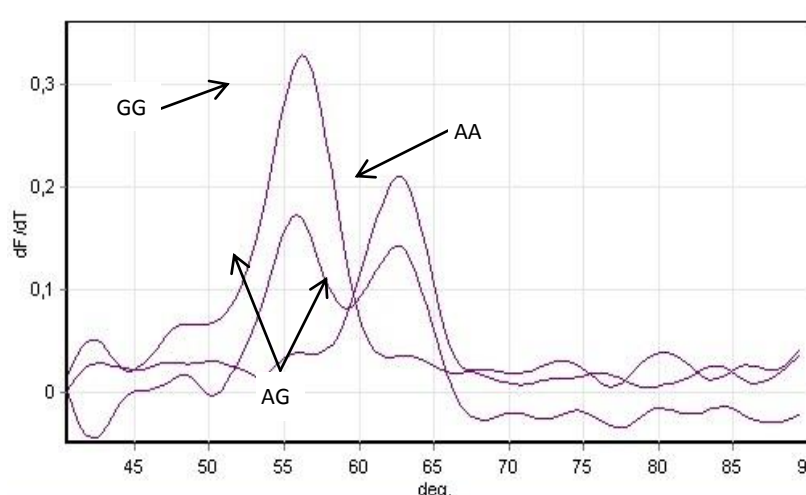


Рисунок — Анализ кривых плавления для определения наличия мутаций в гене CYP2C19

Гомозиготные образцы GG (дикий тип) образуют пик плавления при температуре 56 °C, гомозиготы AA (мутантный тип) — 62 °C. Для гетерозиготных образцов характерно наличие обоих пиков.

### Интерпретация результатов

При выявлении гомозиготы GG — пациент с быстрым типом метаболизма ингибиторов протонной помпы; гетерозиготы AG — с промежуточным метаболизмом ингибиторов протонной помпы; гомозиготы AA — с медленным типом метаболизма ингибиторов протонной помпы.

## **Заключение**

Недостаточная эффективность эрадикационной терапии *H. pylori* может быть вызвана различными причинами, в т. ч. и генетически обусловленной активностью метаболизма ингибиторов протонной помпы. Основным ферментом, участвующим в метаболизме ингибиторов протонной помпы, является CYP2C19.

В зависимости от наличия разных аллелей изофермента CYP2C19 выделяют несколько фенотипов пациентов: с быстрым метаболизмом ингибиторов протонной помпы — носители диких аллелей (GG); с промежуточным метаболизмом — наличие одного вариантного аллеля (AG); у носителей двух вариантных аллелей (AA) скорость метаболизма ингибиторов протонной помпы значительно снижена.

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

Использование метода ПЦР подразумевает строгое следование всем правилам организации и проведения исследований в ПЦР-лаборатории.

Возможны следующие ошибки:

отсутствие кривой флуоресценции в пробе положительного контроля или ее наличие в пробе отрицательного контроля свидетельствует о невозможности учета результатов реакции;

отсутствие кривой флуоресценции в препарате положительного контроля указывает на возможную деградацию ДНК, внесение в реакционную смесь ингибиторов реакции. При исследовании необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников на всех стадиях постановки во избежание внесения ингибиторов реакции.

Наличие кривой флуоресценции в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации проб.

При исследовании должны соблюдаться методические указания и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.