

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Е.Л. Богдан

« » декабря 2020 г.

Регистрационный № 119-1120



**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ДИСБАКТЕРИОЗА
ПОСРЕДСТВОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ**
(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»; государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

АВТОРЫ: Охремчук Е.В., Скоповец Е.Я., Охремчук А.Э., к.м.н. Кирсанова Н.П., Евдокимова О.В., к.б.н., доцент Сидоренко А.В., к.б.н., доцент Валентович Л.Н., д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси Алейникова О.В., д.м.н., профессор Конопля Н.Е.

Минск, 2020

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Е. Л. Богдан
29.12.2020
Регистрационный № 119-1120

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ДИСБАКТЕРИОЗА ПОСРЕДСТВОМ
СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси»

АВТОРЫ: Е. В. Охремчук, Е. Я. Скоповец, А. Э. Охремчук, канд. мед. наук
Н. П. Кирсанова, О. В. Евдокимова, канд. биол. наук, доц. А. В. Сидоренко,
канд. биол. наук, доц. Л. Н. Валентович, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН
Беларуси О. В. Алейникова, д-р мед. наук, проф. Н. Е. Конопля

Минск 2020

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики дисбактериоза у пациентов с онкогематологическими заболеваниями при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с целью быстрого и эффективного определения качественного и количественного состава представителей микробиоты кишечника на основе данных молекулярно-биологических исследований.

Данный метод может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику дисбактериоза.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-онкологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с дисбактериозом при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Оборудование

1. Холодильник с температурой в камере от 4 до 6 °С.
2. Морозильная камера с температурой в камере до -80 °С.
3. Весы электронные или механические с точностью $\pm 0,1$ г.
4. Вортекс.
5. Водяная баня-термостат.
6. Универсальная роторная центрифуга для пробирок до 2 мл.
7. Программируемый амплификатор для пробирок объемом 0,2 мл.
8. Камера для электрофоретической детекции продуктов амплификации и источник электрического тока.
9. Спектрофотометр.
10. Флуориметр.
11. Вытяжной шкаф.
12. Сухожаровой шкаф.
13. Секвенатор для секвенирования «нового поколения».
14. Магнитный штатив для пробирок объемом 1,5 мл.
15. Комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5-10; 10-100 и 100-1000 мкл).
16. Одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема.
17. Пробирки объемом 0,2; 0,5; 1,5 и 2 мл.
18. Штатив-рабочее место для пробирок объемом 1,5 и 0,2 мл.
19. Одноразовые медицинские перчатки без талька.
20. Многопроцессорный или многоядерный компьютер под управлением Linux с объемом оперативной памяти 16 Гб.

Реактивы

1. Набор для выделения тотальной ДНК.
2. Деионизированная вода.
3. Премикс 2× Flash Mix 1,25U.
4. Олигонуклеотидные праймеры (прямой: 5'-tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctacgggnggcwgcag-3', обратный: 5'-gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggactachvgggtatctaacc-3').
5. Комплект реактивов для приготовления библиотеки ампликонным методом.
6. Этанол (80, 70 %).
7. Магнитные частицы.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (МКБ-10: D50-D89).
2. Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, которые обозначены как первичные или предположительно первичные (МКБ-10: C81-C96).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Оценку качественного и количественного состава микробиоты кишечного тракта пациентов проводят в несколько этапов.

Этап 1. Секвенирование нового поколения кишечного микробиома

Из образца кала массой 0,1 г выделяют тотальную ДНК с помощью набора в соответствии с инструкцией производителя. Растворение ДНК проводят в 30 мкл элюирующего буфера. Концентрацию нуклеиновых кислот определяют с помощью флуориметра. Для последующего применения концентрация ДНК должна быть не ниже 5 нг/мкл.

Для приготовления библиотек для секвенирования на матрице тотальной ДНК в объеме 25 мкл осуществляют синтез участков V3-V4 генов 16S рРНК с использованием олигонуклеотидных праймеров в соответствии с параметрами, приведенными в таблицах 1 и 2.

