

**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. Зяцьков, В.Н. Беляковский, 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 определению количества и вида так называемых EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)-мотивов в карбоксильном конце участка CagA-белка, с использованием ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенирования 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.

## **1. 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, которым необходимо назначение этиотропной терапии в стационарных и амбулаторных условиях с целью профилактики развития рака желудка.

## 2. 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); экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны лимфоидной ткани слизистой оболочки [MALT-лимфома] (C88.4).

## 3. Противопоказания к применению: отсутствуют.

## 4. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения

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 -10-+99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 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>Проведение ПЦР-реакции</i>
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С

Комплект пипеточных дозаторов (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
<i>Проведение электорофоретической детекции</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур -10 – + 99 °С
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 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 проведения молекулярно-генетических исследований необходимы: наборы реагентов для экстракции ДНК, для проведения амплификации и горизонтального электрофореза в агарозном геле. Перечень набора основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методик анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использования коммерческих наборов.

## **5. Технология осуществления метода**

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

Методика определения ЕРІУА-мотивов включает следующие этапы:

### **1) Взятие и транспортировка биологического материала.**

Взятие биоптатов слизистой оболочки желудка осуществляют во время проведения фиброгастродуоденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка. Полученный биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5мм<sup>3</sup>) 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<sup>0</sup>С в течение 3–х суток.

## **2) Экстракция ДНК.**

Выделение ДНК проводят с использованием готовых коммерческих наборов, позволяющих 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  $\geq 1,67$ ,  $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$ ,  $A_{320} \rightarrow 0$ .

## **3) Проведение ПЦР и электрофоретической детекции.**

3.1. 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 проведения ПЦР приведены в таблицах 1 и 2, соответственно.

Таблица 1 – Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления ДНК *Helicobacter pylori*

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

Таблица 2 – Программа для проведения ПЦР с целью выявления ДНК *Helicobacter pylori*

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	30 с	35
	Отжиг	63	60 с	
	Элонгация	72	60 с	
3	Элонгация	72	1 мин	1
4	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 контроля использована бидистиллированная вода.

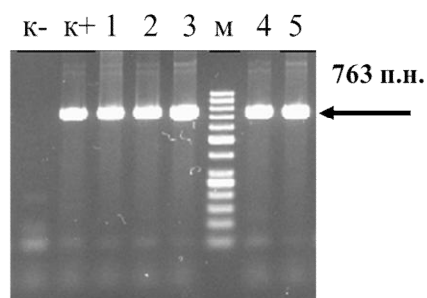


Рисунок 1 – Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР с праймерами 16S

3.2. На следующем этапе работы проводят выявление фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*. Структура праймеров и программа для проведения ПЦР приведены в таблицах 3 и 4, соответственно.

Таблица 3 – Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Размер амплифицируемого фрагмента
CagA-прямой	GATAACAGGCAAGCTTTTGA GGGA	349 пар нуклеотидов (п.н.)
CagA-обратный	CTGCAAAAGATTGTTTGGCA GA	

Таблица 4 – Программа для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента гена *CagA Helicobacter pylori*

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	20 с	42
	Отжиг	55	20 с	
	Элонгация	72	20 с	
3	Элонгация	72	1 мин	1
4	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.

