

Современные методы изучения микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека

Е. А. Полуэктова, О. С. Ляшенко, О. С. Шифрин,
А. А. Шептулин, В. Т. Ивашкин

*Кафедра пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО
«Первый Московский государственный медицинский университет им И. М. Сеченова» Минздрава России*

Modern methods of studying of human gastro-intestinal microflora

Ye. A. Poluektova, O. S. Lyashenko, O. S. Shifrin, A. A. Sheptulin, V. T. Ivashkin

Chair of internal diseases propedeutics, medical faculty, State educational government-financed institution of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university», Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Цель обзора. Рассмотреть современные представления о составе и функциях кишечной микрофлоры и ее возможном влиянии на развитие ряда заболеваний, а также основные методы диагностики нарушений ее качественного и количественного состава.

Основные положения. Микрофлора кишечника играет важную роль в обеспечении нормальной жизнедеятельности организма. Ее качественный и количественный состав может меняться под влиянием факторов окружающей среды, а также в зависимости от возраста, пола человека и климатогеографических условий. Появились новые данные о связи нарушений микрофлоры с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, нарушением обмена веществ, аутоиммунными и аллергическими заболеваниями.

С середины XX века для оценки состава микрофлоры широко применялся бактериологический метод исследования, основанный на выделении чистой культуры. Однако на протяжении последнего десятилетия внедряются современные методы диагностики, которые позволяют исследовать состав и функции микроорганизмов на генетическом уровне, даже при наличии одной бактериальной клетки в образце.

Заключение. Использование современных методов диагностики позволяет получить развер-

The aim of review. To discuss modern concepts on the structure and functions of intestinal microflora and its possible effect on development of certain diseases, as well as the basic methods of diagnostics of disorders of its qualitative and quantitative structure.

Key points. Intestinal microflora plays important role in maintenance of normal ability to live of a human body. Its qualitative and quantitative pattern can vary under effect of environmental factors, in relation to age, gender and climatic geographical conditions. New data on relation of disorders of microflora with diseases of cardio-vascular system, disorders of metabolism, autoimmune and allergic diseases have appeared.

From the middle of XX century bacteriological method of investigation based on obtaining of pure culture was widely applied in rating of microflora pattern. However, during the last decade modern methods of diagnostics which allow to investigate structure and functions of microorganisms at a genetic level, even at the presence of single bacterial cell in a sample.

Conclusion. Application of modern methods of diagnostics allows to receive the unwrapped representation of microbic landscape of small and large intestine, and also to estimate character of metabolism of the defined microorganisms.

Key words: microbiota, bacterial overgrowth syndrome, methods of diagnostics, molecular genetic analysis, metagenomics, metabolomics.

Полуэктова Елена Александровна — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИО Инновационной терапии, врач отделения хронических заболеваний кишечника и поджелудочной железы клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им. В.Х. Василенко УКБ № 2 ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.И. Сеченова». Контактная информация: poluektova@rambler.ru; 119991, Москва, ул. Погодинская, д. 1, стр. 1.
Poluektova Yelena A. — MD, senior research associate, Scientific-educational center of innovative therapy, doctor of department of chronic bowel and pancreatic diseases, Vasilenko Clinic of internal diseases propedeutics, gastroenterology and hepatology, University clinical hospital No 2, State educational government-financed institution of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university», Ministry of Healthcare of the Russian Federation. Contact information: poluektova@rambler.ru; 119991, Moscow, Pogodinskaya street, 1, bld 1.

нутую картину микробного пейзажа тонкой и толстой кишки, а также оценить характер метаболизма выделенных микроорганизмов.

Ключевые слова: микробиота, синдром избыточного бактериального роста, методы диагностики, молекулярно-генетический анализ, метагеномика, метаболомика.

Совокупность микроорганизмов, живущих в условиях мирного сосуществования с организмом «хозяина», называют микробиотой, микрофлорой или нормофлорой. На рубеже XX–XXI веков сформировалось мнение о микрофлоре как об отдельном органе, выполняющем определенные функции.

