

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич

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

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* и генетического полиморфизма гена иммунной системы интерлейкина-1 β .

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

1. Показания к применению

Гастрит и дуоденит (МКБ10 - K29); язва двенадцатиперстной кишки (K26).

2. Противопоказания к применению: отсутствуют.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

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

<i>Экстракция ДНК</i>
ПЦР-бокс
Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (10000-15000xg)
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл (диапазон рабочих температур +25-+99°C);
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл; 200-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18°C
Бактерицидная УФ-лампа
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
ПЦР-бокс
Термоциклер для проведения ПЦР
Микроцентрифуга-вортекс
Термостат твердотельный для микропробирок на 1,5 мл и 0,5 мл (диапазон

рабочих температур +25-+99°C);
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18°C
Бактерицидная УФ-лампа
<i>Проведение электрофоретической детекции</i>
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 20-200 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4°C
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18°C
Система для проведения горизонтального гель-электрофореза
Источник постоянного тока для электрофореза
УФ-трансиллюминатор
Бактерицидная УФ-лампа

Таблица 2 - Реактивы для проведения ПЦР и электрофоретической детекции

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
Набор реагентов для выделения ДНК из биопсийного материала желудка
<i>Проведение ПЦР-реакции</i>
10x 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>Проведение электрофоретической детекции</i>
Агароза для электрофореза
Маркер молекулярного веса (от 50 п.о., 100 п.о., 250 п.о.)
ТАЕ-буфер
Бромистый этидий

Необходимы следующие изделия медицинского назначения: пробирки пластиковые типа «Эппендорф» (0,5 мл 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 проведения молекулярно-биологических исследований.

4. Технология осуществления метода

Материалом для исследования являются биоптаты слизистой оболочки желудка пациентов.

1) Взятие и транспортировка биологического материала.

Взятие биоптатов слизистой оболочки желудка осуществляют во время проведения 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 холоду в течение 1 часа. При необходимости пробы могут храниться при -20°C в течение недели.

2) Экстракция ДНК из биопсийного материала желудка.

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

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

Для выявления ДНК *H.pylori* (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°C	5 мин.
	30 циклов	94°C	20 сек.
		57°C	20 сек.
		72°C	20 сек.
	элонгация	72°C	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).

4) 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 x 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 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
cagE	F - 5' - TATCAAAGAATGGAGCGAGC - 3' R - 5' - CTAGATAGGAGTTTGCAGCG - 3'	242 п.о.
cagL	F - 5' - GAGATTTAGCGTTATTGAAAGCC - 3' R - 5' - AAAAGTTCAGGGCTAGACA - 3'	100 п.о.
cagH	F - 5' - ATGGCAGGTACACAAGCTAT - 3' R - 5' - TCACTTCACGATTATTTAG - 3'	1113 п.о.
babA2	F - 5' - CCTACACCGAAATCACTAAC - 3' R - 5' - GTGATCATCTTTTGGATCG - 3'	217 п.о.
dupA (jhp0917)	F - 5' - TGGTTTCTACTGACAGAGCGC - 3' R - 5' - AACACGCTGACAGGACAATCTCCC - 3'	307 п.о.
dupA (jhp0918)	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
cagE	денатурация 30 циклов	94°C	5 мин.
		94°C	20 сек.
		54°C	20 сек.
		72°C	20 сек.
	элонгация	72°C	7 мин.
cagL	денатурация 30 циклов	94°C	5 мин.
		94°C	20 сек.
		54°C	20 сек.
		72°C	20 сек.
	элонгация	72°C	7 мин.
cagE	денатурация 30 циклов	94°C	5 мин.
		94°C	20 сек.
		54°C	20 сек.
		72°C	20 сек.
	элонгация	72°C	7 мин.
babA2	денатурация 30 циклов	94°C	5 мин.
		94°C	30 сек.
		50°C	30 сек.
		72°C	30 сек.
	элонгация	72°C	7 мин.
dupA (jhp0917)	денатурация 29 циклов	94°C	8 мин.
		94°C	20 сек.
		56°C	20 сек.
		72°C	20 сек.
	элонгация	72°C	7 мин.
dupA (jhp0918)	денатурация 29 циклов	94°C	7 мин.
		94°C	40 сек.
		52°C	40 сек.
		72°C	40 сек.
	элонгация	72°C	7 мин.

