

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЕ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



**АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К
КЛАРИТРОМИЦИНУ ШТАММОВ *HELICOBACTER PYLORI* С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(инструкция по применению)

Гомель, 2011

УДК 615.33:615.015.8]:616.98-074

ББК 52.817.211.1:51.901.1

В 75

Авторы-разработчики:

А.В.Воропаева, Е.В.Воропаев, О.Ю.Баранов, О.В.Осипкина, С.В.Жаворонок

Рецензенты:

доктор медицинских наук, доцент,
директор ГУ «РНПЦ медицинских технологий, информатизации, управления и
экономики здравоохранения», *М.М.Сачек*

доктор медицинских наук, профессор
заведующий кафедрой инфекционных болезней УО «БГМУ», *И.А.Карпов*

В 75 Алгоритм определения устойчивых к кларитромицину штаммов *Helicobacter Pylori* с использованием полимеразной цепной реакции/ авт.-разраб. А.В.Воропаева, Е.В.Воропаев, О.Ю.Баранов, О.В.Осипкина, С.В.Жаворонок – Гомель: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2011. — 25 с.

Инструкция предназначена для организации лабораторных исследований связанных с определением чувствительных и устойчивых к кларитромицину штаммов *Helicobacter pylori*.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

А. Ходжаев

« 29 » 2010

Регистрационный № 250-1210



**АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К
КЛАРИТРОМИЦИНУ ШТАММОВ HELICOBACTER PYLORI С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Воропаева А.В.

к.м.н. Воропаев Е.В.

к.б.н. Баранов О.Ю.

Осипкина О.В.

д.м.н., проф. Жаворонок С.В.

Гомель, 2010

Инструкция предназначена для организации лабораторных исследований связанных с определением чувствительных и устойчивых к кларитромицину штаммов *Helicobacter pylori* (*H.pylori*). Выполнение инструкции позволит выявлять устойчивые штаммы, проводить лабораторно обоснованное назначение эрадикационной терапии и прогнозировать течение заболевания, как у конкретного пациента, так и в популяции в целом.

Предложенная в разработанной нами инструкции модификация методики на основе ПЦР-ПДРФ является простым и эффективным методом лабораторной диагностики, позволяющим выявлять точечные мутации, и может быть применена в медицинских и научных учреждениях Республики Беларусь.

Helicobacter pylori – инфекция является одной из наиболее распространенных в мире [1,2] и ассоциирована с хроническим гастритом и язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Признана важная роль этого микроорганизма в развитии MALT-лимфомы и аденокарциномы желудка [3,4,5].

Количество АМП (антимикробные препараты), используемых в клинической практике для лечения *H.pylori*-инфекции, ограничено из-за уникальной способности обитания этого микроорганизма в подслизистом пространстве. В настоящее время в Республике Беларусь при проведении терапии первого выбора наиболее обоснованным является применение комбинации – ИПП (ингибиторы протонной помпы), амоксициллин и кларитромицин [6]. Анализ полученных на сегодняшний день данных показывает, что чувствительность и резистентность к кларитромицину приводят к эрадикации от 81-95% и 0-48% соответственно [7].

Развитие устойчивости к кларитромицину во время терапии обусловлено возникновением точечных мутаций в V функциональном домене 23S рРНК – гена *H.pylori*. В Европе, Австралии и Бразилии развитие резистентности к кларитромицину связано с возникновением точечных мутаций A2143G (45%) , A2142G (33%) и A2142C (2%) [8,9]. Почти 90% резистентных к кларитромицину штаммов Японии содержат точечную мутацию A2143G [10].

Секвенирование Корейских кларитромицинрезистентных штаммов показало наличие тройных мутаций - A2143G + T2182C + T2190C, A2143G + T2182C + C2195T, и A2143G + T2182C + A2223G [11]. В России резистентность к кларитромицину связана с наличием мутаций A2115C, A2143G/C и A2144G [12]. Проведенные нами исследования показали, что в Беларуси резистентность к кларитромицину возникает в результате нуклеотидных замен в позициях T2182C(62,5%), A2143G (25%) и A2142G (12,5%) [13].

Многочисленные молекулярные методы для определения устойчивости *H.pylori* к кларитромицину основаны на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Относительно недорогим и доступным вариантом ПЦР является метод анализа длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), основанный на применении особого типа ферментов – рестриктаз, открытых в 1962 году Арбером. Рестриктазы способны разрезать молекулы ДНК только в тех местах (сайтах рестрикции), где имеется определенная последовательность нуклеотидов [14]. Благодаря простоте и надёжности метод получил широкое распространение. Этот метод делает возможным обнаружение мутаций в 23S rRNA -гена *H.pylori* при помощи рестриктаз: *MboII* - A2142G/C, *Eco 31I* или *BsaI* - A2143G. [15]. Для выявления точечной мутации T2182C нами построена структура праймера, создающего сайт рестрикции для эндонуклеазы *MspI* (CCGG) в случае наличия мутации - C в 2182 позиции.

