

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

«15» _____ 2024 г.

Регистрационный № 110-1124

**КОМПЛЕКСНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ МИКРОБИОМА У
ПАЦИЕНТОВ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА С ВРОЖДЕННЫМИ
НАРУШЕНИЯМИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ,
ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ
И ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии».

АВТОРЫ: Скоповец Е.Я., Вертелко В.Р., Жаранкова Ю.С, д.м.н.,
профессор Солнцева А.В., к.б.н., доцент Белевцев М.В.

Минск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен комплексный метод оценки микробиома кишечника у пациентов детского возраста с врожденными нарушениями иммунной системы, онкологическими и гематологическими заболеваниями посредством секвенирования нового поколения, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику дисбактериоза (K63).

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-иммунологов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам детского возраста с врожденными нарушениями иммунной системы, онкологическими и гематологическими заболеваниями в стационарных и/или амбулаторных условиях, и/или в условиях отделений дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм (D50 – D89), злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей, которые обозначены как первичные или предположительно первичные (C81 – C96), сопровождающиеся симптомами дисбактериоза (K63).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Нет.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Холодильник, поддерживающий температуру в камере от +4°C до +8°C;

морозильная камера с температурой в камере до минус 80°C;

вихревой смеситель;

водяная баня-термостат;

универсальная роторная центрифуга (12000g) для пробирок объемом до 2 мл;

программируемый амплификатор для пробирок объемом 0,2 мл;

аппарат для горизонтального электрофореза в агарозном геле и источник питания;

спектрофотометр;

флуориметр;

вытяжной шкаф;

генетический анализатор для секвенирования «нового поколения»;

магнитный штатив для пробирок объемом 1,5 мл;

комплект полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (0,5–10 мкл; 10–100 мкл; 100–1000 мкл);

одноразовые наконечники для полуавтоматических одноканальных дозаторов переменного объема (10 мкл; 100 мкл; 1000 мкл);

автоматизированная система гель-документирования;

пробирки объемом 0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл и 2 мл;

штатив для пробирок объемом 1,5 мл и 0,2 мл;

одноразовые медицинские перчатки без талька;

многопроцессорный или многоядерный компьютер под управлением Linux с объемом оперативной памяти 16 ГБ;

набор для выделения тотальной ДНК микроорганизмов;

деионизированная вода;

буферный раствор для проведения ПЦР;

буферный раствор для проведения ПЦР, содержащий ДНК-полимеразу, хлорид магния ($MgCl_2$), смесь дНТФ;

хлорид магния ($MgCl_2$), 50 мМ;

смесь нуклеозидтрифосфатов (дНТФ), каждый в концентрации 2 мМ/мкл);

ДНК-полимераза (5 ед/мкл);

олигонуклеотидные праймеры (прямой: 5'-tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagcctacgggnggcwgcag-3', обратный: 5'-gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacaggactachvgggtatctaacc-3');

комплект реактивов для приготовления ДНК-библиотеки ампликонным методом;

ДНК-маркер молекулярной массы с фрагментами в диапазоне 50–800 п.о.;

агарозный гель 1,5% (1,5 г сухой агарозы на 100 мл трис-борат-ЭДТА (ТБЕ) буферного раствора – 890 мМ Tris, 890 мМ борная кислота, 20 мМ ЭДТА, рН 8,0);

этанол (80%, 70%);

водный раствор гидроксида натрия, 10 нМ;

набор реактивов для пробоподготовки ДНК-библиотек из ПЦР-ампликонов для высокопроизводительного секвенирования;

набор реактивов для проведения высокопроизводительного секвенирования;

набор реактивов для измерения концентрации ДНК методом флуоресцентного анализа;

магнитные частицы;

ТЕХНОЛОГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

Для комплексной оценки состава микробиоты кишечника пациентов детского возраста с врожденными нарушениями иммунной системы, онкологическими и гематологическими заболеваниями проводятся следующие этапы:

1 Ампликонное секвенирование нового поколения гена 16s рРНК бактерий

1.1 Экстракция бактериальной ДНК. Из биологического материала (кала) выделяют тотальную ДНК с помощью набора в соответствии с инструкцией производителя. Растворение бактериальной ДНК осуществляется в 60 мкл элюирующего буфера. Верификация экстракции ДНК проводится спектрофотометрически (концентрация ДНК должна быть не ниже 10 нг/мкл). Затем 5 мкл ДНК микроорганизмов вносят в лунки 1,5% агарозного геля, проводят горизонтальный электрофорез по протоколу 4-5 В/см, 45 минут. Анализ результатов электрофоретического разделения проводят с использованием автоматизированной системы геледокументирования;

1.2 ПЦР на регион V3-V4 гена 16S рРНК бактерий. Для приготовления ампликонов на матрице тотальной ДНК в объеме 25 мкл проводят 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 1 реакцию
Буферный раствор для ПЦР	2,5 мкл
Деионизированная вода	15,5 мкл
Хлорид магния MgCl ₂ (50 мМ)	1 мкл
Смесь дНТФ (каждый в концентрации 2мМ)	2,5 мкл
ДНК-полимераза (5 ед/мкл)	0,3 мкл
Прямой праймер F_V34 (100 мкМ)	0,1 мкл
Обратный праймер R_V34 (100 мкМ)	0,1 мкл
ДНК (5 нг/мкл)	3 мкл

