

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра здравоохранения  
Главный государственный санитарный  
врач

Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ О.В. Арнаутов

11 апреля 2011 г.

Регистрационный №113-1210

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ГЕНОТИПОВ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ У ПАЦИЕНТОВ С ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗОМ

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр  
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д-р. мед. наук, проф. Титов Л.П.,

канд. биол. наук Янович О.О.,

канд. мед. наук Носова Е.С.

Минск 2010

## НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая инструкция предназначена для определения групп риска по факторам патогенности бактерии *Helicobacter pylori* среди больных хеликобактериозом. Показаниями к определению генотипов и аллельных вариантов *H. pylori* являются: обследование больных хеликобактериозом с хроническими воспалительными заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки.

Исход заболевания, вызванного *H. pylori*, зависит от множества факторов, включая взаимодействие между иммунным ответом хозяина, состоянием слизистой оболочки желудка и факторами вирулентности патогена. В геноме *H. pylori* присутствуют гены, ассоциированные с повышенной патогенностью микроорганизма, наиболее важные из них гены острова патогенности *cagPAI* и ген вакуолизирующего цитотоксина *vacA*. *VacA* вызывает вакуолизацию клеток желудочного эпителия, что приводит к гибели эпителиоцитов и создает условия развития атрофии слизистой оболочки желудка. Он также обладает плеотропным эффектом на клетки, включая индукцию апоптоза, ингибирование Т-клеточной пролиферации, повреждение процессинга антигенов. Гены *H. pylori* в составе острова патогенности *cagPAI* причастны к развитию воспалительного ответа путем инициации каскада сигнальных трансдукций, приводящего к продукции интерлейкина-8 (ИЛ-8). Ответная выработка провоспалительных цитокинов и клеточный ответ приводят к дальнейшему прогрессированию воспалительной реакции. Присутствие генов острова патогенности (*cagT* и *cagM*), особенно в сочетании с аллельными вариантами вакуолизирующего цитотоксина (*vacA*), указывает на возможность неблагоприятного развития гастродуоденальной патологии, ассоциированной с *H. pylori*.

### Перечень необходимого оборудования, реактивов

1. Набор для выделения ДНК из биопсийного материала.
2. Реактивы для проведения ПЦР — фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед/мкл); 10×премикс дНТФ; 10×буфер для *Taq* полимеразы без  $MgCl_2$ ; 25 мМ раствор  $MgCl_2$ .
3. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
4. Одноразовая пластиковая посуда (микропробирки для ПЦР на 0,5 и 1,5 мл).
5. Отдельные наборы автоматических пипеток переменного объема (ТУ 9452-002-33189998-2002).
6. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.
7. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема (с аэрозольным барьером).
8. Холодильник на 2–8°C с морозильной камерой (ГОСТ 16317).
9. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл.
10. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об/мин.
11. Вортекс-шейкер.

12. Термоциклер для проведения ПЦР (ТУ 9452-001-46482062-98).

13. Реактивы для проведения электрофореза — 6×буфер для загрузки образцов в гели (10 мМ Трис-НСl, 0,04% бромфеноловый синий); O'Range Ruler на 100 пар оснований; агароза LE; бромистый этидий; 50×ТАЕ буфер для электрофореза.

14. Источник постоянного тока для электрофореза.

15. Камера для горизонтального электрофореза.

16. Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей.

### **Выделение ДНК из биопсийного материала**

ДНК из биопсийного материала выделяют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Полученные образцы ДНК хранят при -20°C.

### **Определение наличия *H. pylori* в биопсийном материале с помощью ПЦР**

Для определения *H. pylori* в биопсийном материале используют праймеры для амплификации фрагмента гена 23S рРНК длиной 267 п.о.:

5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3' (HP-F, прямой) и 5'-CGCATGATATTCCCATTAGCAGT-3' (HP-R, обратный).

