

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

В. 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: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: А. В. Воропаева, канд. мед. наук Е. В. Воропаев, канд. биол. наук
О. Ю. Баранов, О. В. Осипкина, д-р мед. наук, проф. С. В. Жаворонок

Гомель 2010

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ В. А. Ходжаев
29.12.2010
Регистрационный № 250-1210

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

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: А. В. Воропаева, канд. мед. наук Е. В. Воропаев, канд. биол. наук
О. Ю. Баранов, О. В. Осипкина, д-р мед. наук, проф. С. В. Жаворонок

Гомель 2010

Инструкция предназначена для организации лабораторных исследований, связанных с определением чувствительных и устойчивых к кларитромицину штаммов *Helicobacter pylori* (*H.pylori*). Инструкция позволит выявлять устойчивые штаммы, назначать лабораторно обоснованную эрадикационную терапию и прогнозировать течение заболевания, как у конкретного пациента, так и в популяции в целом.

Предложенная в разработанной нами инструкции модификация методики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с анализом длин рестрикционных фрагментов (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 является одной из наиболее распространенных в мире инфекций и ассоциирована с хроническим гастритом и язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки. Признана важная роль этого микроорганизма в развитии MALT-лимфомы и аденокарциномы желудка.

Количество антимикробных препаратов (АМП), 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 ингибиторов протонной помпы (ИПП), амоксициллина и кларитромицина. Анализ полученных на сегодняшний день данных показывает, что чувствительность и резистентность к кларитромицину приводят к эрадикации от 81–95 и 0–48 % соответственно.

Развитие устойчивости к кларитромицину во время терапии обусловлено возникновением точечных мутаций в V функциональном домене 23S рНК-гена *H.pylori*. В Европе, Австралии и Бразилии развитие резистентности к кларитромицину связано с возникновением точечных мутаций A2143G (45 %), A2142G (33 %) и A2142C (2 %). Почти 90 % резистентных к кларитромицину штаммов Японии содержат точечную мутацию A2143G. Секвенирование Корейских кларитромицинрезистентных штаммов показало наличие тройных мутаций — A2143G + T2182C + T2190C, A2143G + T2182C + C2195T, и A2143G + T2182C + A2223G. В России резистентность к кларитромицину связана с наличием мутаций A2115C, A2143G/C и A2144G. 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 %).

Многочисленные молекулярные методы для определения устойчивости *H.pylori* к кларитромицину основаны на использовании полимеразной цепной реакции. Относительно недорогим и доступным вариантом ПЦР является метод ПЦР-ПДРФ, основанный на применении особого типа ферментов — рестриктаз, открытых в 1962 г. Арбером. Рестриктазы способны разрезать молекулы ДНК только в тех местах (сайтах рестрикции), где имеется определенная последовательность нуклеотидов. Благодаря простоте и надежности метод получил широкое распространение. Этот метод делает возможным обнаружение мутаций в 23S rRNA-гена *H.pylori* при помощи рестриктаз: *MboII* — A2142G/C,

Eco 311 или *Bsal* — A2143G. Для выявления точечной мутации T2182C нами построена структура праймера, создающего сайт рестрикции для эндонуклеазы *MspI* (CCGG) в случае наличия мутации — С в 2182 позиции.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, 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, детекции продуктов амплификации и рестрикции методом электрофореза.

В таблице 1 приведен оптимальный вариант набора оборудования при исследовании 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 10000–12000×g	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до -10 °С	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 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 -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; 5–50 (2 шт); 20–200; 100–1000 мкл)	1
Твердотельный термостат с функцией охлаждения до -10 °С	1
Холодильник от 2 до 8 °С с температурой в морозильной камере не менее -6 °С	1
Оборудование для рестрикции продуктов амплификации	Количество
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	1
Микроцентрифуга-вортекс	1
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50 мкл)	1
Твердотельный термостат	1
Холодильник от 2 до 8 °С с температурой в морозильной камере не менее -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; 5–50; 20–200; 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 -16° С	1

Следует учесть, что при исследовании 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 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* — 2143G, *MspI* — T2182C.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

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

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Не установлено.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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

1. Взятие, доставка и хранение биологического материала
2. Выделение ДНК из биоптатов слизистой оболочки желудка (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 СОЖ, бактериальные культуры *H.pylori*.

