



## Анализ таксономического разнообразия патогенных и условно-патогенных микроорганизмов при воспалительных

А.В. Горбач, Е.П. Михаленко, Л.И. Кастюкевич, О.Н. Романова

## заболеваниях кишечника у детей.

### Аннотация

В исследовании проведен анализ таксономического разнообразия потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов кишечной микробиоты у 43 пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК). Целью исследования является выявление возможных ассоциаций между представленностью отдельных патогенных и условно-патогенных бактериальных таксонов и особенностями течения заболевания. Результаты исследования могут способствовать лучшему пониманию роли микробиоты в патогенезе ВЗК и открыть перспективы для разработки новых диагностических и терапевтических подходов, основанных на модуляции кишечного микробиома. Таксономический состав микроорганизмов был установлен с помощью метатаксономического секвенирования фрагментов генов 16S рРНК.

### Цель

Целью данного исследования является проведение сравнительного анализа таксономического состава потенциально патогенной и условно-патогенной бактериальной микробиоты кишечника у педиатрических пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, характеризующихся различными клиническими проявлениями.

### Материалы и методы

Для целей настоящего исследования была собрана выборка из 43 пациентов детского возраста от 0 до 18 лет (медиана 8,1 года) с воспалительными заболеваниями кишечника



- 21 пациента, у которых был идентифицирован диагноз воспалительного заболевания кишечника на основании клинических и гистологических данных
- 10 пациенты с клиническими и гистологическими проявлениями неинфицированного колита
- 12 пациенты с клиническими гастроэнтерологическими симптомами и отсутствием признаков патологических изменений при таксономическом исследовании образцов биологического материала

### Диагностические критерии

сбор анамнеза

клинические обследования

лабораторные обследования

эндоскопические и морфологические данные

### Молекулярно-генетический анализ

Выделение ДНК из биопсийного материала  
Использование набора ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corporation, США)

Аmplification V3-V4 региона гена 16S рРНК  
Использование специфических праймеров.  
V3-V4 регион как маркер для определения таксономической принадлежности бактерий

Подготовка библиотек для секвенирования  
Следование протоколу Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (США)

### Биоинформатическая обработка данных секвенирования

Оценка качества библиотек ампликонов

- Использование программы FastQC V.0.11.9
- Проверка качества прочтений нуклеотидных последовательностей

Удаление праймеров и ложных последовательностей

- Применение программы Cutadapt v3.1 (2020 г.)
- Фильтрация и очистка данных секвенирования

Обработка метагеномных данных с помощью пакета DADA2

- Использование языка программирования R
- Получение таблицы операционных таксономических единиц (OTU)

Выравнивание и таксономическая аннотация фрагментов гена 16S рРНК

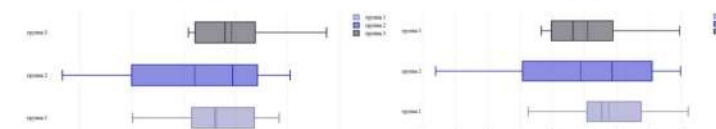
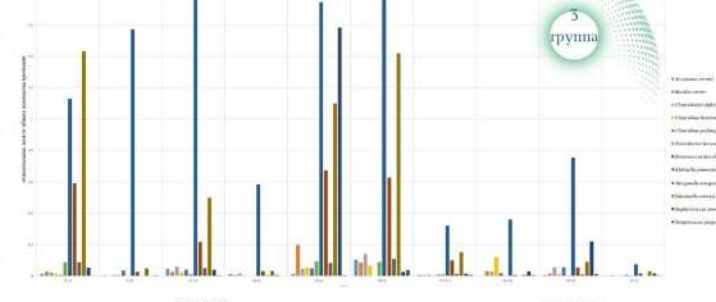
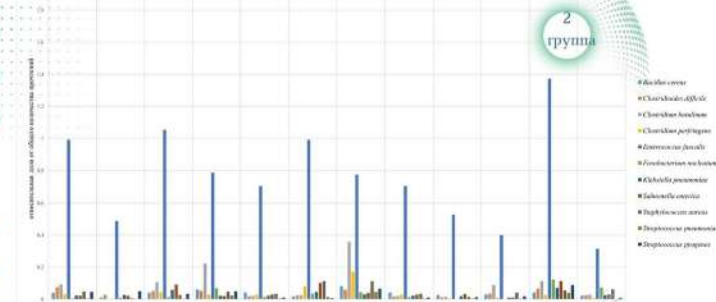
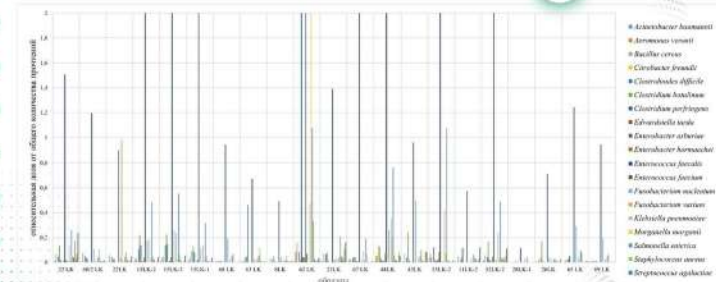
- Использование базы данных Silva SSU NR99 (версия 138)
- Установка доверительного порога 80% для таксономической идентификации

Кластеризация последовательностей в OTU

- Применение программы mothur v.1.45.0
- Кластеризация на расстоянии 0,05

Дополнительный BLAST-анализ для неопределенных таксонов

- Использование базы данных RefSeq nr (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)



Для определения  $\alpha$ -разнообразия потенциально патогенных и потенциально условно-патогенных микроорганизмов в исследуемых образцах использовали индекс Шеннона и индекс Пизелю. В исследовании индексы Шеннона и Пизелю были рассчитаны только для перечня видов потенциально патогенных и условно-патогенных, который был определен для анализа в рамках данного исследования. Наибольшая медиана индекса Шеннона наблюдалась в группе 1, наименьшая - в группе 2. Медианы индекса Пизелю были сопоставимы между группами. Тест Крускала-Уоллиса не выявил статистически значимых различий в медианах индексов Шеннона и Пизелю между исследуемыми группами ( $p > 0,05$ ). Отсутствуют достоверные различия в  $\alpha$ -разнообразии потенциально патогенных и условно-патогенных микроорганизмов между группами пациентов. *Enterococcus faecalis* обнаружен во всех образцах кишечного микробиома трех исследуемых групп, что предполагает его потенциальную роль в развитии воспалительных процессов в кишечнике.