Таблица 2 – Программа ПЦР для синтеза V3 – V4 участков генов 16S рРНК

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

Эффективность ПЦР оценивают методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Устанавливают условия электрофореза 4–5 В/см, 30 мин. Затем помещают гель на детектирующую камеру и при помощи специализированного программного обеспечения и заведомо известного ДНК-маркера молекулярной массы детектируют фрагмент ПЦР. Размер полученных ПЦР-ампликонов должен соответствовать 550 п.о.

1.3 Очистка ПЦР-ампликонов. Осуществляют с помощью магнитных частиц по схеме:

1.3.1 в каждую лунку планшета вносят по 20 мкл ПЦР-ампликонов, далее добавляют по 20 мкл гомогенизированных на вихревом смесителе магнитных частиц, предварительно выдержанных 30 минут при температуре 25°C. Полученную смесь очень медленно и осторожно ресуспендируют путем пипетирования, инкубируют при температуре 25°C без перемешивания 5 минут, после чего помещают планшет с образцами на магнитный штатив на 2 минуты;

1.3.2 удаляют надосадочную жидкость из каждой лунки планшета, не снимая его из магнитного штатива;

1.3.3 для очистки ПЦР-ампликонов, прикрепленных на магнитных частицах:

- а) добавляют 200 мкл 80% этанола к каждому образцу;
- б) инкубируют 30 секунд;
- в) аккуратно удаляют надосадочную жидкость;

1.3.4 полученные осадки высушивают в течение 15 минут или как только осадки начинают трескаться на магнитной подставке, планшет снимают с магнитной подставки и добавляют 52,5 мкл буферного раствора для ресуспендирования, медленно перемешивают путем пипетирования (10 раз) и инкубируют 2 минуты при температуре 25°C.

1.3.5 планшет с образцами помещают на магнитный штатив на 2 минуты, аккуратно переносят 50 мкл надосадочной жидкости в новые пробирки объемом 0,5 мл, не вынимая пробирки из магнитного штатива.

1.4 Индексирование очищенных амплифицированных участков V3–V4 гена 16S рРНК проводят методом ПЦР с использованием специализированных индексных праймеров для секвенирования (Индекс N, Индекс S). Параметры реакции приведены в таблицах 3 и 4, объем реакционной смеси – 50 мкл.

Таблица 3 – Состав реакционной смеси для индексирования образцов при подготовке ДНК-библиотек генов 16S рРНК

Компонент	Содержание
ДНК (очищенный фрагмент V3 – V4)	5 мкл
Индекс N	5 мкл
Индекс S	5 мкл
Буферный раствор для проведения ПЦР, содержащий ДНК-полимеразу, хлорид магния (MgCl ₂), смесь дНТФ	25 мкл
Деионизированная вода	10 мкл

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

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

1.5 Очистка индексируемых ПЦР-продуктов проводится с помощью магнитных частиц по протоколу очистки продуктов ПЦР с незначительными модификациями:

1.5.1 на первых этапах образцы смешивают с 56 мкл магнитных частиц (вместо 20 мкл); для растворения ДНК используют 70 мкл буфера для ресуспендирования (вместо 52,5 мкл); далее отбирают 65 мкл надосадочной жидкости (вместо 50 мкл). Полученную смесь называют ДНК-библиотекой;

1.5.2 с помощью флуориметра и набора реагентов, предназначенного для измерения количества ДНК посредством флуориметрии, измеряют концентрацию ДНК в образцах, каждый образец разводят до концентрации 4 нМ с помощью буфера для элюирования ДНК. Для перевода концентрации (нг/мкл) в нМ используют следующую формулу 1:

$$c(\text{нМ}) = \frac{c\left(\frac{\text{нг}}{\mu\text{л}}\right)}{660\left(\frac{\text{г}}{\text{мол}}\right) \times \text{mean size}(\text{bp})} * 10^6 \quad (1)$$

где $c(\text{нМ})$ – концентрация в нМ,

$c\left(\frac{\text{нг}}{\mu\text{л}}\right)$ – концентрация в нг/мкл,

mean size – средний размер ДНК-библиотеки в п.о.

