

УДК 579.8.06-076.3+579.61(25)+612.4+616.61-007.42

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

© Наталья Владимировна Барышникова^{1, 2, 3}

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова. 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2

³ Институт экспериментальной медицины. 190000, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12А

Контактная информация:

Наталья Владимировна Барышникова — к.м.н., доцент, младший научный сотрудник лаборатории медико-социальных проблем педиатрии. E-mail: baryshnikova_nv@mail.ru

Поступила: 04.05.2022

Одобрена: 30.09.2022

Принята к печати: 28.10.2022

Резюме. В лекции отражены современные методы идентификации микроорганизмов, приведена их сравнительная характеристика, описаны преимущества и недостатки каждого из методов, а также дана клиническая оценка их результатов.

Ключевые слова: микробиом; методы диагностики; дисбиоз кишечника.

MICROORGANISM IDENTIFICATION METHODS

© Natalia V. Baryshnikova^{1, 2, 3}

¹ Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University. 197022, Saint-Petersburg, Leo Tolstoy str., 6–8

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University. 194100, Saint-Petersburg, Litovskaya str., 2

³ Institute of Experimental Medicine. 190000, Saint-Petersburg, Akademika Pavlova str., 12A

Contact information:

Natalia V. Baryshnikova — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Junior Researcher, Laboratory of Medical and Social Problems of Pediatrics. E-mail: baryshnikova_nv@mail.ru

Received: 04.05.2022

Revised: 30.09.2022

Accepted: 28.10.2022

Abstract. The lecture reflects modern methods for the identification of microorganisms, gives their comparative characteristics, describes the advantages and disadvantages of each of the methods. A clinical assessment of the results of each method is given.

Key words: microbiome; diagnostic methods; intestinal dysbiosis.

Для определения состава и выявления возможных нарушений кишечной микробиоты используют целый спектр диагностических методов. Часть этих методов направлена на определение конкретных патогенных микроорганизмов, часть — на оценку состояния микробиоты кишечника в целом. В этой лекции мы рассмотрим методы определения именно особенностей микробиоты толстой кишки как микробного биотопа, т.к. именно изменение баланса этого микробного сообщества может приводить к крайне неблагоприятным последствиям (метаболические и иммунологические нарушения, развитие хронических заболеваний и т.п.). Нужно помнить, что микробиота кишечника новорожденных более разнообразна по составу и менее стабильна, чем у взрослых. За первые годы жизни кишечная микробиота у ребенка изменяется от состояния практически стерильной среды до микробиоты, сходной с таковой у взрослых. Первые обитатели кишечника новорожденных — это эпи-

дермальные стафилококки, энтерококки и энтеробактерии, которые обнаруживаются в стуле ребенка в наибольшем количестве. Однако по мере развития организма количество бифидобактерий в кишечнике ребенка постепенно нарастает [1]. Кроме того, на начальном этапе жизни ребенка состав его микробиоты очень variabelен и во многом зависит от таких факторов, как характер родов, характер вскармливания и микробиота матери. Следовательно, у детей до трех лет проведение оценки состава микробиоты кишечника не имеет такой высокой диагностической значимости, как у взрослых.

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ (МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ) ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛА

Данный метод остается «золотым стандартом» верификации большинства кишечных инфекций и используется как для идентификации отдельных

патогенных микроорганизмов (например, при подозрении на острые кишечные инфекции, так и для оценки состава кишечной микробиоты. Исследование микробиоты кишечника выполняется в три основных этапа: 1) посев исследуемого материала на чашки с дифференциально-диагностическими средами; 2) снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на питательных средах; 3) полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, патогенности, устойчивости к специфическим бактериофагам и антибиотикам) с применением анаэробной техники и специальных питательных сред с последующим подсчетом количества каждого вида микроорганизмов в 1 г биоматериала [2]. Полученные результаты сравниваются с нормативами (табл. 1).

Следует обратить внимание, что в разных лабораториях нормативы могут немного отличаться, поэтому нужно ориентироваться на референтные показатели конкретной лаборатории (рис. 1). При получении результатов анализа, отличающихся от нормы, можно говорить о дисбиозе кишечника, для которого выделяют четыре степени тяже-

сти в зависимости от состава микробиоты кишки (табл. 2) [6, 7].

Современная классификация дисбиоза подразумевает не только определение изменений кишечной микробиоты, но и данных клинического обследования с оценкой дисфункции кишечника [8]. При развитии дисбиоза толстой кишки I степени, как правило, кишечная дисфункция не наблюдается, II степени — отмечается проходящая дисфункция кишечника, III степени — возникает дисфункция кишечника, IV степени — развивается выраженная дисфункция кишечника, снижаются защитная и витаминизирующая функции кишечной микробиоты, изменяются ферментативные процессы, возрастает уровень нежелательных продуктов метаболизма условно-патогенных микроорганизмов, что, помимо дисфункции кишки, может привести к деструктивным изменениям кишечной стенки.

Недостатком бактериологического исследования кала является длительность исследования (от 2 дней до 21 дня в зависимости от вида идентифицируемого микроорганизма) и определение содержания небольшого числа микроорганизмов, колонизирующих толстую кишку. Следовательно, в данном случае представление о состоянии кишечного

Таблица 1. Качественный и количественный состав микробиоты толстой кишки: нормативные показатели (КОЕ/г фекалий) в соответствии с отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003, утвержден приказом Минздрава России от 9 июня 2003 г. № 231) [3]

Группа микроорганизмов	Возраст, годы		
	до 1 года	1–60 лет	>60 лет
Бифидобактерии	10^{10} – 10^{11}	10^9 – 10^{10}	10^8 – 10^9
Лактобациллы***	10^6 – 10^7	10^7 – 10^8	10^6 – 10^7
Бактероиды	10^7 – 10^8	10^9 – 10^{10}	10^{10} – 10^{11}
Энтерококки	10^5 – 10^7	10^5 – 10^8	10^6 – 10^7
Фузобактерии	$<10^6$	10^8 – 10^9	10^8 – 10^9
Эубактерии	10^6 – 10^7	10^9 – 10^{10}	10^9 – 10^{10}
Пептострептококки	$<10^5$	10^9 – 10^{10}	10^{10}
Клостридии	$\leq 10^3$	$\leq 10^5$	$\leq 10^6$
<i>E. coli</i> типичные	10^7 – 10^8	10^7 – 10^8	10^7 – 10^8
<i>E. coli</i> лактозонегативные	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
<i>E. coli</i> гемолитические	0	0	0
Другие условно-патогенные энтеробактерии*	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
Стафилококк золотистый	0	0	0
Стафилококки (сапрофитный, эпидермальный)	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
Неферментирующие бактерии**	$\leq 10^3$	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$

* Представители родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Citrobacter* и др.

** *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др.

*** Некоторые диагностические лаборатории в тестах на состояние микробиоценоза кишечника ошибочно ставят знак равенства между терминами «лактобактерии» и «лактобациллы», однако на деле реально лактобациллы (*Lactobacillus*) являются одним из 11 родов в составе большого семейства лактобактерий: *Camobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* [4, 5].