Для 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 ч (в термосе со льдом) или замораживают и хранят при температуре -20 °С не более 2 недель.

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

При заборе биоптатов СОЖ для микробиологического исследования важно исключить прием пациентами антибиотиков или антисекреторных препаратов, особенно ИПП в течение 2 недель до 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 ч.

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 раствора трис; 250 мМ раствора хлорида натрия; 25 мМ раствора трилона Б; 0,5 % лаурилсульфата натрия (рН буфера довести HCl до 8,1). При помощи прокаленных стеклянных пестиков гомогенизируют биоптат в течение 1 мин при комнатной температуре, закрывают пробирку, перемешивают содержимое на вортексе, а затем инкубируют в твердотельном термостате в течение 30 мин при 65 °С, периодически встряхивая. Пробирку с экстрактом биоптата осаждают на микроцентрифуге и добавляют 350 мкл охлажденного 5М кислого раствора ацетата натрия (рН 5,0). Содержимое перемешивают и инкубируют в твердотельном термостате с функцией охлаждения при 0 °С в течение 60 мин. После инкубации пробирки с экстрактом биоптатов центрифугируют на высокоскоростной центрифуге с охлаждением при 15000 об/мин и 4 °С в течение 20 мин. 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/мин и 4 °С в течение 20 мин. 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 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 60 мин, затем центрифугируют при 15000 об/мин и температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 25 мин. Супернатант осторожно отбирают, полученный осадок ДНК промывают 1 мл 65 % этанола, охлажденного до температуры $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. После промывания содержимое пробирки центрифугируют при 15000 об/мин и $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. 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 мин при $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ до полного испарения этанола. Высушенный осадок растворяют в 30 мкл деионизованной воды при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Растворенную ДНК хранят при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение недели или $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 13000 об/мин в течение 10 мин и осторожно отбирают супернатант. К осадку добавляют 100 мкл ТЕ-буфера, пробирки закрывают и осадок ресуспендируют на вортексе. Взвесь выдерживают в течение 10 мин при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и центрифугируют в течение 5 мин при 13000 об/мин. Затем отбирают 10 мкл надосадка и разводят его деионизованной водой 1:10. Выделенную таким способом ДНК хранят при температуре от 2 до $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение недели.

Оценка качества препаратов ДНК

Поскольку концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа, необходимо устанавливать эти показатели с помощью спектрофотометра. Данное исследование позволяет выявить потерю нуклеиновых кислот в процессе выделения и определить присутствующие в препарате примеси. После получения препарата ДНК проводят качественный и количественный анализ, используя спектрофотометр, позволяющий проводить качественную и количественную оценку нуклеиновых кислот в 1 мкл образца. 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 260/280 нм позволяет судить о чистоте нуклеиновой кислоты. Чистые препараты ДНК имеют соотношение не менее 1,67. Если препарат содержит примесь белка, OD_{260}/OD_{280} менее выше указанного значения, и необходима дополнительная очистка 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 дальнейшего ПЦР-анализа.