С современных позиций нормальную микробиоту следует рассматривать как совокупность множества микробиоценозов (сообществ микроорганизмов), характеризующихся определенным видовым составом и занимающих тот или иной биотоп (место обитания) в организме. Выделяют биотопы кожи, слизистых оболочек верхних дыхательных путей, пищеварительного тракта и наружных отделов мочеполовой системы. *Желудочно-кишечный тракт* (ЖКТ) служит самым крупным ареалом обитания микрофлоры, общее количество микробных клеток в нем, составляющее 10^{14} – 10^{15} , превышает число клеток органов и тканей организма человека в 10 раз [25]. В тонкой кишке содержится около 10^4 – 10^7 КОЕ/мл бактериальных клеток, а количество микроорганизмов, заселяющих толстую кишку, составляет примерно 10^9 – 10^{11} КОЕ/мл. [29]. В тонкой кишке преобладают грамположительные и аэробные бактерии, в то время как в толстой кишке – грамотрицательные и строго анаэробные бактерии [7, 16].

Принято считать, что в состав микрофлоры кишечника входит от 500 до 1000 видов бактерий, причем в толстой кишке находятся 70% всех микробных клеток, населяющих организм человека [31]. Согласно результатам, полученным в исследовании D. N. Frank (2007 г), в состав микрофлоры кишечника больных воспалительными заболеваниями этой области входит более 35 000 видов бактерий [9].

При рождении ЖКТ человека стерилен. Тем не менее, приводятся относительно новые данные, свидетельствующие о том, что заселение бактериальной флорой происходит еще до рождения, когда плод заглатывает амниотическую жидкость, заселенную микроорганизмами [19]. Также имеются сообщения о том, что способ родоразрешения (кесарево сечение или роды) [20] и способ вскармливания (грудное или искусственное) влияют на формирование микробного пейзажа. К двум годам формирование микробиоты обычно завершается и полностью соответствует таковой у взрослого человека [15].

Тип и количество бактерий, населяющих ЖКТ, варьируют в зависимости от возраста, пола и климатогеографических условий [24]. Помимо этого, качественный и количественный состав микробиоты могут изменяться под воздействием факторов окружающей среды, таких как особенности диеты, применение антибиотиков, психологические и физические стрессы, уровень радиационного загрязнения [25].

Микрофлора кишечника играет существенную роль в обеспечении нормальной жизнедеятельности организма. Продукты бактериальной ферментации углеводов (в частности, короткоцепочечные жирные кислоты) служат основным источником энергии для эпителиальных клеток кишки. Микроорганизмы подавляют образование токсичных продуктов белкового обмена (индола, фенола и др.), обладающих канцерогенными свойствами, участвуют в синтезе витаминов, снижают содержание холестерина в крови. Нормальная флора кишечника подавляет рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (колонизационная резистентность), участвует в поддержании необходимой напряженности как иннатного, так и адаптивного иммунитета [2, 3].

Появились новые данные о связи изменений качественного и количественного состава микрофлоры с патологией ЖКТ, заболеваниями сердечно-сосудистой системы, нарушениями обмена веществ (ожирением, сахарным диабетом 2-го типа), аллергическими (атопический дерматит, бронхиальная астма) и аутоиммунными заболеваниями (сахарный диабет 1-го типа, целиакия, воспалительные заболевания кишечника) [12, 21, 25, 26].

В то же время микробные клетки, входящие в состав пробиотических препаратов, оказывают ряд положительных эффектов, в частности, *Bifidobacterium infantis* (Флорасан Д) способствует купированию синдрома раздраженного кишечника; *Lactobacillus casei* DN 114–001 (Актимель) предотвращает развитие острой диареи и уменьшает ее продолжительность у детей [23, 27].

Учитывая изложенное, становится понятным, почему в последние годы значительно возрос интерес к изучению состава микробиоты человека и ее влияния на организм.

Классификация микрофлоры

Выделяют две основные группы кишечной микрофлоры: резидентная (облигатная, индигенная, аутохтонная) и транзиторная (аллохтонная). *Резидентная микрофлора* представлена постоянно обнаруживаемыми в организме хозяина микробными клетками; к резидентной флоре могут быть отнесены, например, микроорганизмы рода бифидо- и лактобактерий. *Транзиторная микрофлора* не способна к длительному существованию в организме и попадает на слизистую оболочку ЖКТ из окружающей среды; к транзиторной микрофлоре относятся, например, стафилококки, стрептококки и дрожжеподобные бактерии.

