

УДК [612.36-002.12]-085.8

Определение микробной флоры пигментных желчных камней на основе анализа гена 16S рибосомальной РНК

А.К. Ларин¹, П.Л. Щербаков^{2,3}, Л.А. Харитонов³, О.А. Царькова³, К.Т. Момыналиев¹¹ФГУ Научно-исследовательский институт физико-химической медицины,²ФГУ Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии,³ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет)

Investigation of microbial flora of pigment gallstones on the basis of 16S ribosomal RNA gene analysis

A.K. Larin, P.L. Scherbakov, L.A. Kharitonova, O.A. Tsarkova, K.T. Momynaliyev

Цель исследования. Оценка микробной флоры пигментных желчных камней с помощью анализа гена 16S рибосомальной РНК.

Материал и методы. При холецистэктомии у детей, инфицированных *H. pylori*, взято 7 образцов пигментных желчных камней. Для идентификации микроорганизмов использовали метод клональных библиотек. С помощью ПЦР амплифицировали участок гена 16S рибосомальной РНК, осуществляли лигирование, трансформацию *E. coli* и получали библиотеки клонов. Определяли нуклеотидную последовательность фрагмента гена 16S рРНК в не менее чем 100 клонов. Проводили компьютерный анализ полученной информации и устанавливали принадлежность прочитанных нуклеотидных последовательностей тому или иному микроорганизму с помощью базы данных NCBI.

Результаты. В 4 образцах черных пигментных камней бактериальной ДНК не обнаружено. Для 3 образцов коричневых пигментных камней созданы библиотеки фрагментов гена 16S рРНК, определены их последовательности и идентифицированы микроорганизмы, которым они принадлежат.

Заключение. У детей, инфицированных *H. pylori*, этот микроб не является причиной формирования желчных камней.

Ключевые слова: желчные камни, полимеразная цепная реакция, 16S рибосомальная РНК, *Helicobacter pylori*.

Aim of investigation. Investigation of microbial flora of pigment gallstones by analysis of ribosomal 16S RNA gene.

Material and methods. Seven samples of pigment gallstones were obtained at cholecystectomy from children infected by *H. pylori*. DNA amplification method (PCR) was used for identification of microorganisms. Ligation, *E. coli* transformation and creation of clonal libraries were carried out. Nucleotide sequence was determined. Computer analysis of the obtained information was done; belonging of the read nucleotide sequences to certain microorganism by NCBI database was accomplished.

Results. In 4 samples of black pigment stones no bacterial DNA was revealed. In 3 samples of brown pigment stones libraries of 16S rRNA gene fragments were created, their sequences were determined and microorganisms to which they belong were identified.

Conclusion. At children infected by *H. pylori*, this microbe is not the cause of gallstones development.

Key words: gallstones, polymerase chain reaction, 16S ribosomal RNA, *Helicobacter pylori*.

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) — одно из самых распространенных заболеваний. *Пигментные желчные камни* (ПК) встречаются примерно в 12% случаев ЖКБ. *Коричневые ПК* содержат билирубинат кальция, небольшое количество холестерина и всегда пальмитат кальция. Как правило, они локализируются в общем протоке и почти всегда ассоциированы с желчной инфекцией [5, 29, 32]. *Черные ПК* содержат полимеры билирубина, карбонат и/или фосфат кальция, изредка холестерин и никогда не содержат пальмитат кальция. Они обычно обнаруживаются в желчном пузыре и ассоциированы с гемолизом либо повреждением печени и гиперпластическим холециститом [32]. Иногда одновременно наблюдаются черные и коричневые ПК, в большинстве своем находящиеся в общем протоке и всегда ассоциированные с желчной инфекцией. Это говорит о том, что даже если черные и коричневые ПК иногда встречаются вместе, они, тем не менее, имеют значительные различия не только в патогенезе, но и в клинической картине и необходимом лечении.