Таблица 1. — Состав реакционной смеси для синтеза V3-V4 участков генов 16S рРНК

Компонент	Объем на одну реакцию
2× Flash Mix 1,25U	12,5 мкл
Праймер F_V34 (1 мкМ)	5 мкл
Праймер R_V34 (1 мкМ)	5 мкл
ДНК (5 нг/мкл)	2,5 мкл

Таблица 2. — Программа полимеразной цепной реакции (ПЦР) для синтеза V3-V4 участков генов 16S рРНК:

Этап		Параметры
Плавление		95 °С, 3 мин
Цикл, 25×	Плавление	95 °С, 30 с
	Отжиг	55 °С, 30 с
	Элонгация	72 °С, 30 с
Элонгация		72 °С, 5 мин

Очистку продуктов ПЦР осуществляют с помощью магнитных частиц, используя следующий протокол:

1. В пробирки объемом 1,5 мл вносят по 20 мкл гомогенизированных на вортексе магнитных частиц, предварительно выдержанных 30 мин при комнатной температуре. Добавляют ПЦР-смесь, перемешивают с помощью дозатора.

2. Полученную смесь перемешивают на вортексе в течение 2 мин.

3. Инкубируют смесь при комнатной температуре без перемешивания 5 мин, после чего помещают образцы в магнитный штатив на 2 мин.

4. Удаляют супернатант, не вынимая пробирки из магнитного штатива.

5. Магнитные частицы промывают свежеприготовленным 80 % этанолом, не вынимая пробирки из магнитного штатива:

добавляют 200 мкл 80 % этанола к каждому образцу;

инкубируют 30 с;

аккуратно удаляют супернатант.

6. Повторяют этап промывки свежеприготовленным 80 % этанолом, после чего аккуратно удаляют остатки спирта с помощью дозатора.

7. Подсушивают образцы, не допуская пересушивания магнитных частиц, не вынимая пробирки из магнитного штатива.

8. Переносят пробирки в обычный штатив, добавляют 52,5 мкл элюирующего буфера к каждому образцу и вортексируют в течение 2 мин.

9. Инкубируют при комнатной температуре 2 мин.

10. Помещают образцы в магнитный штатив на 2 мин, не вынимая пробирки из магнитного штатива, аккуратно переносят 50 мкл супернатанта в новую пробирку объемом 0,5 мл.

Индексирование очищенных амплифицированных участков V3-V4 генов 16S рРНК проводят методом ПЦР с использованием набора. Параметры реакции приведены в таблицах 3 и 4, объем реакционной смеси – 50 мкл.

Таблица 3. — Состав реакционной смеси для индексирования образцов при подготовке библиотек генов 16S рРНК

Компонент	Содержание
ДНК (очищенный фрагмент V3-V4)	5 мкл
Индекс N	5 мкл
Индекс S	5 мкл
2× Flash Mix 1,25U	25 мкл
Деионизированная вода	10 мкл

Таблица 4. — Программа ПЦР для индексирования образцов при подготовке библиотек фрагментов генов 16S рРНК

Этап	Параметры	
Плавление	95 °С, 3 мин	
Цикл, 8×	Плавление	95 °С, 30 с
	Отжиг	55 °С, 30 с
	Элонгация	72 °С, 30 с
Элонгация	72 °С, 5 мин	

Очистку индексированных образцов производят с помощью магнитных частиц по протоколу очистки продуктов ПЦР с незначительными модификациями: на этапе 1 образцы смешивают с 56 мкл магнитных частиц (вместо 20 мкл); на этапе 8 используют 27,5 мкл буфера для элюирования ДНК (вместо 52,5 мкл); на этапе 12 отбирают 25 мкл супернатанта (вместо 50 мкл).

Концентрацию ДНК в образцах измеряют с помощью флуориметра и приводят к 4 нМ с помощью буфера для элюирования ДНК. Для перевода концентрации (нг/мкл) в нМ используют следующую формулу:

$$c(\text{нМ}) = \frac{c\left(\frac{\text{нг}}{\text{мкл}}\right)}{\frac{660}{630}} * 10^6$$

Успешность протекания ПЦР проверяют путем электрофоретического анализа ампликонов в 0,8 % агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл) при напряженности электрического поля 6,5 В/см.