В зависимости от особенностей метаболизма выделяют протеолитическую и сахаролитическую микрофлору. *Протеолитические микроорганизмы* (кишечная палочка, бактероиды, протей, клостридии) расщепляют белки до азотистых соединений, а *сахаролитические* (бифидо- и лактобактерии, энтерококки) метаболизируют углеводы [1].

По отношению к молекулярному кислороду бактерии можно разделить на три основные группы. Первая группа — это *облигатные аэробы*, растущие только при наличии кислорода. К ней можно отнести большинство прокариотических организмов, например, представителей рода бацилл. Вторую группу составляют *облигатные анаэробы*, кислород для которых токсичен (бактероиды, клостридии ботулизма, столбняка, газовой гангрены и др.). Третья группа представлена *факультативными анаэробами*, растущими как при наличии, так и в отсутствие кислорода (*E. Coli*, стрепто-, стафилококки). Количество анаэробных бактерий в организме человека значительно превышает количество аэробов [1]. По мере продвижения содержимого внутри кишечной трубки снижается парциальное давление кислорода и повышаются показатели рН среды, в связи с чем появляется «этажность» расселения различных видов бактерий по вертикали: выше всего располагаются аэробы, ниже — факультативные анаэробы и еще ниже — строгие анаэробы.

Кроме того, микрофлору кишечника подразделяют на мукозную (пристеночную) и просветную (полостную). *Мукозная микрофлора* представлена в основном бифидобактериями и лактобактериями. Микробы располагаются в виде микроколоний, защищенных от внешних воздействий биопленкой, состоящей из секрета бокаловидных клеток (муцина) и экзополисахаридов микробного происхождения. *Полостная микрофлора* представлена микроорганизмами, локализующимися в просвете кишечника (бактероиды, вейлонеллы, энтеробактерии), и является более изменчивой.

Микробиота таксономически классифицируется по традиционной биологической номенклатуре (тип—класс—порядок—семейство—род—вид).

В настоящее время описано более 50 бактериальных типов, или флотипов, населяющих организм человека, 10 из которых находятся в толстой кишке. При этом преобладают три типа: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* [32].

Методы исследования микробиоты тонкой кишки

Нарушение качественного и количественного состава микрофлоры тонкой кишки проявляется развитием *синдрома избыточного бактериального роста* (СИБР) — состояния, при котором наряду с увеличением общего количества бактерий в кишке $>10^5$ КОЕ/мл (в ряде случаев до 10^{11} КОЕ/мл) происходит изменение бактериального спектра в сторону грамотрицательных и анаэробных штаммов, что клинически проявляется диареей, вздутием живота, симптомами нарушенного всасывания жирорастворимых витаминов — остеомалацией, гипокоагуляцией, снижением сумеречного зрения и др. [2].

Методы, применяемые для диагностики СИБР, подразделяются на прямые (посев тонкокишечного аспирата) и косвенные (дыхательные тесты).

Посев аспирата из тонкой кишки (прямой метод). На сегодняшний день в мировой практике «золотым стандартом» диагностики СИБР служит посев аспирата тонкокишечного содержимого. Забор аспирата осуществляется с помощью специального зонда либо энтероскопа. К наиболее часто выявляемым при культуральном исследовании аспирата микроорганизмам относятся стрептококки, эшерихии, лактобациллы, бактероиды [34]. Диагностически значимым считается содержание микроорганизмов в аспирате тонкой кишки $>10^6$ КОЕ/мл [2].

Однако исследование микробной культуры требует специальных условий для анаэробного культивирования и имеет ряд недостатков, таких как низкая воспроизводимость, трудность идентификации некультивируемых бактерий и невозможность оценки пристеночной микрофлоры. Кроме того, при помощи традиционной энтероскопии не может быть диагностирован «дистальный» СИБР, локализованный преимущественно в подвздошной кишке. В некоторых случаях бактериальная обсемененность может быть неравномерной или избыточный рост бактерий может иметь место в областях, труднодоступных для аспирации (например, при аномалиях развития тонкой кишки, приводящих к псевдообструкции и застою содержимого), что также может служить поводом для неинформативности исследования [6, 10].

