

## ВЫБОР МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ 16S NGS И ПЦР-РВ

О. А. Злобовская<sup>1</sup> ✉, А. С. Курносов<sup>1</sup>, А. Ф. Шептулина<sup>2</sup>, Е. В. Глазунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

В последнее время наблюдается значительная коммерциализация услуг по количественной оценке микробиоты кишечника с целью диагностики дисбиоза — нарушения микробного баланса. В условиях растущего интереса к персонализированным подходам в медицине и профилактической терапии диагностика дисбиоза приобретает все большее значение. Результаты подобного скрининга используют для рекомендаций по коррективке питания, изменению образа жизни или, при необходимости, назначения медикаментозного лечения. Для подобной оценки необходим надежный и точный метод оценки микробиоты, поскольку от качества полученных данных зависит корректность последующих рекомендаций и терапевтических вмешательств. В статье рассмотрены основные аспекты двух подходов, применяемых для количественной оценки микробиоты, — высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК (16S NGS) и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), а также представлены их сильные, на наш взгляд, и слабые стороны.

**Ключевые слова:** 16S NGS, ПЦР-РВ, метагеномный анализ, количественный анализ, микробиом, персонализированная медицина

**Вклад авторов:** О. А. Злобовская — идея, анализ литературы, написание рукописи; А. С. Курносов, А. Ф. Шептулина, Е. В. Глазунова — редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Анатольевна Злобовская  
ул. Погодинская, д. 10, с. 1, г. Москва, 119121, Россия; OZlobovskaya@cspfmba.ru

**Статья получена:** 15.10.2024 **Статья принята к печати:** 25.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.10.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.047

## METHOD FOR QUANTITATIVE ASSESMENT OF GUT MICROBIOTA: A COMPARATIVE ANALYSIS OF 16S NGS AND qPCR

Zlobovskaya OA<sup>1</sup> ✉, Kurnosov AS<sup>1</sup>, Sheptulina AF<sup>2</sup>, Glazunova EV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

<sup>2</sup> National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

Recently, considerable commercialization of services for quantification of gut microbiota aimed to diagnose dysbiosis, the microbial imbalance, is observed. In the context of growing interest to the personalized approaches in medicine and preventive therapy, the diagnosis of dysbiosis is becoming increasingly important. The results of such screening are used to adjust guidelines on correction of the diet, lifestyle modification, or, where necessary, drug therapy prescription. Such assessment requires a reliable and accurate method for evaluation of microbiota, since validity of further recommendations and therapeutic interventions depends on the quality of the data obtained. The paper reports the main aspects of the two approaches used for microbiota quantification: 16S rRNA next-generation sequencing (16S NGS) and real-time PCR (qPCR). The strengths (from our perspective) and weaknesses of the approaches are also provided.

**Keywords:** 16S NGS, real-time PCR, metagenomic analysis, quantitative analysis, microbiome, personalized medicine

**Author contribution:** Zlobovskaya OA — concept, literature review, manuscript writing; Kurnosov AS, Sheptulina AF, Glazunova EV — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga A. Zlobovskaya  
Pogodinskaya, 10, str. 1, Moscow, 119121, Russia; OZlobovskaya@cspfmba.ru

**Received:** 15.10.2024 **Accepted:** 25.10.2024 **Published online:** 30.10.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.047

### 16S NGS: широкие возможности и значительные ограничения

Метод 16S NGS стал важным инструментом для изучения микробиоты благодаря возможности параллельного секвенирования множества образцов и выявления широкого спектра микроорганизмов. Он позволяет проводить комплексную оценку таксономического состава микробного сообщества и его разнообразия, что делает этот метод незаменимым для фундаментальных исследований. Однако, несмотря на потенциал, этот метод имеет ряд следующих серьезных ограничений, которые приводят к искажению результатов количественной оценки.

*Неравномерная амплификация (зависимость от праймеров)*

Для амплификации переменных регионов гена 16S рРНК используют универсальные праймеры. Они обладают разным сродством к ДНК различных таксонов, что приводит к неравной эффективности амплификации в

процессе изготовления библиотек [1]. В результате этого искажаются данные о структуре микробиоты, так как одни таксоны могут быть переоценены, а другие — недооценены или вовсе пропущены.