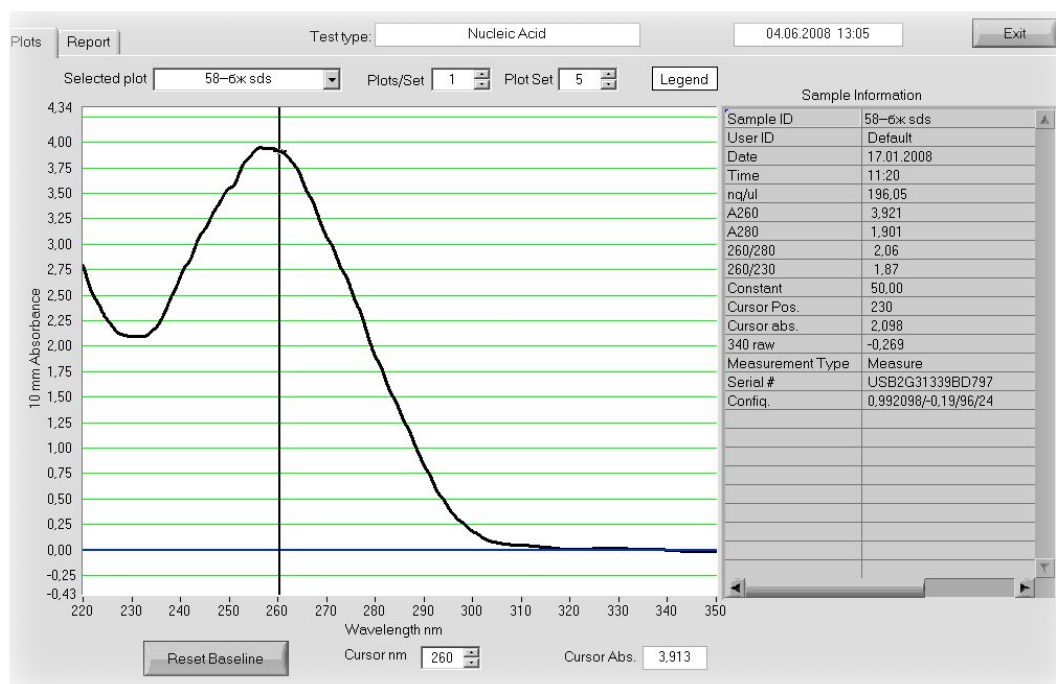


Рисунок 1. — Определение чистоты препарата ДНК на спектрофотометре

Полимеразная цепная реакция для выявления ДНК *H.pylori*

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

Электрофорез

Электрофоретическое разделение производят 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 мм. 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 бромида этидия (после окраски гель просматривают под ультрафиолетовым светом).

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

Полимеразная цепная реакция с измерением длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДФ) для определения полиморфизма 23S rRNA-гена *H.pylori*

После получения положительного результата (выявлена ДНК *H.pylori*) исследуют полиморфизм 23S rRNA-гена *H.pylori* при помощи специфических праймеров, подобранных для 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 пробирки в термоциклер для амплификации по соответствующей программе.

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

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

- 2,5-х ПЦР-буфер (ксиленцианол, 7,5 мМ MgCl₂, Таg-полимераза) — 10 мкл;
- смесь нуклеотидов дНТФ 10 мМ — 0,5 мкл;
- праймер HP V3 F 5 мМ — 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:

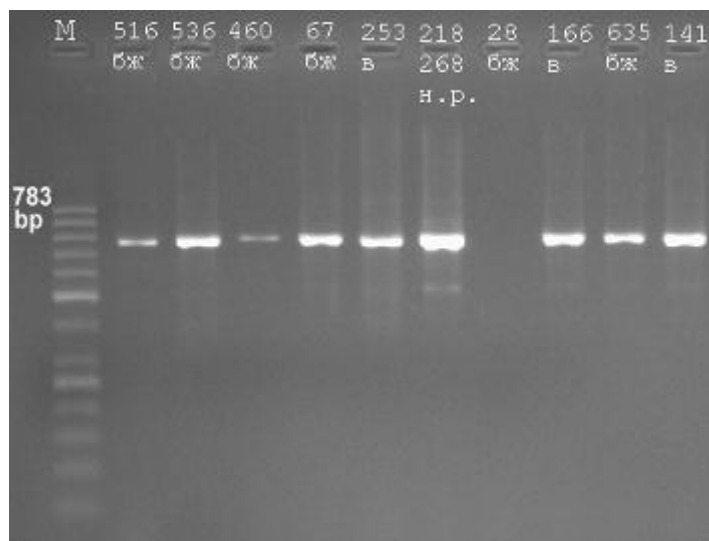
HP V3 F 5'-GTCGGTTAAATACCGACCTG-3'