Дыхательные тесты (косвенный метод). Дыхательные тесты в связи с их безопасностью, инвазивностью, относительной простотой выполнения и невысокой стоимостью в настоящее время служат основным методом для диагностики СИБР.

Все дыхательные тесты, независимо от используемого субстрата, основаны на определении продуктов метаболизма кишечных бактерий в выдыхаемом воздухе. При бактериальной ферментации пищевых волокон, сложных углеводов и гликопротеидов кишечной слизи происходит образование газов (водород, метан, углекислый газ), короткоцепочечных жирных кислот и воды. При проведении водородных дыхательных тестов определяется количество водорода в выдыхаемом воздухе, так как выявлена линейная зависимость между количеством водорода, образующимся в кишечнике, и его количеством, выделяющимся при дыхании [14]. Возможно также определение концентрации в выдыхаемом воздухе углекислого газа (дыхательный тест с C^{14} -D-ксилозой) [33].

Чаще всего субстратом для поведения водородных тестов служат глюкоза и лактулоза [11, 13, 30], ферментирующиеся кишечными бактериями с образованием водорода. Концентрация последнего в выдыхаемом воздухе косвенно отражает количество бактерий и их метаболическую активность в кишечнике, а время, за которое повышается содержание водорода в выдыхаемом воздухе при проведении теста, указывает на отдел кишки, в котором происходят процессы брожения. Появление метаболитов в выдыхаемом воздухе раньше достижения химусом толстой кишки свидетельствует об избыточном росте тонкокишечной флоры.

Лактулоза — синтетический дисахарид, который не расщепляется ферментами тонкой кишки и попадает в толстую кишку в неизменном виде, где служит субстратом для сахаролитических бактерий.

Наличие СИБР по данным дыхательного теста с лактулозой определяется по двум пикам концентрации водорода в выдыхаемом воздухе: первый связан с бактериальной активностью в тонкой кишке, второй — с бактериальной ферментацией лактулозы в толстой кишке (рис. 1). Тест расценивается как положительный в том случае, если определяется двухфазное (двупиковое) повышение концентрации водорода либо раннее (в течение 30–60 мин) ее повышение ≥ 12 ppm [11]. Чувствительность дыхательного теста с лактулозой 52%, специфичность 86% [22].

Глюкоза — моносахарид, в норме всасывающийся в тонкой кишке. При появлении в ней анаэробных бактерий происходит реакция ферментации, при которой выделяется водород. Во время проведения дыхательного теста с глюкозой на наличие СИБР указывает раннее после начала ее введения увеличение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе (один ранний пик), что связано с бактериальной ферментацией глюкозы в тонкой кишке (рис. 2). Результат теста считается положительным при повышении концентрации водорода ≥ 12 ppm за 120 мин [6].

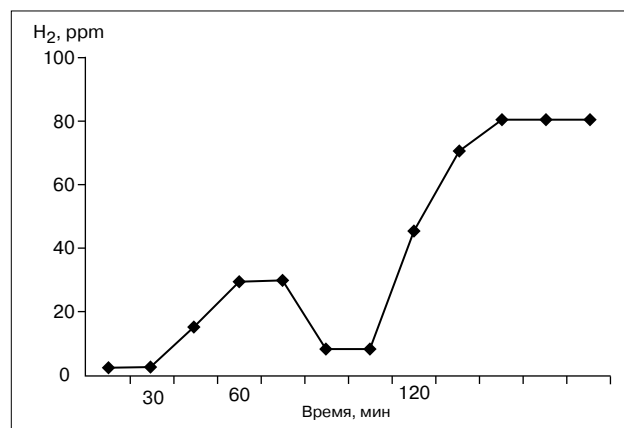


Рис. 1. Графическое изображение результатов водородного дыхательного теста с лактулозой. Наличие СИБР по данным дыхательного теста с лактулозой определяется по двум пикам концентрации водорода в выдыхаемом воздухе: первый связан с бактериальной активностью в тонкой кишке, второй — с бактериальной ферментацией лактулозы в толстой кишке

