

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ГАСТРИТА

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ:

Воропаева А.В., Карпенко О.В., Бредихина Е.В., Борсук А.Д.,
Мартинков В.Н., Кривун Т.П., Жандаров М.Ю.

Гомель, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
11.12.2015
Регистрационный № 154-1115

МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ГАСТРИТА

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: А.В. Воропаева, О.В. Карпенко, Е.В. Бредихина, А.Д. Борсук, В.Н. Мартинков, Т.П. Кривун, М.Ю. Жандаров

Гомель 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод оценки риска развития гастрита, основанный на определении полиморфизма генов кодирующих белки цитокины IL-1 β (C511T), IL-1RN, IL-4(C33T), IL-8 (T251A), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику гастрита (МКБ10 – K29).

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-гастроэнтерологов, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам, страдающим гастритом.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Для определения полиморфизма генов цитокинов использован метод аллельспецифичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) и полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В таблице 1 приведен перечень медицинских изделий, оборудования, необходимых для выявления полиморфных локусов.

Таблица 1 — Набор оборудования для молекулярно-генетического анализа

Наименование оборудования и основные характеристики
<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000 \times g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл с диапазоном рабочих температур от 0 до +25 $^{\circ}$ C
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до +99 $^{\circ}$ C
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 $^{\circ}$ C
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 $^{\circ}$ C
УФ-стерилизатор или его аналог
<i>Проведение ПЦР</i>
Амплификатор (термоциклер), предназначенный для ПЦР
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от -10 до +99 $^{\circ}$ C
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4 $^{\circ}$ C
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от -16 до -18 $^{\circ}$ C
<i>Регистрация результатов амплификации</i>
Источник питания с постоянным током

Камера для горизонтального электрофореза
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)
УФ-трансиллюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером
Холодильник с диапазоном рабочих температур от +2 до +4°С

Также необходимы следующие расходные материалы: 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, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

Необходимым является набор основных реагентов для приготовления собственных реакционных смесей, растворов.

В таблице 2 приведен список основных реагентов для анализа методом АС-ПЦР и ПЦР-ПДРФ. Качество используемых реагентов, включая воду и солевые растворы, должно соответствовать техническим требованиям, предъявляемым к реагентам для молекулярно-генетических исследований.

Таблица 2 — Список реагентов, необходимых для молекулярно-генетических исследований

Этап исследования	Реагенты
Пробоподготовка	ЭДТА
	0,9% раствор хлорида натрия
Выделение ДНК	Изопропиловый спирт
	Этанол
	Хлороформ
	Фенол
	ЭДТА
	Ацетат натрия
ПЦР	Хлорид магния
	Хлорид калия
	дНТФ
	Олигонуклеотиды (праймеры)
	Термостабильная ДНК-полимераза
Электрофорез	Агароза
	Борная кислота
	Бромистый этидий
	Маркер молекулярного веса

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Гастрит (МКБ10 – К29).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Этап 1. Забор материала, пробоподготовка и выделение ДНК

Материалом для выделения ДНК с целью определения полиморфизма генов цитокинов является цельная кровь или биоптаты слизистой оболочки желудка (СОЖ).

Полученный во время фиброэзофагогастродуоденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5 мм) следует внести в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора, плотно закрыть, маркировать и транспортировать в лабораторию. При невозможности немедленной доставки пробы сохраняют в холодильнике при температуре 2–8°C в течение 3-х сут. Далее проводят выделение тотальной ДНК по соответствующим методикам.

Кровь для исследований следует забирать из локтевой вены одноразовой иглой в специальную вакуумную систему с ЭДТА. Пробирку после взятия крови необходимо плавно перемешать, переворачивая вверх дном, чтобы кровь перемешалась с антикоагулянтом и поместить в термостат на 20 мин при 37°C. Затем пробирки с цельной кровью центрифугируют при комнатной температуре в течение 10 мин при 1500 об./мин. Образовавшуюся плазму крови отбирают в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольными фильтрами в пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf» и хранят при температуре -16–20°C.

Из оставшейся части образцов периферической цельной крови отбирают 200 мкл и переносят в стерильную полипропиленовую микроцентрифужную пробирку (объемом 1.5 мл, содержит примерно 1000000 лейкоцитов). Добавляют 1000 мкл лизирующего буфера 1x (гидрокарбонат калия, хлорид аммония, EDTA — 5 объемов), перемешивают содержимое, перевернув пробирку несколько раз, и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем необходимо центрифугировать 1 мин при 12000–14000 об./мин и удалить надосадочную жидкость, стараясь при этом не удалить клеточный осадок, который виден на дне пробирки. Ресуспандируют осадок клеток со дна пробирки в 1000 мкл клеточного буфера 1x (хлорид натрия, TRIS основной, TRIS гидрохлорид). Материал делят на 2 аликвоты и хранят при температуре не выше -16°C.

Выделение ДНК из лейкоцитов крови и биоптатов слизистой оболочки желудка

Для выделения тотальной ДНК из цельной крови и биоптатов желудка применяют экстракционный или сорбционный с протеиназой К методы выделения нуклеиновых кислот.

Оценка качества препаратов ДНК

После выделения следует определить количество ДНК фотометрически с использованием безкюветного фотометра. Концентрация ДНК должна находиться в пределах 20–50 нг/мкл, соотношение экстинций 260/280 нм не менее 1,67, что является достаточным для дальнейшего проведения реакции амплификации. После спектрофотометрического анализа препараты ДНК, отвечающие стандартным требованиям, используют для ПЦР.