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 °С	3 мин	1 цикл
95 °С	30 с	35 циклов
63 °С	30 с	
72 °С	30 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	



*М — маркер молекулярного веса; положительные образцы — 516 бж, 536 бж, 460 бж, 67 бж, 253 в, 218 в, 268 бж, 166 в, 635 бж, 141 в, 2 в; отрицательный образец — 28 бж

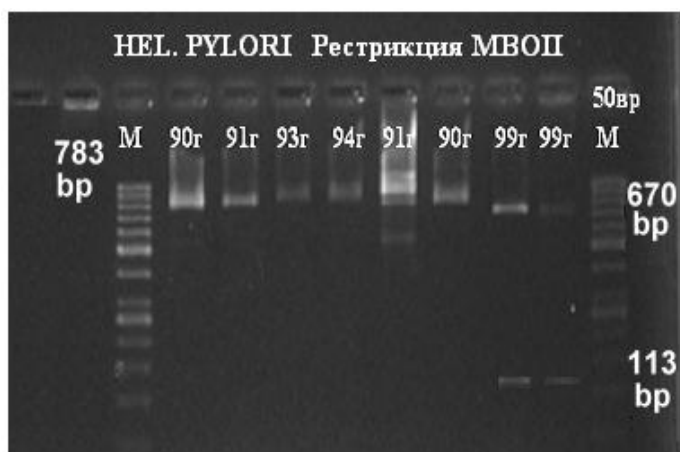
Рисунок 2. — Электрофорез продуктов ПЦР 23S rRNA-гена *H. pylori* для выявления точечных мутаций A2142G/C, A2143G

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 рестрикции в отдельные ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл помещают по 10 мкл ПЦР-продукта для каждой из перечисленных выше рестриктаз и инкубируют в твердотельном термостате при 37 °С в течение 3 ч с 10 единицами эндонуклеазы *MboII* для выявления 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. при ее отсутствии.

Состав смеси для рестрикции при определении точечной мутации A2142G/C:

- вода деионизованная — 18,0 мкл;
- 10×буфер В — 2 мкл;
- рестриктаза *MboII* 5 ед/мкл — 2 мкл;
- ПЦР-продукты — 10 мкл.

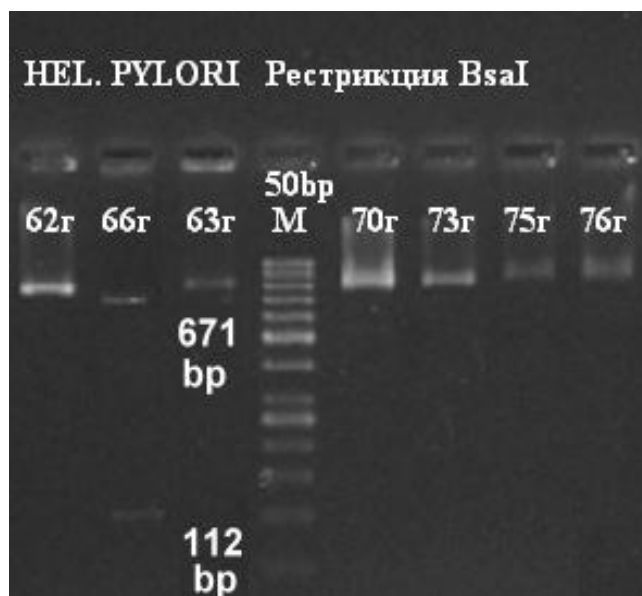


*М — маркер молекулярного веса; 99г — образец с мутантным 2142G/C генотипом; 90г, 91г, 93г, 94г — образцы с нормальным генотипом

Рисунок 3. — Электрофорез продуктов рестрикции определения точечной мутации A2142G/C

Состав смеси для рестрикции при определении точечной мутации A2143G:

- вода деионизованная — 16,0 мкл;
- 10×буфер G — 2 мкл;
- Рестриктаза *Eco 3II (BsaI)* 5ед/ мкл — 2 мкл;
- ПЦР-продукты — 10 мкл.