Бактерии, обитающие в желчных путях, играют значительную роль в патогенезе воспалительных заболеваний желчевыводящей системы печени и формировании желчных камней. В частности, бактериальная инфекция имеет значение в патогенезе коричневых ПК и не играет роли в первичном формировании холестериновых, смешанных или черных ПК. Бактерии, присутствующие в пигментных желчных камнях, чаще вызывают инфекционные заболевания по сравнению с бактериями, обнаруживаемыми в других разновидностях камней [7]. Непосредственно в желчи обнаруживаются такие бактерии, как *E. coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterococcus* [6].

Существуют различные методы определения состава микробиоценоза. До недавнего времени основными являлись бактериологический и микроскопический. Однако далеко не все микроорганизмы могут быть идентифицированы таким образом. Большинство недостатков этих методов (трудоемкость, низкая чувствительность и воспроизводимость результатов, невысокая достоверность и т. д.) лишены подходы, основанные на анализе генов. Среди них наибольшее распространение получил метод амплификации генов-мишеней (ПЦР), но его использование в изучении многообразия микроорганизмов ограничено, так как в ходе одной реакции обычно определяется не более трех микроорганизмов. Между тем полная и достоверная информация о микробиоценозах позволит более адекватно выявлять причины развития патологических состояний.

Для детекции достаточно большого количества видов микроорганизмов используются другие мето-

ды генодиагностики, в частности ДНК-ДНК гибридизация на чипах или определение всех нуклеотидных последовательностей в выделенном образце ДНК. Сегодня на основе анализа гена 16S рРНК ведутся активные исследования микробиоценозов ротовой полости, пищевода, желудка [2, 25, 26], влагалищного эпителия [4, 10, 13, 24, 34, 41]. В России, несмотря на актуальность проблемы, подобных работ пока не проводилось. В настоящей работе нами был использован анализ гена 16S рРНК для оценки микробной флоры желчных камней различной этиологии. Суть метода схематично представлена на рис. 1. Ранее этот метод был использован нами для определения состава микробиоценоза влагалищного эпителия на основе анализа гена 16S рибосомальной РНК [16].

Материал и методы исследования

Сбор образцов

Исследование выполнено на желчных камнях, полученных от 7 детей (6–14 лет), инфицированных *H. pylori*, которым была проведена

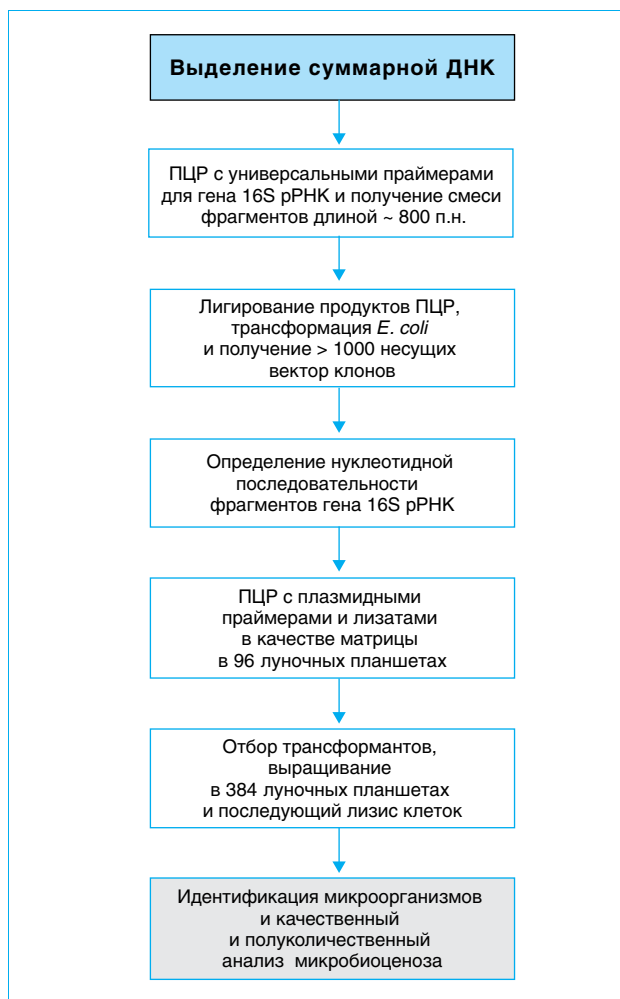


Рис. 1. Схема оценки микробного сообщества с помощью анализа гена 16S рРНК

холецистэктомия в детских больницах г. Москвы. Идентификацию *H. pylori* проводили с помощью гистологического и уреазного тестов. Во всех случаях наличие желчных камней подтверждено ультрасонографией. У всех пациентов была диагностирована желчнокаменная болезнь. Желчные камни отбирались во время операции в стерильный контейнер (см. таблицу).