Таблица 2. Степени дисбиоза кишечника по данным бактериологического исследования кала

Степень дисбиоза	Данные бактериологического исследования кала
I степень (латентная, или компенсированная, форма)	<ul style="list-style-type: none"> Снижение общего количества основных представителей микрофлоры (бактероиды, бифидо- и лактофлора до 10^8–10^7 КОЕ/г). Уменьшение количества кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью до 10^6 КОЕ/г. Уровень условно-патогенных энтеробактерий, золотистых стафилококков, грибов рода <i>Candida</i> до 10^3 КОЕ/г
II степень (субкомпенсированная форма)	<ul style="list-style-type: none"> Снижение общего количества основных представителей кишечной микрофлоры до 10^5 КОЕ/г. Увеличение количества лактозонегативной кишечной палочки до 10^4–10^5 КОЕ/г на фоне уменьшения их нормальных форм. Повышение уровня условно-патогенных энтеробактерий, золотистых стафилококков, грибов рода <i>Candida</i> до 10^4 КОЕ/г
III степень	<ul style="list-style-type: none"> Снижение общего количества основных представителей кишечной микрофлоры до 10^3–10^4 КОЕ/г. Отсутствие эшерихий с нормальной ферментативной активностью на фоне повышения числа их неполноценных штаммов. Повышение уровня условно-патогенных энтеробактерий, золотистых стафилококков, грибов рода <i>Candida</i> до 10^5–10^8 КОЕ/г
IV степень	<ul style="list-style-type: none"> Отсутствие основных представителей анаэробной микрофлоры. Отсутствие эшерихий с нормальной ферментативной активностью. Подавляющее превосходство условно-патогенных энтеробактерий, золотистых стафилококков, грибов рода <i>Candida</i> и их ассоциаций — более 10^8 КОЕ/г

Исследование	Результат	Предыдущий результат/дата	Единицы	Референсные значения	Комментарий
Бифидобактерии	9	9 06.11.20	lg КОЕ/1г	9 - 10	
Лактобактерии	4*	4* 06.11.20	lg КОЕ/1г	7 - 8	
Клостридии	3	3 06.11.20	lg КОЕ/1г	< или = 5	
E.coli типичные	6*	8 06.11.20	lg КОЕ/1г	7 - 8	
E.coli лактозонегативные	5*	2 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 5	
E.coli гемолитические	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	0	
Другие УП энтеробактерии	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Proteus sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Providencia sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Morganella sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Citrobacter sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Klebsiella sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Enterobacter sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Serratia sp.	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< 4	
Неферментирующие бактерии	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	< или = 4	
Патогенные бактерии	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	0	
Золотистый стафилококк	0	0 06.11.20	lg КОЕ/1г	0	
Другие стафилококки	2	2 06.11.20	lg КОЕ/1г	< или = 4	
Энтерококки	4*	4* 06.11.20	lg КОЕ/1г	5 - 8	
Грибы рода <i>Candida</i>	2	3 06.11.20	lg КОЕ/1г	< или = 4	

Рис. 1. Пример результата бактериологического анализа микробиоты кишечника

Показатель	Результат	Референсные значения
Общее бактериальное число	$3 \cdot 10^{12}$	$10^{11} - 10^{13}$
<i>Lactobacillus</i> spp.	менее 10^5	↓ $10^6 - 10^7$
<i>Bifidobacterium</i> spp.	$6 \cdot 10^7$	↓ $10^8 - 10^9$
<i>Escherichia coli</i>	$3 \cdot 10^5$	↓ $10^6 - 10^8$
<i>Bacteroides</i> spp.	$3 \cdot 10^{12}$	↓ $10^{10} - 10^{11}$
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	10^9	допустимо любое количество
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	не обнаружено	$10^8 - 10^{11}$
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$6 \cdot 10^9$	допустимо любое количество до 10^{11}
Соотношение <i>Bacteroides fragilis</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	>100	↓ < 100
<i>Escherichia coli</i> enteropathogenic	не обнаружено	не более 10^4
<i>Enterococcus</i> spp.	не обнаружено	не более 10^7
<i>Proteus vulgaris</i> / <i>Proteus mirabilis</i>	не обнаружено	не более 10^4
<i>Citrobacter</i> spp.	не обнаружено	не более 10^4
<i>Enterobacter</i> spp.	10^4	не более 10^4
<i>Parvimonas micra</i>	не обнаружено	не обнаружено **
<i>Candida</i> spp.	не обнаружено	не более 10^4
<i>Clostridium difficile</i>	не обнаружено	не обнаружено
<i>Clostridium perfringens</i>	не обнаружено	не обнаружено
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	не обнаружено	не обнаружено **
<i>Klebsiella oxytoca</i>	не обнаружено	не более 10^4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	не обнаружено	не более 10^4
<i>Salmonella</i> spp.	не обнаружено	не обнаружено
<i>Shigella</i> spp.	не обнаружено	не обнаружено
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2 \cdot 10^3$	не более 10^4
Условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, выявленные в диагностически значимом титре	есть рост (1)	Условно-патогенные микроорганизмы в диагностически значимом количестве не обнаружены

** при обнаружении данных микроорганизмов рекомендовано углубленное обследование для исключения новообразований кишечника

↓ отклонение от нормы

Рис. 2. Пример результата ПЦР-РВ анализа микробиоты кишечника

микробиоценоза будет неполным. Кроме того, несомненным преимуществом этого метода является возможность определения чувствительности выявленных патогенных и/или условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам, бактериофагам и даже пробиотикам, что позволяет проводить индивидуальный подбор лекарственных препаратов и повышает эффективность коррекции нарушений кишечной микробиоты.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КАЛА

Данные методы позволяют идентифицировать микроорганизмы посредством определения уникальной последовательности оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК) исследуемых микроорганизмов [27]. К этим методам относятся:

- полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией (ПЦР-ФД);
- полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).

Стандартная методика ПЦР-исследования включает три этапа: выделение ДНК из клинического образца (биоптата), амплификация специфических фрагментов ДНК (30–40 циклов), детекция продукта амплификации с определением количества продукта ПЦР в конечной точке амплификации. При ПЦР-ФД в реакционную смесь добавляют специфический флуоресцентный зонд и далее через 30–40 циклов определяют уровень флуоресценции. Наиболее информативным считается метод ПЦР-РВ, когда в реакционную смесь также добавляется или специфический флуоресцентный зонд (TaqMan и др.), или интеркалирующий краситель (SYBR

GreenI и др.), но в этом случае амплификатор позволяет детектировать флуоресценцию каждый цикл и наблюдать рост количества ПЦР-продукта в каждой пробирке, и далее по имеющейся калибровке определять точное исходное количество образца в пробе. Таким образом, ПЦР-РВ позволяет осуществлять количественную оценку содержания ДНК в исследуемом материале (рис. 2) [9, 10].

СЕКВЕНИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Секвенирование — это общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК и РНК. Метод основан на технологии метагеномного секвенирования, которая позволяет «определить» сотни видов бактерий (в том числе и некультивируемых) с помощью бактериологического исследования. Технически секвенирование включает следующие этапы [11].

1. Выделение ДНК и РНК проводится с помощью нескольких методов: выделение фенол-хлороформом, выделение на спин-колонках, выделение на магнитных частицах, умное выделение (smart extraction) с использованием смеси из хаотропных и нехаотропных солей с низкой ионной силой по технологии Dual Chemistry при помощи немагнитных частиц с «умной» поверхностью, ферментативное температурно-зависимое выделение.

2. Амплификация продукта проводится в три этапа с повторением 30–40 циклов: денатурация ДНК (расплетение двойной спирали) при температуре 94 °С в течение 30 с, отжиг (присоединение) праймеров при температуре 57 °С — 60 с, достраивание цепей ДНК с помощью ДНК-полимеразы при температуре 72 °С — 60 с.

