

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-176-4-59-64

Микробиоценоз толстого кишечника и способность к биопленкообразованию штаммов *Klebsiella spp.* у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами

Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Савелькаева М.В., Григорова Е.В., Иванова Е.И., Туник Т.В., Рычкова Л.В.

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

Microbiocenosis of colon and ability to biofilm formation of strains *Klebsiella spp.* in children with functional gastrointestinal disorders

U. M. Nemchenko, E. A. Kungurtseva, M. V. Savelkaeva, E. V. Grigорова, E. I. Ivanova, T. V. Tunik, L. V. Rychkova

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

Для цитирования: Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Савелькаева М.В., Григорова Е.В., Иванова Е.И., Туник Т.В., Рычкова Л.В. Микробиоценоз толстого кишечника и способность к биопленкообразованию штаммов *Klebsiella spp.* у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020;176(4): 59–64. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-176-4-59-64

For citation: Nemchenko U. M., Kungurtseva E. A., Savelkaeva M. V., Grigорова E. V., Ivanova E. I., Tunik T. V., Rychkova L. V. Microbiocenosis of colon and ability to biofilm formation of strains *Klebsiella spp.* in children with functional gastrointestinal disorders. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;176(4): 59–64. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-176-4-59-64

Немченко Ульяна Михайловна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии

Кунгурцева Екатерина Александровна, младший научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии

Савелькаева Марина Владимировна, гастроэнтеролог, врач педиатр высшей категории

Григорова Екатерина Владимировна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии

Иванова Елена Иннокентьевна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии

Тунник Татьяна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии

Рычкова Любовь Владимировна, директор научного центра, профессор РАН, д.м.н.

Ulyana M. Nemchenko, PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology;

ORCID iD: 0000-0002-7656-342

Ekaterina A. Kungurtseva, Junior researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; ORCID iD: 0000-0002-

4535-9397

Marina V. Savelkaeva, gastroenterologist, pediatrician highest category; ORCID iD: 0000-0001-6793-6493

Ekaterina V. Grigорова, PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology;

ORCID iD: 0000-0001-6588-2591

Elena I. Ivanova, PhD of biological Sciences, researcher of the microbiome and microecology; ORCID iD: 0000-0003-4216-8859

Tatiana V. Tunik, Junior researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; ORCID iD: 0000-0002-2355-0289

Lubov V. Rychkova, doctor of Medical Sciences, Professor RAN, director of the research center; ORCID iD: 0000-0003-2910-0737

✉ Corresponding author:

Немченко

Ульяна Михайловна

Ulyana M. Nemchenko

umnemch@mail.ru

Резюме

Цель исследования: установить особенности микробиоценоза толстого кишечника у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами (ФГИР) и проанализировать способность к биопленкообразованию у штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных при исследовании.

Материалы и методы: Материалом для исследования послужили копрологические пробы от 83 детей, разделенных на две группы: первая (n=34) дети до года, вторая (n=49) — дети старше одного года. Изучена способность к биопленкообразованию у 53 штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных в данном исследовании.

Результаты исследования: Установлено, что значимыми факторами в патогенезе развития ФГИР у детей являются дефицитные показатели содержания бифидобактерий, появление штаммов *Escherichia coli* с измененными свойствами и увеличение микробной плотности доминирующих видов условно-патогенных бактерий — *Klebsiella spp.* и *Staphylococcus aureus*. Показано, что клебсиеллы обладали способностью к формированию биопленочных сообществ (48,1% у детей до года и 50,0% у детей старше года). Выявлено, что наличие клебсиелл в кишечнике является значимым фактором риска развития дисбиозов 2–3 степени, а при отсутствии *Klebsiella spp.* в составе кишечного микробиоценоза у детей не зависимо от возраста регистрировались дисбиотические нарушения 1 степени (p<0,05).

Заключение: Персистенция *Klebsiella spp.* с биопленкообразующей способностью имеет значение для сохранения и длительного существования ассоциативного патомикробиоценоза, усугубляющего дисфункции кишечника.

