

ГЕНОМИКА И ПРОТЕОМИКА

УДК 579.842.11, 616.093

Е.И. Иванова¹, С.М. Попкова¹, Ю.П. Джиоев^{1,2}, В.В. Долгих¹, Е.Б. Ракова^{1,2}, Е.В. Бухарова¹ДЕТЕКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ
У ТИПИЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI*¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

С помощью ПЦР исследовали 316 штаммов разных типов *E. coli* (с нормальной ферментативной активностью, со слабой ферментативной активностью, гемолитической активностью), выделенных у здоровых детей и детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, на наличие генов патогенности. Проведенные исследования показали, что штаммы *Escherichia coli* обладают патогенным потенциалом, о чем свидетельствует наличие у них генетических маркеров патогенности.

Ключевые слова: кишечный микробиоценоз, *Escherichia coli*, функциональные нарушения пищеварения, «острова» патогенности, гены патогенности, ПЦР, праймеры

DETECTION OF SOME GENES ENCODING PATHOGENICITY FACTORS IN THE TYPICAL
ISOLATES OF *ESCHERICHIA COLI*E.I. Ivanova¹, S.M. Popkova¹, Yu.P. Dzhioev^{1,2}, V.V. Dolgikh¹, E.B. Rakova^{1,2}, E.V. Bukharova¹¹ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

Using polymerase chain reaction 316 strains of *E. coli* (strains with normal enzymatic activity, strains with weak enzymatic activity and strains with hemolytic activity) were examined for the presence of pathogenicity genes. They were isolated from healthy children and children with functional disorders of the gastro-intestinal tract. The studies have shown that strains of *Escherichia coli* have pathogenic potential, as evidenced by the presence of genetic pathogenicity markers in them.

Key words: intestinal microbiocenosis, *Escherichia coli*, functional digestive disorders, pathogenicity islands, pathogenicity genes, PCR, primers

Микробиоценозы различных полостей макроорганизма остаются одной из недостаточно изученных экологических систем. Наиболее сложным микробиомом является кишечная кооперация, представленная различными популяциями микроорганизмов, выполняющая и регулирующая многочисленные функции по поддержанию гомеостаза [2, 6].

В настоящее время одним из актуальных направлений экологических исследований является изучение видовой структуры сообществ симбиотических микроорганизмов и закономерностей ее организации [4]. *Escherichia coli* – синантропные микроорганизмы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека. Они находятся в эпителиальной слизи, выстилающей кишечник, и, как правило, состоят в симбиотических отношениях с хозяином. Однако высокая пластичность генома этого вида бактерий дает огромный потенциал для развития и появления штаммов патогенных микроорганизмов из комменсальных штаммов [17]. К появлению новых вариантов *E. coli* ведет обмен разных типов бактерий между собой и с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae* мобильными генетическими элементами [9]. Большое разнообразие факторов

вирулентности привело к определению различных патогенных групп, которые обладают различным физиопатологическим поведением. Патогенные изоляты *E. coli* являются основной причиной бактериальных диарей во всем мире [17], они обладают генами, кодирующими различные факторы вирулентности, которые часто иммобилизуются на мобильных генетических элементах, такие как бактериофаги, плазмиды, и «острова» («островки») патогенности [15, 18, 20, 22].

В связи с этим, целью исследования являлось определение некоторых детерминант патогенности в геноме *Escherichia coli* с разной фенотипической активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На дисбиоз кишечника было обследовано 225 детей в возрасте от рождения до 15 лет с функциональными нарушениями (ФН) ЖКТ (абдоминальный синдром, расстройства дефекации, расстройства билиарного тракта, функциональные запоры, колики в течение не менее 12 недель за последние 12 месяцев). В группу сравнения входили здоровые дети аналогичного возраста (100 чел.). Факторами исключения

из исследования были хронические заболевания, в том числе желудочно-кишечного тракта, прием антибактериальных и пробиотических препаратов за 3 месяца до обследования. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН и выполнено с информированного согласия пациентов.