3. Собственно секвенирование: проводится определение нуклеотидных последовательностей различных генов микроорганизмов [12], полученных в результате амплификации отдельных генов бактерий [13]. В основном для идентификации используют гены, кодирующие 16S и 23S рибосомальные-РНК (р-РНК), т.к. они присутствуют во всех бактериальных клетках и являются видоспецифичными для большинства микроорганизмов [14]. Использование для идентификации гена 16S р-РНК (присутствует в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и в ядерных хромосомах эукариот), позволяет различать близкородственные виды и подвиды микроорганизмов [15–17]. Поскольку нуклеотидные последовательности 16S р-РНК многих известных бактерий доступны, при проведении секвенирования выявленные последовательности анализируемых микроорганизмов можно сравнить с присутствующими в базах данных и идентифицировать бактерии [18].

Выделяют несколько методов секвенирования [11, 19–24].

- Секвенирование по F. Sanger — первый метод секвенирования, который ученые сумели применить для обработки целых геномов. Для проведения секвенирования с помощью капиллярного электрофореза используют самый распространенный на сегодняшний день способ подготовки ДНК — «метод терминации цепи» или «дидезокси метод». При этом методе к единичной цепочке ДНК присоединяется единичный помеченный (флюорохромом — светящейся частицей) нуклеотид. Данный нуклеотид считывается оптическим сенсором, сигнал записывается и затем процесс начинается заново со следующего по порядку нуклеотида. Метод абсолютно точен, до сих пор является единственным методом для подтверждения объектов исследования. К сожалению, он крайне продолжителен и дорог. Например, секвенирование человеческой ДНК заняло 15 лет и стоило миллиарды долларов.
- Секвенирование второго поколения:
 - Illumina — секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченных предшественников. Схоже с секвенированием первого поколения принципом единичности определения нуклеотида в каждой цепочке. Дополнения методики включают подготовительные этапы, позволяющие ускорить «чтение» генома в миллионы раз — фрагментация ДНК. При фрагментации ДНК исследуемый участок (или весь геном) последовательно «разрезается» на участки 200–500 нуклеотидов, маркируется специальными комбинациями нуклеотидов «адаптерами» и фиксируется на специальных матрицах. Далее присоединение и детекция флюорохромных нуклеотидов происходит в параллельном режиме одновременно для очень большого числа коротких участков. На завершающем этапе данные об обнаруженных нуклеотидах объединяются согласно маркировке и выстраивается соответствующая последовательность «прочитанного» участка ДНК.
 - Пиросеквенирование (pyrosequencing) — основано на хемилюминесцентных сигналах, которые подаются специально модифицированными нуклеотидами, когда соединяются с комплементарным нуклеотидом в прочитываемой нити ДНК. Метод пиросеквенирования основан на определении пирофосфата, образующегося при синтезе комплементарной цепи ДНК. В 1988 г. Е. Нуман впервые предложил использовать этот метод для секвенирования. В 1996 г. Р. Nyg en и

М. Ronaghi завершили его детальную разработку. Этот вариант секвенирования позволяет считывать около 1/3 человеческого генома (до 1 миллиарда нуклеотидов) за сутки, что несколько удешевляет цену исследования, но снижает и точность.

- Метод ионного полупроводникового секвенирования — детектирует соединения (ионы), которые выделяются при присоединении нового нуклеотида к нити ДНК. Это позволяет радикально сократить время и стоимость получаемых ридов, хотя процент ошибок становится больше, и больше становится ошибок в фрагментах из повторяющейся одной буквы.
- Секвенирование лигированием — процесс секвенирования ДНК с использованием ДНК-лигазы для создания новой комплементарной нити ДНК. Метод развивался параллельно с секвенированием нового поколения (next generation sequencing (NGS)), но не достиг той степени эффективности, производительности и дешевизны, как вышеописанные технологии. Некоторые лаборатории продолжают его использовать для узконаправленных целей. Для широкого клинического применения метод лигирования признан бесперспективным.
- Секвенирование третьего поколения (или секвенирование нового поколения — next

generation sequencing, NGS) — методы призваны исправить основные недостатки методов второго поколения, а именно: сложную пробоподготовку, небольшую длину единичных прочтений, потребность в усилении сигнала от каждого из анализируемых фрагментов ДНК путем их амплификации, длительное время цикла, необходимость многочисленного повторного секвенирования.

- Секвенирование путем синтеза, или технология секвенирования одной молекулы, — одновременное секвенирование миллионов коротких фрагментов ДНК через синтез — получение миллионов одиночных чтений (ридов). Процесс предусматривает использование РНК-зависимой ДНК-полимеразы и праймеров для создания новой комплементарной цепи ДНК (циклический процесс включения нуклеотидов в цепь детектируется).
- Секвенирование единичных молекул в реальном времени. Секвенатор позволяет «читать» каждый фрагмент ДНК десятки раз, при этом консенсусная точность определения его нуклеотидной последовательности достигает 99,9%.
- Секвенирование с помощью нанопор — принцип детектирования основан на конт-

№	Род бактерий	%	№	Род бактерий	%	№	Род бактерий	%
1	NA	81.151	16	Eubacterium	0.286	31	Phascolarctobacterium	0.066
2	Bacteroides	3.607	17	Anaerostignum	0.229	32	Anaerostipes	0.058
3	Phocaeicola	2.703	18	Ruminococcus2	0.227	33	Prevotella	0.054
4	Tyzzerella	1.823	19	Ruminococcus	0.225	34	Lachnospira	0.048
5	Coprococcus	1.329	20	Roseburia	0.224	35	Neglecta	0.047
6	Faecalibacterium	1.105	21	Colidextribacter	0.208	36	Flavonifractor	0.042
7	Agathobacter	1.022	22	Holdemanella	0.184	37	Sutterella	0.034
8	Parabacteroides	0.816	23	Collinsella	0.170	38	Anaerobutyricum	0.030
9	Blautia	0.563	24	Gemmiger	0.166	39	Butyricoccus	0.030
10	Akkermansia	0.550	25	Barnesiella	0.119	40	Fusicatenibacter	0.028
11	Erysipelatoclostridium	0.543	26	Mediterraneibacter	0.097	41	Slackia	0.028
12	Dorea	0.467	27	Faecalibacillus	0.085	42	Ruthenibacterium	0.028
13	Escherichia/Shigella	0.414	28	Lachnospiracea_incertae_sedis	0.081	43	Bilophila	0.025
14	Alistipes	0.404	29	Dysosmobacter	0.076	44	Allisonella	0.024
15	Bifidobacterium	0.293	30	Mitsuokella	0.066	45	Другие	0.225

а



б

Рис. 3. Пример результата секвенирования микробиоты кишечника: а — содержание бактерий по родам, %; б — круговая диаграмма

роле ионного тока, проходящего через нанопору при подаче напряжения на мембрану.

На сегодняшний день секвенирование позволяет наиболее полно оценить состав кишечной микробиоты и считается «золотым стандартом» для анализа состава данного биотопа. С помощью этого метода можно идентифицировать присутствующие в микробиоме микроорганизмы по:

- типу (доминирующими в кишке являются *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* и *Verrucomicrobia*);
- классу;
- порядку;
- семейству;
- роду (рис. 3).

