

профилактических прививок РФ. Насущной потребностью времени является широкое внедрение в практику дополнительной бустер иммунизации против коклюша детей в возрасте 6-7 лет перед поступлением в школу и далее в подростковом возрасте. Для защиты от коклюша новорожденных и детей до 6 месяцев жизни необходимо вакцинировать лиц, контактирующих с ними с учетом наибольшей значимости отдельных категорий - потенциальных источников инфекции.

#### **Выводы:**

1. В Свердловской области эпидемический процесс коклюшной инфекции среди детского населения характеризуется высокой активностью с тенденцией к росту заболеваемости, активным вовлечением детей всех возрастных групп и контингентов.

2. Несмотря на высокие показатели охвата профилактическими прививками против коклюша среди детей до 1 года и школьников в реальном времени они наиболее активно вовлекаются в эпидемический процесс.

3. Факторами, поддерживающими активность эпидемического процесса, являются упущенные возможности по своевременности вакцинации в декретированном возрасте и постепенное угасание постпрививочного иммунитета в старших возрастных группах.

4. В современных условиях возникает потребность оптимизации тактики иммунизации против коклюша детей с учетом изменившихся контингентов риска инфекции.

#### **Список литературы:**

1. Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики: сборник тезисов межрегиональной научно-практической конференции с международным участием (17-18 октября 2018 г.). – Екатеринбург: ИД Юника, 2018. – С. 29-32.

2. Иммунопрофилактика-2018: справочник, 13-е издание, расширенное / В.К. Таточенко, Н.А. Озерецковский. Москва: Боргес. - 2018. - 272с.

3. Нерешенные вопросы эпидемиологии коклюша в РФ и новые возможности его вакцинопрофилактики (Резолюция междисциплинарного совещания специалистов) // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2018. - №17(4). - С. 2–6.

4. Тюкавкина С.Ю. Коклюш: эпидемиология, биологические свойства *bordetella pertussis*, принципы лабораторной диагностики и специфической профилактики / С.Ю. Тюкавкина, Г.Г. Харсеева // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2014. - №4. - С. 50–59.

УДК 579.2

**Паначева Е.А., Ворошила Е.С.**

### **ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ *Enterobacteriaceae spp.* и *Enterococcus spp.* В ЭЯКУЛЯТЕ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР И КУЛЬТУРАЛЬНЫМ МЕТОДОМ**

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Уральский государственный медицинский университет  
Екатеринбург, Российская Федерация

**Panacheva E.A, Voroshilina E.S.**

**IDENTIFICATION OF *Enterobacteriaceae spp.* and *Enterococcus spp.* IN SEMEN BY REAL-TIME PCR AND CULTURE-BASED TECHNIQUE**

Department of microbiology, virology and immunology  
Ural state medical university  
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: evgenia.snigireva@yandex.ru

**Аннотация.** Исследовали микроорганизмы группы *Enterobacteriaceae spp.* и *Enterococcus spp.* в образцах эякулята 86 мужчин репродуктивного возраста с помощью количественной ПЦР (Тест Андрофлор) и культурального метода.

**Annotation.** Microorganisms *Enterobacteriaceae spp.* and *Enterococcus spp.* were identified in semen of 86 men by real-time PCR (Androflor kit) and culture-based technique.

**Ключевые слова:** микробиота эякулята, ПЦР-РВ, культуральный метод

**Key words:** semen microbiota, real-time PCR, culture-based technique

**Введение**

Мужское бесплодие в 6-10% случаев обусловлено инфекциями и воспалительными процессами уrogenитального тракта [4]. Установить этиологию патологического процесса бывает особенно сложно в случае простатита по причине отсутствие роста микроорганизмов при культуральном исследовании. В результате возникают сложности с выбором адекватной схемы терапии [1]. Дискутабельным остается вопрос вклада отдельных условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в развитие воспалительных процессов УГТ. Хотя отмечается, что при отсутствии облигатных патогенов такие УПМ как *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis* могут являться триггером развития воспаления в УГТ [3,4]. На сегодняшний день для оценки микробиоты эякулята в клинической практике применяется несколько подходов. Наряду с культуральным исследованием в практику внедрен метод количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) – тест Андрофлор. Этот метод позволяет проводить количественную оценку широкого спектра микроорганизмов в материале УГТ, в том числе трудно культивируемые и некультивируемые.