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

ИЛ-1β является медиатором острого и хронического воспаления. Полиморфизм гена ИЛ-1β связан с увеличением 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'
T31C	F - 5' - AGAAGCTTCCACCAATACTC - 3' R - 5' - AGCACCTAGTTGTAAGGAAG - 3'
C511T	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

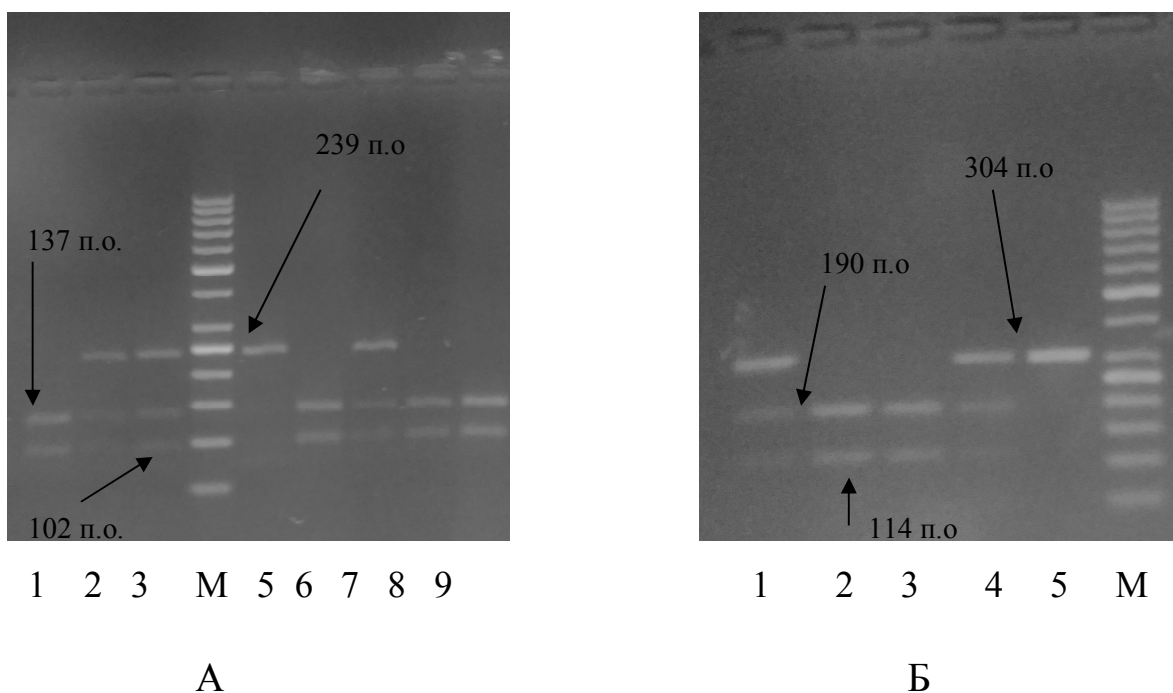
Ген	Шаг	Температура	Время
ИЛ-1 β	денатурация	94°C	5 мин.
	30 циклов	94°C	30 сек.
		55°C	30 сек.
		72°C	30 сек.
	элонгация	72°C	5 мин.

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 10x буфера Танго, 16,5 мкл бидистиллированной воды. Образцы инкубируют 17 часов при 37°C. После рестрикции фрагменты ДНК разделяют при помощи электрофореза в 3%-ном 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 п.о. 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 10х буфера Танго, 18 мкл бидистиллированной воды. Образцы инкубируют 17 часов при 37°C. Фрагмент ДНК, после обработки рестриктазой AvaI, разделяют при помощи электрофореза в 3%-ном агарозном геле в ТАЕ-буфере. При наличии сайта рестрикции образуются два фрагмента длиной 190 п.о. 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-1β

6) 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 раз.

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

5. 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 исследований.

6. 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 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 проведении исследований

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.