Показания к применению

Определение чувствительных и устойчивых к кларитромицину штаммов *H.pylori*.

Противопоказания

Противопоказаний для использования описываемых нами методик не установлено.

Перечень необходимого оборудования, реактивов, изделий медицинской техники

Лабораторное оборудование применяемое в ПЦР – диагностике должно позволять проводить все необходимые этапы работы, начиная с выделения

ДНК из биологического материала, дальнейшей амплификации, и детекции продуктов амплификации и рестрикции методом электрофореза.

В таблице 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования при проведении исследований методом ПЦР-ПДРФ.

Таблица 1 – Оптимальный набор оборудования при проведении исследований методом ПЦР-ПДРФ

Оборудование для пробоподготовки	Количество
Высокоскоростная микроцентрифуга с ротором для пробирок типа «Eppendorf» 1,5 мл до 10 000 – 12 000×g.	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до минус 10 °С	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)	1
Насос с колбой-ловушкой	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Холодильник от +2 до +8 °С с морозильной камерой не менее минус 16 °С	1
Центрифуга лабораторная медицинская	1
Спектрофотометр для определения количества и качества выделенной ДНК	1
Оборудование для амплификации	Количество
Амплификатор ДНК	1
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл (2 шт); 20-200 мкл; 100-1000 мкл)	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до минус 10 °С	1
Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 °С	1
Оборудование для рестрикции продуктов амплификации	Количество
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл)	1
Твердотельный термостат	1
Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 °С	1
Оборудование для регистрации результатов амплификации	Количество
Источник питания с постоянным током	1
Камера для горизонтального электрофореза	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 5-50 мкл, 20-200 мкл; 100-1000 мкл)	1
УФ- трансиллюминатор	1
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером и принтером	1
Холодильник от +2 до +8 °С с температурой в морозильной камере не менее минус 16 °С	1

Следует учесть, что при проведении исследований методом ПЦР – ПДРФ необходимым является наличие расходных материалов, таких как резиновые перчатки, халаты, наконечники для пипеток с фильтром и без фильтра до 10, 20, 200, 1000 мкл, фильтровальная бумага, микроцентрифужные пробирки на 1,5 или 2 мл, ПЦР-пробирки, стеклянные пестики, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др. Желательно наличие основного набора реагентов для работы по оригинальным методикам и для приготовления собственных растворов, реакционных смесей и т.д.

Агароза — компонент агарозного геля, ацетат аммония, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ — выделение ДНК, борная кислота, H_3BO_3 — компонент электрофоретического буфера, бромид этидия, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ — окраска ДНК, бромфеноловый синий — электрофоретический маркер, глицерин, $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ — широкий спектр применения, термостабильная ДНК-полимераза — компонент ПЦР-смеси, изопропанол, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ — выделение ДНК, лаурилсульфат натрия, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SNa}$ — выделение ДНК, маркер молекулярной массы — электрофоретический маркер, дНТФ (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ) — компонент ПЦР-смеси, праймеры — компонент ПЦР-смеси, соляная кислота, HCl — широкий спектр применения, трис, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ — компонент большинства буферных растворов, уксусная кислота, CH_3COOH — широкий спектр применения, хлорид калия, KCl — компонент ПЦР-смеси, хлорид магния, MgCl_2 — компонент ПЦР смеси, хлорид натрия, NaCl — выделение ДНК, хлороформ CHCl_3 — выделение ДНК, ЭДТА, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — широкий спектр применения, этиловый спирт $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ — осаждение ДНК.

Рестриктазы (эндонуклеазы) – необходимый компонент для выявления точечных мутаций: *MboII* -A2142G/C, *Eco 3II* или *BsaI* -A2143G, *MspI* –T2182C [15].

Описание технологии используемого метода

Таблица 2 – Схема этапов определения устойчивости *H.pylori* к кларитромицину

1. Взятие, доставка и хранение биологического материала
2. Выделение ДНК из биоптатов СОЖ, бактериальных культур
3. Оценка качества полученных препаратов ДНК

4. Выявление 16S rRNA -гена <i>H.pylori</i> в анализируемых образцах (непосредственно ДНК <i>H.pylori</i>)
5. Выявление 23S rRNA - гена в образцах содержащих ДНК <i>H.pylori</i>
6. Выявление точечных мутаций A2142G и A2143G
7. Выявление точечной мутации T2182C

Взятие, доставка и хранение биологического материала (биоптатов СОЖ) для исследования методом ПЦР

Материалом для выделения ДНК *H.pylori* являются биоптаты слизистой оболочки желудка (СОЖ), бактериальные культуры *H.pylori*.

Для проведения анализа используются биоптаты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, полученные при эндоскопическом исследовании желудочно-кишечного тракта.

