

Метагеном крови в норме и при псориазе. Дополнения.

 **Короткий Николай Гаврилович**¹,  **Песляк Михаил Юрьевич**².

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, РФ, kng40@mail.ru

² Антипсориазная Ассоциация «Естественный путь», Москва, РФ, mikp2000@gmail.com

Разрешается использовать неизмененные материалы дополнений для некоммерческих целей с указанием авторов, названия и DOI. Распространяется бесплатно.

Лицензия Creative Commons [CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

S1. Сравнительные характеристики 16S и WMS-тестов

	Характеристики	16S	WMS	Источники
	Основные			
1	Возможность выявлять любые, в т.ч. и некультивируемые виды.	Да	Да	
2	Определение ДНК от живых и мертвых (частично деградированных, в т.ч. деградированную ДНК) организмов. Определить отдельно невозможно.	Да	Да	
3	Обнаружение небактериальной ДНК (эукариотов, архей, вирусов, фагов, грибов, растений, простейших и т.д.).	Нет	Да	Jovel 2016 , Meisel 2016 , Ranjan 2016
4	Уровень качественной классификации таксонов. 16S-тест для ~42% родов определение с точностью до вида не может дать в принципе, поскольку межвидовое совпадение последовательности ампликонов более 97%. Только WMS-тест дает возможность идентификации bacDNA с точностью до вида (штамма) (Jovel 2016).	Тип (phyla) +++ Род (genus) ++ Вид (species) - + Штамм -	Тип (phyla) +++ Род (genus) +++ Вид (species) +++ Штамм +-	Frey 2015 , Meisel 2016 , Ranjan 2016 , Тяхт 2014
5	Определяется представленность типов, родов, видов. Чтобы по представленностям определить концентрации выполняется один дополнительный тест исходного биоматериала. Чаще всего применяются qPCR (Glassing 2016 , Païssé 2016) и dPCR (Bhat 2016 , Tan 2015) для определения суммарной bacDNA по одному из универсальных участков 16S rRNA (Nakatsuji 2013). Также применяется метод «внутреннего стандарта» - добавления в биоматериал - конкретного количества (около 1% от суммарной ожидаемой величины) ДНК характерной бактерии. Такой бактерии, bacDNA которой заведомо не может присутствовать в этом биоматериале (Tan 2015). Перед секвенированием всегда определяется концентрация всей ДНК. Этого может быть достаточно для определения концентраций по результатам WMS-теста.	Да	Да	Bhat 2016 , Glassing 2016 , Grumaz 2016 , Païssé 2016 , Tan 2015
6	Покрывание генома. Для WMS-теста возможно даже для ДНК с малой представленностью (зависит от глубины покрытия).	Один или несколько участков в 16S rRNA	Равномерное покрытие всего генома.	Ranjan 2016
7	Идентификация конкретных генов. Благодаря этому результаты WMS-теста могут быть интерпретированы с точностью до штаммов по маркерным уникальным генам (Jovel 2016).	Нет	Да	Ferretti 2017 , Ranjan 2016
8	Идентификация генов резистентности к антибиотикам (резистом).	Нет	Да	Frey 2015
9	Идентификация генов вирулентности (патогенности).	Нет	Да	Meisel 2016
10	Функциональная классификация обнаруженных видов, открытие новых генов.	Нет	Да	Jovel 2016
11	Информация для выбора лекарственных препаратов.	+	++	Frey 2015

