

П. В. Федорич

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ВАГИНОЗОМ, В МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЕ МУЖЧИН МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Украинская военно-медицинская академия, г. Киев, Украина

Проведено клинико-лабораторное обследование 30 мужчин, отобранных среди пациентов, обратившихся за специализированной медицинской помощью по поводу хронических воспалений мочеполовой системы в 2012–2014 гг. Использовалась методика полимеразной цепной реакции в реальном времени как наиболее специфическая и чувствительная из современных методик количественного определения микроорганизмов. Применен оригинальный способ взятия биологического материала с целью адаптации диагностикума Фемофлор-16 для количественной детекции анаэробной и микроаэрофильной микрофлоры мочеполовой системы мужчин. Выделение ДНК осуществлялось с помощью экспресс-методики с использованием «Проба Репид». Исследования проводили при помощи амплификатора ДТ-96 согласно модифицированного протокола постановки теста.

У 29 (96,7%) из 30 обследованных мужчин были обнаружены системные (в пределах урогенитального тракта) дисбиотические нарушения. При этом смешанный дисбиоз был обнаружен у 22 (73,4 %) обследованных, анаэробный дисбиоз у 7 (23,3%), нормоценоз у 1 (3,3%). Наиболее стойкой из представленных ассоциаций факультативных анаэробов оказалась *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.*, что составило 33%. Наибольшее количество среди строгих анаэробов насчитывали представители *Eubacterium spp.* (72%). У 50% обследованных мужчин, в клинически значимом количестве определялись микроорганизмы группы *Gard/Pre/Porph. Mobi/Corupe* – обнаружены у 61% пациентов. У 22% обследованных было обнаружены строгие анаэробы из групп *Mega/Veil/Dial* и *Peptostrept.*

Установлено этиологическое значение условнопатогенной, преимущественно анаэробной микрофлоры в развитии воспалительных процессов урогенитального тракта мужчин. Установлена высокая диагностическая чувствительность и специфичность диагностикума Фемофлор-16. Установлено, что применение диагностикума Фемофлор-16 позволяет проводить у мужчин, страдающих воспалительными процессами урогенитального тракта, количественную детекцию микрофлоры, ассоциируемой с бактериальным вагинозом (женщин), что позволяет оценивать соотношение разных компонентов микробиоценоза мочеполовой системы у мужчин как в числовом (логарифмическом) эквиваленте, так и графически. У подавляющего большинства обследованных мужчин, больных урогенитальными инфекциями, обнаружены дисбиотические нарушения в мочеполовой системе разной степени выраженности, которая имела анаэробный и/или смешанный анаэробно-аэробный характер.

**Ключевые слова:** мужчины, бактериальный вагиноз, диагностикум Фемофлор-16, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

P. V. Fedorich

### DEFINITION OF MIKROFLORA ASSOCIATED WITH THE BACTERIAL VAGINOSIS IN URINOGENITAL SYSTEM OF MEN BY THE POLIMERAZNA METHOD OF CHAIN REACTION IN REAL TIME

Examination of 30 men selected among the patients who asked for specialized medical care concerning chronic inflammations of urinogenital system in 2012–2014 is conducted to the kliniko-laboratoyena. The technique of polimerazny chain reaction in real time as the most specific and sensitive of modern techniques of quantitative definition of microorganisms was used.

**Key words:** men, a bacterial vaginosis, Femoflor-16, polimerazny chain reaction in real time.

Многочисленные результаты клинических и лабораторных исследований, проведенных в последнее десятилетие, убедительно доказывают реальную возможность инфицирования уретры мужчин- половых партнеров женщин, больных бактериальным вагинозом (БВ), условно-патогенной влагалищной микрофлорой, которая состоит преимущественно из анаэробных и микроаэрофильных бактерий [5, 7, 13]. У мужчин такую микрофлору принято расценивать как транзитную [12].

БВ – инфекционный невоспалительный синдром, связанный с дисбиозом биотопа влагалища, которому присущи повышение концентрации анаэробных (облигатных и факультативных) микроорганизмов и значительное снижение молочнокислых бактерий [5, 16, 18]. Среди микробных агентов, которые играют роль в развитии данной патологии, выделяют *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Dianister*, *Lachnobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Leptotrichia*, *Sneathia*, *Veilonella*, *Candida*, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp. [4, 9, 11, 17, 20].

