

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л. Шиневич
«22» 12 2018 г.
Регистрационный № 224-12/8



МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ *HELICOBACTER PYLORI*
– АССОЦИИРОВАННОГО АТРОФИЧЕСКОГО ГАСТРИТА И ЯЗВЫ
ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
ООО «Медицинский центр Нордин»

АВТОРЫ: чл.-корр. НАН Беларуси, д.м.н., профессор Титов Л. П.,
к.б.н. Янович О.О., Дорошко М.В., Сергеева И.Г.

Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневиц
28.12.2018

Регистрационный № 224-1218

**МЕТОД ОЦЕНКИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ
HELICOBACTER PYLORI — АССОЦИИРОВАННОГО
АТРОФИЧЕСКОГО ГАСТРИТА
И ЯЗВЫ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», ООО «Медицинский центр Нордин»

АВТОРЫ: чл.-кор. НАН Беларуси, д-р мед. наук, проф. Л. П. Титов, канд. биол. наук О. О. Янович, М. В. Дорошко, И. Г. Сергеева

Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки вероятности развития *Helicobacter pylori*-ассоциированного атрофического гастрита и язвы двенадцатиперстной кишки на основе молекулярно-генетического типирования генов факторов патогенности *Helicobacter pylori* (HP) и генетического полиморфизма гена иммунной системы интерлейкина-1β.

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

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетического анализа

<i>Экстракция ДНК</i>
ПЦР-бокс
Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (10 000–15 000xg)
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (диапазон рабочих температур 25–99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 20–200; 200–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Бактерицидная УФ-лампа
<i>ПЦР-реакция</i>
ПЦР-бокс
Термоциклер для ПЦР
Микроцентрифуга-вортекс
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл (диапазон рабочих температур 25–99 °С)
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 20–200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Бактерицидная УФ-лампа
<i>Электрофоретическая детекция</i>
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10 и 20–200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от 2 до 4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для проведения горизонтального гель-электрофореза
Источник постоянного тока для электрофореза
УФ-трансиллюминатор
Бактерицидная УФ-лампа

Таблица 2. — Реактивы для ПЦР и электрофоретической детекции

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
Набор реагентов для выделения ДНК из биопсийного материала желудка
<i>ПЦР-реакция</i>
10 x буфер для Таq-полимеразы
Таq-полимераза 5 ед/мкл
Хлорид магния 50 мМ
Смесь дНТФ 25 мМ
Олигонуклеотидные праймеры 10 пМ
Набор рестриктаз
Вода стерильная бидистиллированная свободная от нуклеаз
<i>Электрофоретическая детекция</i>
Агароза для электрофореза
Маркер молекулярного веса (от 50, 100 и 250 п.о.)
ТАЕ-буфер
Бромистый этидий

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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Гастрит и дуоденит (МКБ-10 — К29); язва двенадцатиперстной кишки (К26).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Материалом для исследования являются биоптаты слизистой оболочки желудка пациентов.

Взятие и транспортировка биологического материала

Взятие биоптатов слизистой оболочки желудка осуществляют во время фиброгастродуоденоскопии 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 -20 °С в течение недели.

Экстракция ДНК из биопсийного материала желудка

Тотальную ДНК выделяют с использованием коммерческого набора, предназначенного для выделения ДНК из биопсийного материала. Выделенные образцы ДНК хранят при -20 °С не более 1 года. Не допускается повторное размораживание-оттаивание образцов.

Детекция *H.pylori* в биопсийном материале с помощью ПЦР

Для выявления ДНК *HP* в биопсийном материале желудка используют праймеры для амплификации фрагмента гена 23S рРНК длиной 267 п.о.

Последовательность праймеров и программа амплификации приведены в таблицах 3 и 4 соответственно.

Таблица 3. — Олигонуклеотидная последовательность праймеров для выявления ДНК *H.pylori*

Название праймера	Последовательность, 5'–3'
HP-прямой	5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3'
HP-обратный	5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3'

Таблица 4. — Условия амплификации с целью выявления ДНК *H.pylori*

Ген	Шаг	Температура	Время
23S рРНК	Денатурация	94 °С	5 мин
	30 циклов	94 °С	20 с
		57 °С	20 с
		72 °С	20 с
	Элонгация	72 °С	5 мин

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).

Детекция генов факторов патогенности *HP* методом ПЦР

Наибольшую значимость среди факторов вирулентности *HP* имеет генетически вариабельный остров патогенности *cag* (*cag pathogenicity island*), включающий около 31 гена. Большое значение имеют такие гены патогенности *HP* как *dupA* (расположен в регионе пластичности *HP*) и *babA* (обеспечивающий адгезию бактерии к Lewis b антигенам групп крови, секретлируемым на поверхность эпителия).

Для накопления фрагментов ДНК генов факторов патогенности *HP* используют праймеры, представленные в таблице 5.

Объем реакционной смеси: 1 мкл 10 пмоль раствора прямого праймера, 1 мкл 10 пмоль раствора обратного праймера, 2,5 мкл 10 х ПЦР-буфера, 1,3 мкл 50 ммоль раствора хлорида магния, 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед/мкл Таq-полимеразы, бидистиллированная вода до объема 25 мкл.