Секвенирование по анализу уровня микроорганизмов в кишечном микробиоме позволяет оценить риски развития воспалительных заболеваний кишечника (язвенного колита и болезни Крона), ишемической болезни сердца, ожирения, сахарного диабета 2-го типа; определить потенциал микробиоты к синтезу витаминов В₁ (тиамина), В₂ (рибофлавина), В₃ (никотиновой кислоты), В₅ (пантотеновой кислоты), В₆ (пиридоксина), В₇ (биотина), В₉ (фолиевой кислоты); установить уровни полезных и пробиотических (*Bifidobacteriales* и *Lactobacillales*) бактерий в микробиоте кишки, а также бутират-продуцирующих бактерий (*Bacteroides*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Parabacteroides*, *Blautia*, *Anaerostipes*, *Roseburia*, *Eubacterium* и др.). Последнее крайне важно, т.к. сниженная способность бактерий микробиоты кишки к синтезу масляной кислоты (бутирата) из группы короткоцепочных жирных кислот может привести к ее дефициту и таким негативным последствиям, как изменение перистальтики кишечника, нарушение метаболизма, повышение проницаемости эпителиального

барьера кишечника (развитие синдрома «дырявой» кишки), увеличение риска развития воспалительных, онкологических, аутоиммунных, нейродегенеративных заболеваний.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на:

- газовую — включает газожидкостную и газотвердофазную;
- жидкостную — включает жидкостно-жидкостную и жидкостно-твердофазную;
- ионно-обменную.

На основании данных, полученных с помощью этих методов, был создан метаболический паспорт при зубиозе кишечника, что стало началом нового качественного этапа в понимании роли микрофлоры в развитии патологии человека. С помощью данных методов можно обнаружить составные части клеточной стенки возбудителей в исследуемом материале, а также, что очень важно и диагностически значимо, специфичные для данной группы микроорганизмов метаболиты [9].

Ярким примером использования газожидкостной хроматографии для быстрой и точной оценки состояния индигенной микрофлоры является **определение содержания короткоцепочных жирных кислот в различных биологических субстратах (кровь, кал)**.

Короткоцепочные (летучие) жирные кислоты (КЦЖК; англ. short-chain fatty acids, SCFAs) — это группа кислот, являющихся одним из продуктов расщепления пищевых волокон, белков, жиров и углеводов ферментами микроорганизмов или метаболитами в основном анаэробных микроорганизмов [25]. Эти кислоты относятся к предельным

Таблица 3. Короткоцепочные жирные кислоты и микроорганизмы, их продуцирующие

Короткоцепочные жирные кислоты	Химическая формула	Анаэробные микроорганизмы, продуцирующие короткоцепочные жирные кислоты
Уксусная (C ₂ *)	CH ₃ -COOH	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Ruminococcus</i>
Пропионовая (C ₃)	CH ₃ -CH ₂ -COOH	<i>Veillonella</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Anaerovibrio</i>
Масляная (C ₄)	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	<i>Bacteroides</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Blautia</i> , <i>Anaerostipes</i> , <i>Roseburia</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Acidaminococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lachnospira</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Gemmiger</i> и др.
Изомасляная (iC ₄)	(CH ₃) ₂ -CH-COOH	<i>Bacteroides</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Clostridium difficile</i>
Валериановая (C ₅)	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	<i>Megasphaera</i> , <i>Clostridium difficile</i>
Изовалериановая (iC ₅)	CH ₃ -CH(CH ₃)-CH ₂ -COOH	<i>Bacteroides</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Clostridium difficile</i>
Капроновая (C ₆)	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -COOH	<i>Megasphaera</i>
Изокапроновая (iC ₆)	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -CH ₂ -COOH	<i>Bacteroides</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Clostridium difficile</i>

* Цифра после «С» указывает число атомов углерода в кислоте.

одноосновным карбоновым кислотам, имеющим в алифатической цепи (хвосте) не более 6 атомов углерода. КЦЖК обладают большим спектром позитивных действий: противовоспалительным, противоопухолевым, защитным от патогенов и токсинов, поддерживающим микробное равновесие и целостность слизистой оболочки кишечника. КЦЖК вырабатываются преимущественно анаэробными микроорганизмами, и их можно рассматривать как биохимические маркеры изменений микроэкологии кишечника (микробные метаболиты). КЦЖК представлены в таблице 3 [25–28].

Основными и наиболее значимыми для оценки состояния кишечной микробиоты КЦЖК, продуцируемыми в толстой кишке, являются уксусная, пропионовая и масляная. Соли этих кислот, образующиеся в результате брожения (ферментации пищевых волокон в кишечнике), называются соответственно ацетат, пропионат и бутират, а их соотношение в кишечнике в норме следующее: ацетат : пропионат : бутират — 60% : 20% : 20% или ацетат / пропионат / бутират = 3:1:1.

Для определения уровня КЦЖК используют метод газожидкостной хроматографии [28–30].

Определяют как общее содержание КЦЖК, так и содержание отдельных КЦЖК. Общее содержание КЦЖК отражает метаболическую активность кишечной микробиоты. Низкое общее содержание КЦЖК сопряжено с понижением метаболической активности нормальной микробиоты, снижением моторики толстой кишки, дефицитом пищевых субстратов. Повышение общего уровня КЦЖК может отмечаться при избыточной колонизации толстой кишки отдельными представителями анаэробной микробиоты, усилении ее метаболической активности, а также при ферментативной недостаточности и нарушениях всасывания. Дополнительно оценивается анаэробный индекс, который отражает отношение строгих анаэробов к аэробам и факультативным анаэробам. Его повышение связано с угнетением популяции строгой анаэробной микрофлоры и, следовательно, со снижением КЦЖК (табл. 4) [31].

НЕПРЯМЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА

Эти методы основаны на определении в кале, моче, выдыхаемом воздухе различных микробных метаболитов: индикана, р-крезола, фенола, водорода, метана, углекислого газа, аммиака, ненасыщенных жирных кислот, деконъюгированных желчных кислот и др. Определение какого-либо из этих показателей дает представление о метаболической активности кишечной микробиоты. Однако по результатам таких исследований можно получить лишь ориентировочное представление о составе

Таблица 4. Нормативные показатели содержания короткоцепочечных жирных кислот в кале

Показатель	Значение
Абсолютное содержание уксусной кислоты (C ₂)	5,88±1,22 мг/г
Относительное содержание уксусной кислоты (C ₂)	0,634±0,015 Ед
Абсолютное содержание пропионовой кислоты (C ₃)	1,79±0,95 мг/г
Относительное содержание пропионовой кислоты (C ₃)	0,189±0,011 Ед
Абсолютное содержание масляной кислоты (C ₄)	1,75±0,85 мг/г
Относительное содержание масляной кислоты (C ₄)	0,176±0,011 Ед
Абсолютное содержание iC _n (iC ₄ + iC ₅ + iC ₆)	0,631±0,011 мг/г
Относительное содержание iC _n (iC ₄ + iC ₅ + iC ₆)	0,059±0,015 Ед
Общее содержание (C ₂ +...C ₆)	10,51±2,50 мг/г
Анаэробный индекс (C ₂ -C ₄)	-0,576 (±0,110) Ед

кишечной микрофлоры, поскольку в образовании большинства одних и тех же метаболитов принимают участие разные группы микроорганизмов. Чувствительность и специфичность этих методов очень вариабельна (25–90%) [28]. Надо заметить, что указанные методы не всегда доступны и используются лишь в крупных клинических центрах.

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

В последнее время все большую актуальность приобретает такой метод исследования микробного пейзажа, как масс-спектрометрия. Метод газовой хроматографии масс-спектрометрии (ГХ-МС) позволяет детектировать в исследуемых биологических жидкостях микробные маркеры — компоненты микробной клетки — широкого спектра микроорганизмов, в том числе представителей кишечной микробиоты. Преимуществами этого метода является высокая чувствительность и быстрота получения результата (2,5 часа на полный цикл исследования). Более того, метод автоматизирован, что обуславливает простоту лабораторной диагностики [32].