Определение количественного и качественного состава кишечной микрофлоры проводили по стандартам диагностики, рекомендованным для бактериологических лабораторий [5, 12, 13, 14]. Для исследования были выделены разные типы *E. coli* как от здоровых детей, так и от детей с ФН ЖКТ, с нормальной ферментативной активностью (соответственно 20 и 202 аутоштаммов), со слабой ферментативной активностью (10 и 60 аутоштаммов) и с гемолитической активностью (24 аутоштамма – от детей с ФН ЖКТ). По культурально-ферментативным свойствам и антигенным характеристикам исследуемые штаммы *E. coli* являлись типичными представителями индигенной микрофлоры рода *Escherichia*.

Выделение бактериальной ДНК, амплификацию, электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов осуществляли по ранее описанным методикам [7, 8, 10]. Для исследования одного образца использовали 15 мкл реакционной смеси: 5-х PCR-буфер – 3 мкл; MgSO₄ – 1,5 мкл; dNTP – 0,3 мкл; олигонуклеотидные праймеры – по 1 мкл; Tag-полимераза – 0,05 мкл; деионизированная вода – 7,2 мкл; 2 мкл тотальной ДНК исследуемого микроорганизма. В работе использовали праймеры к ряду генов, обнаруженных в составе «островов» патогенности *E. coli*, контролирующей способность к адгезии (*bfp* – (F1) 5'-AATGGTGCTTGC-GCTTGTGC-3'; (R1) – 5'-GCCGCTTATCCAACTGGTA-3'; *eae* – (F2) 5'-GGAACGGCAGAGTTAATCTGCAG-3'; (R2) – 5'-GGCGTCATCATAGTCTTTC-3') [16, 19]; способность к инвазии (*ipaH* – (F3) 5'-GCTGGAAAACTCAGTGCCT-3'; (R3) – 5'-CCAGTCCGTAATTCATTCT-3') [23]; синтез энтеротоксинов (*eltA* – (F4) 5'-GGCGACAGATTATAC-CGTGC-3'; (R4) – 5'-CCGAATTCTGTATATATGTC-3') [21]. Праймеры синтезированы в НПФ «Литех» (г. Москва). Электрофореграмма тестирования изолятов *E. coli* на наличие исследуемых генов патогенности представлена на рисунке 1.

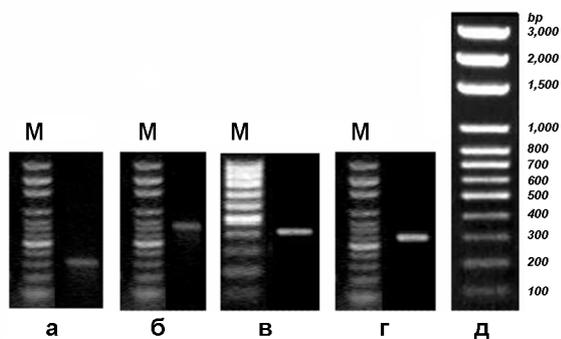


Рис. 1. Электрофореграмма сравнительной интерпретации размерностей ДНК-фрагментов генов патогенности *E. coli* со специфическими праймерами, полученными в результате ПЦР-анализа: **а** – *bfp* (326 п. н. о.); **б** – *eae* (775 п. н. о.); **в** – *ipaH* (424 п. н. о.); **г** – *eltA* (696 п. н. о.); **д** – маркера (М) молекулярного веса 100 п. н. о. (100–3000 п. н. о.)

Статистическая обработка данных произведена при помощи прикладных программ «MS Excel for Windows» методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента при критическом значении уровня значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили выявить у индигенных изолятов *E. coli* наличие фрагментов ДНК, специфичных генам патогенности, характерных для диареогенных форм *E. coli* (табл. 1). В первую очередь, было проведено исследование наличия маркеров патогенности, обеспечивающих адгезию микроорганизмов на эпителии кишечника (ген *bfp* – контролирующая способность к формированию связывания пилей, ген *eae* – синтез бактериального адгезина интимина).

Выявлено, что у исследуемых микроорганизмов, выделенных от здоровых детей и детей с ФН ЖКТ, чаще отмечались маркеры гена, отвечающего за способность к формированию связывания пилей (*bfp*). Наличие данного ампликона у кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью (от детей с ФН) составляла 92,1 %. Частота встречаемости генетических детерминант гена *eae* оказалась значительно ниже и составляла 1,0 % ($p < 0,05$). Редко встречаемым геном являлся и ген *eltA* – 0,5 %. Ампликоны, специфичные *ipaH* гену отсутствовали. В группе сравнения ген *bfp* выявлялся в 100,0 % случаев, гены *eae*, *ipaH* и *eltA* в геноме данных микроорганизмов не выявлялись. Как правило, изучаемые гены патогенности чаще определялись на фоне высокой популяционной плотности эшерихий (10^7 – 10^8 КОЕ/г), на 2–3 порядка превышающих зарегистрированную нами их низкую концентрацию (ОСТ, 2003).