*Неравномерная амплификация (зависимость от количественного состава)*

Наиболее представленные таксоны получают значительное преимущество на ранних этапах амплификации [2], что снижает вероятность точного определения редких таксонов (до 10% от общего количества). Поскольку каждый образец имеет уникальный состав микробиоты, невозможно применить единую систематическую коррективку для всех образцов даже при использовании одинаковых протоколов [3, 4].

*Низкая чувствительность*

При использовании метода 16S NGS для каждого образца в среднем получают от пяти до 50 тыс. прочтений. Однако,

согласно Пуассоновскому распределению, количественную оценку таксона можно считать статистически корректной только при наличии как минимум 100 прочтений данного таксона в образце [5]. Это ограничивает возможность достоверной оценки таксонов, которые составляют менее 0,2–2% от общего числа ридов (в зависимости от суммарного числа прочтений). Увеличение числа прочтений в образце не всегда целесообразно, так как амплификация доминирующих таксонов происходит на ранних этапах, что приводит к значительной недооценке минорных таксонов или их полному исчезновению из анализа. Как следствие, кривая насыщения таксономического разнообразия достигает плато при 20–50 тыс. прочтений, и дальнейшее увеличение числа ридов не повысит репрезентативность данных. Это особенно актуально для минорных условно-патогенных микроорганизмов, которые могут иметь клиническое значение при низких концентрациях, но часто либо не обнаруживаются, либо их количественная оценка оказывается ненадежной. Кроме того, среди исследователей нет единого мнения по вопросу: что более корректно — сравнивать образцы с различным числом прочтений или вводить искажения при унификации их количества [6, 7].

#### *Сниженная специфичность*

При исследовании отдельных регионов (V1-V3, V3-V4, V6, и т. д.) высокая степень консерватизма региона 16S в ряде случаев не позволяет получить таксономическое разрешение на уровне видов, а иногда и родов [1, 8]. Использование полной последовательности гена 16S увеличивает разрешающую способность секвенирования, но доступно только на платформах ONT, PacBio и LoopSeq. К существенным недостаткам данных платформ можно отнести более высокую частоту ошибок относительно ошибок при коротких прочтениях, получаемых, например, на платформе Illumina.

#### *Ограниченность относительной оценки таксонов*

Метод 16S NGS оценивает только относительное содержание таксонов, а не их абсолютное количество. Это означает, что увеличение представленности одного таксона, например, вследствие внедрения изменений в рацион, автоматически приведет к уменьшению доли других при анализе методом 16S NGS. При одновременном изменении нескольких таксонов в сторону уменьшения/увеличения восстановить истинную картину динамики не представляется возможным [4–6].

#### *Влияние количества копий гена 16S рPHK*

Каждый вид микроорганизмов обладает уникальным количеством копий гена 16S рPHK, что редко учитывают при анализе, особенно при идентификации последовательности до уровня родов или семейств. Даже в случае использования специализированного плагина для QIIME 2 искажения, как правило, сохраняются. Причина в том, что при отсутствии данных о копиях гена для конкретной таксономической группы базе данных *rmDB* алгоритм автоматически присваивает значение копияности, равное единице.

#### *Неравная филогенетическая разрешающая способность*

Разные регионы гена 16S рPHK имеют различную филогенетическую разрешающую способность [1, 8–10].

Это приводит к неравномерной точности классификации таксонов, что создает дополнительные трудности при сопоставлении данных из разных исследований.

#### *Различия в платформах секвенирования и методах обработки данных*

Разные платформы секвенирования и методы подготовки библиотек могут приводить к значительным различиям в результатах [1, 11, 12]. Как было сказано выше, это усложняет сопоставление данных между различными исследованиями.

#### *Зависимость от базы данных*

Разные базы данных (RDP, SILVA, Greengenes и т. д.) могут давать разные количественные оценки одного и того же образца [1, 13]. Кроме того, базы обновляют раз в несколько лет, из-за чего в них могут отсутствовать недавно введенные таксономические единицы.

#### **ПЦР-РВ: специализированные задачи, высокая точность**

В отличие от NGS, метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) основан на амплификации специфических фрагментов ДНК. Из этого следует ряд его преимуществ.