Праймеры синтезируют под заказ. Для удобства готовят раствор с концентрацией 10 пМ/мкл. Разведение праймеров готовят по формуле:

$$V = C_k * V_k / C_u,$$

где  $V$  — необходимый объем праймера;

$C_k$  — конечная концентрация праймера (10 пМ/мкл);

$V_k$  — конечный объем смеси (25 мкл);

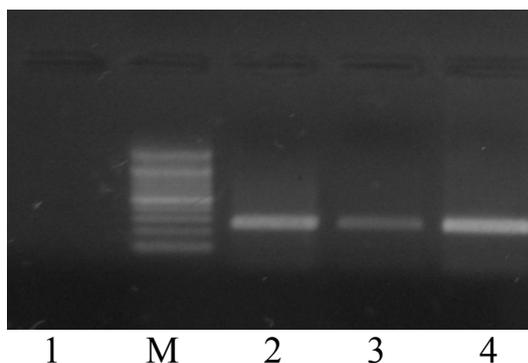
$C_u$  — исходная концентрация праймера.

Объем реакционной смеси составляет 25 мкл: 1 мкл 10 пмоль раствора прямого праймера, 1 мкл 10 пмоль раствора обратного праймера, 2 мкл 10хПЦР-буфера, 2 мкл 25 ммоль раствора MgCl<sub>2</sub>, 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед/мкл *Taq*-полимеразы, 1 мкл образца ДНК (10 нг/мкл) и вода до объема 25 мкл.

В каждую пробирку добавляют одну каплю минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе амплификации. Пробирки переносят в программируемый термоциклер.

Амплификацию проводят в автоматическом режиме по заданной программе: 94°C — 5 мин, (94°C — 20 с, 57°C — 20 с, 72°C — 20 с) — 28 циклов.

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



Линия 1 — отрицательный контроль, линии 2, 3 — *H. pylori* (267 п.о.), линия 4 — положительный контроль *H. pylori*, линия М — маркер молекулярного веса ДНК (100 п.о.),

**Рис. 1. Электрофореграмма результатов определения гена 23S рРНК *H. pylori***

### Определение субтипов гена *vacA* методом ПЦР

При наличии *H. pylori* в биопсийном материале проводят определение субтипов гена *vacA* методом ПЦР.

Праймеры и зонды синтезируют под заказ. Для удобства готовят раствор праймеров с концентрацией 10 пМ/мкл.

Разведение зондов готовят по формуле:

$$V = C_k * V_k / C_u, \text{ где:}$$

$V$  — необходимый объем зонда;

$C_k$  — конечная концентрация зонда;

$V_k$  — конечный объем смеси (20 мкл);

$C_u$  — исходная концентрация зонда.

Праймеры для проведения реакций представлены в таблице 1. Объем реакционной смеси составляет 25 мкл. В нее входят 1 мкл 10 пмоль раствора прямого праймера, 1 мкл 10 пмоль раствора обратного праймера, 2 мкл 10хПЦР-буфера, 2 мкл 25 ммоль раствора  $MgCl_2$ , 2 мкл раствора дНТФ и 0,2 мкл 5 ед/мкл *Taq*-полимеразы, 1 мкл образца ДНК (10 нг/мкл), вода до объема 25 мкл. Амплификация проводится в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 2.

Таблица 1

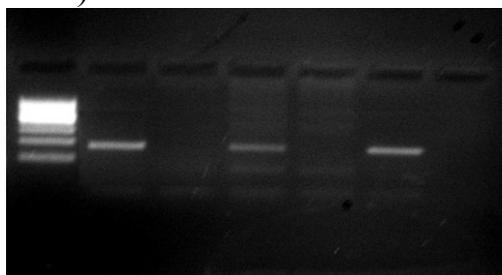
Последовательности праймеров для определения субтипов гена *vacA*

Ген	Последовательность, 5' – 3'	Размер фрагмента
s1a	F – 5' – GTCAGCATCACACCGCAAC – 3' R – 5' – CTGCTTGAATGCGCCAAAC – 3'	190 п.о.
s2	F – 5' – GCTAACACGCCAAATGATCC – 3' R – 5' – CTGCTTGAATGCGCCAAAC – 3'	199 п.о.
m1a	F – 5' – GGTCAAAATGCGGTCATGG – 3' R – 5' – CTGTTAGTGCCCGCAGAAAC – 3'	290 п.о.
m2	F – 5' – GGAGCCCCAGGAAACATTG – 3' R – 5' – CATAACTAGCGCCTTGAC – 3'	352 п.о.