1.5.3 реакцию ПЦР контролируют путем электрофоретического анализа методом попарного сравнения ампликонов (до и после индексирования) в 1,5% агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл) при напряженности электрического поля 6,5 В/см. Средний размер ДНК-библиотеки до секвенирования должен составлять примерно 550 п.о., после индексирования – 630 п.о.;

1.6 Объединение ДНК-библиотеки для секвенирования нового поколения, ее денатурация и разведение:

1.6.1 каждый индексированный очищенный ампликон с

концентрацией 4 нМ по 5 мкл объединяют в одну пробирку, получая общую ДНК-библиотеку для секвенирования. Концентрацию обобщенной библиотеки для секвенирования измеряют флуориметрически;

1.6.2 в пробирке типа эппендорф (0,5 мл) 5 мкл (4 нМ) библиотеки смешивают с 5 мкл 0,2 N NaOH, перемешивают пипетированием и инкубируют в течение 5 минут при температуре 25°C, при этом получают денатурированную 2 нМ ДНК-библиотеку для секвенирования;

1.6.3 после денатурации 10 мкл (2 нМ) ДНК-библиотеки смешивают с 990 мкл гибридизационного буфера для получения 20 пМ библиотеки;

1.7 Денатурация и разведение внутреннего контроля для оценки качества цикла работы высокопроизводительного секвенирования

1.7.1 в одну пробирку смешивают 2 мкл внутреннего контроля для оценки качества цикла работы высокопроизводительного секвенирования (10 нМ) и 8 мкл дистиллированной воды, перемешивают, осаждают;

1.7.2 денатурацию внутреннего контроля (2нМ) проводят путем смешивания 10 мкл внутреннего контроля и 10 мкл 0,2 N NaOH, полученную смесь инкубируют 5 минут при температуре 25°C;

1.7.3 в пробирке типа эппендорф (2 мл) 20 мкл (1 нМ) ДНК-библиотеки смешивают с 980 мкл буферного раствора для гибридизации с целью получения 20 пМ внутреннего контроля для оценки качества цикла работы высокопроизводительного секвенирования.

1.8 Объединение ДНК-библиотеки и внутреннего контроля для оценки качества цикла работы высокопроизводительного секвенирования:

1.8.1 финальную ДНК-библиотеку для секвенирования (20 пМ) и разведенный внутренний контроль (20 пМ) разводят до концентрации 10 пМ. В последующем объединяют в одну пробирку типа эппендорф (2 мл) 480 мкл (80%) 10 пМ библиотеку и 120 мкл (20%) 10 пМ внутреннего

контроля, полученную смесь вносят в загрузочную лунку картриджа, рассчитанного на парноконцевое прочтение по 300 циклов каждый. Далее картридж помещают в генетический анализатор для высокопроизводительного секвенирования и запускают процесс согласно инструкциям на дисплее прибора.

2 Биоинформационный и статистический анализ данных секвенирования нового поколения гена 16S рРНК

2.1 Данные высокопроизводительного секвенирования фрагментов ДНК сохраняют в формате FASTQ. Дальнейший биоинформационный анализ секвенирования осуществляется с помощью операционной системы Linux, проводят удаление последовательностей праймеров и устранение ошибок демультиплексирования с помощью скрипта preprocess16S (<https://github.com/masikol/preprocess16S>).

2.2 Дальнейшие этапы биоинформационного анализа данных проводят с использованием языка программирования R с применением библиотек: dada2, phyloseq и включает следующие этапы:

2.2.1 фильтрация прочтений по качеству и обрезка прочтений;

2.2.2 объединение парных прочтений;

2.2.3 создание таблицы вариантов последовательностей ампликонов (ASV);

2.2.4 удаление химерных последовательностей;

2.2.5 присвоение таксономии на основе базы данных SILVA;

2.2.6 построение объекта phyloseq для дальнейшей статистической обработки и визуализации результатов.

3 Определение индексов разнообразия состава микробиоты и диагностика дисбактериоза (К63)

Количественные изменения в составе микробиоты кишечника

фиксируют в виде снижения показателей индексов разнообразия относительно референсных значений (индекс Шао1, индекс Шеннона, обратный индекс Симпсона). Обратный индекс Симпсона показывает степень выраженности доминирования определенных видов (чем ниже индекс, тем степень доминирования микроорганизма выше).

Референсные значения индексов альфа-разнообразия представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Показатели индексов альфа-разнообразия

Индекс	Индекс Шао1	Индекс Шеннона	Обратный индекс Симпсона
Референсные значения	250 - 120	4,62 - 2,8	52 - 10

Дисбактериоз определяется при снижении показателей индекса Шао1 < 120, индекса Шеннона < 2,8, обратного индекса Симпсона < 10 и в виде повышенного или сниженного относительного количества указанных таксонов на уровне Рода (таблица 6).

Таблица 6 – Относительное количество представителей микробиоты кишечника, связанных с возникновением дисбиоза кишечника

Таксон на уровне Рода	Относительное количество представителя от общего количества, %
<i>Enterococcus spp.</i>	>0,5
<i>Pseudomonas spp.</i>	>0,5
<i>Faecalibacterium spp.</i>	<2%
<i>Escherichia-Shigella spp.</i>	>3%
<i>Citrobacter spp.</i>	>3%
<i>Staphylococcus spp.</i>	>1%
<i>Streptococcus spp.</i>	>3%

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ПРИМЕНЕНИИ МЕТОДА И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Изложены в таблице 7.

Таблица 7 – Перечень осложнений или ошибок, причины и пути их устранения

Ошибки	Причины	Пути устранения
Ложно-положительные результаты	Загрязнение исследуемых образцов инородным биологическим материалом	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.