Возраст пациентов
и природа пигментных желчных камней

Камень	Возраст пациента, лет	Природа камня
1	12	Пигментный коричневый
2	13	»
3	11	»
4	6	Пигментный черный
5	8	»
6	14	»
7	8	»

Выделение ДНК

Камни механически измельчали и выделяли ДНК с помощью набора ХЕЛИКОПОЛ («Литех», Россия) в соответствии с инструкциями производителя за исключением того, что лизис проводили в течение 2 ч при 55 °С.

Амплификация ДНК

Для амплификации исследуемого участка гена 16S рибосомальной РНК (~800 п.н.) использовали универсальные праймеры 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 798R (5'-GGGGTATCTAATCCCC-3'). Реакционная смесь (30 мкл) содержала 75 ммоль/л трис-НСl (рН 8,3), 20 ммоль/л (NH₄)₂SO₄, 2,5 ммоль/л MgCl₂, 0,01% Tween 20, по 0,2 ммоль/л дезоксинуклеозидтрифосфатов (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), по 10 пмоль праймеров и 1 ед. Таq-полимеразы («Литех»). Использовали следующие параметры амплификации: 94 °С — 3 мин, затем 35 циклов: 94 °С — 30 с, 55 °С — 30 с, 72 °С — 60 с. Для амплификации ДНК применялся прибор РТС-225 DNA Engine Tetrad («MJ Research», США).

Создание клональных библиотек

Полученные с помощью универсальных праймеров ампликоны клонировали с помощью набора pGEM®-T Easy Vector System («Promega», США) согласно инструкциям производителя. Для трансформации использовали клетки *E. coli* штамм DH-5α. Клетки рассевали на LB-агар в 22×22 см чашках. На 1 чашке получали 1000–1500 колоний. Клоны, несущие вектор со вставкой, отбирали и переносили в 384-луночные плашки с помощью роботизированной системы QPix-2 («Genetix»,

Англия). Выращенные клетки лизировали в ТЕ-буфере, и полученные лизаты использовали в качестве матрицы для последующей амплификации.

Участок вектора со вставкой амплифицировали с использованием плазмидных праймеров 231 (5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3') и 232 (5'-CAGGAAACAGCTATGA -3') и определяли нуклеотидную последовательность на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3700 (Applied Biosystems), используя наборы BigDye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit согласно протоколам производителя.

Идентификация микроорганизмов по последовательности гена 16S рРНК

Первичный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программы Sequence Scanner v1.0 и Vector NTI 9.0. Полученные последовательности фрагментов 16S рРНК сравнивали между собой с использованием программы множественного выравнивания (multiple alignment) AlignX Vector NTI 9.0 (Informax). Принадлежность каждой группы тому или иному микроорганизму устанавливали с помощью программы BLAST. Таким образом получали список микроорганизмов с максимальной гомологией с определенной 16S рРНК. Достоверным свидетельством того, что фрагмент принадлежит определенному микроорганизму, считали совпадение его нуклеотидной последовательности 16S рРНК с последовательностью 16S рРНК, представленной в банке NCBI, более чем на 97%.

Результаты исследования и их обсуждение

Подбор ПЦР праймеров. Наиболее критическим моментом в представленной схеме (см. рис. 1) является амплификация бактериальной ДНК, так как необходимо подобрать ПЦР праймеры, которые позволяли бы амплифицировать фрагменты ДНК наибольшего количества микробных геномов, т. е. которые не были бы избирательны по отношению к ДНК матрицам. В качестве возможных мишеней для амплификации ДНК бактерий обычно используются нуклеотидные последовательности генов рибосомальных РНК (23S, 16S, межгенная область 16S–23S).