Основана анализа состоит в прямом извлечении с помощью химической процедуры высших жирных кислот из подлежащего исследованию образца, их разделения на хроматографе в капиллярной колонке высокого разрешения и анализа состава в динамическом режиме на масс-спектрометре. Поскольку хроматограф соединен в одном приборе с масс-спектрометром и снабжен компьютером

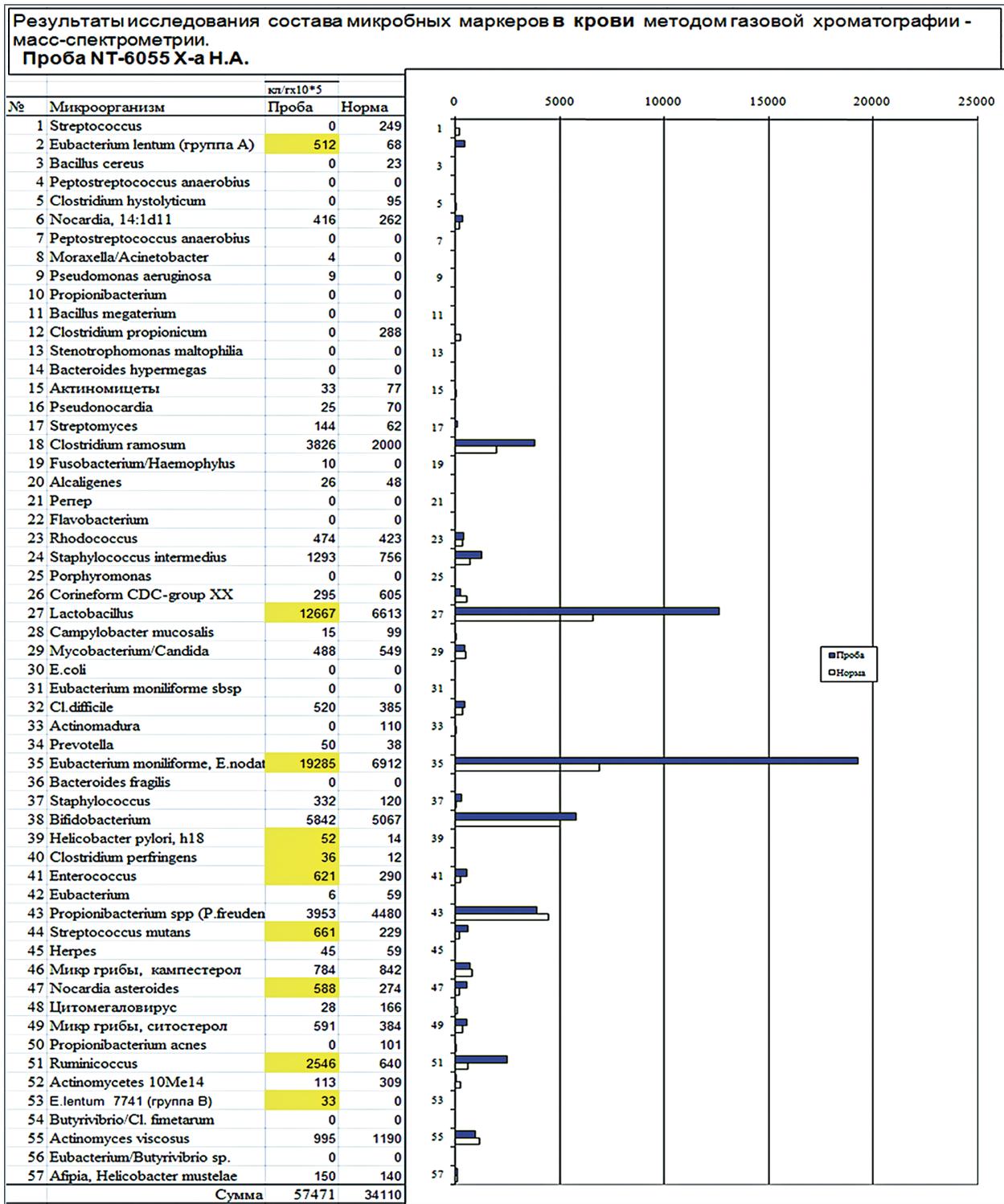


Рис. 4. Результаты исследования состава микробных маркеров в крови методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии

с соответствующими программами автоматического анализа и обработки данных, сам процесс анализа занимает 30 минут, а с учетом времени пробоподготовки и расчета данных — не более 2,5 часов. Поскольку в настоящее время состав жирных кислот большинства микроорганизмов изучен, пока-

зана его воспроизводимость, оценена родо- и видоспецифичность, в результате анализа получается количественное определение состава микроорганизмов пристеночной микробиоты кишечника [32]. У человека возможно определение порядка 60 микробных маркеров, для которых четко определены

нормы их содержания в крови. Следовательно, при изменении уровня микробного маркера можно говорить об изменении содержания определенных микроорганизмов в кишечнике. Данные масс-спектрометрии представлены на рисунке 4.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНДРОМА ИЗБЫТОЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО РОСТА

Определение продуктов микробного метаболизма, в частности определение продуктов микробного гидролиза углеводов, является перспективным и актуальным в диагностике дисбиоза кишечника. Углеводы, не расщепленные панкреатической амилазой или дисахаридазами тонкой кишки, а также не всосавшиеся в кишечнике, становятся пищевым субстратом для сахаролитических бактерий кишечника.

Водород хорошо всасывается в кровь и выделяется через легкие и может, таким образом, быть обнаружен в выдыхаемом воздухе. Он же является продуктом микробного гидролиза непереваренных углеводов. Детекция водорода в выдыхаемом воздухе может использоваться в качестве диагностического маркера при заболеваниях, связанных с нарушениями переваривания и всасывания углеводов и сопровождающихся развитием нарушений кишечной микрофлоры в большом проценте случаев, в частности, для синдрома избыточного бактериального роста (СИБР) — роста анаэробных водород-продуцирующих бактерий. Для диагностики имеют значение основные параметры: уровень водорода (свидетельствует о тяжести процесса) и время нарастания этого уровня (соответствует уровню поражения).

Для получения достоверных результатов теста при подготовке к данному исследованию пациент должен соблюдать ряд условий [33, 34]:

- воздержаться от приема пищи как минимум за 10 часов до начала проведения теста (это не относится к детям грудного возраста); в течение этого времени можно пить только воду;
- последний прием пищи в день, предшествующий проведению теста, должен быть легким; не рекомендуется употреблять трудноперевариваемую пищу; не употреблять в день, предшествующий проведению теста, такие продукты, как лук, чеснок, капуста, соленая капуста, бобовые;
- не курить и не жевать жевательную резинку за 12 часов до начала проведения теста;
- в день исследования можно принимать лекарственные препараты, за исключением витаминов, слабительных и антибиотиков;
- пациентам с зубными протезами нельзя использовать зубопротезный клей;
- перед проведением теста рекомендуется почистить зубы.

Необходимо помнить о противопоказаниях к выполнению водородного дыхательного теста. К ним относятся в первую очередь анамнестические симптомы наследственной непереносимости фруктозы (противопоказаны тест с фруктозной нагрузкой, тест с сорбитольной нагрузкой) и анамнестические симптомы неустановленной гипогликемии (возникающей после приема пищи). Относительными противопоказаниями, способными исказить результаты теста, считаются прием антибиотиков (менее чем за 4 недели до исследования), колоноскопия (менее чем за 2 недели до исследования), ирригоскопия (менее чем за 2 недели до исследования), илеостомия.

