

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель

Министра здравоохранения

Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ Е.Н.Кроткова

\_\_\_\_\_ 28.02.2022 г.

Регистрационный № 168-1221

**Метод определения резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину  
и левофлоксацину**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Государственное учреждение

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

АВТОРЫ:

к.б.н., доцент А.В. Воропаева, И.Б. Тропашко, Т.Е. Гавриленко,

д.м.н., доцент В.М. Мицура

Гомель, 2021

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) изложена методика мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) для выявления резистентности *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) к кларитромицину и левофлоксацину у пациентов с заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки.

Методика мультиплексной ПЦР РВ для выявления резистентности *H.pylori* к кларитромицину и левофлоксацину может быть использована в комплексе медицинских услуг, с целью повышения эффективности эрадикационной терапии, а также контроля антибиотикорезистентности *H.pylori*.

Инструкция предназначена для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-гастроэнтерологов, врачей - инфекционистов и врачей иных специальностей, оказывающих медицинскую помощь пациентам в стационарных и амбулаторных условиях.

**Показания к применению:** Болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (K25-K28), гастрит и дуоденит (K29).

**Противопоказания к применению:** отсутствуют.

**Перечень необходимого оборудования и изделий медицинского назначения.**

**Таблица 1 – Набор оборудования и изделий медицинского назначения для проведения молекулярно-генетического анализа**

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная центрифуга (1000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур -10-+99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс

Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов 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>Проведение ПЦР</i>
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов одноканальных (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С

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.

В таблице 2 приведен список основных реагентов для проведения анализа методом мультиплексной ПЦР РВ.

Таблица 2 — Список реагентов, необходимых для проведения мультиплексной ПЦР РВ.

Этап исследования	Реагенты
Пробоподготовка	0,9% раствор хлорида натрия
Выделение ДНК	Комплект реагентов для выделения ДНК из биоптатов
ПЦР РВ	Мастер-микс для проведения ПЦР-РВ
	Ультрачистая вода для ПЦР
	Олигонуклеотиды (праймеры и флуоресцентные зонды)
	ДНК (20-40 нг/мкл)

### Описание технологии использования методики с указанием этапов

**Этап 1. Получение и транспортировка биологического материала** (биоптаты слизистой оболочки желудка) проводится в соответствии с правилами для проведения молекулярно-биологических исследований.

**Этап 2. Экстракция ДНК.** Выделение ДНК осуществляется с использованием соответствующих коммерческих наборов.

### Этап 3. Проведение мультиплексной ПЦР РВ

Для выявления резистентности *H. pylori* использованы праймеры и флуоресцентные зонды, структура которых приведена в таблице 3.

**Таблица 3 – Структура праймеров и зондов для выявления резистентности *H. pylori* к кларитромицину и левофлоксацину**

	Последовательность праймеров и зондов
<b>Резистентность</b>	<b>A2142G -F -5/ - TTCCTCCTACCCGCGGCAAGACAGG -3/</b>
	<b>A2142C -F- 5/ -TCC TAC CCG CGG CAA GAC TGC-3/</b>

<b>кларитромицину:</b>	<b>A2143G-F</b> -5/-CCTACC CGC GGC AAG ACG ACG- 3/
	<b>23 S HP-C-R</b> - 5/ -GGA TGA CTC CAT AAG AGC CAA AGC
	<b>23SHP-C-P</b> - 5/-CGT CTT GCC GCG GGT AGG AGGAAT TTT CAC-3/ , 5/ -FAM, 3/ BHQ1
<b>Резистентность к левофлоксацину:</b>	<b>gyrA 259 –F</b> - 5/- CAC CCC CAT GGC GGTT- 3/
	<b>gyrA-261A F</b> -5/- FCCC CAT GGC GAT ACA- 3/
	<b>gyrA-261G -F</b> - 5/- CCC CAT GGC GAT ACG- 3/
	<b>gyrA-271A -F</b> - 5/- CAT GGC GAT AAT GCG GTT TGTA- 3/
	<b>gyrA-271T -F</b> - 5/- CAT GGC GAT AAT GCG GTT TGTT- 3/
	<b>gyrA-272G -F</b> - 5/- ACC CCC ATG GCG ATA ATG CGG TTT ATCG- 3/
	<b>gyrA HP F</b> - 5/- RACT CGC CTT AGT CATTC- 3/
	<b>gyrA HP F-P</b> - 5/- CGT TAT CGC CAT CAA TAG AGC CAA- 3/ , 5/ -HEX, 3/ BHQ2
<b>16s RNA H.pylori</b>	<b>16S rRNA HP-F</b> - 5/-CCC ATC AGG AAA CAT CGC TTCA- 3/
	<b>16S rRNA HP-R</b> - 5/-TCCACTATG CTGGAGAATTGGCTA- 3/
	<b>16S rRNA HP-P</b> -5/-TGCTTG CCA CGC CAT CCA TCA CATCA- 3/ , 5/ -ROX, 3/ BHQ2
<b>β- Actin</b>	<b>β-Actin-F</b> - 5/-CCC ATC TAC GAG GGC TAC GC- 3/
	<b>β-Actin-R</b> - 5/-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CGG TCAG- 3/
	<b>β-Actin-P</b> -5/-CCA TCC TGC GTC TGG ACC TGG CTG GC- 3/ 5/ -CY5, 3/ BHQ2