В нашей работе праймеры, использованные для ПЦР реакции, были подобраны из высококонсервативной области 16S рибосомального РНК гена *E. coli*. Ген 16S рРНК содержит ~1600 п.н. Значительную часть гена занимают консервативные области, имеющие практически одинаковый нуклеотидный состав у различных микроорганизмов. Это позволяет подбирать универсальные праймеры для амплификации фрагментов гена различной длины. Ген содержит и видоспецифич-

ные вариабельные участки, определив нуклеотидный состав которых можно идентифицировать микроорганизмы путем сравнения этих последовательностей с аннотированными в базах данных [27, 39]. В настоящее время специализированные базы данных содержат более 300 тыс. аннотированных последовательностей гена 16S рРНК (<http://www.arb-silva.de>).

Нами было протестировано (информационно и экспериментально) большинство опубликованных ПЦР праймеров для указанного гена. Основываясь на этих данных, мы выбрали праймеры 8F и 798R, поскольку эта пара праймеров позволяет получить ПЦР-копию фрагмента 16S рРНК (~800 п.н.) большинства микробных геномов [8, 36, 38]. В Европейской базе данных рибосомальных РНК 8F праймер обозначен как BSF8_20 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/primers/BSF8_20.html), обратный праймер как BSR798/15 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/primers/BSR798_15.html). Подобранные пара праймеров позволяла интерпретировать результаты амплификации выделенной ДНК следующим образом: положительный сигнал ПЦР реакции указывал на наличие бактериальной ДНК, и наоборот.

Анализ бактериальной ДНК в желчных камнях. В 4 черных пигментных камнях с помощью подобранных 16S рРНК праймеров нами не было обнаружено бактериальной ДНК, что свидетельствует об отсутствии микроорганизмов в таких камнях. Для коричневых камней получены библиотеки фрагментов гена 16S рибосомальной РНК, из которых случайным образом были отобраны клоны для определения нуклеотидных последовательностей вставок. Ранее R.W. Нуман и соавт. [13] показали, что достоверность результатов, полученных при анализе 96 случайно отобранных клонов из 1200, составляет ~97% (данные не приведены). Поэтому в нашем исследовании мы анализировали по 96 клонов, полученных при амплификации ДНК из камней. Всего для каждого камня получено по 192 прочитанных нуклеотидных последовательностей длиной по 790 нуклеотидов. В результате проведенной работы в первом образце была обнаружена ДНК микроорганизмов родов *Acidovorax* (27%), *Bradyrhizobium* (21%), *Corynebacterium* (13%), *Brevundimonas* (9%) и др., а также некультивируемых протеобактерий (7%) с гомологией 97–100% (рис. 2). В двух других образцах найдена только *Serratia marcescens*, известная как один из возбудителей нозокомиальных инфекций.

Один из основных вопросов, который может возникнуть при использовании данного метода: насколько частота встречаемости той или бактериальной ДНК в отобранных клонх соответствует ее реальной концентрации в исследуемом образце. Например, если для бактерии А обнаружено 400

соответствующих клонов, а для бактерии Б — 200 клонов в одном образце, то действительно ли концентрация бактерии А в 2 раза больше, чем в бактерии Б? На наш взгляд, это не обязательно, потому что, хотя число обнаруженных клонов и является функцией концентрации бактерии, необходимо учитывать несколько факторов. *Во-первых*, ПЦР праймеры могут полностью не совпадать с присутствующей 16S рибосомальной ДНК матрицей, что, в свою очередь, приведет к снижению эффективности амплификации, особенно при первых циклах ПЦР. В результате для ДНК матрицы, которая присутствует в образце в большом количестве, но последовательность которой не полностью соответствует ПЦР праймерам, выход в реакции будет гораздо меньше, чем для абсолютно гомологичной ДНК матрицы. *Во-вторых*, количество копий 16S рРНК генов в бактериальных геномах может различаться [9, 15]. Предположим, что количество полученных клонов является функцией концентрации ДНК матрицы. Тогда, если геном бактерии А содержит 10 копий рРНК генов, а геном бактерии Б содержит одну копию рРНК, то амплификация эквимольной смеси А и Б даст больше клонов для А, чем для Б (при одинаковой гомологии с ПЦР праймерами). *В-третьих*, в различных работах показано, что статистически достоверные результаты при использовании данной технологии могут быть получены при изменении циклов амплификации ПЦР [3, 37]. Таким образом, с учетом приведенных выше факторов можно предположить, что сравнение числа клонированных нуклеотидных последовательностей является только полуколичественным анализом [13].