Методика проведения водородного дыхательного теста достаточно проста. Тест начинается с измерения, проводимого натощак, до принятия пациентом тестового вещества (нагрузки). Это исходный (базальный) уровень водорода. После измерения базального уровня пациент принимает углеводную нагрузку (например, 50 г лактозы, растворенной в 250 мл теплой воды; для детей — 2 г на килограмм массы тела) и затем измерения повторяют через 30, 60 минут, а иногда дополнительно через 90 и 120 минут. Общее время обследования составляет 1–2 часа, т.е. последнее измерение проводят через 2 часа после приема нагрузки. При проведении исследования в определенные промежутки времени пациент однократно с силой выдыхает в специальную трубку-насадку, вставленную в прибор, на экране прибора после этого появляются цифры концентрации водорода в ppm. При обследовании детей грудного возраста ребенок свободно дышит (выдыхает) в течение 2–3 минут в плотно прижатую к носу и рту маску, из которой постепенно отсасывают поступающий туда выдыхаемый воздух в шприц объемом 20 мл. Затем шприц вынимают из отверстия маски, вставляют в отверстие в приборе, быстро вводят воздух из шприца в прибор (аналогично выдоху взрослого человека) и регистрируют показания прибора на экране.

Диагностическим значением является повышение уровня водорода на 20 ppm и выше, а для детей до года — более 10 ppm. В норме подъем уровня водорода наблюдается на 90–120-й минутах. Повышение концентрации водорода уже через 30 минут свидетельствует об активном участии микробиоты в переваривании углевода еще до расщепления его ферментом, что объясняется наличием большого количества микробов в верхних отделах тонкой кишки, т.е. СИБР.

При СИБР могут наблюдаться следующие варианты кривых концентрации водорода [35]:

- ранний подъем (через 30 минут), затем некоторое снижение (через 60 минут) и новый более высокий подъем (через 90–120 минут);

- ранний подъем (через 30 минут) и дальнейшее повышение концентрации водорода при каждом последующем измерении;
- высокий уровень водорода натошак (более 20 ppm) и дальнейшее его повышение после приема лактазной нагрузки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТАГЕНОМНОЙ ИНФОРМАЦИИ О КИШЕЧНИКЕ

В настоящее время рассматриваются варианты использования возможностей искусственного интеллекта для диагностики состава кишечной микробиоты. Машинное обучение — это применение искусственного интеллекта, которое позволяет вычислительным системам автоматически учиться и совершенствоваться на основе опыта (обучающая когорта) без явного программирования. Благодаря современным вычислительным мощностям машинное обучение широко используется для анализа микроорганизмов, связанных с началом заболевания, и других клинических признаков. Методы машинного обучения дали многообещающие результаты для прогнозирования заболеваний на основе метагеномной информации о кишечнике для таких болезней, как цирроз печени и синдром раздраженного кишечника, но оказались недостаточно эффективными при прогнозировании других заболеваний [36]. Использование PopPhy-сверточной нейронной сети [37] нацелено на повышение точности классификации наборов данных о циррозе печени, диабете 2-го типа и ожирении с использованием структуры обучения сверточной нейронной сети [38], где каждый слой использует функцию активации экспоненциальной линейной единицы. Этот метод использует относительную численность микроорганизмов на уровне рода и вида, а также филогенетическое дерево, чтобы дать нейронной сети возможность исследовать как количественные характеристики из метагеномных данных, так и пространственные отношения из таксономического дерева. Новизна этого подхода заключается в использовании таксономической относительности между микробами и специально разработанного алгоритма извлечения признаков [36]. Хочется надеяться, что при получении достаточного количества данных по идентификации новых биомаркеров искусственный интеллект сможет помочь в прогнозировании рисков развития и диагностики заболеваний по изменению состава кишечной микробиоты [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление новых быстрых и точных методов идентификации микроорганизмов позволяет в ко-

роткие сроки и эффективно определить состав кишечной микробиоты и ее возможные нарушения. Тем не менее это не уменьшает актуальность использования бактериологического метода, поскольку только с его помощью можно определить чувствительности условно-патогенных и патогенных микробов к антибиотикам и бактериофагам. В любом случае, расширение спектра возможностей для диагностики изменений кишечной микробиоты способствует как получению более достоверной информации о биотопе кишки, так и знаний об особенностях нарушений микробиоты кишки при различных заболеваниях, а также расширяются возможности прогнозирования рисков развития заболеваний по составу кишечной микробиоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булатова Е.М., Шабалов А.М., Богданова Н.М. и др. Особенности видового состава бифидобактерий кишечной микробиоты и профиль микробного метаболизма у детей первого полугодия жизни, рожденных естественным и оперативным путем. Педиатр. 2018; 9 (1): 11–6. DOI: 10.17816/PED9111-16.
2. Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник. М.: Медицинское информационное агентство; 2004.
3. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Отраслевой стандарт (ОСТ 91500.11.0004-2003, утв. приказом Минздрава России от 9 июня 2003 г. № 231) [электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200119089> (дата обращения 10.09.2022).
4. Stiles M.E., Holzapfel W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol. 1997; 36(1): 1–29. DOI: 10.1016/s0168-1605(96)01233-0.
5. Бельмер С.В., Хавкин А.И., Алешина Е.О. и др. Кишечная микробиота у детей: норма, нарушения, коррекция. Второе издание, переработанное и дополненное. Под редакцией С.В. Бельмера, А.И. Хавкина. М.; 2020.
6. Грачева Н.М. Клинические особенности различных форм дисбактериоза. Лечащий врач. 1999; 2-3: 17–21.
7. Гриневич В.Б., Успенский Ю.П., Добрынин В.М. и др. Клинические аспекты диагностики и лечения дисбиоза кишечника в общетерапевтической практике. Учебно-методическое пособие. СПб.: Валмед; 2002.
8. Бондаренко В.М. Дисбактериоз. М.: Медицина; 1994.
9. Чубенко Г.И. Методы идентификации бактерий. Методическое пособие для самоподготовки студентов. Благовещенск; 2018.