	Характеристики	16S	WMS	Источники
	Дополнительные характеристики и недостатки			
12	Количество родов (видов) бактерий, для которых определена (полностью или частично) последовательность 16S rRNA (для 16S-теста) или геномов штаммов (для WMS-теста). Данные на 14.02.2019.	~ 3 360 000 (RDP , r11); ~ 6 800 000 (SILVA , r132)	~ 186 000 (в т.ч. ~13 500 полных) Genome	
13	Количество видов бактерий (для 16S с неточной классификацией), которые были обнаружены в одном биоматериале (фекалии) путем увеличения размера библиотек (до $3,2 \cdot 10^7$).	2050	4100	Ranjan 2016
14	Разнообразие микробиома, обнаруженного в одном биоматериале по трем различным метрикам.	Ниже	Выше	Ranjan 2016
15	Чувствительность методов ограничена возможной контаминацией. Необходимы контрольные образцы NTC для оценки уровня контаминации. А также постоянное принятие мер по снижению этого уровня (раздел 5.7).	Да	Да	Glassing 2016
	WMS-тест vs 16S-тест.			
16	Когда патоген неизвестен, когда требуется больше, чем идентификация (определение штамма, оценка патогенной нагрузки, резистентности к антибиотикам). При микст-инфекциях (например, при микст-сепсисе) 16S-тест часто дает ошибки, имеет слабую повторяемость.	Нет	Да	Frey 2015
17	Возможность обнаружить ДНК любого вида, а не только такого, который входит в заранее определенный перечень. Лучшие 16S тесты диагностики сепсиса SepsiTest (более 345 видов бактерий и грибов) и IRIDICA (более 1000 патогенов, в 2017 снят с производства) не в состоянии определить присутствие патогена не из своего перечня.	Нет	Да	Frey 2015 , Stevenson 2016
18	Идентификация геномов новых, ранее не обнаруженных видов.	Нет	Да	Frey 2015 , Jovel 2016
19	16S-тест. Недостаток. Число копий 16S в геноме меняется в широком диапазоне (в зависимости от вида и даже штамма). Это влечет гарантированные погрешности при определении представленности таксонов. Представленность таксонов с большим числом копий 16S в геноме будет завышена, с меньшим - занижена.	Да		Vetrovsky 2013 , Тяхт 2014
20	16S-тест. Недостаток. Выбор праймеров для разных переменных участков (от V1 до V9) для проведения амплификации приводит к существенно различным результатам, не только из-за их различных характеристик при амплификации (аффинитет), но из-за влияния на классификацию по таксонам.	Да		Jovel 2016 , Meisel 2016
21	16S-тест. Недостаток. Мутации в переменных участках 16S rRNA (от V1 до V9) могут помешать правильной классификации по таксонам.	Да		

	Характеристики	16S	WMS	Источники
22	WMS-тест. Недостаток. Необходимость максимальной элиминации хозяйской ДНК (hDNA) из биоматериала до секвенирования (биохимическими методами) и после секвенирования (алгоритмическими методами).		Да	Ferretti 2017 , Frey 2015
	Стоимостные и технические характеристики			
23	Стоимость из расчета на один образец. Зависит от постановки задачи, числа образцов в библиотеке, мощности секвенатора и режима его работы, протокола обработки результатов секвенирования.	47-60\$	120-290 \$	Ranjan 2016 , Genohub , Allseq
24	WMS-тест. Стоимость в будущем может снизиться до суммы менее чем 1\$ на один бактериальный геном (2014). Это уже произошло (см. выше). Стоимость может быть снижена за счет пробоподготовки образца, либо путем обогащения представленности патогенов и/или элиминации хозяйской ДНК.		Да	Applications 2015 , Frey 2015
25	Время выполнения (зависит от оборудования и постановки задачи)	2-5 ч	7-60 ч	Frey 2015
26	Требования к соблюдению температурного режима при транспортировке и пробоподготовке.	Менее высокие	Более высокие	Frey 2015
27	Отработанные конвейеры (pipeline) выполнения тестов. Срок активного применения. Однако для 16S-теста нет (и не может быть) схем удовлетворительных для классификации с точностью до вида (Jovel 2016).	Много. Более 30 лет.	Мало. Около 10 лет.	Sharpton 2014 , Ranjan 2016 , Nayfach 2016 , Vincent 2017 , Aransay 2016 (глава 12)
28	Число публикаций "16S + metagenomic" vs "shotgun + metagenomic" (по данным https://scholar.google.ru)	50800	24300	14.02.2019

S2. Ресурсы по метагеномным исследованиям и секвенированию

Наименование	Описание. Примечания
HMP (Human Microbiome Project)	Вся информация о микроорганизмах, живущих на и в человеческом теле (проект основан в 2008), содержит информацию о более чем 3000 геномах.
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (более 4000 геномов)
MetaHIT	Кишечный микробиом. Проект завершен в 2012 г.
Integrated gene catalog (IGC)	Каталог генов кишечного микробиома
NCBI Reference Sequence (RefSeq) Database	NCBI. Референсная БД геномов. Статистика.
NCBI.Genbank	NCBI. БД геномов. ~ 186000 геномов прокариотов, в т.ч. ~ 13500 полных.
NCBI Microbial Genomes Resources	NCBI. БД геномов бактерий. Таксономическое дерево.
NCBI. Sequence Read Archive	NCBI. БД метагеномных проектов.
Genomes OnLine Database	БД геномов.
MG-RAST	БД метагеномных проектов.
Allseq. The Sequencing Marketplace.	Информация о секвенаторах.
Genohub	Информационный ресурс по методам секвенирования и выбору провайдера. Поиск провайдера.
Science Exchange	Информационный ресурс по методам секвенирования и выбору провайдера. Поиск провайдера.
Omictools	Поиск программного обеспечения для обработки результатов биологических исследований (в т.ч. метагеномных)
Center for Genomic Epidemiology	Ресурс для врачей-инфекционистов
The European Bioinformatics Institute. Metagenomics.	БД метагеномных проектов.

