

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРОЯТНОСТИ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор И.О.Стома, к.м.н., доцент Е.Г.Малаева, к.м.н., доцент Е.В.Воропаев, А.А.Ковалев, О.В.Осипкина, А.С.Шафорост, А.А.Зятков, к.м.н., доцент Н.Н.Усова

Гомель 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения вероятности инфекции мочевыводящих путей при циррозе печени, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на медицинскую профилактику инфекций мочевыводящих путей при циррозе печени.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей общей практики, врачей-гастроэнтерологов, врачей-инфекционистов, врачей-бактериологов, врачей-урологов, врачей-нефрологов и иных врачей-специалистов организаций учреждений здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с циррозом печени в стационарных условиях.

1. Показания к применению

– цирроз печени (K74), сопровождающийся симптомами инфекций мочевыводящих путей (одного или нескольких): клинических (повышение температуры, озноб, боли в поясничной области, боли при мочеиспускании, учащенное мочеиспускание) и лабораторных (лейкоцитоз, повышение СОЭ, повышение в крови концентрации С-реактивного белка, прокальцитонина, лейкоцитурия, протеинурия) при отрицательном или сомнительном результате микробиологического исследования мочи.

2. Противопоказания

Противопоказания отсутствуют.

Ограничения к применению метода: заболевания, которые требуют назначения антибактериальных лекарственных препаратов или иммунодепрессантов за 1 месяц до исследования.

3. Перечень необходимых изделий медицинской техники и изделий медицинского назначения:

– холодильник, поддерживающий температуру в диапазоне +2...+8 °С;

- морозильник, поддерживающий температуру минус 70 °С;
- морозильник, поддерживающий температуру в диапазоне минус 18...минус 20 °С;
- ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха;
- центрифуга (максимальное ускорение – не менее 13000g);
- магнитный штатив для пробирок объемом 0,2 мл для очистки продуктов ПЦР;
- штатив для вакуумных пробирок с ЭДТА для взятия крови;
- штатив «рабочее место» для микроцентрифужных пробирок объемом 0,2 мл и 1,5 мл.
- твердотельный термостат, поддерживающий диапазон температур +40...+100 °С;
- термоконтейнер для транспортировки, поддерживающий температуру в диапазоне +2...+8 °С;
- микроцентрифуга-вортекс;
- аспиратор с колбой-ловушкой объемом 1 л;
- комплект пипеточных дозаторов (объемы: 0,5-10 мкл, 10-100 мкл; 100-1000 мкл);
- спектрофотометр для измерения концентрации и определения качества нуклеиновых кислот;
- флуориметр для измерения концентрации двуцепочечной ДНК;
- амплификатор (термоциклер);
- система для электрофоретического разделения и детекции нуклеиновых кислот;
- высокопроизводительный секвенатор, имеющий функцию длины прочтения не менее 250 нуклеотидов;
- сервер с установленным набором программного обеспечения для биоинформатического анализа данных и определения состава микробиоты

(FastQC [1], Preprocess16S [2], Trimmonatic [3], Kraken2 [4] (база PlusPF от 05.06.2024 [5]), ссылки приведены в приложении 2) или аналогичное программное обеспечение для проверки качества прочтений, удаления последовательностей праймеров, фильтрации некачественных прочтений и классификации таксономических последовательностей).

- набор реагентов для экстракции ДНК для высокопроизводительного секвенирования;

- набор магнитных частиц для очистки ДНК;

- деионизированная вода;

- этиловый спирт 80%;

- набор реагентов для измерения концентрации двуцепочечной ДНК,

- ЦР-смесь с высокоточной ДНК-полимеразой;

- праймеры на V3-V4 регион гена 16S рРНК прокариот:

- прямой V3/V4: 5'-последовательность адаптера-cctacgggnggcwgcag'3,

- обратный V3/V4: 5'-последовательность адаптера-gactachvgggtatctaacc'3;

- праймеры на V1-V5 регион гена 16S рРНК прокариот:

- прямой V1-V5: 5'agagtttgatcctggctcag'3,

- обратный V1-V5: 5'ccgtcaattcctttagttt'3;

- натрия гидроксид концентрацией 2 моль/дм³;

- набор индексов, совместимый с используемым высокопроизводительным секвенатором;

- проточная ячейка, совместимая с используемым высокопроизводительным секвенатором;

- картридж, совместимый с используемым высокопроизводительным секвенатором;

- стандартный контрольный образец (фаговый геном PhiX174);

- стерильные флаконы для сбора мочи;

- индивидуальные пакеты с Zip-Lock;
- ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл;
- микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл;
- наконечники с фильтром для автоматических дозаторов объемом 10, 20, 200, 1000 мкл; наконечники без фильтра для автоматического дозатора объемом 200 мкл;
- комплект средств индивидуальной защиты (одноразовые стерильные халаты, латексные перчатки, маски, бахилы, шапочки).