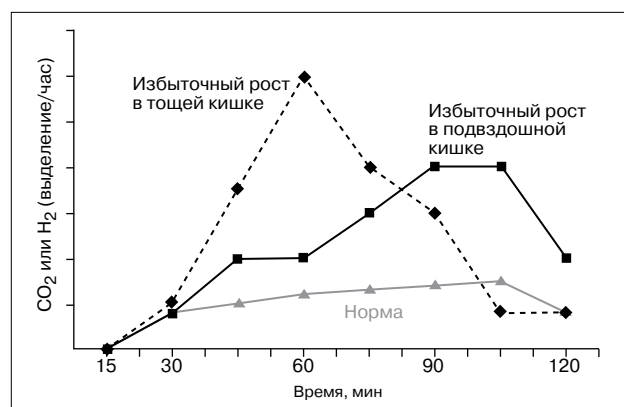


Рис. 2. Графическое изображение результатов водородного дыхательного теста с глюкозой. При проведении дыхательного теста с глюкозой на наличие СИБР указывает раннее после начала ее введения увеличение концентрации водорода в выдыхаемом воздухе (один ранний пик), что связано с бактериальной ферментацией глюкозы в тонкой кишке

Чувствительность дыхательного теста с глюкозой составляет 62,5%, специфичность 82% [22].

К сожалению, водородные дыхательные тесты недостаточно стандартизированы, протоколы их проведения различаются по объему и концентрации тестового субстрата (глюкозы, лактулозы), продолжительности исследования, временным интервалам между дыхательными пробами, значению порогового уровня водорода. При интерпретации полученных данных необходимо помнить, что в случае нарушений двигательной активности желудка или кишечника результаты могут быть ложноотрицательными. Напротив, употребление на ночь перед проведением теста большого количества углеводистой пищи может привести к повышению базальной концентрации водорода

в выдыхаемом воздухе, а следовательно, к ложноположительным результатам исследования [11].

Методы изучения микробного пейзажа в толстой кишке

Культуральный метод, основанный на применении различных питательных сред для выращивания микробных популяций (живых культур) в зависимости от их метаболической активности, традиционно применялся для оценки состава микрофлоры кишечника. С помощью этого метода можно верифицировать основные штаммы патогенных бактерий. К недостаткам можно отнести значительный (до 10 дней) промежуток времени, необходимый для получения результатов, применение дорогостоящих питательных сред, зависимость результатов исследования от соблюдения условий взятия и хранения образцов, сроков транспортировки. При помощи данного метода преимущественно определяются просветная (не пристеночная) микрофлора и бактерии, являющиеся *облигатными аэробами* или *факультативными анаэробами*, но не *облигатными анаэробами* [17]. Кроме того, бактериологическим методом невозможно идентифицировать простейшие, грибы и вирусы.

Молекулярно-генетические методы

Молекулярно-генетические методы исследования позволяют идентифицировать микроорганизмы посредством определения последовательности азотистых оснований их *дезоксирибонуклеиновой* (ДНК) или *рибонуклеиновой* (РНК) кислот в образцах, полученных из любого отдела ЖКТ.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). С помощью ПЦР выделяется фрагмент макромолекулы ДНК или РНК бактериальной клетки, характерный только для конкретного микроорганизма, а затем макромолекулы ДНК или РНК достраиваются до размеров, достаточных для визуальной регистрации. В основе метода лежит процесс комплементарного достраивания ДНК матрицы, осуществляемый с помощью фермента термостабильной ДНК-полимеразы *in vitro*. Этот процесс носит название репликации ДНК.

С помощью ПЦР-диагностики определяются представители микрофлоры с внутриклеточной или мембранной локализацией, трудно культивируемые на питательных средах. Метод отличают простота исполнения, возможность полной его автоматизации, быстрота получения результата, необходимость в небольшом количестве исследуемого материала (возможно обнаружение микроорганизма даже при наличии одной бактериальной клетки в образце). Однако информативность исследования высока только в отношении ограниченного круга условно-патогенных и патогенных

микроорганизмов и вирусов. Помимо этого, во время проведения ПЦР возможен риск контаминации (попадания из внешней среды в реакционную смесь) специфических и неспецифических молекул ДНК на любом этапе проведения реакции, что может служить причиной для появления ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Количественная ПЦР в режиме реального времени (Real-Time quantitative PCR). Отличительные особенности данного метода от традиционной ПЦР заключаются в возможности совмещения обнаружения (детекции) фрагментов искомой макромолекулы ДНК или РНК и количественного их определения в режиме реального времени [25].