S3. YN-модель патогенеза псориаза. Частичное описание.

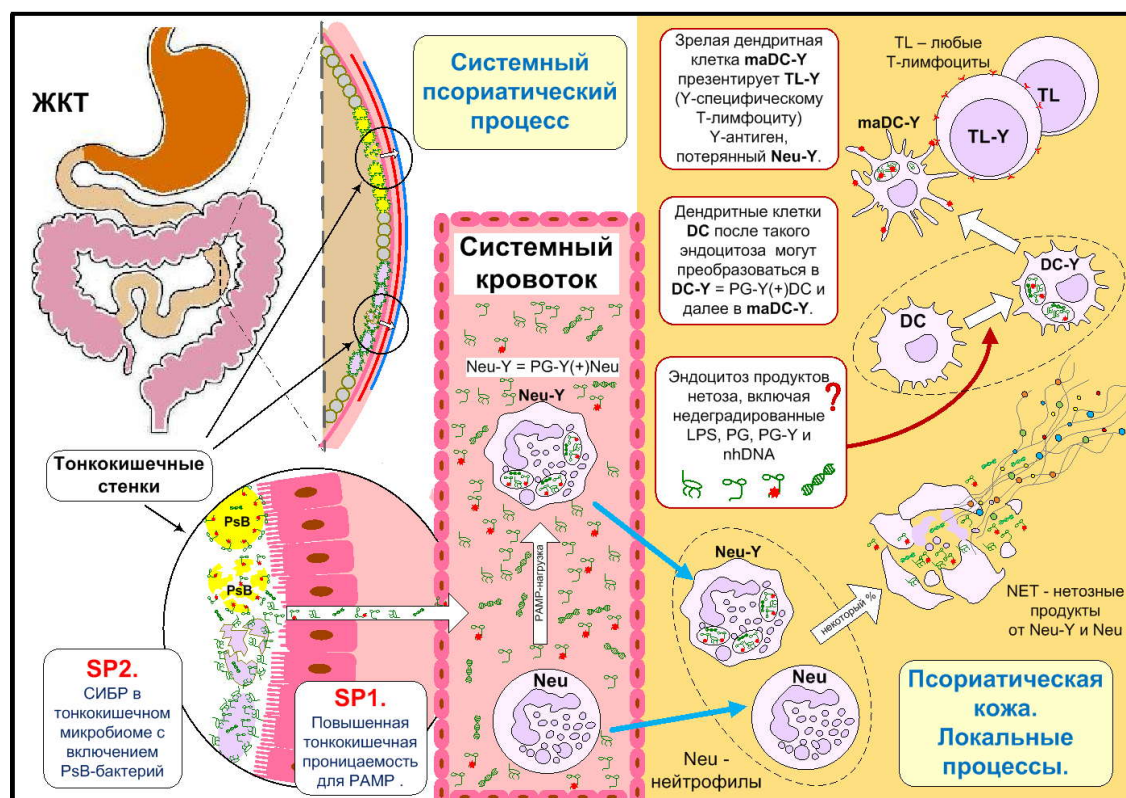


Рис. S1. YN-модель патогенеза псориаза. (Песляк & Короткий 2019, раздел 5.2).