#### *Высокая чувствительность и широкий количественный диапазон оценки*

ПЦР-РВ предоставляет возможность обнаруживать и количественно оценивать от нескольких копий мишени в реакции с высокой точностью. Это особенно важно при исследовании редких клинически значимых таксонов, которые могут быть пропущены при 16S NGS. Метод ПЦР-РВ позволяет достоверно количественно определить до 107–108 копий мишени в реакции.

#### *Высокая специфичность*

Олигонуклеотиды подбирают таким образом, чтобы с высокой точностью отличить даже близкородственные микроорганизмы.

#### *Повышенная точность*

В отличие от 16S NGS, за счет отсутствия одновременной амплификации нескольких сотен разных мишеней индивидуальная оценка содержания определенного таксона более достоверна.

#### *Быстрая и простая интерпретация*

В отличие от 16S NGS, ПЦР-РВ не требует сложных биоинформатических методов для интерпретации данных. Это делает его более удобным и доступным для клинических исследований и диагностики, где важна скорость и точность результатов.

#### *Высокая воспроизводимость*

Метод ПЦР-РВ обладает более высокой степенью воспроизводимости по сравнению с 16S NGS благодаря

простоте метода и анализа результатов, что особенно важно для клинической диагностики и долгосрочных исследований. Этот фактор также облегчает сравнение данных между различными исследованиями и лабораториями.

#### *Абсолютная количественная оценка*

В отличие от относительного подхода NGS, ПЦР-РВ предоставляет возможность как для относительной, так и для абсолютной количественной оценки таксонов. Это позволяет анализировать динамику содержания микробиоты при различных состояниях.

#### *Сниженная зависимость от качества биоматериала*

Анализ методом ПЦР-РВ менее требователен к исходному качеству образца (количество, содержание ингибиторов ПЦР) по сравнению с методом 16S NGS, где данные факторы существенно влияют на предварительный этап подготовки библиотек.

Тем не менее метод ПЦР-РВ также обладает определенными ограничениями. Однако в отличие от ограничений, присущих методу NGS, большинство из них можно свести к минимуму при условии учета и коррекции следующих возможных проблемных аспектов.

#### *Выбор целевых микроорганизмов*

ПЦР-РВ ориентирована на амплификацию заранее выбранных генетических мишеней, что требует предварительного знания о ключевых представителях микробиоты в данном исследовании.

#### *Выбор региона для разработки систем*

Наиболее исследованным регионом для большинства бактерий является ген 16S РНК, поэтому чаще всего именно он является мишенью для разработки систем. Однако это высококонсервативная область генома, поэтому не для всех таксономических единиц на уровне видов (а иногда и родов, например, *Oscillibacter* / *Dysosmobacter*) возможно разработать специфичные системы, амплифицирующие данный регион. Для ряда микроорганизмов есть полногеномные данные, позволяющие выбрать другой регион для детекции. Однако таких организмов меньшинство, поэтому выбранная мишень может быть неспецифичной или система будет амплифицировать не всех представителей данной таксономической группы.

#### **Литература**

1. Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. Tringe SG, editor. mSphere. 2021; 6 (1): e01202–20.
2. Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A. Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare Biosphere in Microbial Communities. Gilbert JA, editor. PLoS ONE. 2012; 7 (1): e29973.
3. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019; 38 (6): 1059–70.
4. Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Brooks JP,

#### *Ограничение одновременного количества исследуемых таксонов*

Поскольку ПЦР-РВ направлена на специфичную амплификацию фрагментов ДНК, количество одновременно анализируемых таксонов ограничено. Для точной количественной оценки желательно совмещать не более двух мишеней (при широком возможном диапазоне и стабильном присутствии обеих в большинстве образцов) или трех мишеней (для редких таксонов) в пробирке. Кроме того, из-за ограниченного суммарного числа таксонов в анализе, метод ПЦР-РВ не предоставляет информацию о структуре всего микробного сообщества или его разнообразии, которые также могут обладать клинической значимостью.

#### *Искажения, связанные с количеством копий генов*

Данная проблема может возникнуть, если система подобрана для детекции таксономической группы на высоком уровне (например, семейства) и внутри группы разные роды / виды обладают существенно различающимся количеством копий гена 16S.