В группе слабоферментативных *E. coli* доля генетических детерминант *bfp* была несколько ниже по сравнению с типичными эшерихиями и составляла 86,6 %. В данной фенотипической группе микроорганизмов впервые из всех вариантов выявлялись генетические детерминанты *ipaH* гена в 5,0 % случаев. При использовании праймеров, амплифицирующих фрагменты *eae* и *eltA* генов, положительные результаты не были получены. В группе сравнения в геноме *E. coli* со слабой ферментативной активностью присутствовал лишь ген *bfp* во всех выделенных изолятах (100,0 %), другие изучаемые генетические детерминанты патогенности не выявлялись.

В группе гемолитических *E. coli*, вегетирующих только в кишечном биотопе детей с ФН, преобладали изоляты с наличием *bfp* гена (91,6 %). Гены *eae*, *eltA* выявлялись в геноме микроорганизмов данной фенотипической группы бактерий с равной частотой – по 4,2 %. Ампликоны, специфичные *ipaH* гену отсутствовали, как и у типичных вариантов *E. coli* [11].

Из всех изученных генов, детерминирующих патогенность, одиночные гены выявлялись в геноме *E. coli* в 89,2 % случаев, при этом в преобладающем большинстве изолятов обнаружен ген *bfp* (88,8 %), реже встречаемым геном являлся ген *eae* (0,4 %). Двухкомпонентные ассоциации (сочетания) генов

Таблица 1

Частота выявления генетических детерминант патогенности у индигенных аутоштаммов *E. coli*

Исследуемые изоляты	Наличие генетических детерминант (%)			
	<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH</i>	<i>eltA</i>
<i>E. coli</i> с нормальной ферментативной активностью	92,1	1,0	0	0,5
<i>E. coli</i> со слабой ферментативной активностью	86,6	0	5,0	0
<i>E. coli</i> с гемолитической активностью	91,6	4,2	0	4,2

регистровались в 2,5 % случаев. Главным ассоциантом которых являлся ген *bfp*, он регистрировался в сочетании как с геном *ipaH* (1,1 %), так и с генами *eae* (0,7 %) и *eltA* (0,7 %).

Среди изолятов *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и гемолитической активностью выявлялись следующие варианты ассоциаций генов патогенности: *bfp* + *eae* (0,5 % и 4,2 % соответственно), *bfp* + *eltA* (0,5 % и 4,2 % соответственно) (рис. 2, 4). Микроэкологический статус при этом характеризовался дефицитом бифидобактерий (в 25,0 % случаев), наличием *Enterococcus spp.* (75,0 %) и вегетацией условно-патогенных микроорганизмов – *Klebsiella spp.* (100,0 %), *Clostridium spp.* (75,0 %) и *Staphylococcus aureus* (25,0 %).

Среди слабоферментативных форм *E. coli* в ДНК этого микроорганизма выявлялось лишь одно сочетание гена *bfp* с *ipaH* (5,0 %) (рис. 3). При этом у каждого третьего ребенка был выявлен дефицит бифидобактерий, наличие *Clostridium spp.* и *Candida spp.* Спектр микроорганизмов в кишечнике данных детей также характеризовался значительной частотой вегетации представителей рода *Enterococcus* (66,6 %). У каждого ребенка (100,0 %) регистрировались представители родов *Klebsiella* и *Staphylococcus* (*S. aureus*). В группе сравнения гены патогенности в ассоциациях не регистрировались.

В связи с нечеткой определенностью различий по выявляемости генов патогенности в сравниваемых группах было решено провести сравнительную оценку данных в зависимости от микроэкологической характеристики кишечного биотопа.