Исследуемый биопсийный материал помещают в стерильную сухую пробирку типа «Eppendorf» вместимостью 1,5 мл. Пробу доставляют в лабораторию в течение 2-х часов (в термосе со льдом) или замораживают и хранят при температуре минус 20°C не более 2 недель.

Взятие, доставка и хранение биологического материала (биоптатов СОЖ) для исследования микробиологическим методом

При заборе биоптатов СОЖ для микробиологического исследования важно было исключить прием пациентами антибиотиков или антисекреторных препаратов, особенно ингибиторов протонной помпы (ИПП) в течение 2 недель до проведения эндоскопии. Хотя ИПП не оказывают прямого антимикробного эффекта, они косвенно сталкиваются с распределением *H.pylori* в желудке, изменяя бактериальную нишу и приводя к исчезновению бактерии в полости желудка.

Биоптаты СОЖ, включая анtrum и тело, помещают в пробирки с транспортной средой содержащей селективные добавки, состоящие из антибактериальных и противогрибковых препаратов, способных подавлять рост сопутствующей или контаминационной микрофлоры и транспортируют в лабораторию. Культивирование в случае применения данной транспортной среды может быть отсрочено на 24 часа [16].

Выделение тотальной ДНК из биоптатов СОЖ SDS - методом

Образец биоптата массой 5-10 мг помещают в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера следующего состава: 200 мМ р-р трис; 250 мМ р-р хлорида натрия; 25 мМ р-р трилона Б; 0,5% лаурилсульфата натрия, (рН буфера довести HCl до значения 8,1). При помощи прокаленных стеклянных пестиков гомогенизируют биоптат в течение 1 минуты при комнатной температуре, закрывают пробирку, перемешивают содержимое на вортексе, а затем инкубируют в твердотельном термостате в течение 30 минут при 65⁰С, периодически встряхивая. Пробирку с экстрактом биоптата осаждают на микроцентрифуге и добавляют 350 мкл охлажденного 5М кислого р-ра ацетата натрия (рН 5,0). Содержимое перемешивают и инкубируют в твердотельном термостате с функцией охлаждения при 0⁰С в течение 60 минут. После инкубации пробирки с экстрактом биоптатов центрифугируют на высокоскоростной центрифуге с охлаждением при 15000 об/минуту и 4⁰С в течение 20 минут. По окончании центрифугирования пипеткой отбирают 850 мкл супернатанта, переносят в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл содержащую 850 мкл хлороформа, перемешивают на вортексе и центрифугируют при 15000 об/минуту и 4⁰С в течение 20 минут. Пипеткой осторожно отбирают 650 мкл супернатанта и переносят в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл содержащую 650 мкл изопропанола. Содержимое пробирки перемешивают на вортексе и инкубируют при температуре минус 10⁰С в течение 60 минут, затем центрифугируют при 15000 об/минуту и температуре 4⁰С в течение 25 минут. Супернатант осторожно отбирают, полученный осадок ДНК промывают 1 мл 65% этанола, охлажденного до температуры минус 10⁰С. После промывания содержимое пробирки центрифугируют при 15000 об/минуту и 4⁰С в течение 10 минут. Процедуру промывания повторяют 2-3 раза для удаления из осадка остатков трилона Б, ацетата натрия и изопропанола. После промывания этанолом просушивают осадок ДНК поместив пробирки с открытыми

крышками в твердотельный термостат в течение 30–40 минут при 45⁰С до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворяют в 30 мкл деионизованной воды при 40⁰С в течение 30 минут. Растворенную ДНК хранят при 4⁰С в течение недели или минус 20⁰С в течение месяца.

Выделение ДНК *H. pylori* из бактериальных культур

В пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие бактериальные культуры *H.pylori*, добавляют по 1 мл фосфатно-солевого буфера, закрывают крышками и тщательно перемешивают на вортексе. Пробирки центрифугируют при 13 000 об/ минуту в течение 10 минут и осторожно отбирают супернатант. К осадку добавляют 100 мкл ТЕ-буфера, пробирки закрывают и осадок ресуспендируют на вортексе. Взвесь выдерживают в течение 10 минут при 100⁰С и центрифугируют в течение 5 минут при 13000 об/минуту. Затем отбирают 10 мкл надосадка и разводят его деионизованной водой 1:10. Выделенную таким способом ДНК хранят при температуре от 2 до 8⁰С в течение недели.