Индивидуальные 4 нМ библиотеки объединяют в одну, отбирая по 5 мкл из каждой библиотеки, и тщательно перемешивают. Секвенирование нормализованных библиотек производят в соответствии с рекомендациями производителя по 16S метагеномному секвенированию.

Этап 2. Биоинформатическая и статистическая обработка ампликонных данных

Обработка данных секвенирования осуществляется с помощью операционной системы Linux, используя возможности командной оболочки Bourne shell, и включает следующие шаги:

1. Удаление адаптеров, демультиплексирование прочтений

Проводят с помощью программного обеспечения bcl2fastq2 Conversion Software v2.20 (Illumina, США). Количество несоответствий, допустимых для каждого индекса, устанавливают равным 1 нуклеотидной замене.

В общем виде используется следующая команда:

```
bcl2fastq -R <RunFolder> -o <BaseCalls> --ignore-missing-bcls \
--ignore-missing-filter --barcode-mismatches 1
```

2. Удаление последовательностей праймеров и устранение ошибок демультиплексирования

Проводят с помощью скрипта preprocess16S (<https://github.com/masikol/preprocess16S>). В общем виде используется следующая команда:

```
/preprocess16S.py -1 forward_R1_reads.fastq.gz
-2 reverse_R2_reads.fastq.gz -o outdir/
```

3. Объединение прочтений и таксономическая классификация

Осуществляется на языке программирования R с применением специализированных библиотек: dada2, phyloseq и включает следующие этапы:

3.1. Фильтрация прочтений по качеству и изменение их длины.

3.2. Дереплицирование прочтений (необходимо для снижения потребления ресурсов памяти при анализе данных).

3.3. Объединение прочтений.

3.4. Конструирование таблицы последовательностей и удаление химерных последовательностей.

3.5. Присвоение таксономии.

3.6. Сохранение всех файлов, необходимых для создания объекта формата phyloseq.

4. Статистическая обработка данных

Осуществляется на языке программирования R с применением специализированных библиотек для обработки метагеномных данных и визуализации: phyloseq, ggplot2 и включает следующие этапы:

4.1. Создание объекта формата phyloseq.

4.2. Вычисление индексов биоразнообразия.

4.3. Визуализация.

4.4. Выявление наиболее представленных таксонов на уровне семейств и визуализация (топ 100 таксонов).

Этап 3. Интерпретация полученных результатов

Отклонения от нормы в составе кишечной микробиоты у пациентов с онкогематологическими заболеваниями при ТГСК оцениваются сочетанием 2 подходов: по значениям индексов альфа-разнообразия и по доминирующим таксонам.

Референсные значения индексов альфа-разнообразия в исследованной группе здоровых лиц и группе пациентов представлены в таблице 5.

Таблица 5. — Минимальные и максимальные показатели индексов биоразнообразия, медиана значений

Индекс	Группа	Минимальное значение	Максимальное значение	Медиана
Chao1	Здоровые лица	231,3	938,1	396,0
	Пациенты	69,0	690,7	161,0
Индекс Шеннона	Здоровые лица	3,4	4,9	4,3
	Пациенты	0,8	4,6	2,9
Обратный индекс Симпсона	Здоровые лица	11,3	73,5	33,9
	Пациенты	1,3	52,2	13,5

Основанием для подтверждения дисбактериоза является значение индексов альфа-разнообразия Chao1 и Шеннона, значительно ниже медианного значения в группе пациентов с онкогематологическими заболеваниями (приближение его к минимальному либо значения индекса ниже минимального). Свидетельством дисбаланса в составе микробиоты является доминирование одного или нескольких таксонов микроорганизмов, что детектируется обратным индексом Симпсона. В случае доминирования ряда таксонов, установленное значение обратного индекса Симпсона значительно ниже значения медианы в группе пациентов.