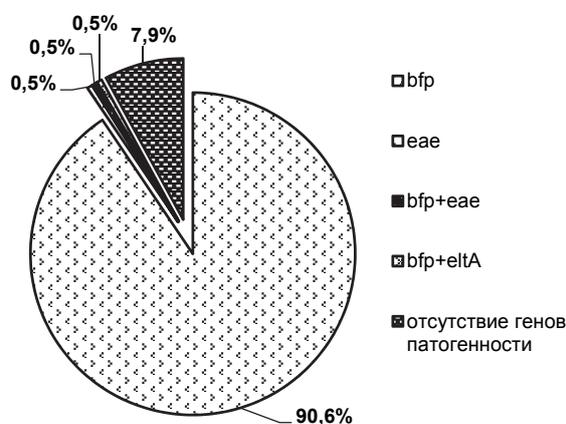


Рис. 2. Распределение генов патогенности и их ассоциаций у изолятов *E. coli* с нормальной ферментативной активностью.

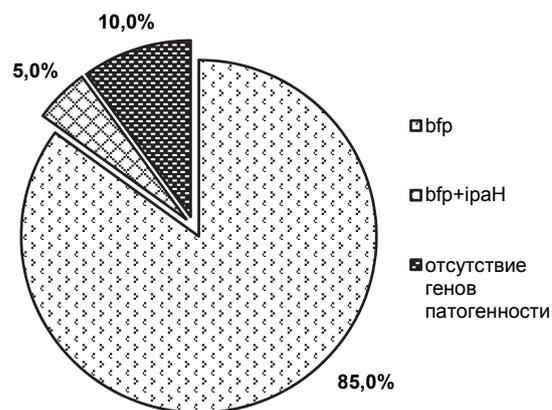


Рис. 3. Распределение генов патогенности и их ассоциаций у изолятов *E. coli* со слабой ферментативной активностью.

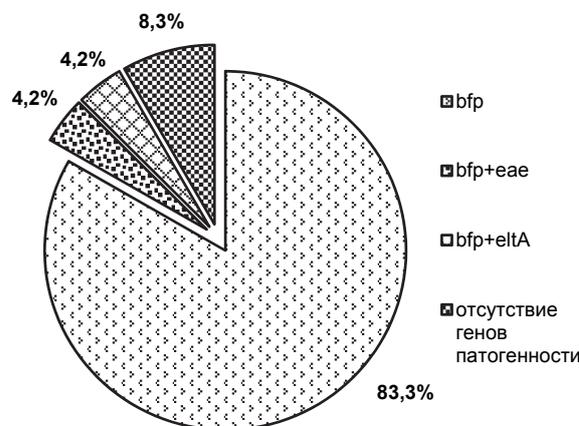


Рис. 4. Распределение генов патогенности и их ассоциаций у изолятов *E. coli* с гемолитической активностью.

В результате данного анализа было отмечено, что при эубиозе и в условиях нарушения микроэкологического равновесия в кишечном биоценозе (дефицит лакто- и бифидобактерий, вегетация условно-патогенной биоты) гены патогенности выявлялись в геноме *E. coli* по-разному (см. рис. 5). Так, при микроэкологической норме выявляемость *bfp* была в 2 раза ниже, чем при дефиците индигенной биоты и почти в 6 раз ниже, чем при вегетации условно-патогенной микробиоты ($p < 0,05$). Регистрация гена патогенности *eae* определялась только на фоне микроэкологического дисбаланса. Положительный сигнал при детекции генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию (*eltA*) и

к инвазии (*ipaH*), был получен только в условиях дефицита индигенной микрофлоры с одновременным присутствием в биотопе условно-патогенной (рис. 5).

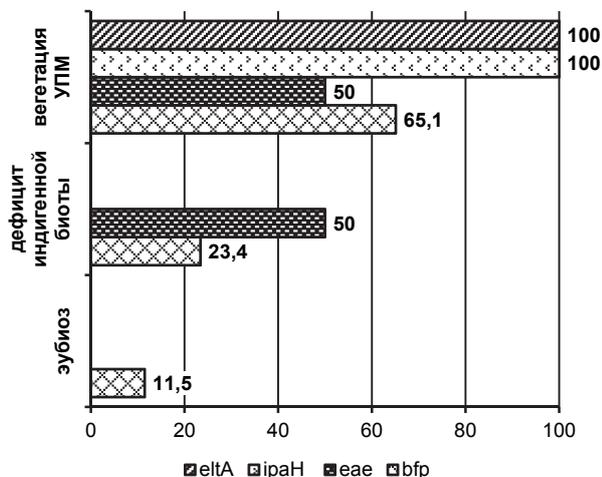


Рис. 5. Частота детекции генов патогенности в зависимости от микробиологического состояния кишечной биоты, %.