Оценка качества препаратов ДНК

Поскольку концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа, необходимо устанавливать значения этих показателей с помощью спектрофотометра. Данное исследование позволяет выявить потерю нуклеиновых кислот в процессе выделения и определить присутствующие в препарате примеси. После получения препарата ДНК, проводят её качественный и количественный анализ, используя спектрофотометр, позволяющий проводить качественную и количественную оценку нуклеиновых кислот в 1мкл образца [15]. Для определения количества ДНК измеряли поглощение раствора в областях с длинами волн 260 и 280 нм. Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе. Соотношение экстинций 260 нм/280 нм позволяет судить о чистоте нуклеиновой кислоты. Чистые препараты ДНК имеют соотношение не менее 1,67. Если препарат содержит примесь белка, OD₂₆₀/OD₂₈₀ меньше указанного выше значения и необходимо

проводить дополнительную очистку препарата. Дополнительное измерение препаратов ДНК проводят при 320 нм. В чистых препаратах значение OD_{320} стремится к нулю. После спектрофотометрического анализа препараты ДНК, отвечающие стандартным требованиям, используют для проведения дальнейшего ПЦР анализа.

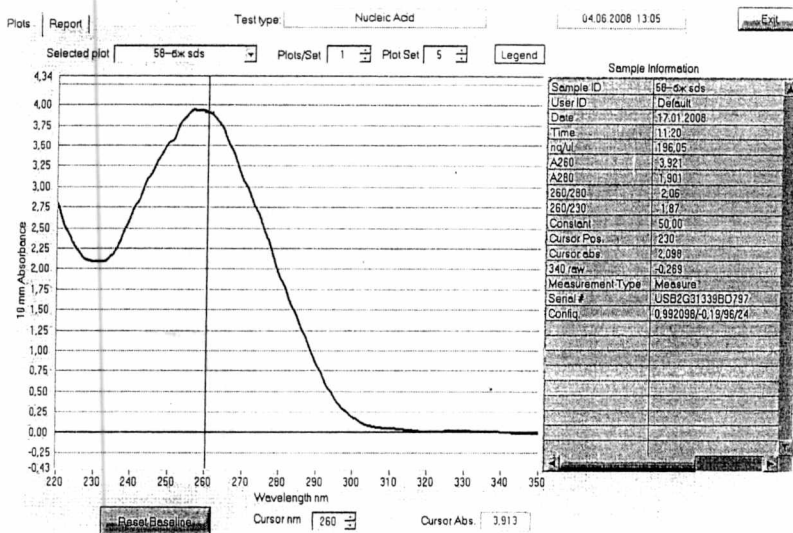


Рисунок 1 – Определение чистоты препарата ДНК на спектрофотометре

Проведение полимеразной цепной реакции для выявления ДНК *H. pylori*

Для выявления ДНК *H. pylori* возможно использовать коммерческие ПЦР - тест-системы.

Электрофорез

Электрофоретическое разделение проводят в вертикальных или горизонтальных электрофоретических камерах. Для приготовления агарозного геля агарозу растворяют в электрофоретическом буфере (обычно Трис-ЭДТА-Боратный или Трис-ЭДТА-Ацетатный) путем нагревания смеси. Затем горячий раствор заливают в специальную кювету, с помощью пластмассовых гребенок в геле выдавливают лунки и помещают кювету в электрофоретическую камеру. Далее отсеки камеры наполняют электрофоретическим буфером, так, чтобы слой

буфера над гелем составил 5–7 миллиметров. В лунки геля с помощью пипетки вводят образцы, смешанные с буфером для загрузки, камеру плотно закрывают, подсоединяют электроды и подключают к универсальному источнику питания. Напряжение, сила тока и время электрофореза подбирают эмпирически.

После электрофоретического фракционирования гель кладут в кювету, где и производят окрашивание. Для флуоресцирующего окрашивания используют раствор этидиум бромид (после окраски гель просматривают под ультрафиолетовым светом).

Для визуализации полученных результатов используют любую стандартную видеосистему (трансиллюминатор с видеосистемой), для переноса изображения на компьютер используется различное программное обеспечение позволяющее фиксировать полученные фотографические изображения гелей соответствующим программным обеспечением.

Проведение полимеразной цепной реакции с определением длин рестрикционных фрагментов (ПЦР – ПДРФ) для определения полиморфизма 23S rRNA-гена *H.pylori*

После получения положительного результата (выявлена ДНК *H.pylori*) проводят исследование полиморфизма 23S rRNA-гена *H.pylori* при помощи специфических праймеров, подобранных реакционной смеси и температурного режима. Для выявления 23S rRNA-гена *H.pylori* в ПЦР-пробирку вносят 24 мкл реакционной смеси, добавляют 1 мкл образца исходной ДНК и помещают пробирку в термоциклер для проведения амплификации по соответствующей программе.