Для подтверждения дисбактериоза анализируется таксономический состав кишечной микробиоты пациента. Основанием для подтверждения заболевания также будет повышенная численность указанных таксонов: *Enterococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacteroidaceae* (рисунок).

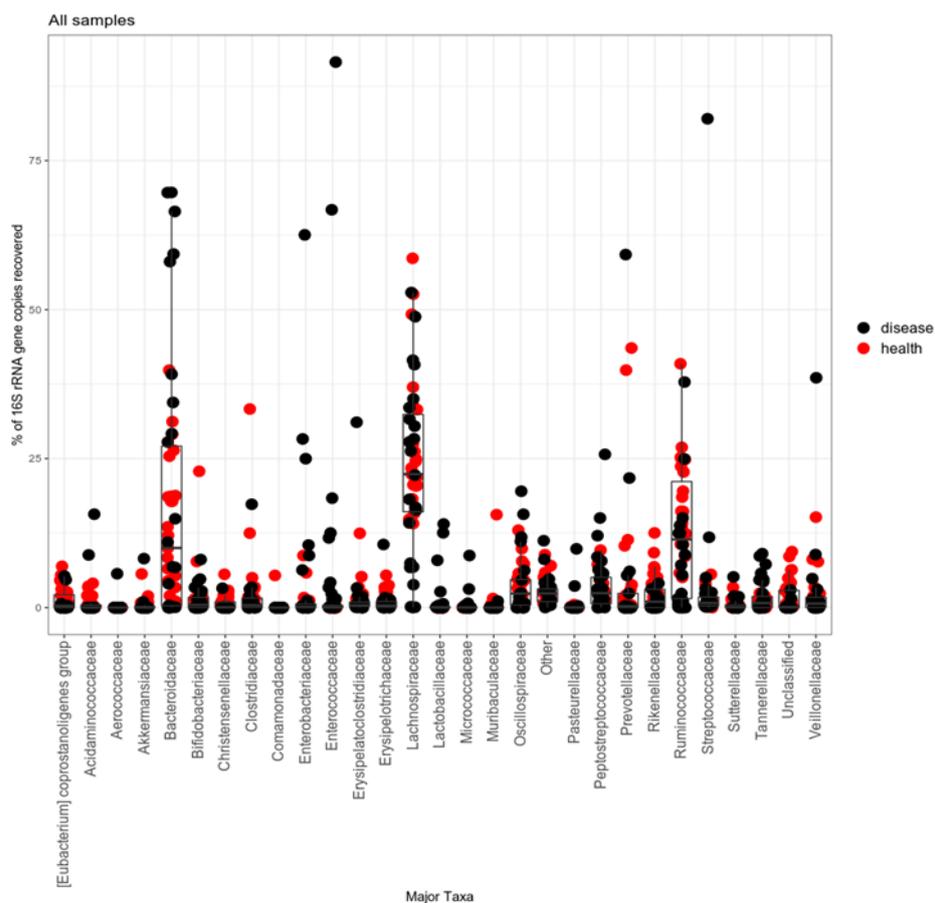


Рисунок — Наиболее представленные таксоны в микробиоте здоровых лиц и пациентов с онкогематологическими заболеваниями

Дополнительным прогностическим фактором развития реакции «трансплантат против хозяина» может выступать присутствие в кишечной микробиоте следующих таксонов микроорганизмов: *Erysipelatoclostridium*, *Butyricicoccus*, *Rothia*, *Clostridium* (групп *sensu stricto* 1, *innocuum*), *Ruminococcus* (групп *gnavus*, UBA1819), *Flavonifractor*.

**ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК
ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложно-положительные результаты	Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом	<ol style="list-style-type: none">1. Соблюдение принципов зонирования лаборатории.2. Использование спецодежды (стерильные перчатки, халат, бахилы, шапочка).3. Использование стерильной одноразовой посуды, расходных материалов и растворов.4. Использование отрицательных контрольных образцов в каждой серии исследований. Проведение исследования в повторе