Ключевые слова: дисбиоз кишечника, бактериальные биопленки, степень биопленкообразования, условно-патогенные энтеробактерии, дети

Summary

Objective of the study: to establish the features of large intestine microbiocenosis in children with functional gastrointestinal disorders (FGIDs) and to analyze the biofilm ability of *Klebsiella spp.* strains isolated in the study.

Materials and methods: the coprological tests from 83 children, divided into two groups: The first group (n=34) is children under one year, the second group (n=49) is children over one year. The ability of biofilm formation has been studied in 53 strains of *Klebsiella spp.* identified in this study.

Results: It has been identified that significant factors in pathogenesis of FGIR in children are deficiency indices of bifidobacterial content, appearance of modified *Escherichia coli* strains and increase of microbial density of dominant species of opportunistic bacteria — *Klebsiella spp.* and *Staphylococcus aureus*. *Klebsiella* was shown to have the ability to form biofilm communities (48.1% in children under one year old and 50.0% in children over one year old). It is revealed that the presence of *Klebsiella* in the intestine is a significant risk factor for the development of dysbiosis 2–3 degrees, and in the absence of *Klebsiella spp.* as part of the intestinal microbiocenosis in children, regardless of age, dysbiotic disorders of 1 degree ($p < 0,05$) were recorded.

Conclusion: Persistence *Klebsiella spp.* with biofilm formation ability has implications for the conservation and continued existence of associative pathological microbiocenosis that exacerbate bowel dysfunction.

Keywords: intestinal dysbiosis, bacterial biofilms, degree of biofilm formation, opportunistic Enterobacteriaceae, children

Введение

В современных условиях процесс становления нормобиоценозов у детей стал более продолжительным. Даже у практически здоровых детей к 6–7-му дню жизни в большинстве случаев концентрация нормальной микробиоты, особенно в кишечном биотопе, оказывается значительно ниже нормы [1].

Недостаток эубиотической микрофлоры приводит к снижению колонизационной резистентности макроорганизма и способствует пролиферации адгезивных инвазивных условно-патогенных бактерий (УПБ), которые способны проникать в эпителиальные клетки кишечника, реплицироваться внутри макрофагов и формировать биопленку. В биопленке бактерии приобретают качественно новые свойства по сравнению с микробами, находящимися в планктонной (не связанной с образованием биоплёнок) форме [2]. При изменении фенотипа УПБ могут стать патобионтами кишечника, участвуя в синтезе токсических

субстанций и специфических протеаз, повреждая клетки организма хозяина [2,3]. При этом происходит формирование врожденных дисбиозов, часто приобретающих хроническую форму и связанных, по современным представлениям, с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта, а также других органов, включая суставы, кожу, глаза, сосудистую систему, легкие и центральную нервную систему [4,5,6,7,8].

В связи с этим, особую актуальность приобретает поиск связей между наличием функциональных расстройств толстой кишки и устойчивыми дисбиотическими состояниями у детей разного возраста.

Цель исследования: установить особенности микробиоценоза толстого кишечника у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами (ФГИР) и проанализировать способность к биопленкообразованию у штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных при исследовании.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили копрограммы от 83 детей в возрасте от 3 мес. до 11 лет, обратившихся в клинику ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ с ФГИР (Rome IV G5, G6, G7 – дети до четырех лет; Rome IV H1, H2, МКБ-10: K 30 – дети старше четырех лет), а именно: жалобами на периодические боли в животе без четкой связи с приемом пищи, тошноту, эпизоды

рвоты, неустойчивый стул, и направленных на обследование врачом-гастроэнтерологом [9]. В зависимости от возраста дети были разделены на две группы: первая (n=34) дети до года, вторая (n=49) – дети старше одного года. Изучение способности к биопленкообразованию проводили на штаммах *Klebsiella spp.* (n=53), выделенных от детей с ФГИР.

Пациенты не имели в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта и не получали антибактериальные препараты в течение 3 месяцев, предшествующих обследованию.