Частота встречаемости генов патогенности также анализировалась в зависимости от возраста детей. Так, наличие гена, отвечающего за формирование связывания пилей, у детей с ФН ЖКТ как первого года жизни, так и в старшей возрастной группе регистрировалось с высокой частотой – 90,6 и 94,3 % соответственно. Ген *eae*, контролирующий синтез интимина, встречался редко (2,4 %), и при этом только у детей до года. Частота встречаемости искомым ампликонов в геноме кишечных палочек, выделенных от детей младшей и старшей возрастных групп, при использовании праймеров к *ipaH* и *eltA* была низкой и составляла: 2,4 % и 0,7 %, 1,2 % и 0,7 % соответственно по группам (табл. 2).

Таблица 2
Частота детекции генов патогенности у детей различных возрастных групп (%)

Группы детей	Гены патогенности, %			
	<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH</i>	<i>eltA</i>
Дети до года (85 чел.)	90,6	2,4	2,4	1,2
Дети старше года (140 чел.)	94,3	0	0,7	0,7

Таким образом, результаты продемонстрировали высокую частоту присутствия гена *bfp* в популяциях различных биохимических вариантов, в том числе *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, что свидетельствует об эффективных процессах адгезии *E. coli* к эпителию кишечника. Что, с одной стороны, дает ей огромные преимущества в конкурентной борьбе с условно-патогенной микробиотой за сайты адгезии и занятием экологической ниши, а, с другой стороны, дает возможность типичной *E. coli* сохранять в кишечнике физиологически высокую популяционную плотность, осуществляя выполнение

полезных для хозяина функций (синтез витаминов и аминокислот, поддержание колонизационной резистентности кишечника, обеспечение антигенной стимуляции местного иммунитета и др.). Это подтверждают данные о высоком уровне детекции гена *bfp* в геноме кишечных палочек в группе здоровых детей. Эти данные свидетельствуют о становлении микробиологического гомеостаза кишечного биоценоза у детей, приближающихся к 4-летнему возрасту, когда один из главных компонентов индигенной микробиоты (нормальная кишечная палочка) получил селективное преимущество за счет экспрессии генов, способствующих колонизации слизистой кишечника. Высокая частота присутствия гена *bfp* в геномах атипичных *E. coli* является фактом нежелательным, т.к. наличие данных микроорганизмов наряду с дефицитом бифидо- и лактобактерий свидетельствует о начинающихся дисбиотических нарушениях, и при наличии данного гена возможно усугубление процесса.

Сочетания генов *bfp* и *eltA* в геноме типичных и гемолитических кишечных палочек, свидетельствует об усилении вирулентности бактерий, обеспечивающих как прикрепление к клеткам кишечного эпителия, так и последующее эффективное воздействие выделяемого ими токсина. Ассоциации гена *bfp* и *ipaH* в ДНК слабоферментативных фенотипов *E. coli* дает возможность данным микроорганизмам прикрепляться к эпителиоцитам, проникать в них и размножаться, данные способности характерны только вирулентным изолятам, которые контролируются инвазивной активностью этих бактерий.

По нашим данным, при микробиологических нарушениях в кишечном микробиоценозе частота встречаемости генов патогенности выше, нежели при зубиозе. Данные штаммы имели селективное преимущество в условиях дефицита бифидобактерий, т.е. в условиях сниженной популяционной антагонистической активности бифидобактерий. Вероятно, это связано с особенностями изучаемого биотопа детей с ФН ЖКТ.

Возрастной группой риска по наличию детерминант патогенности в геноме *E. coli* была возрастная группа детей до года. Дети первого года жизни наиболее уязвимы в связи с незрелостью иммунной системы и процессами формирования относительно стабильного микробиоценоза, в результате чего происходит последовательная смена на определенном участке среды обитания одних сообществ организмов другими (сукцессия) [1, 3]. При этом в определенный период жизни кишечника ребенка могут колонизировать условно-патогенные микроорганизмы, которые могут стать причиной развития дисбактериозов и различных осложнений, связанных с ним [1].

Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о необходимости углубленного изучения внутривидового разнообразия *E. coli*, определения факторов патогенности или их генетических детерминант наряду с серологическим типированием для окончательной идентификации эшерихий как возбудителей различных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисян Л.Р. Эпидемиологические и микробиологические аспекты колонизации кишечника детей первого года жизни условно-патогенными микроорганизмами: дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 143 с.
 Avetisyan L.R. Epidemiological and microbiological aspects of intestinal colonization in infants with opportunistic pathogens: dissertation of Candidate of Medical Sciences. – Moscow, 2008. – 143 p. (in Russian).
2. Бережной В.В., Крамарев С.А., Шунько Е.Е., Янковский Д.С. и др. Микрофлора человека и роль современных пробиотиков в ее регуляции // Здоровье женщины. – 2004. – № 1 (17). – С. 134–139.
 Berezhnoy V.V., Kramarev S.A., Shunko E.E., Yankovskiy D.S. et al. Human microflora and the role of modern probiotics in its regulation // Zdorovye zhenshiny. – 2004. – N 1 (17). – P. 134–139. (in Russian)
3. Бухарова Е.В., Попкова С.М., Ракова Е.Б., Джиоев Ю.П. и др. Детекция некоторых генетических маркеров факторов патогенности в аутоштаммах *Klebsiella spp.* у детей первого года жизни // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – № 2 (96). – С. 58–62.
 Bukharova E.V., Popkova S.M., Rakova E.B., Dzhioev Yu.P. et al. Detection of some genetic markers of pathogenetic factors in *Klebsiella spp.* autostrains in infants // Bjul. VSNC SO RAMN. – 2014. – N 2 (96). – P. 58–62. (in Russian)
4. Варичев А.Н., Соловьёва И.В., Гелашвили Д.Б. Ранговые распределения численности сообществ симбиотических микроорганизмов толстой кишки здоровых и больных людей разных возрастных групп // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – № 2 (3). – С. 34–40.
 Varichev A.N., Solovjova I.V., Gelashvili D.B. Rank-abundance distribution of symbiotic microorganisms biocenosis in the large intestine of healthy and sick people of various age groups // Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. – 2012. – N 2 (3). – P. 34–40. (in Russian)
5. Диагностика, профилактика и лечение дисбактериозов кишечника: Метод. рек. – М., 1991. – 15 с.
 Diagnostics, prevention and treatment of intestinal dysbiosis: guidelines. – Moscow, 1991. – 15 p. (in Russian)
6. Дука Е.Д. Диагностика и коррекция дисбиозов кишечника у детей // Здоровье ребенка. – 2010. – № 2 (23). – С. 47–51.
 Duka E.D. Diagnosis and correction of intestinal dysbiosis in children // Zdorovje rebenka. – 2010. – N 2 (23). – P. 47–51. (in Russian)
7. Иванова Е.И. Формирование патогенного потенциала у аутоштаммов *Escherichia coli* в ассоциативном симбиозе толстой кишки у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 2014. – 22 с.
 Ivanova E.I. Formation of pathogenic potential in *Escherichia coli* autostrains in associative symbiosis of the colon in children with functional disorders of gastrointestinal tract: abstract of dissertation of Candidate of Biological Sciences. – Irkutsk, 2014. – 22 p. (in Russian)
8. Иванова Е.И. Формирование патогенного потенциала у аутоштаммов *Escherichia coli* в ассоциативном симбиозе толстой кишки у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта: дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 2014. – 125 с.
 Ivanova E.I. Formation of pathogenic potential in *Escherichia coli* autostrains in associative symbiosis of the colon in children with functional disorders of gastrointestinal tract: dissertation of Candidate of Biological Sciences. – Irkutsk, 2014. – 125 p. (in Russian)
9. Иванова Е.И., Джиоев Ю.П., Попкова С.М. Детекция генетических детерминант токсинообразования (*stx1, stx2*) у штаммов *Escherichia coli* // Глобализация науки: проблемы и перспективы: матер. междунар. научно-практич. конф. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2014. – Ч. 1. – С. 136–138.
 Ivanova E.I., Dzhioev Yu.P., Popkova S.M. Detection of genetic determinants of toxin production (*stx1, stx2*) in *Escherichia coli* strains // Globalizacija nauki: problemy i perspektivy: mater. mezhhdunar. nauchno-praktich. konf. – Ufa: Publishing Center of Bashkortostan State University, 2014. – Part 1. – P. 136–138. (in Russian)
10. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б. Выявление генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию, у штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2 (90), Ч. 2. – С. 111–114.
 Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Yu.P., Rakova E.B. Identification of pathogenicity genes, coding toxin production, in *Escherichia coli* strains, isolated from intestinal habitat of children // Bjul. VSNC SO RAMN. – 2013. – N 2 (90). – P. 111–114. (in Russian)
11. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б. Определение генетических детерминант патогенности у гемолизирующих *Escherichia coli* // Инфекция и иммунитет. – 2014. – С. 68–69.
 Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Yu.P., Rakova E.B. Determination of genetic determinants of pathogenicity in *Escherichia coli* // Infekcija i immunitet. – 2014. – P. 68–69. (in Russian)
12. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабора, 2009. – Т. 3. – С. 71–141.
 Methods of clinical laboratory tests: A Reference Guide. Clinical microbiology. Bacteriological tests. Mycological research. Parasitological research. Infectious immunodiagnosis. Molecular studies in the diagnosis of infectious diseases / Ed. by V.V. Menshikov. – Moscow: Labora, 2009. – Vol. 3. – P. 71–141. (in Russian)
13. Немченко У.М., Попкова С.М., Горбунова Е.Л., Петрова И.В. и др. Микроэкологический пейзаж кишечного биоценоза у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 5 (81). – С. 89–93.
 Nemchenko U.M., Popkova S.M., Gorbunova E.L., Petrova I.V. et al. Micro-ecological landscape of intestinal