Выявление точечной мутации A2143G и A2142G 23SrRNA-гена *H.pylori*

Состав компонентов реакционной смеси для выявления 23S rRNA *H.pylori* из расчета на 1 исследование для выявления точечных мутаций A2142G/C, A2143G:

- ♦ 2,5-х ПЦР-буфер (ксиленцианол, 7,5 mM MgCl₂, Tag-полимераза) – 10 мкл.
- ♦ Смесь нуклеотидов дНТФ 10 mM – 0,5 мкл
- ♦ Праймер HP V3 F 5 mM - 1 мкл

- ♦ Праймер HP V2 R 5 мМ - 1 мкл
- ♦ Вода деионизованная – 11,5 мкл
- ♦ Препарат ДНК с концентрацией 20-40 нг/мкл- 1 мкл

Нуклеотидный состав используемых праймеров:

HP V3 F 5' - GTCGGTTAAATACCGACCTG - 3'

HP V2 R 5' - TGTGTAGCTACCCAGCGATGCTC - 3'

Размер искомого фрагмента для 23S rRNA-гена *H.pylori* - 783 п.н.

Таблица 3 – Программа амплификации 23S rRNA гена *H.pylori* для выявления точечных мутаций A2142G/C, A2143G

95 ⁰ C		3 минуты	1 цикл
95 ⁰ C		30 секунд	35 циклов
63 ⁰ C		30 секунд	
72 ⁰ C		30 секунд	
72 ⁰ C		2 минуты	1 цикл
4 ⁰ C		хранение	

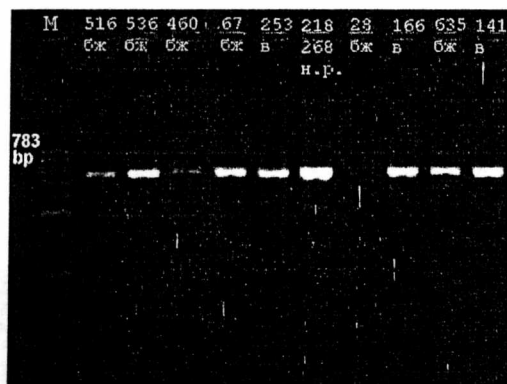


Рисунок 2 – Электрофорез продуктов ПЦР 23S rRNA гена *H.pylori* для выявления точечных мутаций A2142G/C, A2143G

*М – маркер молекулярного веса; положительные образцы – 516 бж, 536 бж, 460 бж, 67 бж, 253 в, 218268 нр, 166 в, 635 бж, 141 в, 2 нр; отрицательный образец – 28 бж.

Далее полученные нами ПЦР-продукты (выявлена ДНК 23S rRNA гена *H.pylori*) подвергают рестрикционному анализу с использованием эндонуклеаз *MboII* и *Eco 3II* или *BsaI*.

Для проведения рестрикции в отдельные ПЦР - пробирки объемом 0,2мл помещают по 10мкл ПЦР - продукта для каждой из перечисленных выше рестриктаз и инкубируют в твердотельном термостате при 37°C в течение 3 часов с 10 единицами эндонуклеазы *MboII* для обнаружения мутаций A2142G/C и 10 единицами *Eco 3II* (*BsaI*) для обнаружения мутации A2143G. Рестрикция эндонуклеазой *MboII* соответствует двум фрагментам 670 и 113 п.н. в присутствии мутации в положении A2142C/G и единственному фрагменту, соответствующему размеру ПЦР - продукта 783 п.н. в случае аллеля дикого типа. Рестрикция *BsaI* соответствует двум фрагментам 671 и 112 п.н. при наличии мутации A2143G и единственному фрагменту 783 п.н. в отсутствие мутации.

Состав смеси для рестрикции для определения точечной мутации A2142G/C:

- ♦ Вода деионизованная - 18,0 мкл
- ♦ 10×буфер В - 2 мкл
- ♦ Рестриктаза *MboII* 5ед/мкл - 2мкл
- ♦ ПЦР-продукты - 10 мкл

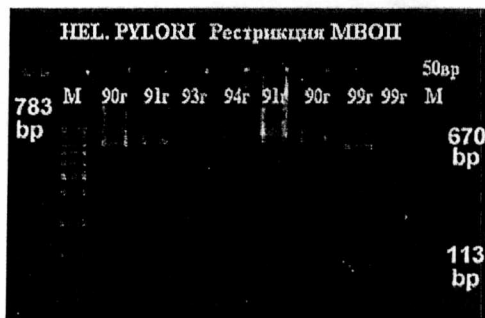


Рисунок 3 – Электрофорез продуктов рестрикции определения точечной мутации A2142G/C

*М – маркер молекулярного веса; 99г – образец с мутантным 2142G/C генотипом; 90г, 91г, 93г, 94г – образцы с нормальным генотипом

Состав смеси для рестрикции для определения точечной мутации A2143G:

- ♦ Вода деионизованная - 16,0 мкл
- ♦ 10×буфер G - 2 мкл
- ♦ Рестриктаза *Eco 311 (BsaI)* 5ед/ мкл - 2мкл
- ♦ ПЦР-продукты - 10 мкл

