

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2018 г.

Регистрационный № 121-1118

Метод оценки канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori*

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Е.В. Воропаев, О.В. Осипкина, О.Ю. Баранов, Э.Н. Платошкин,
А.А. Зятыков, В.Н. Беляковский, С.Л. Ачинович, В.И. Зайцева

Гомель, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич
30.11.2018
Регистрационный № 121-1118

**МЕТОД ОЦЕНКИ КАНЦЕРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА
*HELICOBACTER PYLORI***

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: Е. В. Воропаев, О. В. Осипкина, О. Ю. Баранов, Э. Н. Платошкин,
А. А. Зяцьков, В. Н. Беяковский, С. Л. Ачинович, В. И. Зайцева

Гомель 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен молекулярно-генетический метод анализа канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori*, основанный на определении степени фосфорилирования CagA белка бактерии. Степень фосфорилирования CagA белка *Helicobacter pylori* оценивается по количеству и виду так называемых EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)-мотивов в карбоксильном конце участка CagA-белка с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенированием локуса цитотоксин-ассоциированного гена А (CagA). CagA-ген является иммунодоминантным антигеном *Helicobacter pylori* и основным патогенетическим маркером, играющим значимую роль в патогенезе заболеваний, связанных с данной бактерией.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на формирование групп риска пациентов, с целью раннего прогнозирования рака желудка, связанного с инфекционным процессом, вызванным доминирующими в Республике Беларусь штаммами *Helicobacter pylori*.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-онкологов, врачей-гастроэнтерологов и врачей иных специальностей, оказывающих медицинскую помощь пациентам, нуждающимся в назначении этиотропной терапии в стационарных и амбулаторных условиях с целью профилактики развития рака желудка.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для проведения молекулярно-генетического анализа (Набор оборудования для проведения молекулярно-генетического анализа)

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>	
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С	
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур от -10 до +99 °С)	
Микроцентрифуга-вортекс	
Насос с колбой-ловушкой	
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–10; 100–1000 мкл)	
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки нуклеиновых кислот	
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С	
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С	
УФ-стерилизатор или его аналог	
<i>ПЦР</i>	
Амплификатор (термоциклер)	
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха	

Продолжение таблицы 1

Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до + 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
<i>Электорофоретическая детекция</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до + 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
УФ-трансиллюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером

Также необходимы следующие изделия медицинского назначения: 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, фильтровальная бумага, штативы для пробирок и др. Для молекулярно-генетических исследований необходимы: наборы реагентов для экстракции ДНК, амплификации и горизонтального электрофореза в агарозном геле. Перечень основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методик анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использованием коммерческих наборов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Helicobacter pylori в качестве причины болезней, классифицированных в других рубриках (B98.0); болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки (K20-K31); злокачественное новообразование желудка (C16); экстра nodальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны лимфоидной ткани слизистой оболочки [MALT-лимфома] (C88.4).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

В качестве материала для исследования ЕРІУА-мотивов СаgА-белка используются биоптаты слизистой оболочки желудка пациентов.

Методика определения ЕРІУА-мотивов включает следующие этапы:

Взятие и транспортировка биологического материала

Взятие биоптатов слизистой оболочки желудка осуществляют во время

проведения фиброгастроуденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка. Полученный биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5 мм³) вносят в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора. Пробирки с пробами плотно закрывают, маркируют и транспортируют в лабораторию. При невозможности немедленной доставки пробы хранят в холодильнике при температуре 2–8 °С в течение 3 сут.

Экстракция ДНК

Используют готовые коммерческие наборы, позволяющие выделять ДНК из небольшого количества образца. Для определения качественных и количественных характеристик ДНК проводят спектрофотометрический анализ. Для дальнейшего анализа используют образцы, соотношение экстинкций A_{260}/A_{280} которых $\geq 1,67$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$, $A_{320} \rightarrow 0$.