4. Технология осуществления метода

Метод, изложенный в данной инструкции, реализуется в несколько этапов в соответствии с алгоритмом (приложение 1 к настоящей инструкции).

Этапы

4.1 Получение и транспортировка биологического материала

В качестве биологического материала используют свежевыпущенную мочу. Получение биоматериала проводят утром в стерильные флаконы для сбора мочи. Транспортировку образцов мочи в лабораторию осуществляют в течение 1-2 часов после взятия биоматериала в термоконтейнере для транспортировки с температурным режимом $+2...+8$ °С. Хранение образцов мочи осуществляют при температуре не выше минус 70 °С.

4.2 Пробоподготовка образцов мочи для проведения высокопроизводительного секвенирования:

4.2.1 Экстракция ДНК

Проводят с использованием коммерческих наборов, адаптированных для высокопроизводительного секвенирования. Определение качественных и количественных характеристик ДНК в полученных после экстракции образцов кала проводят с использованием спектрофотометра.

Для дальнейшего анализа используют образцы ДНК, для которых соотношение экстинкций $A_{260}/A_{280} \geq 1,67$ и $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$.

4.2.2 Проведение целевой ПЦР

Состав ПЦР-смеси и программа амплификации для проведения целевой ПЦР приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Состав ПЦР-смеси и программа амплификации для проведения целевой ПЦР

Состав реакционной смеси (на 1 реакцию с итоговым объемом 25 мкл)	Программа целевой ПЦР	
2,5х ПЦР-смесь с высокоточной ДНК-полимеразой – 10 мкл	+98 °C – 30 с*	1 цикл
Прямой праймер V3-V4 (1 пМ/мкл) – 5 мкл	+98 °C – 5 с*	25
Обратный праймер V3-V4 (1 пМ/мкл) – 5 мкл	+55 °C – 30 с	циклов
Образец ДНК – 5 мкл	+72 °C – 30 с	
	+72 °C – 300 с	1 цикл

*Примечание: температура и продолжительность этапа зависит от используемой ДНК-полимеразы и приведена в инструкции производителя.

В результате проведения целевой ПЦР получают амплифицированные фрагменты региона V3-V4 гена 16S рРНК прокариот (далее – ампликоны V3-V4.).

4.2.3 Оценка результатов целевой ПЦР

Проводят электрофоретическое разделение и детекцию ампликонов V3-V4. При визуализации фрагмента ампликонов V3-V4 соответствующего размера проводят очистку с использованием магнитных частиц (см. этап 4.2.5), если фрагмент соответствующего размера в ампликонах V3-V4 отсутствует, проводят этап обогащения образцов (см. этап 4.2.4).

4.2.4 Обогащение образцов ДНК с последующей целевой ПЦР

Обогащение образцов ДНК проводят с использованием праймеров

V1-V5 гена 16S рРНК прокариот, состав ПЦР-смеси и программа амплификации приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Состав реакционной смеси и программа амплификации, используемые для обогащения образцов

Состав реакционной смеси (на 1 реакцию с итоговым объемом 25 мкл)	Программа ПЦР	
2,5х ПЦР-смесь с высокоточной ДНК-полимеразой – 10 мкл	+98 °C – 30 с*	1 цикл
V1-V5-прямой – 0,2 мкл (50 пМ/мкл)	+98 °C – 5 с*	15 циклов
V1-V5-обратный – 0,2 мкл (50 пМ/мкл)	+55 °C – 20 с	
Вода – 9,6 мкл	+72 °C – 50 с	
Образец ДНК – 5 мкл	+72°C – 120 с	1 цикл

*Примечание: температура и продолжительность этапа зависит от используемой ДНК-полимеразы и приведена в инструкции производителя.

В результате проведения ПЦР-обогащения получают амплифицированные фрагменты региона V1-V5 гена 16S рРНК (далее – ампликоны V1-V5).