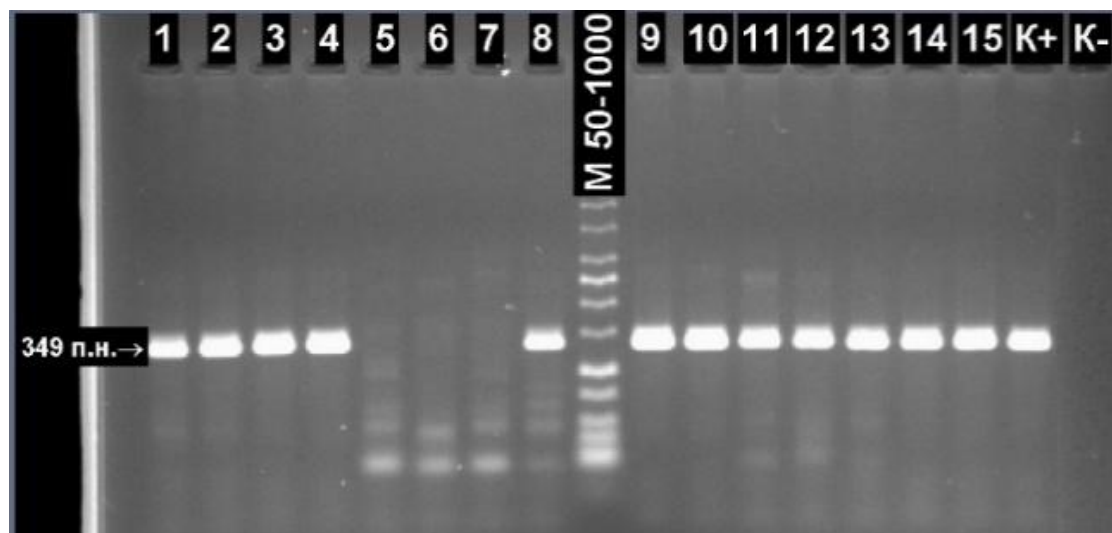


Рисунок 2 – Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР, амплифицирован фрагмент гена *CagA Helicobacter pylori*

3.3. При выявлении *CagA* гена *Helicobacter pylori* определяют количество и вид EPIYA-мотивов гена *CagA* методом ПЦР, структура праймеров и программа для проведения ПЦР приведены в таблицах 5 и 6, соответственно.

Таблица 5 – Структура праймеров для проведения ПЦР с целью выявления EPIYA-мотивов гена *Cag A Helicobacter pylori*

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



Таблица 6 – Программа для проведения ПЦР с целью выявления фрагмента EPIYA-мотивов гена CagA *Helicobacter pylori*

№	Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
1	Денатурация	95	3 мин	1
2	Денатурация	95	30 с	35
	Отжиг	38	45 с	
	Элонгация	72	45 с	
3	Элонгация	72	1 мин	1
4	Охлаждение	4	3 мин	1

#### 4) 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 7 – Количество, виды EPIYA и соответствующие им зоны на электрофореграмме

Зоны на фореграмме	Количество EPIYA	Виды EPIYA
147 и/или 204	2	AB
147 и 366 (или 366)	3	ABC
209 и 374	3	ABD
147-366-468	4	ABCC
153-209-375-537	4	ABBD
147-363-465-567	5	ABCCC

Электрофоретическая детекция в качестве примера представлена на рисунке 3.

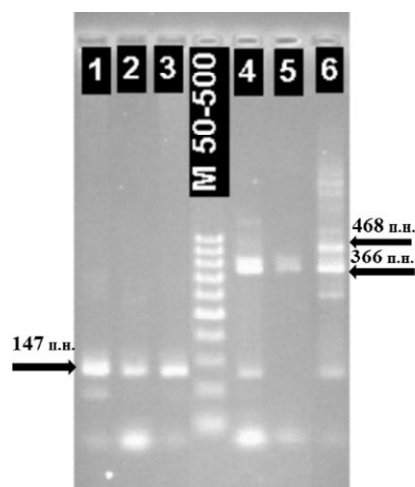


Рисунок 3 – Электрофоретическая детекция с целью выявления количества и видов EPIYA-мотивов CagA *Helicobacter pylori*

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

Как видно из таблицы 7, с увеличением размера амплифицированного фрагмента увеличивается количество EPIYA – мотивов, за счет появления С или D видов EPIYA – мотивов, являющихся наиболее канцерогенными и обуславливающими значительное увеличение риска развития рака желудка, что имеет важное прогностическое значение.

Результаты данного метода диагностики должны оцениваться только в комплексе с результатами других диагностических исследований с последующим выставлением диагноза согласно МКБ-10. При выявлении

трех и более EPIYA-мотивов или как минимум одного EPIYA-C или EPIYA-D мотива рекомендуется направление к врачам-онкологам и более частое (не реже 1 раза в 3 мес.) тщательное обследование этого пациента. А также назначение антихеликобактерной терапии. При выявлении 2-х и менее EPIYA-мотивов врач осуществляет динамическое наблюдение за пациентом в стандартном режиме.

## **6. 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 прогностическим фактором неблагоприятного развития заболеваний желудочно-кишечного тракта (Z03.1 «Наблюдение при подозрении на злокачественную опухоль»), а 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 по развитию рака желудка.