ПЦР и электрофоретическая детекция

1. На первом этапе в клиническом материале выявляют ДНК *Helicobacter pylori* методом ПЦР, используя праймеры для амплификации фрагмента гена 16S ribosomal RNA *Helicobacter pylori*. Структура праймеров и программа для ПЦР приведены в таблицах 1 и 2 соответственно.

Таблица 2. — Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления ДНК *Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
16S-прямой	GGCTATGACGGGTATCCGGC	763 пары нуклеотидов (п.н.)
16S-обратный	GCCGTGCAGCACCTGTTTTC	

Таблица 3. — Программа для проведения ПЦР с целью выявления ДНК *Helicobacter pylori*

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	35
Отжиг	63	60 с	
Элонгация	72 С	60 с	
Элонгация	72 С	1 мин	1
Охлаждение	4 °	3 мин	1

В результате ПЦР в образцах амплифицируется специфический фрагмент размером 763 п.н. гена 16S ribosomal RNA *Helicobacter pylori*. Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 1; в качестве положительного контроля (к+) использован имеющийся в лаборатории

стандарт ДНК *Helicobacter pylori*, в качестве отрицательного — бидистиллированная вода.

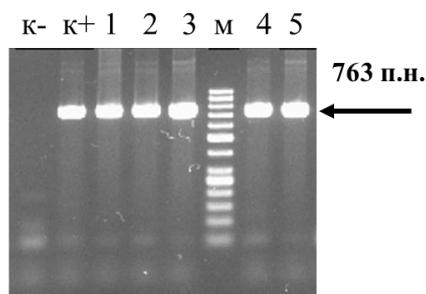


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами 16S

2. На следующем этапе работы выявляют фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*. Структура праймеров и программа для ПЦР приведены в таблицах 4 и 5 соответственно.

Таблица 4. — Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная Последовательность 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
CagA-прямой	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG GA	349 пар нуклеотидов (п.н.)
CagA-обратный	CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	

Таблица 5. — Программа для ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	20 с	42
Отжиг	55	20 с	
Элонгация	72	20 с	
Элонгация	72	1 мин	1
Охлаждение	4	3 мин	1

В результате ПЦР в образцах амплифицируется специфический фрагмент размером 349 п.н. гена *CagA Helicobacter pylori*. Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 2.

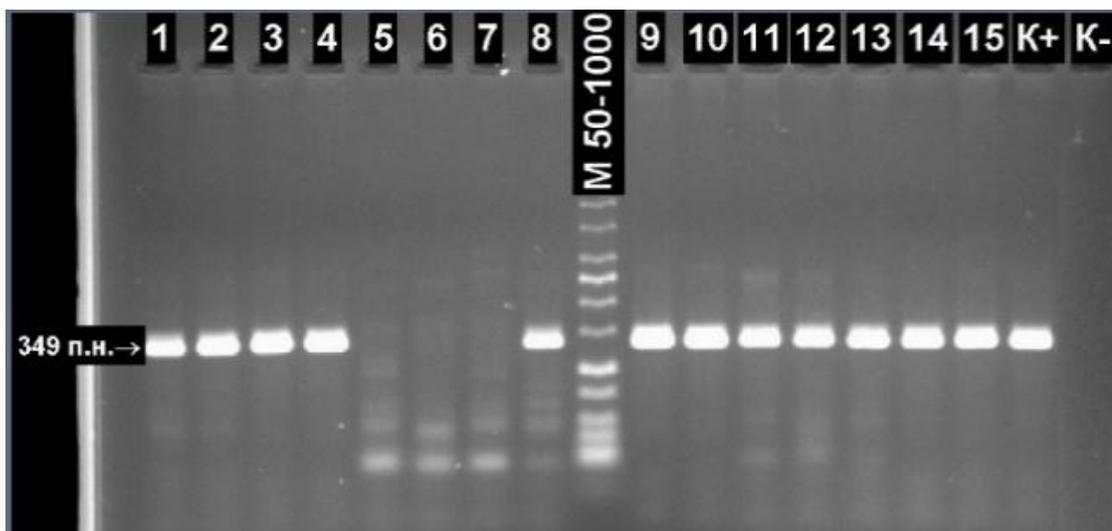


Рисунок 2. — Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР, амплифицирован фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*

3. При выявлении *CagA* гена *Helicobacter pylori* определяют количество и вид EPIYA-мотивов гена *CagA* методом ПЦР; структура праймеров и программа для ПЦР приведены в таблицах 6 и 7 соответственно.