IB-Y	Межпептидные мостики пептидогликана <i>Str.pyogenes</i> : (L-Ala)-(L-Ala) или (L-Ser)-(L-Ala).
PG-Y	Пептидогликан A3alpha, содержащий межпептидные мостики IB-Y (но может содержать и другие также).
PsB	Виды бактерий предполагаемые псоразгенными (с пептидогликаном PG-Y)
Y-антиген	Часть(и) межпептидного мостика IB-Y
СИБР	Синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке. Превышение суммарной концентрации бактерий над нормой и/или присутствие патогенов.
Системный псориазный процесс	<p>SP1. Повышенная тонкокишечная проницаемость для PAMP (в т.ч. LPS, PG, bacDNA). SP2. СИБР в тонкокишечном микробиоме с включением PsB-бактерий.</p> <p>SP1 и SP2 приводят к хронически повышенным</p> <ul style="list-style-type: none"> - концентрациям PAMP (в т.ч. PG-Y) в кровотоке; - PAMP- и (PG-Y)-нагрузке на нейтрофилы крови; <p>В результате многие нейтрофилы крови</p> <ul style="list-style-type: none"> - становятся PAMP- и (PG-Y)-носителями; - переходят в преднетозное состояние; - претерпевают нетоз.
Локальные процессы	<p>В здоровой коже нейтрофилы практически отсутствуют. Они привлекаются из кровотока на самой ранней стадии возникновения псориазного пятна (еще до видимых изменений кожи). Их интенсивное привлечение продолжается пока пятно есть. В стабильном или растущем пятне из-за провоспалительного окружения нейтрофилы оканчивают свое существование преимущественно нетозом (а при ремиссии пятна – апоптозом).</p> <p>В нетозных продуктах оказываются недеградированные PAMP (в т.ч. PG-Y), принесенные из кровотока. Они эндоцитируются фагоцитами кожи и, в частности, дендритными клетками. Дендритные клетки процессируют PG-Y и презентуют Y-антиген (содержащийся в PG-Y) эффекторным T-лимфоцитам. Другие PAMP выступают адъювантами. Формируется ложный приобретенный ответ кожной иммунной системы на мнимую PsB-инфекцию. Псориазные пятна возникают и растут пока имеет место системный псориазный процесс, т.е. пока привлекаемые из кровотока нейтрофилы в избытке содержат PAMP и PG-Y.</p>

Литература к дополнениям

- Applications of Clinical Microbial Next-Generation Sequencing. Report on an American Academy of Microbiology Colloquium held in Washington, DC, in April 2015. p.56. [link](#).
- Aransay AM, Trueba JLL. Field Guidelines for Genetic Experimental Designs in High-Throughput Sequencing. Springer International Publishing Switzerland, 2016, 399 p. ISBN: 978-3-319-31350-4.
- Bhat S, Emslie KR. Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials. *Biomol Detect Quantif*. 2016 May 3;10:47-49. [27990349](#).
- Ferretti P, Farina S, Cristofolini M. et al. Experimental metagenomics and ribosomal profiling of the human skin microbiome. *Exp Dermatol*. 2017 Mar; 26(3):211-219. [27623553](#).
- Frey KG, Bishop-Lilly KA. Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection and Identification. Chapter 15 in *Methods in Microbiology*. Volume 42, 2015, 525–554. ISSN 0580-9517. [link](#).
- Glassing A, Dowd SE, Galandiuk S, Davis B, Chiodini RJ. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathog*. 2016 May 26;8:24. [27239228](#).
- Grumaz S, Stevens P, Grumaz C. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med*. 2016 Jul 1;8(1):73. [27368373](#).
- Jovel J, Patterson J, Wang W. et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol*. 2016 Apr 20;7:459. [27148170](#).
- Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS. et al. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. *J Invest Dermatol*. 2016 May;136(5):947-56. [26829039](#).
- Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB. The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. *Nat Commun*. 2013;4:1431. [23385576](#).
- Nayfach S, Pollard KS. Toward Accurate and Quantitative Comparative Metagenomics. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1103-1116. [27565341](#).
- Païssé S, Valle C, Servant F. et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion*. 2016 May;56(5):1138-47. [26865079](#).
- Ranjan R, Rani A, Metwally A. et al. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 22;469(4):967-77. [26718401](#).
- Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci*. 2014 Jun 16;5:209. [24982662](#).
- Stevenson M, Pandor A, Martyn-St James M, et al. Sepsis: the LightCycler SeptiFast Test MGRADE®, SepsiTTM and IRIDICA BAC BSI assay for rapidly identifying bloodstream bacteria and fungi - a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2016 Jun;20(46):1-246. [27355222](#).
- Tan B, Ng C, Nshimiyimana JP. et al. Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Front Microbiol*. 2015 Sep 25;6:1027. [26441948](#).
- Vetrovsky T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One*. 2013;8(2):e57923. [23460914](#).
- Vincent AT, Derome N, Boyle B. et al. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods*. 2017 Jul;138:60-71. [26995332](#).
- Песляк М.Ю., Короткий Н.Г. «Метагеномы крови и псориатической кожи. Проект исследования.», изд. г2.2, Москва, Антипсориазная Ассоциация «Естественный путь», 2019, 73 с. ISBN 9785905504051, DOI: [10.5281/zenodo.1415418](#).
- Тяхт А.В. Функциональный анализ метагенома кишечника человека. дис. кнм, Москва, 2014, 131 с. [link](#).