**Требования по организации биомедицинского исследования микробиоты**

**Введение**

Данные требования состоят из 2-х частей и включают в себя:

А) критерии включения и исключения пациентов, с перечнем необходимых данных о пациентах;

Б) протоколы сбора биологического материала для исследования с переченем необходимого для этого оборудования

Информация, представленная в части А, составленна для типового биомедицинского исследования. В зависимости от характера исследования, критерии, представленные во части А могут быть дополнены по согласованию сторон.

Для проведения биомедицинского исследования, необходимо, чтобы сбор материала осуществлялся строго согласно протоколам, представленным в части Б, т.к. при отклонении от протоколов, велика вероятность получения недостоверных данных.

**А. Критерии включения и исключения пациентов, с перечнем необходимых данных о пациентах**

**1) Критерии включения и исключения**

Примечание: перечисленные критерии подлежат уточнению в связи со спецификой исследуемого заболевания.

Критерии включения субъектов в исследование: мужчины и женщины, без симптомов кишечных расстройств и не принимавшие антибиотиков и нестероидных противовоспалительных средств в течение 3 месяцев до забора образцов.

Критерии исключения: возраст меньше 18 лет; отсутствие информированного письменного согласия; неспособность следовать устным и письменным инструкциям; положительный тест на беременность или лактация; серьезные сопутствующие заболевания (сердечно-сосудистой системы, легких, почек или печени; церебральная ишемия; заболевания крови; декомпенсированный сахарный диабет и т.д.); онкологические заболевания; хирургические операции менее чем за 3 месяца до забора; злоупотребление алкоголем, наркотическими веществами, токсикомания.

**2) Реестры групп и пациентов**

После утверждения протокола исследования запись о каждой группе пациентов вносится в файл ведения групп пациентов (шаблон в формате Excel и образец заполнения прилагается). Каждой группе назначается уникальный идентификатор, состоящий из 4-6 латинских букв и цифр: например, CTRL (контроль), KRON1 (пациенты с болезнью Крона, 1 подгруппа), COPD (пациенты с хронической обструктивной болезнью легких) и т.п.

Для каждого пациента должны быть собраны следующие данные: пол, возраст, вес, рост, диагноз, сопутствующий диагноз (важно отразить заболевания ЖКТ, наличие сахарного диабета, аутоиммунные заболевания, заболевания сердечно-сосудистой системы), данные о приеме антибиотиков и про-/пребиотиков за последние 3 месяца, курение (да/нет), заполненные опросники по диете за последние 7-14 дней до забора образца кала. На фазе составления протокола данный список может быть расширен другими клиническими показателями.

Непосредственно после включения субъекта в исследование, запись о нем вносится в файл ведения пациентов (шаблон в формате Excel и образец заполнения прилагается; в случае необходимости нужно внести дополнительные столбцы), включая идентификатор группы, в которую он входит.

**Б. Протоколы сбора и хранения биологических образцов**

**1) Забор кала**

**Необходимое оборудование и расходные материалы**

- Контейнеры для забора кала

- Морозильник, обеспечивающий температуру -20оС

- Термосумка для транспортировки образцов

**Протокол забора, хранения и транспортировки кала**

Перед забором образцов не должны вноситься изменения в диету, назначаться/отменяться прием препаратов, приниматься сорбенты и/или слабительные (включая соли магния и касторовое масло). Образец кала в количестве приблизительно чайная ложка помещается в стандартный флакон для забора кала, замораживается при -20оС, хранится при той же температуре и транспортируется в лабораторию в термоконтейнере с охлаждением, избегая разморозки. В образец категорически не должны попадать моча, вода из сливного бачка унитаза и туалетная бумага.

**2) Забор крови**

**Необходимое оборудование и расходные материалы**

- Вакутейнеры для забора крови. В данном протоколе под «вакутейнером» имеется в виду специальная вакуумная пробирка, покрытая изнутри сухим активатором образования сгустка емкостью 9 мл. Она должен быть с красной маркировкой без антикоагулянта и без геля. В качестве активатора образования сгустка в вакутейнере должен использоваться SiO2, а не стеклянные шарики.

- Центрифуга, обеспечивающая относительную силу центрифугирования (RCF) 1900 G.

- Эппендорфы объемом 1,5 или 2 мл.

- Морозильник, обеспечивающий температуру -80оС

- Термосумка для транспортировки образцов

**Протокол забора крови и получения сыворотки крови для анализа пептидов**

1. Взятие крови из вены производить с использованием специальной системы, состоящей из двухсторонней иглы, иглодержателя и вакутейнера, а не шприцом или самотеком. Двухстороннюю иглу закрепить в иглодержателе. Одну из сторон иглы ввести в вену, а затем на вторую аккуратно насадить вакутейнер. За счет созданного внутри пробирки вакуума наберется около 8 мл крови. Вакутейнер промаркировать.

2. Инкубировать образец при комнатной температуре в течение 1 часа, но не более 3 часов.

3. Открыть вакутейнер и чистым шпателем (или какой-либо другой чистой длинной тонкой металлической палочкой) аккуратно провести по внутренней поверхности вакутейнера с кровью, чтобы устранить возможное налипание сгустка крови на стенки вакутейнера. Закрыть вакутейнер.

4. Центрифугировать образец при оборотах не более 1900 G (3000 об./мин) в течение 15 мин (при комнатной температуре).

5. Надосадочную жидкость (сыворотку) отобрать и перенести в необходимое число пробирок типа эппендорф по 1,5 или 2 мл. Не допускается попадание в сыворотку частичек осадка – лучше отбирать меньшее количество.

6. Пробирки промаркировать и заморозить. На срок не более 2-3 недели допускается хранение в морозильной камере при температуре -15оС – -20оС. На более длительный срок образцы следует хранить при температуре ниже -80оС.

7. Не допускается размораживание сыворотки при хранении или транспортировке.

8. Транспортировку образцов осуществлять в термоконтейнере с охлаждающими элементами. Температура охлаждающих элементов должна быть достаточной, чтобы поддерживать образцы в замороженном состоянии в течение всего времени транспортировки (при как можно более низкой температуре).

**3) Реестр образцов и маркировка**

Непосредственно после получения образца, контейнер с образцом сразу же должен быть промаркирован уникальным идентификатором вида: [идентификатор\_проекта]\_[идентификатор\_группы\_образцов]\_[увеличивающийся\_трехзначный\_номер\_образца]. Например, DIAB\_CTRL\_001, IBD\_CASE\_002 и т.п. Маркировка производится с помощью наклейки, на которую отчетливо наносится надпись перманентным маркером, при этом наклейка и надпись должны быть устойчивы к температурным изменениям и запотеванию. При отсутствии специальных наклеек и маркеров для лабораторных целей, удовлетворяющих этим требованиям, для обеспечения целостности маркировки на контейнер должна быть плотно наклеена прозрачная канцелярская скотч-лента таким образом, чтобы наклейка с надписью была полностью ей покрыта.

Сразу после маркировки образца запись о нем, включающая идентификаторы образца, пациента, от которого он получен, и другие поля, вносится в файл ведения образцов (шаблон в формате Excel и образец заполнения прилагается). При невозможности воспользоваться компьютером в процессе забора образцов, данные вписываются от руки в распечатанную таблицу шаблона, которые сразу после окончания забора образцов переносятся в файл.