Таблица 6. — Структура праймеров для ПЦР с целью выявления EPIYA-мотивов гена *Cag A Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
EPIYA-прямой	GGAACCCTAGTCGGTAATG	147–567 п.н.
EPIYA-обратный	AGC(A/G)TAAAATGGGTTC	

Таблица 7. — Программа для ПЦР с целью выявления фрагмента EPIYA-мотивов гена *CagA Helicobacter pylori*

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Денатурация	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	35
Отжиг	38	45 с	
Элонгация	72	45 с	
Элонгация	72	1 мин	1
Охлаждение	4	3 мин	1

Интерпретация результатов

В результате ПЦР в образцах амплифицируются специфические фрагменты размером от 147 до 567 п.н. гена *CagA Helicobacter pylori*. Для интерпретации результатов используют таблицу 8, в которой приведены возможные зоны на электрофореграмме и соответствующие им количество и виды EPIYA-мотивов.

Таблица 8. — Количество, виды ЕРІУА и соответствующие им зоны на электрофореграмме

Зоны на фореграмме	Количество ЕРІУА	Виды ЕРІУА
147 и/или 204	2	АВ
147 и 366 (или 366)	3	АВС
209 и 374	3	АВD
147-366-468	4	АВСС
153-209-375-537	4	АВВD
147-363-465-567	5	АВССС

Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 3.

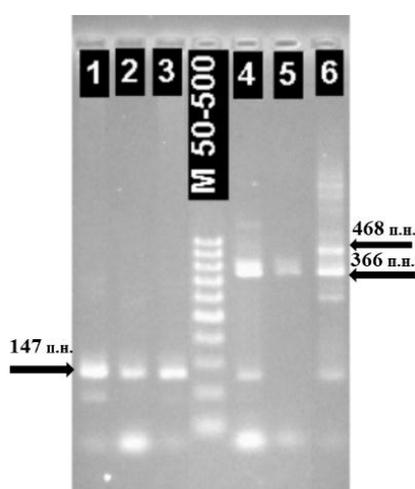


Рисунок 3. — Электрофоретическая детекция с целью выявления количества и видов ЕРІУА-мотивов *CagA Helicobacter pylori*

Как видно на рисунке 3, образцы № 1, 2, 3 визуализируются как зона размером 147 п.н., соответственно содержат ЕРІУА-мотивы АВ. Образец № 4 визуализируется в виде двух зон 147 и 366 п.н., образец № 5 — в виде зоны 366 п.н., что соответствует наличию 3 ЕРІУА-мотивов АВС. Образец № 6 представлен тремя зонами 147, 366 и 468 п.н, что соответствует ЕРІУА-мотивам АВСС.

Как видно из таблицы 8, с увеличением размера амплифицированного фрагмента растет количество ЕРІУА-мотивов за счет появления С или D видов ЕРІУА-мотивов, являющихся наиболее канцерогенными и обуславливающими значительное повышение риска развития рака желудка, что имеет важное прогностическое значение.

Данный метод должен применяться только комплексно с другими диагностическими исследованиями для более полной оценки результатов с последующим установлением диагноза согласно МКБ-10. При выявлении трех и более ЕРІУА-мотивов или как минимум одного ЕРІУА-С или ЕРІУА-D-мотива рекомендуется направление к врачу-онкологу и более частое (не реже 1 раза в

3 мес.) тщательное обследование пациента, а также назначение антихеликобактерной терапии. При выявлении двух и менее EPIYA-мотивов врач осуществляет динамическое наблюдение за пациентом в стандартном режиме.