В ходе проведенного нами исследования было установлено, что черные желчные камни не содержат бактериальной флоры. В коричневых желчных камнях от детей, инфицированных *H. pylori*, в одном случае была найдена разнообразная бактериальная флора. Причем, если бактериальная

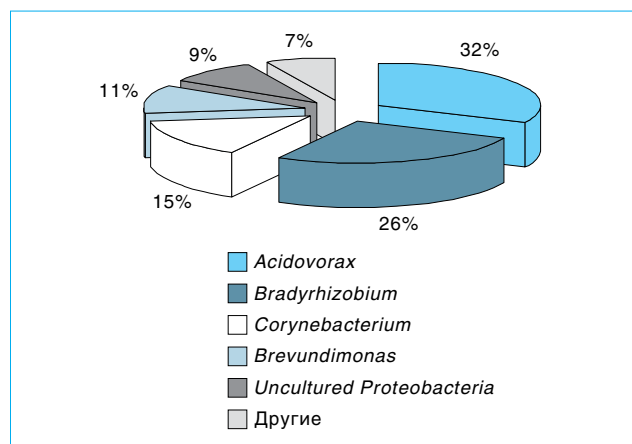


Рис. 2. Распределение ДНК различных родов микроорганизмов в желчном камне № 1

флора в одном желчном камне включала широкий спектр факультативных анаэробов (*Acidovorax* spp), аэробов *Bradyrhizobium*, *Corynebacterium*, *Brevundimonas*, а также некультивируемых протеобактерий, то в двух других камнях она состояла только из *Serratia marcescens*.

До настоящего времени процесс образования желчных камней остается не до конца понятным. Для их формирования *in vivo* требуются годы, что делает достаточно трудным проведение динамического наблюдения от стадии образования ядра камня до стадии его консолидации [30]. Некоторые теории камнеобразования основаны на бактериальном механизме их происхождения, так как многочисленными исследованиями доказано присутствие микроорганизмов в желчи и желчных камнях у больных ЖКБ [14, 17, 18, 22, 31, 35, 40]. С другой стороны, возможно, что микробная флора, которая обнаруживается в желчных камнях, является вторичной, т. е. сформировавшийся желчный камень служит субстратом для колонизации бактерий. С этой точки зрения можно предположить, что если при анализе бактериальной флоры желчных камней выявляются различные ее представители [17, 28, 40], то вероятно в этом случае наличие бактерий обусловлено вторичным инфицированием желчного камня (образец № 1). Если же при анализе обнаруживаются бактерии только одного вида, то можно говорить о бактериальном генезе коричневых желчных камней (образцы № 2 и № 3). Примечательно, что в последних случаях была обнаружена *Serratia marcescens*, известная как один из возбудителей нозокомиальных инфекций. *S. marcescens* — грамтрицательная факультативно анаэробная

бактерия палочковидной формы, являющаяся оппортунистической инфекцией. Однако ранее было показано [33], что *S. marcescens* встречается в желчи пациентов с клиническими признаками заболевания желчного пузыря (лихорадка, желтуха, брюшные боли). То есть в некоторых случаях нельзя исключить этиологическую роль этой бактерии в камнеобразовании.

Следует отметить, что отдельные авторы связывают частоту поражения желчного пузыря не только с длительностью язвенного анамнеза, но и с наличием *H. pylori* [1, 19, 20, 23]. Так, в ряде работ было установлено, что при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки изменяется не только функциональное состояние желчного пузыря, но и качественный состав желчи [11, 12]. При этом по мере увеличения числа обострений язвенной болезни прогрессируют и ультраструктурные признаки патологии желчного пузыря. Кроме того, было показано, что в ДНК смешанной бактериальной популяции желчных камней у взрослых верифицируется ДНК *H. pylori*. Это, по мнению авторов, может указывать либо на то, что этот микроорганизм является необходимой частью флоры желчи, либо что его колонизация в желчном протоке провоцирует образование желчных камней [21].