Транзитная микрофлора (ТМ) мочеполювых органов – это условнопатогенная микрофлора, постоянное присутствие которой не присуща для соответствующей части организма здорового человека. ТМ может вызывать воспалительные процессы в мочеполювых органах и передаваться половым путем лишь при определенных условиях. Именно поэтому, все состояния и заболевания, связанные с наличием ТМ, по литературным данным, рекомендуется рассматривать как инфекционный процесс [3, 8].

Мужская уретра, в отличие от здорового женского влагалища, имеет более щелочную среду, которая является благоприятным фактором для существования и размножения там влагалищной микрофлоры [1]. Однако не все мужчины склонны к заражению влагалищной ТМ. Среди мужчин, инфицированных ТМ, по данным литературы можно четко выделить три основных группы [7]:

- 1) лица, перенесшие в прошлом хламидийную или гонококковую инфекции;
- 2) больные хроническим простатитом;
- 3) лица, злоупотребляющие местной антисептикой для профилактики мочеполювых инфекций.

Носительство ТМ является наиболее распространенным вариантом ее пребывания в мочеполювой системе мужчин и отмечается у 50–70% половых партнеров женщин, больных БВ. При этом происходит колонизация уретры *Gardnerella vaginalis* и другими возбудителями, ассоциируемыми с БВ [19]. Мужчины при этом могут абсолютно ничего не чувствовать субъективно. Но при условии беспорядочной половой жизни, они могут выступать в качестве основного резервуара и распространителей соответствующей микрофлоры среди женщин. Кроме того, у мужчин возбудители, которые ассоциируются с БВ женщин, могут вызывать баланиты, баланопоститы, хронические простатиты, а также быть предпосылкой развития аденомы предстательной железы [13].

На современном этапе развития дерматовенерологии еще нет четкого представления о роли анаэробной и микроаэрофильной микрофлоры, ассоциируемой с БВ, в этиологии и патогенезе инфекций мочеполювой системы у мужчин. По результатам наших предыдущих исследова-

ний супружеских пар, отдельные возбудители, которые ассоциируются с БВ, выявляются преимущественно в произвольных комбинациях, что доказывает возможность неполового пути инфицирования ими. Таким образом, нельзя исключить, что определенная часть мужчин, больных инфекциями, передающимися преимущественно половым путем (ИППП), имеют дисбиоз мочеполювой системы, вызванный анаэробной и/или микроаэрофильной микрофлорой по аналогии с БВ женщин [13].

Обычно выявление ТМ при лабораторном обследовании в мочеполювой системе возможно лишь при условии использования специальных высокоточных диагностических методов [14]. Учитывая важность и актуальность для здоровья человека решения проблемы объективной лабораторной диагностики урогенитальных инфекционных заболеваний, вызванных условнопатогенной микрофлорой, ассоциированной с БВ женщин, возникла неотложная потребность в разработке и внедрении в практическое здравоохранение новых диагностических подходов, которые позволили бы диагностировать такие состояния у пациентов-мужчин.

#### Цель работы

Определение значения микрофлоры, ассоциированной с бактериальным вагинозом, в патогенезе урогенитальных инфекций у мужчин путем количественного ее определения методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

#### Материалы и методы

Нами было проведено клинко-лабораторное обследование 30 мужчин в возрасте от 24 до 46 лет (средний возраст  $35 \pm 3,5$ ), отобранных среди пациентов, обратившихся за специализированной медицинской помощью по поводу хронических воспалений мочеполювой системы в 2012–2014 гг. Для сохранения чистоты эксперимента в опытную группу включались лишь пациенты, которые во время проведения исследования, не имели заболеваний, наличие которых предусматривало бы прием лекарственных средств.

Одним из наиболее ответственных этапов в данной опытной работе является этап взятия биологического материала. Был использован оригинальный способ взятия биологического материала с целью адаптации диагностикума Фемофлор-16 (тест-системы, рассчитанной на проведение диагностики исключительно у женщин) для количественной детекции анаэробной и микроаэрофильной микрофлоры в мочеполювой системе мужчин [10, 12]. Он осуществлялся следующим образом: мужчинам, которые не мочились не менее 2 часов выполнялся массаж предстательной железы. При этом, секрет, который выделяется, должен свободно вытекать из уретры. После чего одноразовым уретральным зондом делали соскоб из уретры с глубины 1,5–2 см. В материале, взятом именно таким образом, одновременно присутствуют и секрет предстательной железы – материал, наиболее информативный относительно содержимого анаэробных микроорганизмов, и уретральные выделения – наиболее перспективный материал относительно детекции гарднерелл, микоплазм и дрожжеподобных грибов рода кандиды, а также большое количество эпителиальных клеток. Кроме того, пациенты перед взятием биологического материала для названного исследования, должны были не менее 2 недель не при-

мать антибиотики, не менее 2 суток воздерживаться от алкоголя и от половой жизни [7].