Заключение

Таким образом, определение типа и количества EPIYA-мотивов в карбоксильном конце участка CagA-белка *Helicobacter pylori*, полученной из клинических изолятов, имеет важное прогностическое значение в оценке риска развития патологических состояний, связанных с инфекционным процессом, вызванным циркулирующими в Республике Беларусь штаммами *Helicobacter pylori*.

Увеличение количества EPIYA-мотивов служит прогностически неблагоприятным фактором развития при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (Z03.1 «Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль»). Пациент нуждается в обязательном углубленном обследовании и дополнительном диспансерном наблюдении. Количество и тип EPIYA-мотивов могут быть использованы как дополнительные критерии с целью определения групп риска развития рака желудка.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Молекулярно-генетические исследования подразумевают соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил ведет к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Это в свою очередь приводит к неверной интерпретации и диагностике и соответственно, неправильно подобранной терапии, что в конечном итоге может нанести вред пациенту.

Причины появления ложноположительных результатов: контаминация исследуемых образцов различными биологическими агентами вирусной, бактериальной или иной природы, перекрестная контаминация от образца к образцу, загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при выделении ДНК и постановке реакции в двух или трех параллелях, а также при использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии пробоподготовки. Параллельно с опытными образцами в каждом эксперименте должен использоваться специальный контроль, позволяющий верифицировать результаты.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация, отсутствие либо наличие небольшого количества исследуемой ДНК в пробах или образцах выделенных нуклеиновых кислот, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, неисправность оборудования, наличие ингибиторов ПЦР, несоблюдение технологии внесения образцов ДНК в пробирку на этапе амплификации, а также ампликонов в гель, что приводит к их вымыванию во время электрофореза.

Сотрудники, проводящие исследования, должны неукоснительно соблюдать методические инструкции и санитарные правила в отношении безопасности работы в ПЦР-лаборатории.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОЦЕНКИ КАНЦЕРОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА *HELICOBACTER PYLORI*

К инфекционным агентам, обладающим канцерогенным потенциалом, относится патогенная грамотрицательная бактерия *Helicobacter pylori* — единственная бактерия, классифицированная ВОЗ как канцероген I типа. *Helicobacter pylori* — мелкая грамотрицательная бактерия изогнутой или слегка спиралевидной формы, колонизирующая слизистую оболочку желудка человека и вызывающая хронический воспалительный процесс. Она избирательно колонизирует эпителий желудка и является этиологическим агентом MALT-лимфомы, язвы желудка, 12-перстной кишки и рака желудка. В настоящее время *Helicobacter pylori* считается наиболее распространенным этиологическим инфекционным канцерогенным агентом, по сути ответственным за 5,5 % глобального бремени рака, что делает изучение канцерогенных аспектов данного микроорганизма весьма актуальной задачей. Распространенность *Helicobacter pylori* в различных регионах мира существенно различается и зависит от социально-экономических условий. Средний уровень его распространенности в мире составляет около 60 %. Наибольшая распространенность *Helicobacter pylori* отмечена в развивающихся странах, где может быть инфицировано до 80 % взрослого населения. Значительная часть инфицированных пожизненно являются бессимптомными носителями, но при этом у большинства может развиваться хроническое воспаление. Среди инфицированных приблизительно в 10 % случаев возникает язвенная болезнь желудка и/или 12-перстной кишки, у 1–3 % процесс может прогрессировать до рака желудка (в основном представленного аденокарциномой) и у очень небольшого числа пациентов — примерно у 0,1 % — инфекционный процесс может закончиться развитием MALT-лимфомы. Из различных заболеваний, этиологической причиной которых является *Helicobacter pylori*, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта являются самыми важными объектами для изучения, требующими широкомасштабных популяционных исследований. Понимание молекулярно-генетического механизма канцерогенеза, индуцированного *Helicobacter pylori*, имеет очень важное значение для разработки новых стратегий борьбы с возникновением рака желудка. Частота рака желудка, причиной которого непосредственно является *Helicobacter pylori*, варьирует в различных популяциях, наибольший процент (75 %) такого рака отмечают в Японии, а наименьший (около 10 %) — в европейской популяции. В настоящее время выявление рака желудка в 80 % случаев происходит на IV стадии, когда вероятность успешного лечения крайне мала, что делает разработку ранней системы диагностики рака желудка хеликобактерной этиологии очень важной.