На основе ПЦР создан целый ряд методов изучения кишечной микрофлоры, в которых в качестве маркера генетического разнообразия используется *16S рибосомальная РНК (16S рРНК)*. Последняя служит обязательным компонентом любой бактериальной клетки и используется для видовой верификации бактерий. Размер гена 16S рРНК составляет около 1500 нуклеотидных пар. Значительная часть гена представлена консервативными областями, имеющими практически одинаковый нуклеотидный состав у различных микроорганизмов, что позволяет подбирать универсальные праймеры. Праймер — короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный РНК-мишени, служащий затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью РНК-полимеразы, для амплификации (увеличения числа копий) фрагментов гена различной длины, содержащих видоспецифичные вариабельные участки, определив нуклеотидный состав которых, можно идентифицировать микроорганизмы путем сравнения этих последовательностей с образцами, представленными в уже имеющихся базах данных [5,18].

Секвенирование, или определение нуклеотидной последовательности ДНК. Методы секвенирования могут быть основаны на определении маркерных генов (16S рРНК для бактерий и археев, 18S рРНК для эукариот) или полного генома (полногеномное, *whole-genome sequencing*, секвенирование). Данные методы предоставляют исчерпывающую характеристику бактериологического состава микробных сообществ, поскольку позволяют не только определять видовое разнообразие микроорганизмов в исходном образце, но и оценивать их количественные соотношения.

ДНК-микрочипы (DNA microarray). ДНК-микрочип состоит из множества дезоксиолигонуклеотидов (зондов или проб), сгруппированных в виде микроскопических точек и закрепленных на твердой поверхности. Каждая точка содержит ДНК с определенной нуклеотидной последовательностью, которые используются для *гибридизации* (соединения в одну молекулу) с ДНК изу-

чаемого образца. Гибридизация зонда и мишени регистрируется и количественно характеризуется при помощи флуоресценции или хемилюминесценции, дает возможность определять в образце относительное количество нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью.

Метагеномика. Представляет собой исследование генетического материала (геномов), полученного от смешанной колонии микроорганизмов. Метагеномный подход позволяет комплексно оценивать функциональное влияние, оказываемое микробиотой ЖКТ на своего «хозяина». Для этого применяются методы, основанные на выделении микробной ДНК путем ПЦР и последующего секвенирования, что дает возможность получить информацию о всех генах в сообществе микроорганизмов. На сегодняшний день на основе метагеномного анализа выявлено более 5 миллионов различных генов микроорганизмов кишечника, что в 200 раз превосходит набор генов самого человека [28].

Исследование метаболома

В основе изучения метаболома (всех метаболитов, служащих конечным продуктом обмена веществ в бактериальной клетке микроорганизмов) лежат **хроматографические методы**.

Хроматография — это метод разделения смесей на составляющие их вещества, основанный на распределении компонентов между двумя фазами — подвижной и неподвижной. С учетом агрегатного состояния подвижной фазы хроматографические методы разделяются на жидкостные (подвижная фаза — жидкость) и газовые (подвижная фаза — газ). В зависимости от состояния неподвижной фазы выделяют газо-адсорбционную и газо-жидкостную [4]. Для изучения метаболома применяются методы *газо-жидкостной хроматографии фекалий* (ГЖХ) и *газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией* (ГХ—МС).

Газо-жидкостная хроматография основана на определении в режиме реального времени метаболической активности анаэробной микрофлоры по спектрам и уровням летучих жирных кислот (уксусная, пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая и капроновая) и органических соединений (фенол, индол), что позволяет оценить состояние облигатной микрофлоры. Ограниченность данного метода состоит в возможности определения только летучих веществ.

Для определения состава микроорганизмов по нелетучим соединениям (жирным кислотам) применяется **газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией**. Метод базируется на выявлении микроорганизмов по специфическим

для них нелетучим жирным кислотам (молочная, щавелево-уксусная, щавелевая, янтарная, пировиноградная и др.), альдегидам и стеринам, входящим в состав их клеточной стенки, на основании разделения данных веществ на хроматографе и анализа их состава в динамическом режиме на масс-спектрометре.