Далее проводят целевую ПЦР для ампликонов V1-V5, состав реакционной смеси и программа амплификации приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Состав ПЦР-смеси и программа амплификации для проведения целевой ПЦР

Состав реакционной смеси (на 1 реакцию с итоговым объемом 25 мкл)	Программа целевой ПЦР	
2,5х ПЦР-смесь с высокоточной ДНК-полимеразой – 10 мкл	+98 °C – 30 с*	1 цикл
Прямой праймер V3-V4 (1 пМ/мкл) – 5 мкл	+98 °C – 5 с*	20 циклов
Обратный праймер V3-V4 (1 пМ/мкл) – 5 мкл	+55 °C – 30 с	
Вода – 4,9 мкл	+72 °C – 30 с	
Ампликоны V1-V5 – 0,1 мкл	+72 °C – 300 с	1 цикл

*Примечание: температура и продолжительность этапа зависит от используемой ДНК-полимеразы и приведена в инструкции производителя.

В результате проведения целевой ПЦР получают ампликоны V3-V4.

Оценку результатов целевой ПЦР осуществляют, как описано в этапе 4.2.3., при отсутствии фрагмента ампликонов V3-V4 после обогащения, данные образцы исключаются из протокола пробоподготовки образцов мочи для проведения высокопроизводительного секвенирования.

Для ампликонов V3-V4 после обогащения с выявленным фрагментом проводят очистку с использованием магнитных частиц (см. этап 4.2.5).

4.2.5 Очистка и нормализация концентрации ампликонов V3-V4

Для очистки к 20 мкл ампликона V3-V4 добавляют 16 мкл смеси магнитных частиц, пипетируют (не менее 10 раз) до образования гомогенной смеси. Инкубируют 5 мин. при температуре +18...+25 °С. ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с полученной смесью помещают на магнитный штатив и инкубируют 2 мин. при температуре +18...+25 °С. На протяжении всех последующих этапов промывки ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл остаются в магнитном штативе.

Удаляют супернатант, добавляют 200 мкл свежеприготовленного 80% этилового спирта, инкубируют 30 с при температуре +18...+25 °С. Затем удаляют спирт и повторно вносят 200 мкл свежеприготовленного 80% этилового спирта, инкубируют 30 с, а затем проводят полное удаление остатков спирта.

Выдерживают ПЦР-пробирки с открытой крышкой на обычном штативе при температуре +18...+25 °С в течение 10 мин. Элюцию проводят путем добавления 52,5 мкл деионизированной воды в ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с последующим пипетированием до полного растворения осадка магнитных частиц. Далее ПЦР-пробирки инкубируют 2 мин. при температуре +18...+25 °С и устанавливают на магнитный штатив, инкубируют 2 мин., после чего супернатант, содержащий

очищенные ампликоны V3-V4, переносят в новые ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл.

Проводят измерение концентрации ДНК на флуориметре с использованием коммерческого набора для измерения концентрации двуцепочечной ДНК.

Выполняют разведение очищенных ампликонов V3-V4 деионизированной водой до концентрации 5 нг/мкл.

4.2.6 Индексная ПЦР

В таблице 4 приведен состав смеси и условия амплификации для проведения индексной ПЦР.

Таблица 4 – Состав ПЦР-смеси и программа амплификации для проведения индексной ПЦР

Состав реакционной смеси (на 1 реакцию с итоговым объемом 50 мкл)	Программа индексной ПЦР
2,5х ПЦР-смесь с высокоточной ДНК-полимеразой – 20 мкл	+98 °C – 30 с* 1 цикл
Индекс-праймер 1 – 5 мкл	+98 °C – 5 с* 10
Индекс-праймер 2 – 5 мкл	+55 °C – 30 с циклов
Вода – 10 мкл	+72 °C – 30 с
Очищенный ампликон V3-V4 – 10 мкл	+72 °C – 300 с 1 цикл

*Примечание: температура и продолжительность этапа зависит от используемой ДНК-полимеразы и приведена в инструкции производителя.

В результате проведения индексной ПЦР получают ампликоны V3-V4 с индексами.

4.2.7 Очистка ампликонов V3-V4 с индексами

К 50 мкл ампликонов V3-V4 с индексами добавляют 56 мкл смеси магнитных частиц, пипетируют (не менее 10 раз) до образования гомогенной смеси. Инкубируют 5 мин. при температуре +18...+25 °C.

ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с полученной смесью помещают на магнитный штатив и инкубируют 2 мин. при температуре +18...+25 °С. На протяжении всех последующих этапов промывки ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл остаются в магнитном штативе.

Удаляют супернатант, добавляют 200 мкл свежеприготовленного 80% этилового спирта, инкубируют 30 с при температуре +18...+25 °С. Затем удаляют спирт и повторно вносят 200 мкл свежеприготовленного 80% этилового спирта, инкубируют 30 с, а затем проводят полное удаление остатков спирта.