В соседних с Беларусью странах инфицированность взрослых составляет 70,3 %, детей до 18 лет — 5,4–65,4 % (Польша); в России (Нижегород, Владивосток) этот показатель равен 82,9 и 58,9 % соответственно, в то время как у детей в Санкт-Петербурге — 75,7 %. Инфицированность *Helicobacter pylori* составляет 74,6 % у взрослых и 66,7 % у детей; по данным других белорусских исследователей, при наличии гастроэнтерологической симптоматики она

колеблется от 60 до 94 %, а при дуоденальной язве близка к абсолютной, тогда как у детей до 18 лет находится в пределах 52 %.

Патогенетические механизмы *Helicobacter pylori* реализуются посредством факторов вирулентности и патогенности, одним из которых является белок CagA. CagA белок *Helicobacter pylori* и систему секреции IV типа Cag (T4SS) кодируют несколько генов, расположенных на острове патогенности (cagPAI), одним из которых является CagA. CagA-ген (цитотоксин-ассоциированный ген А) — иммунодоминантный антиген *Helicobacter pylori*, имеющий наибольшее значение в патогенезе заболеваний, связанных с данной бактерией. Патогенетический потенциал CagA-гена реализуется системой T4SS, вводящей CagA в клетки хозяина и тем самым стимулируя канцерогенный ангиогенез. После переноса в цитоплазму клетки хозяина CagA может связываться с внутренней поверхностью клеточной мембраны и подвергаться фосфорилированию тирозина киназами семейства Src на EPIYA (глутамат-пролин-изолейцин-тирозин-аланин) мотивах. Эти мотивы определяются как EPIYA-A, -B, -C и -D в соответствии с аминокислотной последовательностью, окружающей последовательность EPIYA. Фосфорилированный таким образом CagA-белок индуцирует изменения сигнальной клетки хозяина, повышающие пролиферативную способность клеток желудочного эпителия, что приводит к их резкому удлинению, называемому «фенотипом колибри», и напрямую зависит от количества мотивов EPIYA в варибельной области. Увеличение количества EPIYA-мотивов может служить оценкой степени канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori* и прогностическим фактором развития рака желудка. Ранее проведенные исследования показали, что западные типы CagA-белка почти всегда содержат EPIYA-A, -B и -C-мотивы (может присутствовать до 5 EPIYA-C-мотивов), а восточно-азиатские типы — EPIYA-A, -B и -D. Увеличение числа EPIYA-C-мотивов повышает риск развития рака желудка в западных штаммах *Helicobacter pylori*, а EPIYA-D — в восточных.

В основе предлагаемого метода лежит молекулярно-генетическая оценка степени фосфорилирования CagA-белка *Helicobacter pylori*, ответственного за патогенный потенциал бактерии с помощью определения EPIYA-мотивов, обычно различающихся по количеству и виду А, В, С или D-повторов в карбоксильном конце участка CagA-белка *Helicobacter pylori*.

Штаммы, имеющие одновременно EPIYA-A и B-мотивы или содержащие один EPIYA-C-мотив, обуславливают более чем семикратное увеличение риска развития рака желудка по сравнению с CagA-негативными штаммами. Штаммы, содержащие два или более EPIYA-C-мотивов, обуславливают более чем 30-кратное повышение риска. Большее число EPIYA-C или D мотивов ассоциируется с увеличением риска кишечной метаплазии, предзлокачественных изменений.

Таким образом, определение степени фосфорилирования CagA-белка зависящее от полиморфных мотивов EPIYA CagA-белка, представляется более важным, чем простое определение CagA. Данный метод позволяет улучшить клиническое прогнозирование заболеваний желудочно-кишечного тракта и имеет важное прогностическое значение в оценке риска развития рака желудка у конкретного пациента и в популяции.