Таким образом, ГЖХ и ГХ—МС позволяют получить уникальную информацию о составе мономерных химических компонентов микробной клетки и ее метаболитов [8]. К недостаткам хроматографических методов можно отнести необходимость выполнения многократных исследований для анализа широкого диапазона микроорганизмов, особенности компьютерной обработки, высокая стоимость исследования.

Заключение

В настоящее время хорошо изучены физиологические функции микрофлоры, заселяющей ЖКТ человека в норме. Так, сапрофитные микроорганизмы предотвращают колонизацию ЖКТ условно-патогенными и патогенными микробами, осуществляют конечный гидролиз белков, омыление жиров, сбраживание высокомолекулярных углеводов, которые не всосались в тонкой кишке. Под влиянием ферментов нормальной микрофлоры в подвздошной кишке осуществляется деконъюгация желчных кислот и преобразование первичных желчных кислот, синтезированных в печени, во вторичные желчные кислоты. Микрофлора способствует регуляции двигательной активности кишечника, обеспечивает синтез многих жизненно необходимых веществ, участвует в формировании как местного, так и общего иммунитета.

Кроме того, получено достаточно много данных относительно участия кишечной микрофлоры в патогенезе воспалительных и функциональных заболеваний ЖКТ, ожирения, заболеваний сердечно-сосудистой системы и др.) [12, 21, 25, 26].

Однако на данном этапе роль отдельных таксонов бактерий в патогенезе того или иного заболевания остается не вполне ясной. Для того чтобы определить степень влияния отдельных классов, порядков, семейств или родов бактериальных клеток на физиологические или патологические процессы, происходящие в организме хозяина, *во-первых*, необходима их точная идентификация, *во-вторых*, требуется изучение особенностей метаболизма.

Ожидается, что в ближайшем будущем в клиническую практику постепенно будут внедряться современные методы исследования генома и метаболома микроорганизмов, краткая информация о которых изложена в настоящей статье.