Заключение

В результате проведенного нами исследования установлено, что у детей, инфицированных *H. pylori*, данный микроб не является причиной образования желчных камней.

Список литературы

1. Abayli B., Colakoglu S., Serin M. et al. *Helicobacter pylori* in the etiology of cholesterol gallstones // J. Clin. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 39, N 2. — P. 134–137.
2. Bik E.M., Eckburg P.B., Gill S.R. et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2006. — Vol. 103, N 3. — P. 732–737.
3. Blaut M., Collins M.D., Welling G.W. et al. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project // Br. J. Nutr. — 2002. — Vol. 87 (suppl 2). — P. 203–211.
4. Burton J.P., Cadieux P.A., Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 69, N 1. — P. 97–101.
5. Cetta F. Bile infection documented as initial event in the pathogenesis of brown pigment biliary stones // Hepatology. — 1986. — Vol. 6, N 3. — P. 482–489.
6. Cetta F. The role of bacteria in pigment gallstone disease // Ann. Surg. — 1991. — Vol. 213, N 4. — P. 315–326.
7. Cetta F., Dharmo A., Malagnino G. et al. Fewer infectious manifestations are induced by bacteria entrapped in cholesterol stones than by bacteria in brown pigment gallstone // J. Gastrointest. Surg. — 2008. — Vol. 12, N 5. — P. 988–990.
8. Edwards U., Rogall T., Blöcker H. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucleic Acids Res. — 1989. — Vol. 17, N 19. — P. 7843–7853.
9. Farrelly V., Rainey F.A., Stackebrandt E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — Vol. 61, N 7. — P. 2798–2801.
10. Ferris M.J., Maszta A., Martin D.H. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42, N 12. — P. 5892–5894.
11. Graham D.Y., Osato M.S. *H. pylori* in the pathogenesis of duodenal ulcer: interaction between duodenal acid load, bile, and *H. pylori* // Am. J. Gastroenterol. — 2000. — Vol. 95, N 1. — P. 87–91.
12. Han S.W., Evans D.G., el-Zaatari F.A. et al. The interaction of pH, bile, and *Helicobacter pylori* may explain duodenal ulcer // Am. J. Gastroenterol. — 1996. — Vol. 91, N 6. — P. 1135–1137.
13. Hyman R.W., Fukushima M., Diamond L. et al. Microbes on the human vaginal epithelium // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2005. — Vol. 102, N 22. — P. 7952–7957.