Бактериологическое исследование фекалий и оценку количественного и качественного состава кишечной микрофлоры толстой кишки проводили в соответствии с Отраслевым Стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника»*. Для выделения и идентификации микроорганизмов использовали селективные питательные среды производства ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии, НИЦФ, Оболенск, Россия; Himedia, India, коммерческие идентификационные тест-системы производства «PLIVA- Lachema Diagnostika», Чехия; Himedia, Индия.

Образование биопленок изучали с помощью определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-ти луночного стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета. Использовали суточную культуру бактерий в планктонной фазе, суспензированную в мясо-пептонном бульоне (МПБ). Стартовая концентрация исследуемых культур доводилась до одной оптической плотности. Тестируемые штаммы инокулировали в лунку планшета в количестве по 150 мкл в трех повторностях. Контролем фона служил стерильный МПБ, так же вносимый в трех повторностях по 150 мкл. Планшеты культивировали во влажной камере в термостате в течение 48-ми часов. По окончании срока инкубации планктонные клетки удаляли из лунок пипетированием, планшет трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. Для детекции накопления биомассы биопленки в лунки добавляли 150 мкл дистиллированной воды и 20,0 мкл 1% генцианвиолета и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Несвязавшийся краситель удаляли путем трехкратной отмывки дистиллированной водой.

Результаты исследования

При оценке изменений количественных и качественных показателей микробиоты кишечника установлено, что у детей с увеличением возраста снижалась частота встречаемости условно-патогенных бактерий – сем. *Enterobacteriaceae* и *S. aureus*, и *E. coli* с атипичными (агрессивными) свойствами. Снижение концентрации бифидофлоры ниже показателей, указанных в Отраслевом Стандарте наблюдалось у детей обеих групп (Табл. 1).

Одним из основных показателей нарушения микробиоценоза кишечника, нуждающимся в коррекции, является увеличение числа УПБ. Нами был проанализирован качественный и количественный состав грамотрицательных микроорганизмов сем. *Enterobacteriaceae*, персистирующих у детей из обозначенных групп сравнения. Выяснено, что наиболее часто у детей встречались бактерии рода

Затем в лунку добавляли 200 мкл 95% этанола для экстракции связанного с биомассой красителя и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм. Все действия для контрольных лунок были аналогичными таковым для опытных образцов. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени пленкообразования. Количественным выражением активности образования биопленок служили значения оптической плотности (ОП), измеряемые на спектрофотометре Multiscan Plus [10].

Коэффициент биопленкообразования (КБП) рассчитывали как отношение A_{492} опыт/ A_{492} контроль (т.е. отношение оптической плотности раствора генцианвиолета, связанного с клетками микроорганизмов, к оптической плотности раствора в контроле) [11]. Результаты интерпретировали следующим образом: при значениях КБП ≤ 2 единиц считали штаммы слабообразующими; при КБП от 2 до 3,99 – штаммы обладали умеренной способностью к образованию биопленки; при КБП от 4 и выше – высокой способностью к образованию биопленки.

Исследование проводилось с соблюдением этических принципов, предъявляемых Хельсинской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, 2013) и выполнено с информированного согласия родителей пациентов.

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ «MS Excel 2007 for Windows 7». Так как по критерию Шапиро-Уилка исследуемые выборки не подчиняются закону нормального распределения, для оценки достоверности различий между двумя группами по уровню какого-либо признака применяли непараметрические критерии: χ^2 , U-критерий Манна-Уитни. Для качественных переменных рассчитывались абсолютные и относительные (процентные) величины (при $p < 0,05$ различия считали статистически значимыми) [12].

Klebsiella (у 79,4% детей до года и 53,0% детей старше года), представители родов *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* встречались у менее 10% обследованных детей обеих групп. При этом все микроорганизмы высевались в диагностически значимой концентрации (10^5 – 10^8 КОЕ/г).

Имеющиеся у семейства *Enterobacteriaceae* различные фимбриальные и нефимбриальные адгезины способствуют адгезии микроорганизмов к слизи и эпителию кишечного тракта, что является ключевым моментом в образовании биопленки, приводя к длительной персистенции УПМ в кишечнике [13].

Данный факт послужил причиной проведения оценки способности к биопленкообразованию у штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных в данном исследовании у детей разного возраста (Табл. 2). Всего

* Отраслевой Стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003:70.

Таблица 1.

Частота обнаружения и численность микроорганизмов в 1 г. фекалий у детей разного возраста

Примечание:

* $U_{эмп} < U_{табл}$ уровень значимости $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни – ↓ снижение показателей статистически значимо между первой и второй группой

Table 1.

Detection frequency and number of microorganisms in 1 g of feces in children of different ages

Note:

* $U_{emp} < U_{table}$, significance level $p < 0.05$ according to the Mann-Whitney criterion – ↓ decrease in indicators is statistically significant between the first and second group

Наименование микроорганизма	Первая группа (n=34)		Вторая группа (n=49)	
	Частота встречаемости %	M±m Ig КОЕ/г	Частота встречаемости %	M±m Ig КОЕ/г
Анаэробные микроорганизмы				
Бифидобактерии	100	7,11±1,66	100	7,16±1,34
Лактобациллы	100	9,30±1,39	100	8,44±1,0
Аэробные микроорганизмы				
<i>E. coli</i> типичные	94,2	6,5±1,94	98,0	6,26±0,37
<i>E. coli</i> атипичные, в т.ч. лактозо-негативные и гемолитические*	41,17	7,08±0,66	20,4 ↓	7,0±0,47
Энтерококки	73,5	6,8±0,4	53,06	5,19±0,56
УПМ сем. <i>Enterobacteriaceae</i> *	94,11	6,25±1,01	69,4 ↓	5,41±0,78
Клостридии	29,4	3,8±1,68	24,8	3,08±1,62
Грибы рода Кандида	8,8	3,3±1,5	8,3	4,66±0,5
Золотистый стафилококк*	44,1	4,53±0,51	14,2 ↓	4,42±0,53

было идентифицировано 53 штамма клебсиелл, 27 штаммов – у детей первой группы и 26 – у детей второй группы. 58,5% выделенных культур относились к виду *K. pneumoniae*, 41,5% – к виду *K. oxytoca*.

Коэффициент БП у аутоштаммов клебсиелл, вегетирующих при дисбиозах кишечника в возрастных группах практически не различался: 51,9% культур у детей до года и 50,0% культур у детей старше одного года обладали слабой способностью к образованию БП, менее 50% проявляли умеренную, и только по одной культуре клебсиелл имели сильную способность образовывать БП (Табл. 2). Межвидовое сравнение (по уровню адсорбции генцианвиолета этанолом) показало, что штаммы *K. pneumoniae* характеризовались более высокой плотностью биопленки по сравнению с *K. oxytoca*

($p < 0,05$), из 50,9% культур, обладающих умеренной и сильной степенью КБП, 65,3% относились к виду *K. pneumoniae*.

Для того чтобы оценить роль адгезивных свойств бактерий в поддержании дисбиозов кишечника была исследована зависимость характера микробиологического нарушений от способности клебсиелл формировать биопленки. Данные были обработаны с помощью критерия χ^2 . Выявлено, что независимо от КБП индикация клебсиелл является значимым фактором риска для развития дисбиотических изменений 2–3 степени ($\chi^2 = 4.71$) (ОСТ). При отсутствии *Klebsiella spp.* в составе кишечного микробиоценоза у детей не зависимо от возраста регистрировались дисбиотические нарушения 1 степени ($\chi^2 = 19.61$, $p < 0,05$).

Таблица 2

Частота встречаемости биопленкообразующей способности у штаммов *Klebsiella spp.* (в %)

Примечание:

КБП – коэффициент биопленкообразования

Table 2

Frequency of biofilm forming ability in strains of *Klebsiella spp.* (at %)

Note:

КБП – biofilm formation coefficient

Частота встречаемости биопленок,%	Первая группа (n=27)	Вторая группа (n=26)
Слабая степень КБП	51,9	50,0
Умеренная степень КБП	44,4	46,2
Сильная степень КБП	3,7	3,8

Обсуждение результатов

Функциональные гастроинтестинальные расстройства у детей в настоящее время широко распространены в России и за рубежом. Дискутируется вопрос о роли нормальной микробиоты человека и участии отдельных видов условно-патогенных микроорганизмов в этиологии и патогенезе ФГИР [14,15,16].