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

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что, 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 проведении выделения 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 должны использоваться специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация, отсутствие или 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 несоблюдение технологии внесения 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 [22]. *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, двенадцатиперстной кишки и рака желудка. В настоящее время *Helicobacter pylori* считается наиболее распространенным этиологическим инфекционным канцерогенным агентом и является по сути ответственным за 5,5% глобального бремени рака [28], что делает изучение канцерогенных аспектов данного микроорганизма весьма актуальной задачей. Распространенность *Helicobacter pylori* – инфекции в различных регионах мира существенно отличается и зависит от социально-экономических условий. Наибольшая распространённость *Helicobacter pylori* отмечена в развивающихся странах, где может быть инфицировано до 80% взрослого населения [10]. Средний уровень распространенности *Helicobacter pylori* в мире составляет около 60 %. В настоящее время данный микроорганизм считается наиболее распространенным этиологическим инфекционным канцерогенным агентом и является по сути ответственным за 5,5% глобального бремени рака [16]. Значительная часть инфицированных, пожизненно являются бессимптомными носителями, но при этом у большинства может развиваться хроническое воспаление [21]. Среди инфицированных приблизительно в 10% случаев возникает язвенная болезнь желудка и/или 12-ти перстной кишки, у 1-3% процесс может прогрессировать до рака желудка (в основном представленного аденокарциномой), и у очень небольшого количества

пациентов – примерно у 0,1% инфекционный процесс может закончиться развитием MALT - лимфомы [20]. Из различных заболеваний, этиологической причиной которых является *Helicobacter pylori*, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта являются самыми важными объектами для изучения, требующие 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* различается в различных популяциях, наибольший процент (75%) таких раков отмечают в Японии, а наименьший процент (около 10%) отмечен в Европейских популяциях [25]. Следует отметить, что 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 показан 70,3% уровень инфицированности среди взрослых и от 5,4% до 65,4% среди детей до 18 лет (Польша), в России (Нижний Новгород, Владивосток) уровень инфицированности взрослых составляет 82,9% и 58,9% - детей, в то время как уровень инфицированности детей в Санкт-Петербурге - 75,7% [3, 4, 5, 8]. Инфицированность *Helicobacter pylori* составляет 74,6% у взрослых и 66,7% у детей, по данным других белорусских исследователей при наличии гастроэнтерологической симптоматики инфицированность составляет от 60 до 94% [7, 6], а при дуоденальной язве близка к абсолютной, тогда как у детей до 18 лет находится в пределах 52% [1, 23].

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 островке патогенности (cagPAI) [1], 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 [1, 13, 17]. Патогенетический потенциал CagA гена реализуется системой T4SS, вводящей CagA гена в клетки хозяина и тем самым стимулируя канцерогенный ангиогенез [24]. 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 [26]. Фосфорилированный таким образом CagA белок индуцирует изменения сигнальной клетки-хозяина, повышающие пролиферативную способность клеток желудочного эпителия, что приводит к резкому удлинению клеток, называемому «фенотипом колибри» и напрямую зависит от количества мотивов EPIYA в варибельной области [14]. Исходя из вышеизложенного, увеличение количества EPIYA мотивов, может служить оценкой степени канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori* и прогностическим фактором развития рака желудка [18]. Ранее проведенные исследования показали, что западные типы CagA-белка почти всегда содержат EPIYA -A, -B, и -C мотивы (может присутствовать до 5-ти 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* [27], а EPIYA-D в восточных [19].

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 [12]. Штаммы, содержащие два или более EPIYA-C-мотивов, обуславливают более чем 30-кратное повышение риска [19]. Большое число EPIYA-C или D мотивов ассоциируется с увеличением риска кишечной метаплазии, предзлокачественных изменений [15].

Таким образом, определение степени фосфорилирования CagA белка зависящее от полиморфных мотивов EPIYA CagA белка, представляется более важным, чем простое определение CagA [11]. Применение данного метода 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 [1].

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Воропаев Е.В., Воропаева А.В., Осипкина О.В., Зятьков А.А., Баранов О.Ю. // Молекулярно-генетические факторы канцерогенного потенциала *Helicobacter pylori* С.347-348 Сборник трудов Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» - Минск 27-28 сентября 2018 года.
2. Жебрун А.Б. // Инфекция *Helicobacter pylori* – глобальная проблема здравоохранения Междисциплинарный научный и прикладной журнал «Биосфера», 2015, т. 7, № 2.
3. Климанская Е. В. Клинико-эпидемиологическое наблюдение при хроническом гастродуодените у детей, проживающих в условиях мегаполиса. / Е. В. Климанская, Ф. С. Возжаева, А. В. Новикова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. — 1997. — Т. VII, № 5 (приложение 4). — С. 30.
4. Корсунский А. А. Результаты обследования на *Helicobacter pylori*. / А. А. Корсунский, Г. П. Раба, А. П. Ругаева // Материалы VIII тематической сессии Российской группы по изучению *Helicobacter pylori*. — Уфа, 1999. — С. 21-22.