**Цель исследования** - сравнение частоты выявления бактерий, представителей *Enterobacteriaceae spp.* и *Enterococcus spp.* в образцах эякулята с использованием культурального метода и ПЦР-РВ (тест Андрофлор).

**Материалы и методы исследования**

Для решения поставленной цели в период с января по май 2018 г. были отобраны образцы эякулята 86 мужчин в возрасте от 18-57 лет (средний возраст  $34 \pm 6,7$  года). Пациенты обратились в указанный период в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург) для решения репродуктивных проблем. Критерием исключения из исследования являлось обнаружение облигатных патогенов (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*). Необходимым условием для забора эякулята было соблюдение полового воздержания в течение 3-5 суток до исследования для исключения возможной контаминации материала транзиторной микрофлорой (*Lactobacillus spp.*) партнерши. Сбор эякулята пациенты осуществляли в стерильный контейнер объемом до 60 мл. Культуральное исследование и ПЦР-РВ выполняли одновременно из одной пробы. Культуральное исследование эякулята проводили в микробиологической лаборатории «Кволити Мед» (г. Екатеринбург). Для культурального исследования материал высевали на 5 питательных сред: 5% кровяной агар, обогащенный сывороткой и дрожжевым экстрактом; шоколадный агар, приготовленный на основе кровяного агара; хромогенный агар UriSelect4, агар Сабуро и маннит-солевой агар. Идентификацию полученных колоний микроорганизмов производили методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе VitekMS (BioMerieux, Франция). ПЦР исследование проводили в лаборатории МЦ «Гармония» (г.Екатеринбург). Для проведения ПЦР-РВ 1,0 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 1,0 мл транспортной среды, содержащей муколитик. Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Исследование проводили с использованием набора реагентов «Андрофлор» (Компания «ДНК Технологии») в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) [2]. Расчет доли отдельных видов и групп бактерий проводили относительно суммы всех выявленных в образце микроорганизмов. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2016.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

При культуральном исследовании грамотрицательные факультативно-анаэробные бактерии *Enterobacteriaceae spp.* были выявлены в 14 (16,3%) из 86 образцов. В том числе 4 (28,6%) из 14 образцов в монокультуре. Идентифицировали 3 вида: *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *E.coli*, *Moraxella osloensis*. Количество бактерий в большинстве случаев (3 (75%) из 4) было клинически малозначимым и составляло  $10^2$ – $10^3$  КОЕ/мл [6].

В 10 (71,4%) из 14 образцов энтеробактерии были выявлены в составе смешанной культуры. Так в 6 (60%) из 10 образцов одновременно выявили по 2 микроорганизма (МО). Идентифицировано 5 видов *Enterobacteriaceae spp.*: *E. coli*, *Enterobacter hormaechei* (*E. hormaechei*), *Pseudomonas aeruginosa*, *K. oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*. В одном образце были выявлены исключительно энтеробактерии. В 5 (83,3%) из 6 образцов одновременно

присутствовали грамотрицательные и грамположительные факультативно-анаэробные бактерии (*E. faecalis*, *S. haemolyticus*, *Corynebacterium gluconormum*). В 2 (33,3%) из 6 образцов энтеробактерии преобладали количественно, однако титр был клинически малозначимым. В остальных случаях количество энтеробактерий и грамположительных факультативно-анаэробных бактерий было равным, при этом в 2 образцах количество выделенных видов составило  $10^4$ - $10^6$  КОЕ/мл.

В 3 (30%) из 10 образцов одновременно выделили по 3 МО, среди которых присутствовал как минимум один представитель *Enterobacteriaceae spp.* Сочетания бактерий были следующие: *S. agalactiae*/ *E. coli*/ *C. gluconolyticum*; *Corynebacterium amycolatum*/ *E. hormaechei*/ *E. faecalis* и *E. faecalis* / *E. coli*/ *S. anginosus*. Клинически значимым количеством энтеробактерий было в одном образце, где одновременно выявили *E. hormaechei* и *E. faecalis* в титре  $10^4$  КОЕ/мл. В остальных случаях преобладали грамположительные факультативно-анаэробные микроорганизмы: *S. agalactiae*, *S. anginosus*.