По нашим данным, наиболее значимыми факторами в патогенезе развития ФГИР у детей являются дефицитные показатели содержания бифидобактерий, появление штаммов *E. coli* с измененными свойствами и увеличение микробной плотности доминирующих видов УПМ – *Klebsiella spp.* и *S. aureus*. Несмотря на то, что с возрастом происходило снижение частоты встречаемости этих показателей, нарушения микробиоценоза кишечника сохранялись и не соответствовали нормам, указанным в ОСТ.

В ряде исследований было показано, что увеличение численности отдельных видов УПБ приводит

к их доминированию среди представителей нормальной микробиоты, и может способствовать развитию патологического процесса в организме человека. Фактором, инициирующим приоритетное развитие УПБ, является активное формирование ими микробных сообществ, в том числе биопленок [2]. Отмечается, что коллективный иммунитет патологической биопленки часто практически сводит на нет возможность коррекции дисбиозов с помощью пробиотиков (препаратов живых культур основных микроорганизмов кишечника: бифидобактерий, лактобацилл, энтеробактерий и других). Таким образом, для практической медицины преимущество коллективного реагирования имеет и отрицательную сторону [17].

Проведенный нами спектрофотометрический анализ показал, что персистирующие в течение длительного времени в кишечном микробиоценозе детей клебсиеллы обладали способностью к фор-

мированию биопленочных сообществ. Наиболее высокая плотность биопленок была выявлена у вида *K. pneumoniae*, который преобладал в структуре выделенных штаммов. При этом было установлено, что независимо от выраженности пленкообразования, наличие клебсиелл в кишечнике является значимым

фактором риска развития дисбиозов 2–3 степени, при которых появляется дисбаланс в качественном и количественном соотношении индигенной и условно-патогенной микрофлоры, что приводит к дисфункциям кишечника с расстройствами моторики, секреции ферментов и всасывания [18].

Заключение

Таким образом, при ФГИР у детей разного возраста происходят дисбиотические изменения кишечного биоценоза, связанные с персистенцией таких представителей УПБ, как клебсиеллы с биопленкообразующей способностью. Формирование УПБ биопленки имеет значение для сохранения и длительного существования ассоциативного патомикробиоценоза, поскольку микроорганизмы

в биопленке более устойчивы к действию этиотропных препаратов, клеточных и гуморальных защитных факторов [19]. Необходимо, учитывая современные знания, вести поиск новых лечебно-профилактических препаратов, обладающих способностью эффективно подавлять развитие бактериальных биопленок УПБ, не воздействуя при этом на состояние нормальной микробиоты [20,21].