biocenosis in children with functional disorders of gastrointestinal tract // *Bjul. VSNC SO RAMN.* – 2011. – N 5 (81). – P. 89–93. (in Russian)

14. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» // ОСТ 1500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003.

Industry Standard “Treatment Protocol. Intestinal dysbiosis” // OST 1500.11.0004-2003. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 231 as of 09.06.2003. (in Russian)

15. Alfredo G.T., Vazquez-Juarez R.C., Christopher B.T., Garcia-Gallegos J.G. Pathoadaptive mutation that mediates adherence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 // *Infection and immunity.* – 2005. – Vol. 73, N 8. – P. 4766–4776.

16. Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Rey J. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 41, N 4. – P. 1351–1356.

17. Bouguéne C.L., Servin A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens // *FEMS Microbiology Letters.* – 2006. – Vol. 256, Issue 2. – P. 185–194.

18. Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // *Nature Reviews Microbiology.* – 2010. – Vol. 8. – P. 26–38.

19. Gunzburg S.T., Tornieporth N.G., Riley L.W. Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33, N 5. – P. 1375–1377.

20. Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation // *Nature.* – 2000. – Vol. 405. – P. 299–304.

21. Schultsz C., Pool G.J., Ketel R., Wever B. et al. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR // *J. Clin. Microbiol.* – 1994. – Vol. 32, N 10. – P. 2393–2397.

22. Sokurenko E.V., Hasty D.L., Dykhuizen D.E. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens // *Trends Microbiol.* – 1999. – Vol. 7. – P. 191–195.

23. Tornieporth N.G., John J., Salgado K., Jesus P. et al. Differentiation of pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian children by PCR // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33, N 5. – P. 1371–1374.

Сведения об авторах

Иванова Елена Иннокентьевна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; e-mail: ivanova.iem@gmail.com)

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генодиагностики Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Долгих Владимир Валентинович – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, главный врач клиники Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Ракова Елена Борисовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Бухарова Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Information about the authors

Ivanova Elena Innokentievna – Junior Research Officer of the Laboratory of Microecology of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str., 16, Irkutsk, 664003; e-mail: ivanova.iem@gmail.com)

Popkova Sofia Markovna – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Microecology of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Dzhioev Yuri Pavlovich – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Molecular Epidemiology and Gene Diagnostics of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Dolgikh Vladimir Valentinovich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Doctor of Russian Federation, Chief Doctor of the Clinic of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Rakova Elena Borisovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of the Laboratory of Microecology of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Bukharova Ekaterina Vladimirovna – Junior Research Officer of the Laboratory of Microecology of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems