

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневич
«11» января 2015 г.
Регистрационный № 154-1115



МЕТОД ОЦЕНКИ РИСКА РАЗВИТИЯ ГАСТРИТА

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

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

АВТОРЫ:

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

Гомель, 2015

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

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

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов и т.д.

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

Таблица 1 — Набор оборудования для проведения молекулярно-генетического анализа

Наименование оборудования и основные характеристики
<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10 000–15 000 $\times$ g) с ротором для пробирок типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, с диапазоном рабочих температур от 0 до +25 $^{\circ}$ C
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от (-10 $^{\circ}$ C) до (+ 99 $^{\circ}$ C)
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки препаратов нуклеиновых кислот
Холодильник с диапазоном рабочих температур от (+2 $^{\circ}$ C) до (+4 $^{\circ}$ C)
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от (-16 $^{\circ}$ C) до (-18 $^{\circ}$ C)
УФ-стерилизатор, или его аналог
<i>Проведение ПЦР</i>
Амплификатор (термоциклер) предназначенный для проведения ПЦР
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат с диапазоном рабочих температур от (-10 $^{\circ}$ C) до (+ 99 $^{\circ}$ C)
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл)
Холодильник с диапазоном рабочих температур от (+2 $^{\circ}$ C) до (+4 $^{\circ}$ C)
Морозильная камера с диапазоном рабочих температур от (-16 $^{\circ}$ C) до (-18 $^{\circ}$ C)
<i>Регистрация результатов амплификации</i>
Источник питания с постоянным током
Камера для горизонтального электрофореза

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

Также необходимы следующие расходные материалы: ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера); микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; наконечники с фильтром объемом 10, 20, 200, 1000 мкл; наконечники без фильтра; халаты, резиновые перчатки, штативы для пробирок, стеклянная химическая посуда и др.

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

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

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

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

Показания к применению:

Гастрит (МКБ10 – K29)

Противопоказания:

Нет.

Описание технологии используемого метода

Этап 1. Забор материала, пробоподготовка и выделение ДНК

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

Полученный во время фиброзофагогастродуоденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5мм) следует вносить в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5мл типа «Eppendorf» содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора, плотно закрывать, маркировать и транспортировать в лабораторию. При невозможности немедленной доставки проб сохранять их в холодильнике при температуре 2–8⁰С в течение 3–х суток. Далее проводить выделение тотальной ДНК по соответствующим методикам.

Кровь для проведения исследований следует забирать из локтевой вены одноразовой иглой в специальную вакуумную систему с ЭДТА. Пробирку после взятия крови плавно перемешать, переворачивая вверх дном, чтобы кровь перемешалась с антикоагулянтом и поместить в термостат на 20 минут при 37⁰С. Затем пробирки с цельной кровью центрифугировать при комнатной температуре в течение 10 мин при 1500 об/мин. Образовавшуюся плазму крови отобрать в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольными фильтрами в пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf» и хранить при температуре минус 16–20⁰С.

Из оставшейся части образцов периферической цельной крови отобрать 200 мкл и перенести в стерильную полипропиленовую микроцентрифужную пробирку (объемом 1.5 мл, содержит примерно 1 000 000 лейкоцитов). Добавить 1000 мкл лизирующего буфера 1х (гидрокарбонат калия, хлорид аммония, EDTA – 5 объемов), перемешать содержимое, перевернув пробирку несколько раз, и инкубировать при комнатной температуре в течение 5 минут. Центрифугировать 1 минуту при 12 000-14 000 об./мин. и удалить надосадочную жидкость, стараясь при этом не удалить клеточный осадок, который виден на дне пробирки. Ресуспендировать осадок клеток со дна пробирки в 1000мкл клеточного буфера 1х (хлорид натрия, TRIS основной, TRIS гидрохлорид). Материал разделить на 2 аликвоты и хранить при температуре не выше минус 16⁰С.

Выделение ДНК из лейкоцитов крови и биоптатов слизистой оболочки желудка

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

Оценка качества препаратов ДНК

После проведения выделения, следует определить количество ДНК фотометрически с использованием безкюветного фотометра. Концентрация ДНК должна находиться в пределах 20-50 нг/мкл, соотношение экстинций 260/280 нм не менее 1,67, что является

достаточным для дальнейшего проведения реакции амплификации. После спектрофотометрического анализа препараты ДНК, отвечающие стандартным требованиям, использовать для проведения ПЦР.

Этап 2. Проведение ПЦР

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

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

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

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

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

Полиморфизм, генотипы, аллели	Последовательность праймеров	Режим амплификации
IL-1β (C511T) СТ: 304 п.н., 190 п.н., 114 п.н. СС: 190 п.н., 114 п.н. ТТ: 304 п.н.	F1: 5'-tggcattgactgggtcatc-3' R1: 5'-gtttaggaatcttcccactt-3'	ПЦР-ПДРФ: рестриктаза <i>AvaI</i> (<i>Eco88I</i>) 1 цикл (95°C - 3 мин); 35 циклов- (95°C - 30 с, 55°C - 1 мин, 72°C - 1 мин); 1 цикл (72°C - 5 мин)
IL-1 RN 1: 410 п.н. 2: 240 п.н. 3: 530 п.н. 4: 325 п.н. 5: 595 п.н.	N1: 5'-cccctcagcaaacactcc -3' N2: 5'-ggtcagaagggcagaga -3'	АС-ПЦР 1 цикл (95°C - 3 мин); 35 циклов- (95°C - 30 с, 60°C - 1 мин, 72°C - 1 мин); 1 цикл (72°C - 5 мин)

IL - 4 (C33T) T: 157 п.н. C: 244 п.н. Контрольный фрагмент: 358 п.н.	F1: 5'-ccaagtgactgacaatctgg -3' R1: 5'-att tgcagtgacaatgtg aga-3' F2:5'-gcttctcctgataaacatatt gc -3' R2:5'-atactgagagcatcaccagaac- 3'	АС-ПЦР 1 цикл (95°С - 3 мин); 35 циклов- (95°С - 30 с, 56°С - 1 мин, 72°С - 1 мин); 1 цикл (72°С - 5 мин)
IL-8 (T251A) A: 114 п.н. T: 114 п.н.	F1:5'-aatacggagtatgacgaaaa - 3' R1:5'-ctagaaataaaaaagcatacat - 3' F2:5'-aatacggagtatgacgaaaa - 3' R2:5'-ctacaaataaaaaagcatacaa - 3'	АС-ПЦР 1 цикл (95°С - 3 мин); 35 циклов- (95°С - 30 с, 53°С - 1 мин, 72°С - 40 с); 1 цикл (72°С - 5 мин)

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

3. Заключение

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

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

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

Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

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