10. Белов Ю.В., Петров А.И., Курочкин В.Е. Двухкомпонентный количественный ПЦП-анализ. Научное приборостроение. 2012; 22(4): 72–6.
11. Общие сведения о секвенировании биополимеров. [Электронный ресурс]. URL: <http://propionix.ru/sekvenirovaniye-i-ptsr> (дата обращения 10.09.2022).
12. Определитель бактерий Берджи. Под ред. Дж. Холта и др. 9-е издание в 2-х томах. Пер. с англ. под ред. акад. РАН Г.А. Заварзина. М.; 1997.
13. Vesterlund S.R., Sorvari J., Vasemägi A. Molecular identification of cryptic bumblebee species from degraded samples using PCR-RFLP approach. *Mol Ecol Resour.* 2014; 14(1): 122–6. DOI: 10.1111/1755-0998.12168.
14. Schlegel L., Grimont F., Grimont P.A., Bouvet A. Identification of major Streptococcal species by rrrn-amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(2): 657–66. DOI: 10.1128/JCM.41.2.657-666.2003.
15. Зернов Ю.П., Дедков В.С., Антонова Ю.А. и др. Термолабильная щелочная фосфатаза из психрофильного микроорганизма *Alteromonas undina* P2. *Биотехнология.* 2005; 2: 38–43.
16. Жимулев И.Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Сибирское университетское издательство; 2003.
17. Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. М.: Наука; 2004.
18. ГенБанк [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (дата обращения 10.09.2022).
19. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарапова Н.А., Черкасов А.В. Современные методы секвенирования ДНК (обзор). *Микробиология. Проблемы особо опасных инфекций.* 2014; 2: 73–9.
20. Bennett S.T., Barnes C., Cox A. et al. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics.* 2005; 6(4): 373–82. DOI: 10.1517/14622416.6.4.373.
21. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001; 11(1): 3–11. DOI: 10.1101/gr.11.1.3.
22. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B. et al. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996; 242(1): 84–9. DOI: 10.1006/abio.1996.0432.
23. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74(12): 5463–7. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
24. Singer A., Wanunu M., Morrison W. et al. Nanopore based sequence specific detection of duplex DNA for genomic profiling. *Nano Lett.* 2010; 10(2): 738–42. DOI: 10.1021/nl100058y.
25. Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAS) [Электронный ресурс]. URL: <http://propionix.ru/sintez-letuchih-zhirnyh-kislot> (дата обращения 10.09.2022).
26. Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature.* 2009; 461(7268): 1282–6. DOI: 10.1038/nature08530.
27. Ардатская М.А., Минушкин О.Н., Иконников Н.С. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностические подходы и пути коррекции. Возможности и преимущества биохимического исследования кала. Методическое пособие. М.: УНМЦ УД Президента РФ; 2004.
28. Ардатская М.Д., Минушкин О.Н. Современные принципы диагностики и фармакологической коррекции. *Гастроэнтерология, приложение к журналу Consilium Medicum.* 2006; 8 (2) [Электронный ресурс]. URL: <https://www.gastroscan.ru/literature/authors/3248?> (дата обращения 10.09.2022).
29. Мазанкова Л.Н., Ильина Н.О., Кондракова О.А., Затевалов А.М. Оценка состояния кишечной микрофлоры при острых кишечных инфекциях у детей младшего возраста. *Детские инфекции.* 2005; 3: 11–5.
30. Ардатская М.Д., Минушкин О.Н., Прихно Н.И., Дубинин А.В. Летучие жирные кислоты и их диагностическое и прогностическое значение в гастроэнтерологической клинике. *Росс. журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.* 2000; 5: 63–9.
31. Биохимический анализ кала [Электронный ресурс]. URL: <https://helix.ru/kb/item/06-267> (дата обращения 10.09.2022).
32. Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Новикова В.П. и др. Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микрофлоры при заболеваниях органов пищеварения. Учебно-методическое пособие. 2020 [Электронный ресурс]. URL: <https://iat.com.ru/uncategorized/metodika-mass-spektrometrii-mikrobnyh-markerov-kak-sposob-oczenki-pristenochnoj-kishechnoj-mikrobioty-pri-zabolevaniyah-organov-pishhevareniya/> (дата обращения 10.09.2022).
33. Корниенко Е.А., Дмитриенко М.А., Никулин Ю.А. и др. Применение медицинской техники при функциональной диагностике в гастроэнтерологии. Учебно-методическое пособие. СПб.; 2006.
34. Корниенко Е.А., Кубалова С.С., Дмитриенко М.А., Джагацпанян И.Э. Клиническое применение водородного дыхательного теста в диагностике лактазной недостаточности и синдрома избыточного бактериального роста у детей раннего возраста. *Педиатр.* 2013; 4(1): 9–15.
35. Корниенко Е.А., Дмитриенко М.А., Тимофеева Д.Ф. и др. Водородный дыхательный тест в диагностике непереносимости углеводов и синдрома избыточного бактериального роста: методические рекомендации для врачей. СПб.; 2011.

36. Curry K.D., Nute M.G., Treangen T.J. It takes guts to learn: machine learning techniques for disease detection from the gut microbiome. *Emerg Top Life Sci.* 2021; 5(6): 815–27. DOI: 10.1042/ETLS20210213.
37. Reiman D., Metwally A.A., Sun J., Dai Y. PopPhy-CNN: A Phylogenetic Tree Embedded Architecture for Convolutional Neural Networks to Predict Host Phenotype From Metagenomic Data. *IEEE J Biomed Health Inform.* 2020; 24(10): 2993–3001. DOI: 10.1109/JBHI.2020.2993761.
38. Krizhevsky A., Sutskever I., Hinton G.E. ImageNet classification with deep convolutional neural networks. In *Advances in Neural Information Processing Systems*. 2012; 25. Curran Associates, Inc. DOI: 10.1145/3065386.
39. Lin Y., Wang G., Yu J., Sung J.J.Y. Artificial intelligence and metagenomics in intestinal diseases. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021; 36(4): 841–7. DOI: 10.1111/jgh.15501.

REFERENCES

1. Bulatova Ye.M., Shabalov A.M., Bogdanova N.M. i dr. Osobennosti vidovogo sostava bifidobakteriy kishechnoy mikrobioty i profil' mikrobnogo metabolizma u detey pervogo polugodiya zhizni, rozhdennykh yestestvennym i operativnym putem [Features of the species composition of bifidobacteria of the intestinal microbiota and the profile of microbial metabolism in children of the first six months of life born naturally and surgically]. *Pediatr.* 2018; 9 (1): 11–6. DOI: 10.17816/PED9111-16. (in Russian).
2. Vorob'yev A.A. *Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya* [Medical microbiology, virology and immunology]. Uchebnik. Moskva: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo; 2004. (in Russian).
3. Protokol vedeniya bol'nykh. Disbakterioz kishechnika [Intestinal dysbacteriosis]. Otrasleyevy standart. (OST 91500.11.0004-2003, utv. prikazom Minzdrava RF ot 9 iyunya 2003 g. № 231) [elektronnyy resurs]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200119089> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
4. Stiles M.E., Holzapfel W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 1997; 36(1): 1–29. DOI: 10.1016/s0168-1605(96)01233-0.
5. Bel'mer S.V., Khavkin A.I., Aleshina Ye.O. i dr. Kishechnaya mikrobiota u detey: norma, naruseniya, korrektsiya [Intestinal microbiota in children: norm, disorders, correction]. Vtoroye izdaniye, pererabotannoye i dopolnennoye. Pod redaktsiyey S.V. Bel'mera i A.I. Khavkina. Moskva; 2020. (in Russian).
6. Gracheva N.M. Klinicheskiye osobennosti razlichnykh form disbakterioza [Clinical features of various forms of dysbacteriosis]. *Lechashchiy vrach.* 1999; 2-3: 17–21. (in Russian).
7. Grinevich V.B., Uspenskiy Yu.P., Dobrynin V.M. i dr. Klinicheskiye aspekty diagnostiki i lecheniya disbioza kishechnika v obshcheterapevticheskoy praktike [Clinical aspects of diagnosis and treatment of intestinal dysbiosis in general therapeutic practice]. Uchebno-metodicheskoye posobiye. Sankt-Peterburg: Valmed Publ.; 2002. (in Russian).
8. Bondarenko V.M. *Disbakterioz* [Dysbacteriosis]. Moskva: Meditsina Publ.; 1994. (in Russian).
9. Chubenko G.I. *Metody identifikatsii bakteriy* [Methods for identification of bacteria]. Metodicheskoye posobiye dlya samopodgotovki studentov. Blagoveshchensk; 2018. (in Russian).
10. Belov Yu.V., Petrov A.I., Kurochkin V.Ye. Dvukomponentnyy kolichestvennyy PTSR-Analiz [Two-component quantitative PCR-Analysis]. *Nauchnoye priborostroyeniye.* 2012; 22(4): 72–6. (in Russian).
11. Obshchiye svedeniya o sekvenirovani biopolimerov [General information about biopolymer sequencing]. [Elektronnyy resurs]. URL: <http://propionix.ru/sekvenirovaniye-i-ptsr> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
12. *Opredelitel' bakteriy Berdzhii* [Bergey's Bacteria Key]. Pod red. Dzh. Khoulta i dr. 9-ye izdaniye v 2-kh tomakh. Per. s angl. pod red. akad. RAN G.A. Zavarzina. Moskva; 1997. (in Russian).
13. Vesterlund S.R., Sorvari J., Vasemägi A. Molecular identification of cryptic bumblebee species from degraded samples using PCR-RFLP approach. *Mol Ecol Resour.* 2014; 14(1): 122–6. DOI: 10.1111/1755-0998.12168.
14. Schlegel L., Grimont F., Grimont P.A., Bouvet A. Identification of major Streptococcal species by rrn-amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(2): 657–66. DOI: 10.1128/JCM.41.2.657-666.2003.
15. Zernov Yu.P., Dedkov V.S., Antonova Yu.A. i dr. Termolabil'naya shchelochnaya fosfataza iz psikhrofil'nogo mikroorganizma *Alteromonas undina* P2 [Thermolabile alkaline phosphatase from the psychrophilic microorganism *Alteromonas undina* P2]. *Biotekhnologiya.* 2005; 2: 38–43. (in Russian).
16. Zhimulev I.F. *Obshchaya i molekulyarnaya genetika* [General and molecular genetics]. Novosibirsk: Sibirskoye universitetskoye izdatel'stvo; 2003. (in Russian).
17. Patrushev L.I. *Iskusstvennyye geneticheskiye sistemy* [Artificial genetic systems]. Moskva: Nauka Publ.; 2004. (in Russian).
18. GenBank [Elektronnyy resurs]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
19. Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. *Sovremennyye metody sekvenirovaniya DNK (OBZOR)* [Modern methods of DNA sequencing (REVIEW)]. *Mikrobiologiya. Problemy osobopasnykh infektsiy.* 2014; 2: 73–9. (in Russian).