Список литературы

1. Воробьев А.А. Микробиология и иммунология. – М.: Медицина, 1999.
1. Vorob'yev A.A. Microbiology and immunology. – M.: Medicine, 1999.
2. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А., Склянская О.А. Синдром диареи. 2-е изд., расшир. и перераб. – М.: ГЭОТАР–МЕДИА, 2002. – С. 58–63
2. Ivashkin V.T., Sheptulin A.A., Sklyanskaya O.A. Syndrome of diarrhea. 2 ed., corr., revised. M.: GEOTAR media, 2002. – С. 58–63.
3. Кучумова С.Ю., Полуэктова Е.А., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2011. – Т. 21, № 5. – С. 17–27.
3. Kuchumova S.Yu., Poluektova Ye.A., Sheptulin A.A., Ivashkin V.T. Physiological value of intestinal microflora // Ros. zhurn. gastroenterol. hepatol. koloproktol. – 2011. – Vol. 21, N 5. – P. 17–27.
4. Шапалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа: Метод. пособие для специального курса. – М., 2007.
4. Shapalova E.N., Pirogov A.V. Chromatographic methods of analysis: The manual for specialty course. – M., 2007.
5. Blaut M., Collins M.D., Welling G.W. et al. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: The EU human gut flora project // Br. J. Nutr. – 2002. – Vol. 87 (suppl. 2). – P. 203–211.
6. Bures J., Cyraný J., Kohoutová D. et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome // World J. Gastroenterol. – 2010. – Vol. 16 (suppl. 24). – P. 2978–2990.
7. Carrara M., Desideri S., Azzurro M. et al. Small intestine bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2008. – Vol. 12, N 3. – P. 197–202.
8. Dennemont J., Roupas A., Heitz M. Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lary* and *C. fetus* fatty acid profiles obtained by gas chromatography – mass spectrometry and by their hippurate hydrolysis // Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. – 1992. – Vol. 83, N 2. – P. 142–150.
9. Frank D.N., St. Amand A.L., Feldman R.A. et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104. – P. 13780–13785.
10. Gasbarrini A., Lauritano E.C., Gabrielli M. et al. Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment // Dig. Dis. – 2007. – N 25. – P. 237–240.
11. Hamilton L.H. Breath tests and gastroenterology. 2nd ed. – Milwaukee: QuinTron Instruments, 1998.
12. Isolauri E., Kalliomaki M., Laitinen K., Salminen S. Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease // Curr. Pharm. Des. – 2008. – Vol. 14. – P. 1368–1375.
13. King C.E., Toskes P.P. Comparison of the 1-gram [¹⁴C] xylose, 10-gram lactulose-H₂, and 80-gram glucose-H₂ breath tests in patients with small intestine bacterial overgrowth // Gastroenterology. – 1986. – Vol. 91. – P. 1447–1451.
14. Levitt M.D. Production and excretion of hydrogen gas in man // N. Engl. J. Med. – 1969. – Vol. 281. – P. 122–127.
15. Mackie R.I., Sghir A., Gaskins H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract // Am. J. Clin. Nutr. – 1999. – Vol. 69. – P. 1035–1045.
16. Malinen E., Rinttilä T., Kajander K. et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR // Am. J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 100, N 2. – P. 373–382.
17. McCartney A.L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora // Br. J. Nutr. – 2002. – Vol. 88 (suppl. 1). – P. 29–37.
18. Morgan X.C., Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. PLoS Comput Biol. – 2012. – Vol. 8 (suppl. 12).
19. Mshvildadze M., Neu J. The infant intestinal microbiome: Friend or foe? // Early Hum. Dev. – 2010. – Vol. 86 (suppl. 1). – P. 67–71.
20. Neu J., Rushing J. Cesarean versus vaginal delivery: Long term infant outcomes and the hygiene hypothesis // Clin. Perinatol. – 2011. – Vol. 38 (suppl. 2). – P. 321–331.
21. Ott S.J., Musfeldt M. et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease // Gut. – 2004. – Vol. 53 (suppl. 5). – P. 685–693.
22. Parodi A., Capurso G., Perri F. et al. H₂-breath testing for small-intestinal bacterial overgrowth // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2009. – Vol. 29 (suppl. 1). – P. 18–22.
23. Pedone C.A. et al. The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN 114–001) on acute diarrhoea in children attending day care centres // Int. J. Clin. Pract. – 1999. – Vol. 53 (suppl. 3). – P. 179–184.
24. Ponnusamy K., Choi J.N., Kim J. et al. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces // J. Med. Microbiol. – 2011. – Vol. 60, N 6. – P. 817–827.
25. Prakash S. et al. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics // Biologics. – 2011. – Vol. 5 – P. 71–86.
26. Proal A.D., Albert P.J., Marshall T. Autoimmune disease in the era of the metagenome // Autoimmun. Rev. – 2009. – Vol. 8 (suppl. 8). – P. 677–681.
27. Pujol P. et al. The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise // Training and Rehab. – 2000. – Vol. 9. – P. 209–223.
28. Qin J., Li R., Raes J. et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. MetaHIT Consortium // Nature. – 2010. – Vol. 464 (suppl. 7285). – P. 59–65.
29. Rambaud J. – C. et al. Gut Microflora. Digestive physiology and pathology. – Paris: John Libbey Eurotext, 2006. – P. 19–32.
30. Riordan S.M., McIver C.J., Walker B.M. et al. The lactulose breath hydrogen test and small intestinal bacterial overgrowth // Am. J. Gastroenterol. – 1996. – Vol. 91. – P. 1795–1803.
31. Sekirov I., Russell S.L., Caetano M. et al. Gut microbiota in health and disease // Physiol. Rev. – 2010. – Vol. 90, N 3. – P. 859–904.
32. Simrén M., Barbara G., Flint H.J. et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report // Gut. – 2013. – Vol. 62 (suppl. 1). – P. 159–176.
33. Simrén M., Stotzer P. – O. Use and abuse of hydrogen breath tests // Gut. – 2006. – Vol. 55 (suppl. 3). – P. 297–303.
34. Spinucci G., Guidetti M., Lanzoni E., Pironi L. Endogenous ethanol production in a patient with chronic intestinal pseudoobstruction and small intestinal bacterial overgrowth // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2006. – Vol. 18, N 7. – P. 799–802.