Анализ продуктов амплификации осуществляют методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).

Наличие гена *dupA* считают положительным только при выявлении ампликонов как с праймером *jhp0917* (307 п.о.), так и *jhp0918* (276 п.о.).

Таблица 5. — Праймеры для накопления фрагментов генов *HP*

Ген	Последовательность, 5'–3'	Размер фрагмента
<i>cagE</i>	F-5'-TATCAAAGAATGGAGCGAGC-3' R-5'-CTAGATAGGAGTTTGCAGCG-3'	242 п.о.
<i>cagL</i>	F-5'-GAGATTTAGCGTTATTGAAAGCC-3' R-5'-AAAAGTTCAGGGCTAGACA-3'	100 п.о.
<i>cagH</i>	F-5'-ATGGCAGGTACACAAGCTAT-3' R-5'-TCACTTCACGATTATTTTAG-3'	1113 п.о.
<i>babA2</i>	F-5'-CCTACACCGAAATCACTAAC-3' R-5'-GTGATCATCTTTTGGATCG-3'	217 п.о.
<i>dupA</i> (<i>jhp0917</i>)	F-5'-TGGTTTCTACTGACAGAGCGC-3' R-5'-AACACGCTGACAGGACAATCTCCC-3'	307 п.о.
<i>dupA</i> (<i>jhp0918</i>)	F-5'-CCTATATCGCTAACGCGCTCGC-3' R-5'-AAGCTGAAGCGTTTGTAACG-3'	276 п.о.

Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 6.

Таблица 6. — Условия амплификации фрагментов генов *HP*

Ген	Шаг	Температура	Время
<i>cagE</i>	Денатурация 30 циклов	94 °C	5 мин
		94 °C	20 с
		54 °C	20 с
		72 °C	20 с
	Элонгация	72 °C	7 мин
<i>cagL</i>	Денатурация 30 циклов	94 °C	5 мин
		94 °C	20 с
		54 °C	20 с
		72 °C	20 с
	Элонгация	72 °C	7 мин
<i>cagE</i>	Денатурация 30 циклов	94 °C	5 мин
		94 °C	20 с
		54 °C	20 с
		72 °C	20 с
	Элонгация	72 °C	7 мин
<i>babA2</i>	Денатурация 30 циклов	94 °C	5 мин
		94 °C	30 с
		50 °C	30 с
		72 °C	30 с
	Элонгация	72 °C	7 мин

Продолжение таблицы 6

dupA (jhp0917)	Денатурация 29 циклов	94 °С	8 мин
		94 °С	20 с
		56 °С	20 с
		72 °С	20 с
	Элонгация	72 °С	7 мин
dupA (jhp0918)	Денатурация 29 циклов	94 °С	7 мин
		94 °С	40 с
		52 °С	40 с
		72 °С	40 с
	Элонгация	72 °С	7 мин

Определение полиморфизма гена интерлейкина – 1 β (ИЛ-1 β)

ИЛ-1 β является медиатором острого и хронического воспаления. Полиморфизм гена ИЛ-1 β связан с повышением риска развития гипохлоргидрии и атрофии, что в свою очередь увеличивает возможность возникновения опухолевого процесса. Важными заменами, влияющими на транскрипционную активность, являются биаллельные полиморфизмы (СТ) формы ИЛ-1 β в позициях -31 и -511.

Структура праймеров, используемых для детекции мутаций в гене ИЛ-1 β , представлена в таблице 7.

Таблица 7. — Структура праймеров, используемых для детекции мутаций в гене ИЛ-1 β

Локус	Последовательность, 5'-3'
Т31С	F-5'-AGAAGCTTCCACCAATACTC-3'
	R-5'-AGCACCTAGTTGTAAGGAAG-3'
С511Т	F-5'-GGCATTGATCTGGTTCATC-3'
	R-5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3'

Для накопления фрагментов гена ИЛ-1 β проводят ПЦР с условиями, представленными в таблице 8.