Опытные образцы регистрировали и помещали в пробирки «Еппендорф», содержащие 1 мл раствора «Проба Репид» производства НПО «ДНК Технология» (Российская Федерация), и хранили в замороженном виде. Исследование проводили при помощи амплификатора ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-технология» (Российская Федерация), согласно модифицированного нами протокола постановки теста.

Для исследования биоценоза мочеполовой системы мужчин использовалась методика ПЦР в реальном времени как наиболее специфическая и чувствительная из современных методик определения микроорганизмов [2], при помощи набора реагентов Фемофлор-16, который включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфическую для всех бактерий (общая бактериальная масса), смесь, специфическую для лактобактерий (*Lactobacillus* spp.) и смеси, специфические для условнопатогенных микроорганизмов. Он предназначен для одно временного проведения 12 тестов, в том числе, контроля взятия материала и общей бактериальной массы, определение позитивных и негативных контрольных образцов и 23 групп микроорганизмов [11]. Комплектация набора реагентов приведена в таблице 1.

Таблица 1. Комплектация набора реагентов диагностикума Фемофлор-16

N	Определяемый показатель
1	Общая бактериальная масса
2	Нормофлора – <i>Lactobacillus</i> spp./ВК
3	<i>Enterobacteriaceae</i>
4	<i>Streptococcus</i> spp.
5	<i>Staphylococcus</i> spp.
6	<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas</i> spp.
7	<i>Eubacterium</i> spp.
8	<i>Sneathia</i> spp./ <i>Leptotrichia</i> spp./ <i>Fusobacterium</i> spp.
9	<i>Megasphaera</i> spp./ <i>Veilonella</i> spp./ <i>Dialister</i> spp.
10	<i>Lachnobacterium</i> spp./ <i>Clostridium</i> spp.
11	<i>Mobiluncus</i> spp./ <i>Corynebacterium</i> spp.
12	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
13	<i>Atopobium vaginae</i>
14	<i>Mycoplasma</i> ( <i>hominis</i> + <i>genitalium</i> )
15	<i>Ureaplasma</i> ( <i>urealyticum</i> + <i>parvum</i> )
16	<i>Candida</i> spp./контроль взятие материала

При исследовании биоценоза уrogenитального тракта определяется количество микроорганизмов в транспортной среде, пропорциональное общей обсемененности соответствующего биотопа. В образцах биологического материала, содержащих геномную ДНК человека, детектирующий амплификатор регистрировал экспонентный рост уровня флуоресценции в соответствующей пробирке. В образцах соскобов из уrogenитального тракта человека, содержащих ДНК условнопатогенных микроорганизмов и лактобактерий, после проведения реакций амплификации детектирующий амплификатор регистрировал экспонентный рост уровня флуоресценции для соответствующего микроорганизма и для общей бактериальной массы [15].

В наборах в формате реального времени в смесь для амплификации введены зонды ДНК, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфического продукта, ДНК-зонд разрушается, что приводит к росту уровня флу-

оресценции, который фиксируется специальными приборами [2].

Назначением набора реагентов диагностикума Фемофлор-16 является количественное определение соответствующей микрофлоры у женщин. Информации относительно способов количественного определения условнопатогенной, преимущественно анаэробной, микрофлоры при помощи метода ПЦР в реальном времени у мужчин найдено не было.

### Результаты исследования

Клинически значимым результатом исследования считалось наличие микроорганизмов определенной группы, которая превышала 1% от общей бактериальной массы. На основании учета полученных результатов лабораторных исследований микробиоценоза мочеполовой системы у мужчин были получены следующие показатели: почти у 95% обследованных обнаружены системные (в пределах уrogenитального тракта) дисбиотические нарушения. Смешанный дисбиоз составил 73,4%, анаэробный дисбиоз – 23,3%, нормоценоз – 3,3% (1 пациент из 30 обследованных). Следовательно, нарушение микробиоценоза мочеполовой системы, вызванного анаэробными микроорганизмами (МО) самими или в сочетании с аэробными МО у мужчин исследованной группы было зарегистрировано у 96,7% лиц.