14. Kawai M., Iwahashi M., Uchiyama K. et al. Gram-positive cocci are associated with the formation of completely pure cholesterol stones // Am. J. Gastroenterol. — 2002. — Vol. 97, N 1. — P. 83–88.
15. Klappenbach J.A., Dunbar J.M., Schmidt T.M. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — Vol. 66, N 4. — P. 1328–1333.
16. Larin A.K., Seleznyova O.V., Momynaliev K.T. A method for identification of vaginal epithelial microflora by the analysis of 16S ribosomal RNA gene // Bull. Exp. Biol. Med. — 2007. — Vol. 144, N 3. — P. 413–415.
17. Lee D.K., Tarr P.I., Haigh W.G., Lee S.P. Bacterial DNA in mixed cholesterol gallstones // Am. J. Gastroenterol. — 1999. — Vol. 94, N 12. — P. 3502–3506.
18. Leung J.W., Liu Y.L., Leung P.S. et al. Expression of bacterial beta-glucuronidase in human bile: an in vitro study // Gastrointest. Endosc. — 2001. — Vol. 54, N 3. — P. 346–350.
19. Maurer K.J., Rogers A.B., Ge Z. et al. *Helicobacter pylori* and cholesterol gallstone formation in C57L/J mice: a prospective study // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. — 2006. — Vol. 290, N 1. — P. 175–182.
20. Misra V., Misra S.P., Dwivedi M. et al. *Helicobacter pylori* in areas of gastric metaplasia in the gallbladder and isolation of *H. pylori* DNA from gallstones // Pathology. — 2007. — Vol. 39, N 4. — P. 419–424.
21. Monstein H.J., Jonsson Y., Zdolsek J., Svanvik J. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in human cholesterol gallstones // Scand. J. Gastroenterol. — 2002. — Vol. 37, N 1. — P. 112–119.
22. Myung S.J., Kim M.H., Shim K.N. et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human biliary tree and its association with hepatolithiasis // Dig. Dis. Sci. — 2000. — Vol. 45, N 7. — P. 1405–1412.
23. Neri V., Margiotta M., de Francesco V. et al. DNA sequences and proteic antigens of *H. pylori* in cholecystic bile and tissue of patients with gallstones // Aliment. Pharmacol. Ther. — 2005. — Vol. 22, N 8. — P. 715–720.
24. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation // J. Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29, N 2. — P. 297–301.
25. Pei Z., Bini E.J., Yang L. et al. Bacterial biota in the human distal esophagus // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2004. — Vol. 101, N 12. — P. 4250–4255.
26. Pei Z., Yang L., Peek R.M. et al. Bacterial biota in reflux esophagitis and Barrett's esophagus // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11, N 46. — P. 7277–7283.
27. Petti C.A., Polage C.R., Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, N 9. — P. 3469–3470.
28. Soloway R.D., Crowther R.S. Bacteria and cholesterol gallstones: molecular biology comes to gallstone pathogenesis // Gastroenterology. — 1995. — Vol. 108, N 3. — P. 934–936.
29. Soloway R.D., Malet P.F. Pigment stones // Bockus Gastroenterology / Ed. J.E. Berk. — 4th ed. Philadelphia: WB Saunders. — 1985. — P. 3510–3517.
30. Swidsinski A., Khilkin M., Pahlig H. et al. Time dependent changes in the concentration and type of bacterial sequences found in cholesterol gallstones // Hepatology. — 1998. — Vol. 27, N 3. — P. 662–665.
31. Swidsinski A., Lee S.P. The role of bacteria in gallstone pathogenesis // Front. Biosci. — 2001. — Vol. 6. — P. 93–103.
32. Trotman B.W., Soloway R.D. Pigment gallstone disease: summary of the National Institutes of Health International Workshop // Hepatology. — 1982. — Vol. 2, N 6. — P. 879–884.
33. Vaishnavi C., Kochhar R., Kaur S., Singh G. Estimation of endotoxin in infected bile from patients with biliary diseases // Trop. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 27, N 1. — P. 22–25.
34. Verhelst R., Verstraeten H., Claeys G. et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis // BMC Microbiol. — 2004. — Vol. 4. — P. 16.
35. Vitetta L., Best S.P., Sali A. Single and multiple cholesterol gallstones and the influence of bacteria // Med. Hypotheses. — 2000. — Vol. 55, N 6. — P. 502–506.
36. Wilmotte A., van der Auwera G., de Wachter R. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis HTF* ('*Mastigocladus laminosus HTF*') strain PCC7518, and phylogenetic analysis // FEBS Lett. — 1993. — Vol. 317. — P. 96–100.
37. Wilson K.H., Blitchington R.B. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis // Appl. Environ. Microbiol. — 1996. — Vol. 62, N 7. — P. 2273–2278.
38. Wilson K.H., Blitchington R.B., Greene R.C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction // J. Clin. Microbiol. — 1990. — Vol. 28, N 9. — P. 1942–1946.
39. Woo P.C., Lau S.K., Teng J.L. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories // Clin. Microbiol. Infect. — 2008. — Vol. 14, N 10. — P. 908–934.
40. Wu X.T., Xiao L.J., Li X.Q., Li J.S. Detection of bacterial DNA from cholesterol gallstones by nested primers polymerase chain reaction // World J. Gastroenterol. — 1998. — Vol. 4, N 3. — P. 234–237.
41. Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G. et al. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods // SGM Microbiol. — 2004. — Vol. 150, N 8. — P. 2565–2573.