Этап 2. ПЦР

Смесь реагентов для одной реакции в объеме 25 мкл формируют следующим образом: 10× ПЦР-буфер (100 мМ раствор Трис-НСl, рН = 9,0, 500 мМ раствор хлорида калия, 25 мМ раствор хлорида магния) — 2,5 мкл, смесь нуклеотидтрифосфатов (дНТФ, 10 мМ раствор каждого) — 0,5 мкл, прямой праймер F (10 мМ раствор) — 1 мкл, обратный праймер R (10 мМ раствор) — 1 мкл (или несколько праймеров такой же концентрации), Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл) — 0,2 мкл, образец ДНК — 2 мкл. Конечный объем доводится водой до 25 мкл.

Также в ходе каждой реакции следует использовать отрицательные образцы (дистиллированная вода), предназначенные для выявления артефактов в ходе реакции. Наличие амплификации в данной пробирке указывает на загрязнение реагентов или расходных материалов чужеродной ДНК.

Для ПЦР более 1 образца следует приготавливать общий раствор (Mastermix), в который входят все компоненты смеси (кроме образца ДНК) в количестве, соответствующем числу образцов. Образец вносят индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) Mastermix.

Выявление полиморфизма генов IL-1β (C511T), IL-1RN, IL-4 (C33T), IL-8 (T251A) проводят согласно таблице 3.

Таблица 3 — Параметры ПЦР для определения полиморфизма IL-1β (C511T), IL-1RN, IL-4(C33T), IL-8 (T251A)

Полиморфизм, генотипы, аллели	Последовательность праймеров	Режим амплификации
IL-1β (C511T) СТ: 304 п.н., 190 п.н., 114 п.н. СС: 190 п.н., 114 п.н. ТТ: 304 п.н.	F1: 5'-tggcattgactggttcac-3' R1: 5'-gtttaggaatctcccactt-3'	ПЦР-ПДРФ: рестриктаза <i>AvaI</i> (<i>Eco88I</i>) 1 цикл (95°C — 3 мин); 35 циклов (95°C — 30 с, 55°C — 1 мин, 72°C — 1 мин); 1 цикл (72°C — 5 мин)
IL-1 RN 1: 410 п.н. 2: 240 п.н. 3: 530 п.н. 4: 325 п.н. 5: 595 п.н.	N1: 5'-cccctcagcaactcc-3' N2: 5'-ggtcagaagggcagaga-3'	АС-ПЦР 1 цикл (95°C — 3 мин); 35 циклов (95°C — 30 с, 60°C — 1 мин, 72°C — 1 мин); 1 цикл (72°C - 5 мин)
IL-4 (C33T) Т: 157 п.н. С: 244 п.н. Контрольный фрагмент: 358 п.н.	F1: 5'-ccaagtgactgacaatctgg-3' R1: 5'-att tgcagtgacaatgtg aga-3' F2: 5'-gcttctcctgataaacatatt gc-3' R2: 5'-atactgagagcatcaccagaac-3'	АС-ПЦР 1 цикл (95°C — 3 мин); 35 циклов (95°C — 30 с, 56°C — 1 мин, 72°C — 1 мин); 1 цикл (72°C — 5 мин)
IL-8 (T251A) А: 114 п.н. Т: 114 п.н.	F1: 5'-aatacggagtatgacgaaaa-3' R1: 5'-ctagaataaaaaagcatacat-3' F2: 5'-aatacggagtatgacgaaaa-3' R2: 5'-ctacaaataaaaaagcatacaa-3'	АС-ПЦР 1 цикл (95°C — 3 мин); 35 циклов (95°C — 30 с, 53°C — 1 мин, 72°C — 40 с); 1 цикл (72°C — 5 мин)

Для детекции продуктов амплификации следует использовать метод электрофореза в 2% агарозном геле по стандартной схеме с визуализацией полученных результатов при помощи видеосистемы. В качестве контроля следует применять маркер молекулярного веса.

Риск развития хронического гастрита умеренно или высокой степени активности увеличен в 2,3 раза ($p < 0,05$) при генотипе 2/2 по гену IL-1RN. При генотипе СТ по гену IL-1 β (C511T) в 2,1 раза ($p < 0,05$) увеличен риск инфицирования CagA штаммами *Helicobacter pylori*, обладающими онкогенным потенциалом, что приводит к формированию атрофического гастрита и увеличивает риск развития рака желудка.

Присутствие у пациентов с гастритом генотипа 1/1 по гену IL-1RN увеличивает риск развития рака желудка в 2,2 раза ($p < 0,05$); генотипа ТА гена IL-8 (T251A) — в 2 раза ($p < 0,05$); генотипа СТ гена IL-4 (C33T) — в 21 раз ($p < 0,001$).

Носители данных полиморфных локусов нуждаются в диспансерном наблюдении (Z03.1 «Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль»).

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки при выполнении молекулярно-генетических исследований могут быть связаны с неправильной организацией лаборатории (выделением недостаточного количества помещений для ПЦР-лаборатории), методических и технических ошибок при заборе, хранении и пробоподготовке; выделении нуклеиновых кислот, амплификации и детекции. Нарушение этих правил является причиной неверной диагностики и интерпретации полученных результатов.