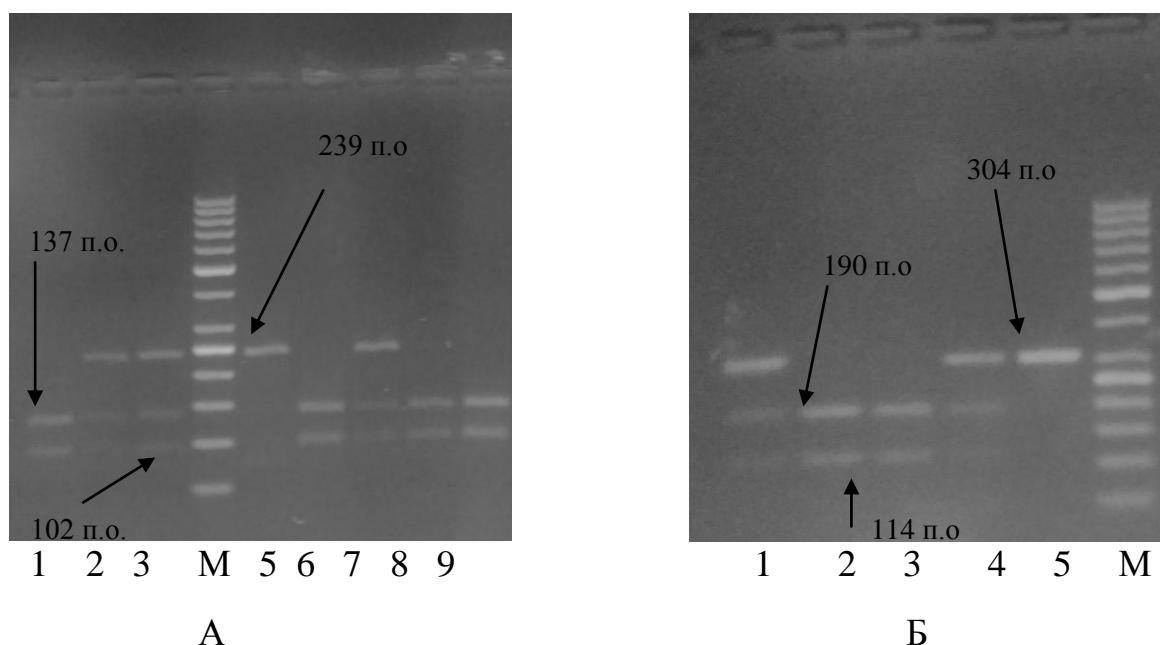
Таблица 8. — Условия амплификации фрагментов гена ИЛ-1 β

Ген	Шаг	Температура	Время
ИЛ-1 β	Денатурация 30 циклов	94 °С	5 мин
		94 °С	30 с
		55 °С	30 с
		72 °С	30 с
	Элонгация	72 °С	5 мин

В результате амплификации получают фрагменты ДНК гена ИЛ-1 β , используемые в дальнейшем для рестрикции.

Для выявления генотипов ИЛ-1 β в локусе -31 полученный продукт амплификации обрабатывают рестриктазой AluI. В объем рестрикционной смеси входит 1,5 мкл рестриктазы, 10 мкл ПЦР-образца, 2 мкл 10 х буфера Танго, 16,5 мкл бидистиллированной воды. Образцы инкубируют 17 ч при 37 °С. После рестрикции фрагменты ДНК разделяют при помощи электрофореза в 3 %-м агарозном геле в ТАЕ-буфере. При наличии дикой аллели С длина ампликона составляет 239 п.о.; при наличии аллели Т наблюдается появление сайта узнавания для фермента AluI и образуются рестрикционные фрагменты размером 137 и 102 п.о.

Для выявления мутации в локусе -511 используется рестриктаза AvaI. В объем рестрикционной смеси входит 1,3 мкл рестриктазы, 10 мкл ПЦР-образца, 2 мкл 10 х буфера Танго, 18 мкл бидистиллированной воды. Образцы инкубируют 17 ч при 37 °С. Фрагмент ДНК после обработки рестриктазой AvaI разделяют при помощи электрофореза в 3%-м агарозном геле в ТАЕ-буфере. При наличии сайта рестрикции образуются два фрагмента длиной 190 и 114 п.о., что соответствует аллели С, при отсутствии сайта (аллель Т) — длина фрагмента остается без изменений (304 п.о.). Электрофореграмма продуктов рестрикционного анализа представлена на рисунке 1.



(А) линии 2, 3, 7 — гетерозигота СТ; 5 — генотип СС; 1, 6, 8, 9 — генотип ТТ;
 (Б) линия 5 — генотип ТТ; 1, 4 — генотип СТ; 2, 3 — генотип СС;
 М — маркер молекулярного веса ДНК (50—2500 п.о.)

Рисунок 1. — Электрофореграмма продуктов рестрикционного анализа фрагментов гена ИЛ-1 β

Интерпретация результатов

При выявлении генотипов *H.pylori* dupA/cagE, dupA/cagL и dupA/babA2 риск развития язвы двенадцатиперстной кишки увеличивается в 8 раз, генотипа dupA/cagH — в 7 раз.

Наличие у пациентов, инфицированных *HP*, гомозиготного генотипа Т/Т в локусе -511 гена ИЛ-1 β увеличивает риск развития атрофического гастрита в 4 раза; гомозиготного генотипа С/С в локусе -31 гена ИЛ-1 β — в 6,5 раза.

Результаты данного метода диагностики должны оцениваться только в комплексе с результатами других диагностических исследований.

Заключение

Выявление патогенных генотипов *H.pylori* и мутантных генотипов ИЛ-1 β служит прогностическим фактором неблагоприятного развития *H.pylori*-ассоциированных заболеваний желудочно-кишечного тракта — атрофического гастрита и язвы двенадцатиперстной кишки. Пациент при этом нуждается в дополнительных лабораторных и иных методах исследования.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

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

Возможны следующие ошибки:

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

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

Наличие специфической полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации проб.

Сотрудники, проводящие исследования, должны соблюдать методические указания и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.