Литература | References

1. Мельников В.Г., Абрамов В. М., Хлебников В. С., Чикилева И. О. Василенко Р. Н., Косарев И. В., Сакулин В. К., Овинова Г. Р., Захарова И. Н., Киселевский М. В., Запорожец Т. С., Кузнецова Т. А. Восстановление микробного баланса матери как оптимальный путь профилактики врожденного дисбиоза у детей. *Тихоокеанский медицинский журнал*. – 2012. – № 1. – С. 20–22
Melnikov V. G., Abramov V. M., Khlebnikov V. S., Chikileva I. O., Vasilenko R. N., Kosarev I. V., Sakulin V. K., Ovinova G. R., Zakharova I. N., Kiselevsky M. V., Zaporozhets T. S., Kuznetsova T. A. Vosstanovleniye mikrobnogo balansa materi kak optimal'nyy put' profilaktiki vrozhdennogo disbioza u detey [Restoration of mother's microbial balance as optimal way of preventing innate dysbiosis] *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal – Pacific Medical Journal*, 2012, no. 1, pp. 20–22.
2. Бондаренко В.М., Рыбальченко О. В., Орлова О. Г. Бактериальные биопленки условно патогенных бактерий и их подавление пробиотическими лактобациллами. *Лечение и профилактика*. – 2014. – № 2 (10). – С. 28–35
Bondarenko V. M., Rybalchenko O. V., Orlova O. G. Bakterial'nyye bioplenki uslovno patogennykh bakteriy i ikh podavleniye probioticheskimi laktobatsillami [The bacterial biofilms of opportunistic bacteria and their suppression of probiotic lactobacilli]. *Lecheniye i profilaktika – Treatment and prevention*, 2014, no.2 (10), pp. 28–35
3. Buret A.G., Motta J.P., Allain T., Ferraz J., Wallace J.L. Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron? *Journal of biomedical science*, 2019, no. 26(1):1. doi: 10.1186/s12929-018-0495-4
4. Григорова Е.В., Немченко У. М., Иванова Е. И., Шабанова Н. М., Савелькаева М. В., Сердюк Л. В., Белькова Н. Л., Рычкова Л. В., Шолохов Л. Ф. Особенности микробиоценоза толстого кишечника у детей первого года жизни с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта на фоне высокой популяционной плотности бактерий рода *Klebsiella*. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. – 2017. – № 66. – С. 83–88. doi: 10.1186/s12929-018-0495-4
Grigorova E.V., Nemchenko U. M., Ivanova E. I., et al. Features of large intestine microbiocenosis in infants with functional disorders of gastrointestinal tract against high population density of bacteria of the genus *Klebsiella*. *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration*, 2017, no.66, pp.83–88. doi: 10.12737/article_5a24cd3713fea5.15038282 5.
5. Backhed F., Fraser C. M., Ringel Y., Sanders M. E., Sartor R. B., Sherman P. M., Versalovic J., Young V., Finlay B. B. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe*, 2012, no. 12, pp. 611–622. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.012
6. Sartor R.B., Wu G. D. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. *Gastroenterology*, 2017, no.152, pp. 327–329. doi: 10.1053/j.gastro.2016.10.012
7. Sherwin E, Dinan T. G., Cryan J. F. Recent developments in understanding the role of the gut microbiota in brain health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2018, no.1420, pp. 5–25. doi: 10.1111/nyas.13416
8. Sekirov I, Russell S. L., Antunes C. M., Finlay B. B. Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 2010, no. 90, pp. 859–904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009
9. Бельмер С.В., Хавкин А. И., Печкуров Д. В. Функциональные нарушения органов пищеварения у детей. Принципы диагностики и лечения (в свете Римских критериев IV). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 160 с.
Bel'mer S.V., Havkin A. I., Pechkurov D. V. Funkcional'nye narusheniya organov pishchevareniya u detey. Principy diagnostiki i lecheniya (v svete Rimskih kriteriev IV) [Functional disorders of the digestive system in children. Principles of diagnosis and treatment (in the light of Roman criteria IV)]. Moscow. GEOTAR-Media Publ., 2018. 160 p.
10. Анганова Е.В., Савилов Е. Д., Ушкарева О. А., Аблов А. М., Духанина А. В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2014. – № 5(99). – С. 34–37
Anganova E. V., Savilov Y. D., Ushkareva O. A., Ablov A. M., Dukhanina A. V. Sposobnost' patogennykh i uslovno-patogennykh enterobakteriy k formirovaniyu bioplenok [Ability of pathogenic and opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae to the formation of