Таблица 2. Структура микробиоценоза мочеполовой системы у мужчин, обследованных при помощи тест-системы Фемофлор-16

Тип дисбиоза	Абсолютный показатель	Относительный показатель (%)
Нормоценоз	1	3,3
Смешан дисбиоз	22	73,4
Анаэробный дисбиоз	7	23,3
Аэробный дисбиоз	0	0
В целом	30	100

По выявлению отдельных групп МО у мужчин среди факультативных анаэробов преобладают:

- 1) группа *Streptococcus* spp. – 55,5%;
- 2) группа *Staphylococcus* spp. – в 44,4%;
- 3) группа *Enterobacterium* spp. – 22,2% случаев.

Наиболее стойкой из представленных ассоциаций факультативных анаэробов оказалась *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp, что составляет 33%. Наибольшее количество среди строгих анаэробов насчитывают представители *Eubacterium* spp. (72%). У 50% обследованных в клинически значимом количестве выявлялись микроорганизмы группы *Gard/Pre/Porph. Mobi/Coryne* – обнаружены у 61% пациентов. У 22% обследованных обнаружены строгие анаэробы из групп *Mega/Veil/Dial* и *Peptostrept*.

По данным результатов исследования ПЦР в реальном времени наиболее стойкие ассоциации, которые состоят преимущественно из строгих анаэробов, – *Gard/Pre/Porph+Eubacterium* spp., что составило 45% и *Eubacterium* spp. + *Mobi/Coryne*, что составило 39%. Группа *Peptostrept* часто сосуществовала вместе с *Mega/Veil/Dial* (17%) и *Peptostrept* + *Mobi/Coryne* (17%).

Поскольку при индивидуальной оценке показателей Фемофлор – 16 у женщин одной из опорных точек подсчета является процент лактофлоры в общей бактериальной массе, при проведении аналогичного теста с помощью

этого диагностикума у мужчин, мы имеем несколько искаженный результат. Тем не менее, он дает нам возможность понимать приблизительное соотношение разных компонентов микробиоценоза мочеполовой системы у мужчин, как в числовом (логарифмическому) эквиваленте, так и графически.

Таким образом, с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени нами было показано наличие дисбиозів мочеполовой системы разной степени выразительности у подавляющего большинства исследованных мужчин, больных на ИПСШ. Приблизительно 2/3 из них имели смешанный анаэробно-аэробный характер, а 1/3 – анаэробный. Полученные нами результаты свидетельствуют об определенном значении увеличения количества микрофлоры, ассоциируемой с бактериальным вагинозом (женщин) в патогенезе урогенитальных инфекций мужчин. Конкретная роль каждого из компонентов микрофлоры, которую можно исследовать с помощью диагностикума Фемофлор-16, еще нуждается в углубленном специальном исследовании.

### Выводы

1. Установлено этиологическое значение условнопатогенной, преимущественно анаэробной микрофлоры в развитии воспалительных процессов урогенитального тракта мужчин, что нуждается в разработке новых и усовершенствованных методов их диагностики.

2. Установлена высокая диагностическая чувствительность и специфичность диагностикума Фемофлор-16. Результаты количественной детекции анаэробной и микроаэрофильной микрофлоры мочеполовой системы у мужчин при помощи диагностикума Фемофлор-16 свидетельствуют о успешной адаптации этого метода для работы с пациентами-мужчинами, больными инфекционными заболеваниями мочеполовой системы.

3. Установлено, что применение диагностикума Фемофлор-16 позволяет проводить у мужчин, страдающих воспалительными процессами урогенитального тракта, количественную детекцию микрофлоры, ассоциируемой с бактериальным вагинозом (женщин). Соответствующие диагностические исследования на современном этапе являются оригинальными. Их результаты нельзя считать абсолютно корректными, вместе с тем, они позволяют оценивать соотношение разных компонентов микробиоценоза мочеполовой системы у мужчин как в числовом (логарифмическом) эквиваленте, так и графически.

4. У подавляющего большинства обследованных мужчин, больных урогенитальными инфекциями, обнаружены дисбиотические нарушения в мочеполовой системе разной степени выраженности, которая имела анаэробный и/или смешанный анаэробно-аэробный характер. Анализ результатов проведенных исследований указывает на определенное патогенетическое значение увеличения микробиоты, ассоциируемой с бактериальным вагинозом (женщин), в патогенезе урогенитальных инфекций у мужчин.