Выдерживают ПЦР-пробирки с открытой крышкой на обычном штативе при температуре +18...+25 °С в течение 10 мин. Элюцию проводят путем добавления 27,5 мкл деионизированной воды в ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл с последующим пипетированием до полного растворения осадка магнитных частиц. Далее ПЦР-пробирки инкубируют 2 мин. при температуре +18...+25 °С и устанавливают на 2 мин. на магнитный штатив, после чего супернатант, содержащий очищенные ампликоны V3-V4 с индексами, и переносят в новые ПЦР-пробирки объемом 0,2 мл.

4.2.8 Оценка результатов проведения индексной ПЦР

Проводят электрофоретическое разделение и детекцию очищенных ампликонов V3-V4 с индексами, затем измеряют их концентрацию на флуориметре с использованием коммерческих наборов для измерения концентрации двуцепочечной ДНК.

4.3 Настройка высокопроизводительного секвенатора

Нормализация очищенных ампликонов V3-V4 с индексами, приготовление образца для секвенирования и настройка высокопроизводительного секвенатора производится согласно

руководству к прибору для секвенирования фрагмента гена 16S рРНК прокариот.

4.4 Биоинформатический анализ

Для проведения биоинформатического анализа и определения состава микробиоты используют сервер с установленным программным обеспечением: FastQC, Preprocess16S, Trimmomatic, Kraken2 (приложение 2).

4.5 Проведение расчета

Расчет модифицированного коэффициента дисбиоза MDR (modified dysbiosis ratio) (индекс соотношения основных микроорганизмов мочи) проводят после определения состава микробиоты методом высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа.

После проведения биоинформационного анализа рассчитывают модифицированный коэффициент дисбиоза (MDR) по формуле 1:

$$\text{MDR} = \frac{\text{Gammaproteobacteria} (\%) + \text{Bacilli} (\%)}{\text{Prevotella} (\%) + \text{Clostridioides} (\%) + \text{Bacteroidota} (\%)}, (1)$$

где *Gammaproteobacteria* (%) – относительная представленность бактерий класса *Gammaproteobacteria*;

Bacilli(%) – относительная представленность бактерий класса *Bacilli*;

Prevotella (%) – относительная представленность бактерий рода *Prevotella*;

Clostridioides (%) – относительная представленность бактерий рода *Clostridioides*;

Bacteroidota (%) – относительная представленность бактерий рода *Bacteroidota*.

4.6 Определение вероятности развития инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) при циррозе печени

Определение вероятности развития инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) при циррозе печени проводят по значению модифицированного коэффициента дисбиоза (таблица 5).

Таблица 5 – Оценка вероятности развития ИМВП на основании значения MDR

Вероятность ИМВП	Значение MDR
высокая	$>23,5$
низкая	$\leq 23,5$

4.7 Принятие управленческого решения

При высокой вероятности ИМВП ($MDR > 23,5$) осуществляются мероприятия в соответствии с заболеванием «Инфекция мочевыводящих путей не установленной локализации (N39.0)» Клинического протокола диагностики и лечения пациентов (взрослое население) с урологическими заболеваниями при оказании медицинской помощи в амбулаторных и стационарных условиях районных, областных и республиканских организаций здравоохранения Республики Беларусь, утвержденного приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 22.09.2011 № 920.

При низкой вероятности ИМВП ($MDR \leq 23,5$) через 3 месяца осуществляется повторное исследование для определения вероятности развития инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) при циррозе печени в соответствии с пунктами 4.1–4.6 настоящей инструкции.

6. Перечень возможных осложнений или ошибок.

При точном соблюдении инструкции ошибки маловероятны.

**Приложение 1 Алгоритм определения вероятности развития
инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) при циррозе печени**



Приложение 2

(справочное)

**Адреса репозиторий программного обеспечения для выполнения
биоинформатического анализа данных высокопроизводительного
секвенирования образцов мочи
для определения коэффициента дисбиоза (MDR)**

1. Andrews, S. FastQC. GitHub (quality control analysis tool for high throughput sequencing data) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://github.com/s-andrews/FastQC>.
2. Sikolenko, M. Preprocess16S. GitHub (Preprocessing for 16S rDNA Illumina reads) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://github.com/masikol/preprocess16S>.
3. Flutre, T. Trimmomatic. GitHub (Read trimming tool for Illumina NGS data) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://github.com/timflutre/trimmomatic>.
4. Wood, D. Kraken2. GitHub (taxonomic sequence classification system) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://github.com/DerrickWood/kraken2>.
5. Langmead, B. Kraken 2, KrakenUniq and Bracken indexes. BenLangmead [Электронный ресурс] / benlangmead.github.io. – Режим доступа: <https://benlangmead.github.io/aws-indexes/k2>.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНСТРУКЦИИ ПО ПРИМЕНЕНИЮ «МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ»

Изучение микробиома и микробиоты человека является актуальной в связи с открытием новых перспектив исследования патогенетических механизмов развития заболеваний и патологических функциональных состояний, а также возможностей их коррекции. Термины «микробиом» и «микробиота» становятся частью лексики практического врача [1].