5. Ляликова Ю.В. и соавторы / Распространенность генотипов *VacA* и *CagA Helicobacter pylori* у детей и взрослых города Владивостока // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 4.
6. Мараховский К. Ю. Гастродуоденальная патология, ассоциированная с *Helicobacter pylori*, в детском возрасте. / К. Ю. Мараховский, Ю. Х. Мараховский // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. — 1997. — Т. VII, № 3. — С. 62-63.
7. Пиманов С.И., Макаренко Е.В., Крылов Ю., Матвеев М.Е., Малашенко С.В., Воропаев Е.В., Ачинович С.Л. Динамика морфологических изменений слизистой оболочки желудка при оценке отдаленных результатов эрадикации *Helicobacter pylori* Архив патологии, 2011.-N 1.-С.19-23.
8. Решетников О. В. К вопросу об эпидемиологии пилорического хеликобактериоза в г. Новосибирске. / О. В. Решетников, С. А. Курилович, К. Гранберг // Актуальные вопросы современной медицины: сб. статей. — Новосибирск, 1997. — С. 178-179.
9. A. Muller / Multistep activation of the *Helicobacter pylori* effector *CagA* // Journal Of Clinical Investigation 122 (2012) 1192–1195.
10. A.Y. Wang, D.A. Peura / The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori* associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world // Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America 21 (2011) 613–635.
11. Argent, R. H., Y. Zhang, and J. C. Atherton. 2005. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* *CagA* variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. J. Clin. Microbiol. 43:791-795.
12. Batista, Sérgio A et al. “Higher Number of *Helicobacter Pylori* *CagA* EPIYA C Phosphorylation Sites Increases the Risk of Gastric Cancer, but Not Duodenal Ulcer.” BMC Microbiology 11 (2011): 61. PMC.
13. Boyanova L. / Role of *Helicobacter pylori* virulence factors for iron acquisition from gastric epithelial cells of the host and impact on bacterial colonization. Future Microbiology. 2011 Aug;6(8):843-6.

14. Chang, Chih-Chi et al. “Fragmentation of CagA Reduces Hummingbird Phenotype Induction by *Helicobacter Pylori*.” Ed. Rupesh Chaturvedi. PLoS ONE 11.3 (2016): e0150061. PMC.
15. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 659–672.
16. D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani /Global cancer statistics 2002, // CA: A Cancer Journal for Clinicians 55 (2005) 74–108.
17. Fischer W, Prassl S, Haas R. Virulence mechanisms and persistence strategies of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;337:129-171.
18. G.T. Van Nhieu et al. / *Helicobacter pylori* type iv secretion apparatus exploits b1 integrin in a novel RGD-independent manner // PLOS Pathogens 5 (2009) e1000684.
19. Hatakeyama, Masanori. “Structure and Function of *Helicobacter Pylori* CagA, the First-Identified Bacterial Protein Involved in Human Cancer.” *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 93.4 (2017): 196–219. PMC.
20. J.M. Noto, R.M. Peek / *Helicobacter pylori*: an overview // *Methods in Molecular Biology* 921 (2012) 7–10.
21. J.R. Warren / Gastric pathology associated with *Helicobacter pylori*, *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* // 29 (2000) 705–751.
22. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(3):449-490. doi:10.1128/CMR.00054-05.
23. Li J, Ou Z, Wang F, et al. Distinctiveness of the cagA genotype in children and adults with peptic symptoms in South China. *Helicobacter* 2009;14:248–55.
24. Momoyo Asahi et al. / *Helicobacter pylori* Caga Protein Can Be Tyrosine Phosphorylated in Gastric Epithelial Cells // *Journal of Experimental Medicine* 2000 Feb 21; 191(4): 593–602.

25. Nagini S. / Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. // World Journal of Gastrointestinal Oncology. 2012;4(7):156-169.

26. Papadakos KS, Sougleri IS, Mentis AF, Hatziloukas E, Sgouras DN. Presence of Terminal EPIYA Phosphorylation Motifs in *Helicobacter pylori* CagA Contributes to IL-8 Secretion, Irrespective of the Number of Repeats. Ahmed N, ed. PLoS ONE. 2013;8(2):e56291. doi:10.1371/journal.pone.0056291.

27. Vilar e Silva, Adenilson et al. "Evaluation of the Pattern of EPIYA Motifs in the *Helicobacter Pylori* cagA Gene of Patients with Gastritis and Gastric Adenocarcinoma from the Brazilian Amazon Region." International Journal of Bacteriology 2014 (2014): 418063. PMC.

28. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. Clinical Microbiology Reviews. 2010;23(4):713-739. doi:10.1128/CMR.00011-10.