### Литература

1. Адаскевич, В. П. Инфекции, передаваемые половым путем / В. П. Адаскевич. – М.: Медицинская книга. – 2006. – 425 с.  
 2. Ворошилина, Е. С. Структура дисбиотических нарушений у женщин репродуктивного возраста по результатам исследования методом количественной ПЦР в реальном времени / Е. С. Ворошилина, Л. В. Тумбинская, А. Е. Донников // Молекулярная ди-

агностика – 2010. Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том III. – М. – 2010. – С. 197–200.

3. Дерматологія, венерологія. Підручник / За редакцією В. І. Степаненка. – К.: Д 36 КІМ, 2012. – 848 с., 253 іл.

4. Каминский, В. В. Современный взгляд на проблему лечения бактериального вагиноза / В. В. Каминский, Т. А. Одинокоз, В. В. Суменко. – Мистецтво лікування. – 2007. – № 7. – С. 28–29.

5. Кира, Е. Ф. Бактериальный вагиноз / Е. Ф. Кира // СПб. – 2001. – 40 с.

6. Мавров, І. І. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом / І. І. Мавров, О. П. Белозоров, Л. С. Тацька. – Х.:Факт. – 2000. – 120 с.

7. Мавров, І. І. Половые болезни. / И. И. Мавров – М.: АСТ-ПРЕСС КНИГА, 2002. – 752 с.: ил. – (Медицинская энциклопедия).

8. Переверзев, А. С. Симптомы нижних мочевых путей / А. С. Переверзев, В. А. Козлюк. – Харьков: Факт, 2009. – 431с.: ил.

9. Плахова, К. И. Особенности терапии бактериального вагиноза, ассоциированного с *Atorobium vaginae*, и характеристика выделений из влагалища с использованием ДНК-чипов (клинико-лабораторное исследование) Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, М. 2007.

10. Федорич, П. В. ФЕМОФЛОР-16 – тест-система для етіологічної діагностики бактеріального вагіноза / П. В. Федорич, О. М. Слободянюк, Т. С. Базиль, Ю. В. Бройде, Ю. В. Полшкова // Тези доповідей Наукової конференції молодих вчених Української військово-медичної академії, м. Київ 23–24 квітня. – 2010. – С. 40–41.

11. Федорич, П. В. Проблема бактеріального вагінозу і шляхи її вирішення / П. В. Федорич, О. Ю. Мацас // Therapia. Український медичний вісник. – № 11 (52). – 2010. – С. 18–21.

12. Федорич, П. В. Обґрунтування та апробація оригінального способу взяття біологічного матеріалу з метою адаптації діагностикума Фемофлор-16 для кількісної детекції анаеробної та мікроаерофільної мікрофлори сечостатевої системи чоловіків / Федорич П. В. – Український науково-медичний молодіжний журнал. – 2012. – № 2. – С. 155–158.

13. Федорич, П. В., Примак А. В., Коновалова Т. С. Бактеріальний вагіноз: сучасний погляд на проблему. Рациональна терапія та реабілітаційні заходи щодо способу життя пацієнток / Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2013. – № 3 (50). – С. 86–94.

14. Шипулина, О. Ю. Сравнение ПЦР тест-систем отечественных производителей для диагностики заболеваний, ассоциированных с условно-патогенной флорой / О. Ю. Шипулина, Т. Н. Романюк, Т. С. Скачкова // Молекулярная диагностика – 2010. Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том III. – М. – 2010. – С. 298–306.

15. Ягвдик, Н. З., Сосновский А. Т., Качук М. В., Белугина И. Н. Венерические болезни. Справочник // Минск: «Беларуская навука». – 1998. – 342 с.

16. Amsel, R., Totten P. A., Spiegel C. A., Chen K. C., Eschenbach D., Holmes K.K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations // The American Journal of Medicine, vol. 74, 1983, № 1, P. 14–22.

17. Hillier, S. L. The complexity of microbial diversity in bacterial vaginosis. N Engl J Med. – 2005. – Vol. 353. – P. 1886–1887.

18. Eschenbach, D. A., Hillier S., Critchlow C., Stevens C., DeRouen T., Holmes K. K. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol. – 1988. – Vol. 158. – P. 819–828.

19. Patterson Jennifer L., Stull-Lane Annica, Girerd Philippe H., Jefferson Kimberly K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of Gardnerella vaginalis relative to other bacterialvaginosis-associated anaerobes. Microbiology 2010, 156, 392–399.

20. Turovskiy, Yevgeniy, Sutyak Noll Katia, Chikindas Michael L. The etiology of bacterial vaginosis. J Appl Microbiol. 2011 May ; 110 (5): 1105–1128.

Поступила 30.10.2014 г.