Взаимодействие микробиоты и организма человека осуществляется на принципах мутуализма. При этой форме симбиоза пользу извлекает как человек, так и его микробиота [2]. С помощью микроорганизмов человек способен выполнять функции, которые не кодируются собственным геномом, такие как защита от инвазивных патогенов, извлечение дополнительной энергии из пищи, синтез ключевых молекул для развития собственных клеток и тканей [3].

Значение микробиоты в развитии патологических состояний многих органов и систем стало очевидным после открытия осей взаимосвязи «микробиота кишечника – головной мозг», «микробиота кишечника – печень», «микробиота кишечника – дыхательная система», «микробиота кишечника – урогенитальный тракт», что сделало кишечник основным органом, отвечающим за здоровье человека [3, 4].

Новые данные показывают, что микроорганизмы, населяющие мочевыводящие пути, которые долгое время считались стерильными у здоровых людей, могут играть определенную роль в поддержании здоровья мочевыводящих путей. Исследования микробиоты мочи выявили значительные различия между здоровыми популяциями и людьми с

урологическими заболеваниями [5]. Мочевыводящие пути являются местом обитания уникальной микробиоты [6,7].

Новые технологии обнаружения микроорганизмов позволили выявить другие виды бактерий в составе микробиоты мочевыводящих путей. Чаще всего обнаруживают представителей рода *Lactobacillus* и, в меньшей степени, *Gardnerella*, *Streptococcus* и *Corynebacterium*. Также выявлены различные сообщества грибов.

Микробиота играет важную роль в инициации и прогрессировании некоторых заболеваний печени и не вызывает сомнения связь кишечной микробиоты с заболеваниями печени – неалкогольной жировой болезнью печени, неалкогольным стеатогепатитом, алкогольным поражением печени, аутоиммунным гепатитом. Во многих исследованиях доказана роль кишечной микробиоты в прогрессировании лекарственно-индуцированных поражений печени, аутоиммунного гепатита, осложнений цирроза печени, в первую очередь печеночной энцефалопатии [8].

Таким образом, изучение микробиоты, установление ассоциативных взаимосвязей между микроорганизмами, факторов, влияющих на видовой и количественный состав, позволит повысить качество терапии инфекционных и соматических заболеваний, а также поспособствует разработке новых фармакологических препаратов для профилактики, лечения, сокращения времени лечения социально-значимых заболеваний.

Список использованных источников

1. Brubaker, L. The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders / L. Brubaker, A.J. Wolfe // Ann. Transl. Med. – 2017. – Vol. 5, № 2. – P. 34–40.

2. Ситкин, С.И. Метаболический дисбиоз кишечника и его биомаркеры / С.И. Ситкин, Е.И. Ткаченко, Т.Я. Вахитов // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – 124 (12) – С. 6–29.
3. Стома, И.О. Микробиом в медицине: руководство для врачей // И.О. Стома. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2020. – 320 с.
4. Berg, G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges / G. Berg, et al. // Microbiom. – 2020. – Vol. 8 (103). – P. 1–22. doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0.
5. Whiteside SA et al. The microbiome of the urinary tract--a role beyond infection / SA Whiteside et al. // Nat Rev Urol. – 2015. – Feb;12(2). – P. 81-90. doi: 10.1038/nrurol.2014.361. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25600098.
6. Hilt EE et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder / EE Hilt et al. // J Clin Microbiol. – 2014. – Mar;52(3). – P. 871-6. doi: 10.1128/JCM.02876-13. Epub 2013 Dec 26. PMID: 24371246; PMCID: PMC3957746.
7. Pearce MM et al. The female urinary microbiome: a comparison of women with and without urgency urinary incontinence / MM Pearce et al. // mBio. – 2014. – Jul 8;5(4). – P. e01283-14. doi: 10.1128/mBio.01283-14. PMID: 25006228; PMCID: PMC4161260.
8. Philips, C.A., et al. Modulating the intestinal microbiota: therapeutic opportunities in liver disease / C.A. Philips, et al. // J. Clin. Transl. Hepatol. – 2020. – Vol. 8(1). – P. 87–99. doi: 10.14218/JCTH.2019.00035.