#### *Необходимость стандартизации данных*

Для перевода данных, полученных с помощью ПЦР-РВ, в абсолютные значения требуется использование калибровочных стандартов. Для максимальной точности ПЦР-РВ используемые стандарты необходимо предварительно оценивать методом капельно-цифровой ПЦР. При этом чувствительность и линейный диапазон олигонуклеотидных систем крайне желательно исследовать не на модельных образцах (например, титровке плазмиды или ампликона), а на геномной ДНК соответствующего таксона, предпочтительно на фоне фекальной ДНК в клинически релевантном количестве.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Сравнение особенностей методов 16S NGS и ПЦР-РВ показывает, что NGS лучше подходит для исследования общего состава микробиоты и ее разнообразия, в то время как его использование для количественной оценки ограничено рядом проблем, которые на текущий момент не имеют практического решения. В то же время ПЦР-РВ обеспечивает более точную и надежную количественную оценку, что делает его предпочтительным методом для исследований, где важна высокая точность, а исследуемые маркеры известны.

5. Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, et al. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. BMC Microbiol. 2015; 15 (1): 66.
6. Barlow JT, Bogatyrev SR, Ismagilov RF. A quantitative sequencing framework for absolute abundance measurements of mucosal and luminal microbial communities. Nat Commun. 2020; 11 (1): 2590.
7. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. Nature. 2017; 551 (7681): 507–11.
8. Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, et al. Microbiome differential abundance methods

- produce different results across 38 datasets. *Nat Commun.* 2022; 13 (1): 342.
8. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 5029.
  9. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech JBT.* 2017; 28 (1): 19–30.
  10. Kameoka S, Motooka D, Watanabe S, Kubo R, Jung N, Midorikawa Y, et al. Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets. *BMC Genomics.* 2021; 22 (1): 527.
  11. Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, et al. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 2015; 6.
  12. Chuang HH, Huang CG, Chou SH, Li HY, Lee CC, Lee LA. Comparative analysis of gut microbiota in children with obstructive sleep apnea: assessing the efficacy of 16S rRNA gene sequencing in metabolic function prediction based on weight status. *Front Endocrinol.* 2024; 15: 1344152.
  13. Ceccarani C, Severgnini M. A comparison between Greengenes, SILVA, RDP, and NCBI reference databases in four published microbiota datasets. 2023 [cited 2024 Oct 4]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.04.12.535864>.

## References

1. Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. Tringe SG, editor. *mSphere.* 2021; 6 (1): e01202–20.
2. Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A. Amplification by PCR Artificially Reduces the Proportion of the Rare Biosphere in Microbial Communities. Gilbert JA, editor. *PLoS ONE.* 2012; 7 (1): e29973.
3. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38 (6): 1059–70.
4. Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Brooks JP, Edwards DJ, Harwich MD, Rivera MC, Fettweis JM, et al. The truth about metagenomics: quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies. *BMC Microbiol.* 2015; 15 (1): 66.
5. Barlow JT, Bogatyrev SR, Ismagilov RF. A quantitative sequencing framework for absolute abundance measurements of mucosal and lumenal microbial communities. *Nat Commun.* 2020; 11 (1): 2590.
6. Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature.* 2017; 551 (7681): 507–11.
7. Nearing JT, Douglas GM, Hayes MG, MacDonald J, Desai DK, Allward N, et al. Microbiome differential abundance methods produce different results across 38 datasets. *Nat Commun.* 2022; 13 (1): 342.
8. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 5029.
9. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, et al. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J Biomol Tech JBT.* 2017; 28 (1): 19–30.
10. Kameoka S, Motooka D, Watanabe S, Kubo R, Jung N, Midorikawa Y, et al. Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets. *BMC Genomics.* 2021; 22 (1): 527.
11. Tremblay J, Singh K, Fern A, Kirton ES, He S, Woyke T, et al. Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing. *Front Microbiol.* 2015; 6.
12. Chuang HH, Huang CG, Chou SH, Li HY, Lee CC, Lee LA. Comparative analysis of gut microbiota in children with obstructive sleep apnea: assessing the efficacy of 16S rRNA gene sequencing in metabolic function prediction based on weight status. *Front Endocrinol.* 2024; 15: 1344152.
13. Ceccarani C, Severgnini M. A comparison between Greengenes, SILVA, RDP, and NCBI reference databases in four published microbiota datasets. 2023 [cited 2024 Oct 4]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2023.04.12.535864>.