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 35 мкл формируют следующим образом: мастер-микс для проведения ПЦР-РВ-17,5 мкл, 3 прямых праймера для определения резистентности к кларитромицину (10 пмоль) - по 0,2 мкл каждого, обратный праймер для определения резистентности к кларитромицину (10 пмоль) - 2,0 мкл, флуоресцентный зонд для определения резистентности к кларитромицину (10 пмоль) - 0,7 мкл; 6 прямых праймеров для определения резистентности к левофлоксацину (10 пмоль) - по 0,2 мкл каждого, обратный праймер для определения резистентности к левофлоксацину (10 пмоль) - 2,0 мкл, флуоресцентный зонд для определения резистентности к левофлоксацину (10 пмоль) - 0,7 мкл; прямой и обратный праймеры для определения 16s RNA *H.pylori* (10 пмоль) - по 0,2 мкл каждого, флуоресцентный зонд для определения 16s RNA *H.pylori* (10 пмоль) - 0,7 мкл; прямой и обратный праймеры для определения  $\beta$ - актина (10 пмоль) - по 0,2 мкл каждого, флуоресцентный зонд для определения  $\beta$ - актина (10 пмоль) - 0,7 мкл; вода- 3,2 мкл, образец ДНК – 5 мкл.

В ходе каждой реакции следует использовать контрольные образцы, предназначенные для выявления артефактов в ходе реакции. Наличие амплификации в данных пробирках будет указывать на загрязнение реагентов или расходных материалов чужеродной ДНК. Для этого используется постановка реакции с отрицательным контрольным образцом (ОКО).

При проведении ПЦР РВ более 1 образца готовят общий раствор (Master mix), в который входят все компоненты смеси (кроме образца ДНК) в количестве, соответствующем числу образцов + ОКО + 1 дополнительный образец. Образец вносят индивидуально в каждую пробирку, содержащую аликвотированный (на 1 анализ) мастер-микс.

Программа амплификации: 95°C - 2 минуты (1цикл); 95° С - 15 секунд, 58°C - 45 секунд (40циклов) → считывание сигнала в конце каждого цикла.

**Этап 4. Анализ результатов.** Анализ результатов проводят по каждому из образцов и контролей, согласно рассчитанных программой пороговых линий для всех кривых амплификации по соответствующему каналу флуоресцентной детекции и визуально.

Детектируемый канал FAM – наличие резистентности к кларитромицину;

Детектируемый канал HEX – наличие резистентности к левофлоксацину;

Детектируемый канал ROX – наличие ДНК *H.pylori*;

Детектируемый канал CY5 – наличие  $\beta$ - актина (ВКО).

Образец считается положительным, если в таблице результатов пороговых циклов по детектируемым каналам определено значение  $C_t$  и кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Наличие характерных кривых хотя бы по одному из детектируемых каналов (FAM, HEX, ROX, CY5) в образцах ОКО свидетельствует о загрязнении реакционной смеси или расходных материалов (ложноположительные образцы). Отсутствие характерного роста кривой по каналу CY5 (ВКО) свидетельствует о ингибировании ПЦР (ложноотрицательные образцы).

#### **Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения**

Возможные ошибки при выполнении мультиплексной ПЦР РВ, как и других 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 биологического материала; выделении нуклеиновых кислот, амплификации и детекции.