20. Bennett S.T., Barnes C., Cox A. et al. Toward the 1,000 dollars human genome. *Pharmacogenomics*. 2005; 6(4): 373–82. DOI: 10.1517/14622416.6.4.373.
21. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res*. 2001; 11(1): 3–11. DOI: 10.1101/gr.11.1.3.
22. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B. et al. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem*. 1996; 242(1): 84–9. DOI: 10.1006/abio.1996.0432.
23. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12): 5463–7. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
24. Singer A., Wanunu M., Morrison W. et al. Nanopore based sequence specific detection of duplex DNA for genomic profiling. *Nano Lett*. 2010; 10(2): 738–42. DOI: 10.1021/nl100058y.
25. Korotkotsepochechnyye zhirnyye kisloty (SCFAS) [Short chain fatty acids (SCFAS)] [elektronnyy resurs]. URL: <http://propionix.ru/sintez-letuchih-zhirnyh-kislot> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
26. Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009; 461(7268): 1282–6. DOI: 10.1038/nature08530.
27. Ardatskaya M.A., Minushkin O.N., Ikonnikov N.S. Disbakterioz kishechnika: ponyatiye, diagnosticheskiye podkhody i puti korrektsii [Intestinal dysbacteriosis: concept, diagnostic approaches and ways of correction]. *Vozmozhnosti i preimushchestva biokhimicheskogo issledovaniya kala. Metodicheskoye posobiye. Moskva: UNMTS UD Prezidenta RF; 2004.* (in Russian).
28. Ardatskaya M.D., Minushkin O.N. Sovremennyye printsipy diagnostiki i farmakologicheskoy korrektsii [Modern principles of diagnostics and pharmacological correction]. *Gastroenterologiya, prilozheniye k zhurnalu Consilium Medicum*. 2006; 8 (2) [elektronnyy resurs]. URL: <https://www.gastroscan.ru/literature/authors/3248?> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
29. Mazankova L.N., Il'ina N.O., Kondrakova O.A., Zatevalov A.M. Otsenka sostoyaniya kishechnoy mikroflory pri ostrykh kishechnykh infektsiyakh u detey mladshogo vozrasta [Assessment of the state of the intestinal microflora in acute intestinal infections in young children]. *Detskiye infektsii*. 2005; 3: 11–5. (in Russian).
30. Ardatskaya M.D., Minushkin O.N., Prikhno N.I., Dubinin A.V. Letuchiye zhirnyye kisloty i ikh diagnosticheskoye i prognosticheskoye znachenie v gastroenterologicheskoy klinike [Volatile fatty acids and their diagnostic and prognostic significance in the gastroenterological clinic]. *Ross. zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii*. 2000; 5: 63–9. (in Russian).
31. Biokhimicheskiy analiz kala [Biochemical analysis of feces] [elektronnyy resurs]. URL: <https://helix.ru/kb/item/06-267> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
32. Osipov G.A., Boyko N.B., Novikova V.P. et al. Metodika mass-spektrometrii mikrobnikh markerov kak sposob otsenki pristenochnoy kishechnoy mikrobioty pri zabolevaniyakh organov pishchevareniya [Method of mass spectrometry of microbial markers as a method for assessing the parietal intestinal microbiota in diseases of the digestive system]. *Uchebno-metodicheskoye posobiye*. 2020 [elektronnyy resurs]. URL: <https://iat.com.ru/uncategorized/metodika-mass-spektrometrii-mikrobnih-markerov-kak-sposob-oczenki-pristenochnoj-kishechnoj-mikrobioty-pri-zabolevaniyah-organov-pishchevareniya/> (data obrashcheniya 10.09.2022). (in Russian).
33. Korniyenko Ye.A., Dmitriyenko M.A., Nikulin Yu.A. i dr. Primeneniye meditsinskoj tekhniki pri funktsional'noy diagnostike v gastroenterologii [Application of medical technology in functional diagnostics in gastroenterology]. *Uchebno-metodicheskoye posobiye. Sankt-Peterburg; 2006.* (in Russian).
34. Korniyenko Ye.A., Kubalova S.S., Dmitriyenko M.A., Dzhagatspanyan I.E. Klinicheskoye primeneniye vodorodnogo dykhatel'nogo testa v diagnostike laktaznoy nedostatochnosti i sindroma izbytochnogo bakterial'nogo rosta u detey rannego vozrasta [Clinical application of the hydrogen breath test in the diagnosis of lactase deficiency and bacterial overgrowth syndrome in infants]. *Pediatr*. 2013; 4(1): 9–15. (in Russian).
35. Korniyenko Ye.A., Dmitriyenko M.A., Timofeyeva D.F. i dr. Vodorodnyy dykhatel'nyy test v diagnostike neperenosimosti uglevodov i sindroma izbytochnogo bakterial'nogo rosta: metodicheskkiye rekomendatsii dlya vrachey [Hydrogen breath test in the diagnosis of carbohydrate intolerance and bacterial overgrowth syndrome: guidelines for physicians]. *Sankt-Peterburg; 2011.* (in Russian).
36. Curry K.D., Nute M.G., Treangen T.J. It takes guts to learn: machine learning techniques for disease detection from the gut microbiome. *Emerg Top Life Sci*. 2021; 5(6): 815–27. DOI: 10.1042/ETLS20210213.
37. Reiman D., Metwally A.A., Sun J., Dai Y. PopPhy-CNN: A Phylogenetic Tree Embedded Architecture for Convolutional Neural Networks to Predict Host Phenotype From Metagenomic Data. *IEEE J Biomed Health Inform*. 2020; 24(10): 2993–3001. DOI: 10.1109/JBHI.2020.2993761.
38. Krizhevsky A., Sutskever I., Hinton G.E. ImageNet classification with deep convolutional neural networks. In *Advances in Neural Information Processing Systems*. 2012; 25. Curran Associates, Inc. DOI: 10.1145/3065386.
39. Lin Y., Wang G., Yu J., Sung J.J.Y. Artificial intelligence and metagenomics in intestinal diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2021; 36(4): 841–7. DOI: 10.1111/jgh.15501.