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

Рисунок 4. — Электрофорез продуктов рестрикции определения точечной мутации A2143G

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

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

- 2,5-х ПЦР-буфер (ксиленцианол, 7,5 mM MgCl₂, Таг-полимераза) — 10 мкл;
- смесь нуклеотидов дНТФ 10 mM — 0,5 мкл;
- праймер HP F 2182C MspI mut 10 mM — 1 мкл;
- праймер HP R 2182C 10 mM — 1 мкл;
- вода деионизованная — 11,5 мкл;
- препарат ДНК с концентрацией 20–40 нг/мкл — 1 мкл.

Нуклеотидный состав используемых праймеров:

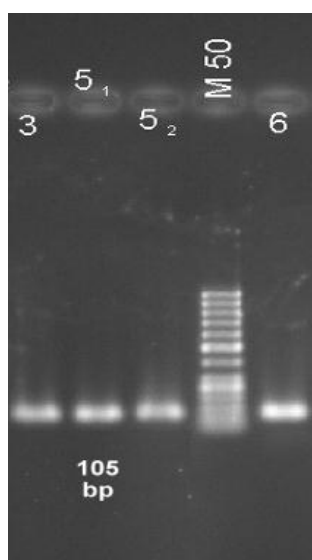
5'-ТАСААСТТАГСАСТГСТАС-3'

5'-ТСААГГГТГГТАТСТСААГГА-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 °С	3 мин	1 цикл
94 °С	15 с	10 циклов
55 °С	15 с	
72 °С	15 с	
86 °С	17 с	30 циклов
57 °С	15 с	
72 °С	15 с	
72 °С	2 мин	1 цикл
4 °С	хранение	



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

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

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

Состав смеси для рестрикции при определении точечной мутации T2182C:

- вода деионизованная — 1 6,0 мкл;
- 10×буфер Tango — 2 мкл;
- рестриктаза *MspI* — 5 ед/мкл — 2мкл;
- ПЦР-продукты — 10 мкл.



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

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

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Метод ПЦР требует строгого соблюдения правил организации работы ПЦР-лаборатории и проведения 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 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. Сотрудники ПЦР-лаборатории должны неукоснительно соблюдать санитарные правила в отношении безопасности работы с микроорганизмами 3–4-й групп патогенности.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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 г. составляли 8827,1 случая, 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 позволяют сделать вывод о высоком — 66,7 % — уровне инфицирования *H.pylori* детей с патологией желудочно-кишечного тракта.

В 2005 г. 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 %, 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.

Новые лекарственные препараты, такие как фторхинолоны, нитрофураны и рифампицин иногда применяют на втором и третьем этапе эрадикационной терапии, однако многообещающие первоначальные результаты, полученные при назначении этих препаратов, потеряли ценность с появлением антибиотикорезистентных штаммов [F.Megraud, 2009].

Выбор конкретного метода идентификации зависит от диагностических возможностей лабораторий и стоимости исследования. Применяемые методы должны быть простыми, эффективными и выявлять аллели, встречающиеся в популяциях с высокой частотой. Для определения устойчивости *H.pylori* к антибиотикам разработаны как микробиологические, так и молекулярно-генетические методы, основанные на обнаружении мутантных генотипов. Микробиологические методы определения устойчивости к препаратам —

инфузия в агаре, диско-диффузионный метод и E-тесты не имеют широкого распространения из-за трудностей, связанных с выделением *H.pylori* в чистой культуре. Результаты микробиологического исследования могут быть получены только по прошествии 6–10 дней, 5–10 % случаев; данные исследования различных лабораторий трудно сравнимы из-за отсутствия стандартизации метода.

Молекулярные методы определения устойчивости к препаратам, в частности кларитромицину, представляются наиболее перспективными, так как их выполнение не зависит от жизнеспособности клеток и роста бактерий. Протокол молекулярно-генетического исследования легко воспроизводим и стандартизован, осуществляется в течение 2-х дней. В настоящее время в Республике Беларусь достаточное число 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 терапии *H.pylori*-ассоциированных заболеваний в белорусском регионе.