Программы амплификации для определения субтипов гена *vasA*

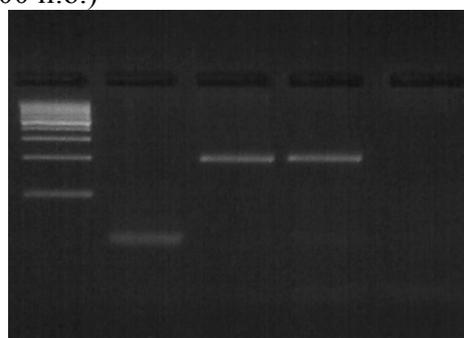
Ген	Шаг	Температура	Время
s1a, s2	денатурация	94°C	5 мин
	28 циклов	94°C	30 сек
		59°C	30 сек
		72°C	30 сек
	элонгация	72°C	8 мин
m1a	денатурация	94°C	5 мин
	35 циклов	94°C	25 сек
		60°C	25 сек
		72°C	25 сек
	элонгация	72°C	8 мин
m2	денатурация	94°C	5 мин
	30 циклов	94°C	25 сек
		60°C	25 сек
		72°C	25 сек
	элонгация	72°C	8 мин

Анализ продуктов амплификации (рис. 2, 3) осуществляют методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).



М 1 2 3 4 5 6

Линия 1 — положительный контроль, линии 3, 5 — s1a (190 п.о.), линии 2, 4 — отрицательные пробы, линия 6 — отрицательный контроль, линия М — маркер молекулярного веса ДНК (100 п.о.)



М 1 2 3 4

Линия 1 — отрицательная проба, линия 2 — положительный контроль, линия 3 — s2 (199 п.о.), линия 4 — отрицательный контроль, линия М — маркер молекулярного веса ДНК (100 п.о.)



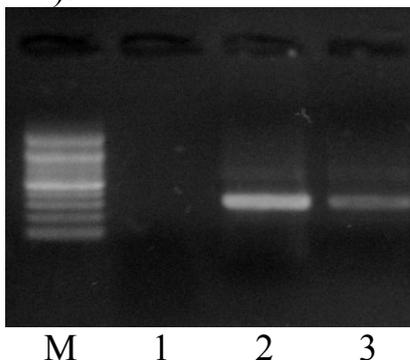
нг/мкл), вода до объема 25 мкл. Амплификация проводится в автоматическом режиме по заданным программам, представленным в таблице 4.

Таблица 4

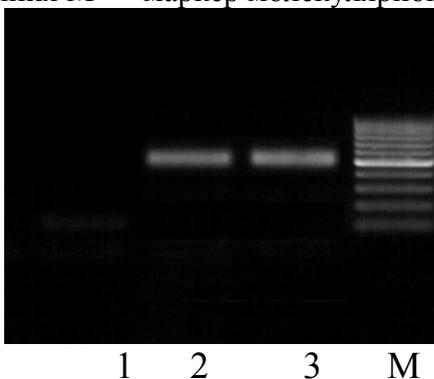
Программы амплификации фрагментов генов *sagPAI*

Ген	Шаг	Температура	Время
sagM	денатурация 29 циклов	94 °С	5 мин
		94 °С	60 с
		54 °С	60 с
		72 °С	60 с
	элонгация	72 °С	10 мин
sagT	денатурация 30 циклов	94 °С	10 мин
		94 °С	30 с
		57 °С	30 с
		72 °С	30 с
	элонгация	72 °С	8 мин

Анализ продуктов амплификации (рис. 4) осуществляют методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (0,5 мг/мл) и детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе (312 нм).



Линия 1 — отрицательный контроль, линия 2 — положительный контроль, линия 3 — *sagM* (301 п.о.), линия М — маркер молекулярного веса ДНК (100 п.о.)



Линия 1 — отрицательный контроль, линия 2 — положительный контроль, линия 3 — *sagT* (586 п.о.), линия М — маркер молекулярного веса ДНК (100 п.о.)

**Рис. 4. Электрофореграммы результатов ПЦР генов *sagM* и *sagT***

### **Возможные проблемы при постановке ПЦР и их устранение**

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. Для устранения следует строго соблюдать зональность рабочих зон (использовать отдельные комплекты спецодежды и оборудования, расходных материалов для каждой из рабочих зон).