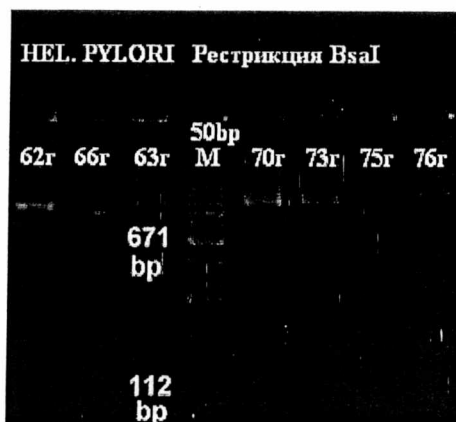


Рисунок 4 – Электрофорез продуктов рестрикции определения точечной мутации A2143G

*М – маркер молекулярного веса; 66 г – образец с мутантным 2143G генотипом; 62г, 63г, 70г, 73г , 75г , 76г – образцы с нормальным генотипом

Выявление точечной мутации T2182C 23S rRNA гена *H. pylori*

Состав компонентов реакционной смеси для выявления 23S rRNA *H. pylori* из расчета на 1 исследование для выявления точечной мутации T2182C:

- ♦ 2,5-х ПЦР-буфер (ксиленцианол, 7,5 мМ MgCl₂, Таг-полимераза) - 10мкл
- ♦ Смесь нуклеотидов дНТФ 10 мМ - 0,5 мкл
- ♦ Праймер HP F 2182C MspI mut 10 мМ – 1 мкл
- ♦ Праймер HP R 2182C 10 мМ - 1 мкл
- ♦ Вода деионизованная – 11,5 мкл
- ♦ Препарат ДНК с концентрацией 20 – 40 нг/мкл - 1мкл

Нуклеотидный состав используемых праймеров:

5/ - TACAACCTTAGCACTGCTAC - 3/

5/ -TCAAGGGTGGTATCTCAAGGA - 3/

Размер искомого фрагмента для 23S rRNA-гена *H.pylori* - 105 п.н.

Таблица 4 – Программа амплификации 23S rRNA гена *H.pylori* для выявления точечной мутации T2182C

94 ⁰ C	3 минуты	1 цикл
94 ⁰ C	15 секунд	10 циклов
55 ⁰ C	15 секунд	
72 ⁰ C	15 секунд	
86 ⁰ C	17 секунд	30 циклов
57 ⁰ C	15 секунд	
72 ⁰ C	15 секунд	
72 ⁰ C	2 минуты	1 цикл
4 ⁰ C	хранение	

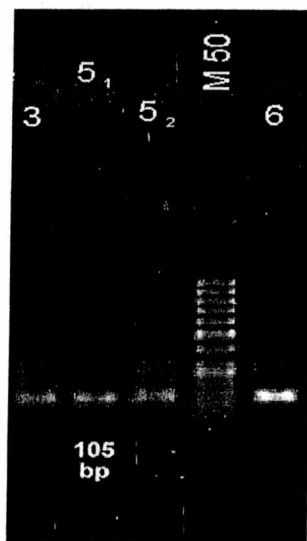


Рисунок 5 – Электрофорез продуктов амплификации 23S rRNA гена *H.pylori* для выявления точечной мутации T2182C

*М – маркер молекулярного веса; 3, 5₁, 5₂, 6, – положительные образцы

Для проведения рестрикции в отдельную ПЦР-пробирку объемом 0,2 мл помещают 10 мкл ПЦР - продукта и инкубируют в твердотельном термостате при 37°C в течение 3 часов с 5 единицами рестриктазы MspI для обнаружения мутации T2182C. По окончании продукты рестрикции подвергаются электрофорезу в 2% агарозном геле в течение 1,5 часов с последующей окраской бромидом этидия как описано выше. Мутантные генотипы 2182C представлены 2 фракциями (≈ 85 и 20 п.н.), аллель дикого типа не подвергается рестрикции — одна зона 105 п.н.

Состав смеси для рестрикции для определения точечной мутации T2182C:

- ♦ Вода деионизованная - 1 6,0 мкл
- ♦ 10×буфер Tango - 2 мкл
- ♦ Рестриктаза MspI - 5ед/ мкл - 2мкл
- ♦ ПЦР-продукты - 10 мкл



Рисунок 6 – Электрофорез продуктов рестрикции 23S rRNA гена *H. pylori* для выявления точечной мутации T2182C

*М – маркер молекулярного веса; 3, 5₁, 5₂, 6 - образцы с нормальным T2182 генотипом, 99, 166, 1482 - образцы с мутантным 2182C генотипом