- biofilms]. Byull. VSNTS SO RAMN – Acta Biomedica Scientifica, 2014, no. 5(99), pp. 34–37
11. Малафеева Э.В., Гульнева М. Ю., Носков С. М., Романов В. А. Формирование биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными у больных с ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2014. – Т. 59. № 11. – С. 53–55
Malafeeva, E. V. Gulneva, M. Yu. Noskov, V. A. Romanov. The formation of biofilms by opportunistic microorganisms isolated from patients with rheumatic. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014, vol.59, no. 11, pp. 53–55.
 12. Савилов Е.Д., Астафьев В. А., Жданова С. Н., Заруднев Е. А. Эпидемиологический анализ: методы статистической обработки материала. – Новосибирск: Наука-Центр, 2011. – 156 с.
Savilov E. D., Astaf'yev V. A., Zhdanova S. N., Zarudnev E. A. Epidemiologicheskii analiz: metody statisticheskoy obrabotki materiala [Epidemiological analysis: methods of statistical processing of the material]. Novosibirsk, Nauka-Tsentr, 2011. 156 p.
 13. *Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L.* Exploring dangerous connections between *Klebsiella pneumoniae* biofilms and healthcare-associated infections. *Pathogens*. 2014, vol.3, no. 3, pp. 720–731. doi:10.3390/pathogens3030720
 14. Ивашкин В.Т., Ивашкин К. В. Микробиом человека в приложении к клинической практике. *Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол*. 2017; 27(6):4–13 doi: 10.22416/1382–4376–2017–27–6–4–13
Ivashkin V. T., Ivashkin K. V. Human microbiome, applied to clinical practice. *Ros z gastroenterol gepatol koloproktol*, 2017; no. 27(6), pp. 4–13 doi: 10.22416/1382–4376–2017–27–6–4–13
 15. *Backhed F, Roswall J., Dahlgren J., Jun Wang.* Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 2015, vol. 17, pp. 690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
 16. *Moles L., Gomez M., Heilig H., Bustos G, Fuentes S, de Vos W, Fernández L, Rodríguez JM, Jiménez E.* Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 2013, vol. 8 (6), no. 28, pp e66986 doi: 10.1371/journal.pone.0066986
 17. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? *Практическая медицина*. – 2011. – № (53). – С. 7–10.
Maltsev S. V., Mansurova G. S. Chto takoye bioplenka? [What is biofilm?]. *Prakticheskaya meditsina – Practical medicin*, 2011, no. 53, pp. 7–10.
 18. Ардатская М.Д., Бельмер С. В., Добрица В. П., Захаренко С. М., Лазебник Л. Б., Минушкин О. Н., Орешко Л. С., Ситкин С. И., Ткаченко Е. И., Суворов А. Н., Хавкин А. И., Шендеров Б. А. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2015. – №5. – С. 13–50.
Ardatskaya M. D., Bel'mer S.V., Dobritsa V. P., et al. Colon dysbacteriosis (dysbiosis): modern state of the problem, comprehensive diagnosis and treatment correction. *Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya*. 2015, vol. 117 (5), pp. 13–50.
 19. Бухарин О. В. Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов при инфекции. *Журн. микробиол.* – 2013. – № 1. – С. 93–97.
Bukharin O. V. Simbioticheskiye vzaimootnosheniya mikroorganizmov pri infektsii [Symbiotic interactions of microorganisms during infection]. *Zhurn. mikrobiol. – Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunologii*, 2013, no.1, pp. 93–97.
 20. Рыбальченко О.В., Бондаренко В. М. Образование биопленок симбиотными представителями микробиоты кишечника как форма существования бактерий. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина*. – 2013. – № 1. – С. 179–186
Rybal'chenko O. V., Bondarenko V. M. Obrazovaniye bioplenok simbiotnymi predstavitel'yami mikrobioty kishchnika kak forma sushchestvovaniya bakteriy [Biofilm formation by symbiotic representatives of gut microbiota as a form of bacteria existence]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Meditsina. – Bulletin of St. Petersburg university. Medicine*, 2013, no.1, pp. 179–186.
 21. Рыбальченко О.В., Орлова О. Г., Ларионов И. В., Потокин И. Л., Черкасова Г. В. Воздействие хитозана на биопленки условно патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas indica*. *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. – 2018. – № 3–2. – С. 27–30. doi:10.31040/2222–8349–2018–2–3–27–30
Rybal'chenko O.V., Orlova O. G., Larionov I. V., Potokin I. L., Cherkasova G. V. Impact of chitosane on biofilms of pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas indica*. *Proceedings of the RAS Ufa Scientific Centre*, 2018, no.3–2, pp. 27–30. doi:10.31040/2222–8349–2018–2–3–27–30