Перечень возможных ошибок и пути их устранения

Применение метода ПЦР требует строгого соблюдения правил в организации работы ПЦР-лаборатории и проведении всех этапов анализа. Отсутствие достаточного опыта использования амплификационных технологий и стереотипы мышления персонала, ранее работавшего в биохимических или бактериологических лабораториях, могут приводить к ошибкам, результатом которых может стать неверное - ложноотрицательное или ложноположительное заключение. С точки зрения получения ложноотрицательного или ложноположительного результата особенно опасны ошибки, контроль которых невозможно осуществить во время проведения ПЦР-анализа. Это, прежде всего, ошибки, связанные с нарушением правил забора, хранения и транспортировки проб. Поскольку эти процедуры осуществляются вне ПЦР-лаборатории, большое внимание следует уделять обучению медицинского персонала, выполняющего забор проб, так как именно от него во многом зависит качество ПЦР-анализов. Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении безопасности работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ «АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К КЛАРИТРОМИЦИНУ ШТАММОВ HELICOBACTER PYLORI С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ»

Актуальность лабораторной диагностики и оптимизации эрадикационной терапии при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с *H.pylori*-инфекцией, обусловлена их высокой распространенностью, частой хронизацией, рецидивирующим и прогрессирующим течением, и, как следствие, высокой социальной значимостью данной патологии. В Республике Беларусь заболевания желудочно-кишечного тракта в 2009 году составляли 8827,1 случаев, из них 9792,8 среди детей (4357,0 впервые выявлены) и 8609,9 (среди взрослых (1560,5 впервые выявлены) из расчета на 100 000 населения соответствующего возраста. Инфицированность *H.pylori* при наличии гастроэнтерологической симптоматики у взрослых по результатам исследований К.Ю. Мараховского, Е.В. Макаренко и С.И. Пиманова составляет от 60 до 94%, а при дуоденальной язве – близка к абсолютной, у детей по данным К.Ю. Мараховского, С.Б. Попко, С.К. Клецкого – до 52% . Полученные нами результаты обследования позволяют сделать вывод о высоком - 66,7 % - уровне инфицирования *H. pylori* детей с патологией желудочно-кишечного тракта.

В 2005 году Маастрихтским консенсусом-3 приняты новые стандарты лечения больных с *H. pylori* - ассоциированными заболеваниями, которые явились мерами упреждающего реагирования на рост резистентности *H. pylori* по отношению к ранее рекомендованным стандартам терапии. Согласно рекомендациям этого же консенсуса, лицам, у которых *H.pylori* выявляется повторно после эрадикации, необходимо провести лабораторную оценку антибиотикорезистентности с целью подбора адекватной схемы эрадикационной терапии.

Развитие устойчивости к кларитромицину во время терапии - преобладающая причина неуспешного лечения. Результаты Европейского мультицентрового исследования показали, что при наличии чувствительных штаммов эрадикация достигает 87,8%, а при устойчивости к кларитромицину - 18,3% [17], что подчеркивает клиническое значение резистентности *H.pylori* к кларитромицину. Согласно рекомендациям Маастрихт-3 использование кларитромицина как базового препарата терапии первого выбора возможно при 15-20% устойчивости к нему в популяции [18].

Новые лекарственные препараты, такие как фторхинолоны, нитрофураны и рифампицин иногда применяют на втором и третьем этапе эрадикационной терапии, однако многообещающие первоначальные результаты, полученные с этими препаратами, исчезли с появлением антибиотикорезистентных штаммов [F.Megraud, 2009].

Для определения устойчивости *H.pylori* к антибиотикам разработаны как микробиологические методы, так и молекулярно-генетические, основанные на выявлении мутантных генотипов.

Выбор конкретного метода идентификации определяется диагностическими возможностями лабораторий и стоимостью исследования. Применяемые методы должны быть простыми, эффективными и выявлять аллели, встречаемые в популяциях с высокой частотой. Для определения устойчивости *H.pylori* к антибиотикам разработаны как микробиологические методы, так и молекулярно-генетические, основанные на выявлении мутантных генотипов. Микробиологические методы определения устойчивости к препаратам, такие как метод диффузии в агаре, диско-диффузионный метод и Е-тесты не получили широкого распространения из-за имеющихся трудностей, связанных с выделением *H.pylori* в чистой культуре. Результаты микробиологического исследования могут быть получены только по прошествии 6-10 дней, 5-10% случаев, результаты, полученные в различных лабораториях трудно сравнимы из-за отсутствия стандартизации метода [19,20].

Использование молекулярных методов в определении устойчивости к препаратам и в частности к кларитромицину представляется наиболее правильным, так как проведение молекулярных исследований не зависит от жизнеспособности клеток и роста бактерий. Протокол молекулярно-генетического исследования легко воспроизводим и стандартизован, исследование выполняется в течение 2-х дней. В настоящее время в Республике достаточно хорошо оснащенных ПЦР-лабораторий и подготовленных специалистов, следовательно, определение устойчивости к кларитромицину с использованием молекулярных методов диагностики не представляет затруднений.

Решение вопросов антибиотикорезистентности позволит прогнозировать результаты лечения *H.pylori*-инфекции и создать основу для усовершенствования рекомендаций по лечению *H.pylori*-ассоциированных заболеваний в белорусском регионе.

ЛИТЕРАТУРА

1. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries / R. Pounder [et al.] // Aliment. Pharmacol. - 1995. - Ther.9 Suppl. - №2. - P. 33-39.
2. *Helicobacter* in the developing world / R.Frenk [et al.] // Microbes Infect. - 2003. - №5. - P. 705-713.
3. Григорьев, П.Я. *Helicobacter pylori*: гастрит, дуоденит (гастродуоденит), язвенная болезнь и другие геликобактер-ассоциированные заболевания / П.Я.Григорьев, Э.П.Яковенко // Рос. Гастроэнтерол. журн. - 1999.- № 4.- P.38-42.
4. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma / J .Parsonnet [et al]. // N: Engl. J .Med.-1994.- Vol. 330. P. 1267-1271
5. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma /J. Parsonnet [et al]. // N. Engl. J. Med .-1991.- Vol. 325. P. 1127-1131.
6. CagA pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. S.Censini [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA .-1996. - № 93.- P.14648-14653.

7. Пиманов, С.И. Римский III Консенсус: избранные разделы и комментарии / Пиманов С.И., Силивончик Н.Н. // Пособие для врачей. Витебск: ВГМУ, - 2006. - 106с.
8. Пиманов, С.И. Анализ эффективности протоколов эрадикации инфекции *Helicobacter pylori* / С.И. Пиманов, Е.В. Макаренко // Рецепт. – 2005. – №1. – С. 19–23.
9. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* / Y. Glupczynski [et al.] // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. - 2001. -Vol.20. - P. 820–823.
10. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection // P. Malfertheiner [et al.] // The Maastricht III Consensus Report. - 2007. - № 56. - 772 р.
11. Guidelines for the Management of *Helicobacter pylori* Infection in Japan: 2009 Revised Edition 2010. M. Asaka [et al.] // *Helicobacter*.-Blackwell Publishing Ltd -2010.- Vol.15.- P.1-20.
12. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. J.J.Kim [et al.] // J. Antimicrob. Chemother.-2001.-№47. -P.459-461.
13. Саблин, О. Проблема резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину / О.А. Саблин, Т.А. Ильчишина // Гастроэнтерология.-2009.- № 2.- С. 4-8
14. Ворopaева, А.В. Молекулярно-генетическое тестирование мутаций гена 23S рРНК *Helicobacter pylori*, определяющих резистентность к кларитромицину / А.В. Ворopaева, Е.В. Ворopaев, О.Ю. Баранов, Э.Н. Платошкин, А.А. Шафранский, С.И. Пиманов, Е.В. Макаренко // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.-2010.-№4.-с.30-35
15. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Ворopaев. Мн.: Юнипол.- 2007.-176 с

16. Detection of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* in Stool Samples / C. Fontana [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2003. - Vol. 41. - №. 8. - P. 3636-3640.
17. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной терапии / Л.С.Страчунский, Ю.Б.Белоусова, С.Н.Козлова // Смоленск;- 2007. – С.19-32.
18. Megraud, F. *H.pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advances in testing / F. Megraud // *Gut*.- 2004. -Vol.53.- № 9.-P.1374-1384.
19. Megraud F. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing / F.Megraud, Ph. Lehours // *Clinical microbiology reviews*. Apr. 2007.- Vol. 20, No. 2.- P. 280–322.
20. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. «*Molecular Biology of the Cell*.» 2002; Garland Science, New York, NY.
21. Alessandrini A. AFM: a versatile tool in biophysics /A. Alessandrini, P.Facci // *Measurement Science and Technology* .-2005.-Vol.16.-P.65-92.

УТВЕРЖДАЮ

(инициалы, фамилия)

«__» _____ 20__ г.

АКТ
о практическом использовании результатов исследования

В _____
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования)

Комиссия в составе

_____ настоящим подтверждает,
что _____
(название структурного подразделения организации)

Осуществлено внедрение в
Инструкции по применению «Алгоритм определения устойчивых к кларитромицину
штаммов *Helicobacter Pylori* с использованием полимеразной цепной реакции»
(указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)

полученных _____
Воропаевой А.В., Воропаевым Е.В., Барановым О.Ю.,
(фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)

Осипкиной О.В., Жаворонком С.В.

при выполнении темы _____
(название программы, проекта, темы НИР)

для _____
(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего материалы инструкции «Алгоритм определения устойчивых
(приводятся конкретные результаты практического использования)

к кларитромицину штаммов *Helicobacter Pylori* с использованием полимеразной
цепной реакции» используются для _____

Члены комиссии:

(подпись)

(инициалы, фамилия)

(дата)

Научное издание

Воропаева Алла Викторовна

Воропаев Евгений Викторович

Баранов Олег Юрьевич

Осипкина Ольга Викторовна

Жаворонок Сергей Владимирович

**АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ К КЛАРИТРОМИЦИНУ
ШТАММОВ *HELICOBACTER PYLORI* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Инструкция по применению