В 1 (10%) из 10 образцов эякулята выделили одновременно 5 МО: *C. gluconormum*/ *E. faecalis* / *S. mitis*/ *S. oralis*/ *E. coli*, где только *E. faecalis* присутствовал в количестве  $10^4$  КОЕ/мл, остальные — менее  $10^4$  КОЕ/мл.

Таким образом, представители семейства *Enterobacteriaceae spp.* при культуральном исследовании были выявлены в 14 (16,3%) из 86 образцов эякулята, при этом в 10 (11,6%) пробах количество бактерий составило  $10^2$ – $10^3$  КОЕ/мл, что расценивают как клинически малозначимое [6].

При культуральном исследовании в 19 (22,1%) из 86 образцов эякулята выявили *E. faecalis*, том числе 8 (42,1%) из 19 образцов — в монокультуре. При этом количество бактерий в половине случаев было клинически малозначимым и составило  $10^2$ - $10^3$  КОЕ/мл. В 11 (57,9%) из 19 случаев *E. faecalis* был выделен в смешанной культуре. Так в 8 (72,7%) из 11 образцов это было сочетание 2 МО, в 2 образцах — 3 МО и в 1 образце — 5 МО. В 5 (62,5%) из 8 образцов эякулята, содержащих 2 МО, *E. faecalis* был выделен в сочетании с грамположительными факультативно-анаэробными бактериями: *C. gluconormum*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. parasanguinius*, при этом только в 1 случае *E. faecalis* преобладал количественно, и титр был клинически значимым. В 3 (37,5%) из 8 образцов *E. faecalis* выделяли совместно с энтеробактериями: *E. coli*, *K. oxytoca*. Только в одном случае при сочетании *E. faecalis*/*K. oxytoca* количество обоих видов составило ( $10^4$  КОЕ/мл). Во всех остальных случаях количество бактерий было клинически малозначимым.

Одновременно 3 МО выделили в 2 (18,2%) из 11 образцов эякулята. В одном случае это было сочетание *C. amycolatum*/ *E. hormaechei*/ *E. faecalis*, где одновременно два вида (*E. faecalis* и *E. hormaechei*) присутствовали в количестве  $10^4$  КОЕ/мл и преобладали в образце. Во втором случае было сочетание *E. faecalis* / *E. coli*/ *S. anginosus*, где *S. anginosus* присутствовал в количестве  $10^6$  КОЕ/мл, остальные бактерии были выделены в клинически малозначимом титре. В 1 (9,1%) из 11 образцов эякулята одновременно выделили 5 МО в следующем сочетании: *C. gluconormum*/ *E. faecalis* / *S. mitis*/ *S.*

*oralis/ E. coli*, где *E. faecalis* присутствовал в количестве  $10^4$  КОЕ/мл, остальные — менее  $10^4$  КОЕ/мл. Таким образом, *E. faecalis* был обнаружен в 19 (22,1%) из 86 образцов эякулята, при этом в 11 (12,8%) пробах количество данного вида было менее  $10^4$  КОЕ/мл.

В 6 (6,9%) из 86 исследуемых образцов эякулята одновременно выявляли *Enterobacteriaceae spp.* и *E. faecalis*, в половине случаев им сопутствовали грамположительные факультативно-анаэробные бактерии. В 3 из 6 проб как минимум один вид из *Enterobacteriaceae spp.* и/или *E. faecalis* присутствовал в количестве  $10^4$  КОЕ/мл и численно преобладал в образце, в остальных пробах их количество было клинически малозначимым.

При исследовании в ПЦР-РВ использование математического алгоритма, рассчитывающего долю каждого из микроорганизмов по отношению к общей бактериальной массе (ОБМ), позволило определить в большинстве образцов численно преобладающую группу бактерий – превышающую в процентном соотношении другие группы. Бактерии группы *Enterobacteriaceae spp.* и *Enterococcus spp.* в связи с особенностями компоновки теста Андрофлор определялись совместно в одной пробирке отдельно от прочих грамположительных и грамотрицательных факультативных анаэробов, но без различения конкретной принадлежности к семейству. Методом ПЦР-РВ группа *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.* выявлена во всех 86 образцах эякулята в количестве – от  $10^2$  до  $10^5$  ГЭ/мл, в 23 (26,7%) из 86 образцов численно преобладала среди других групп микроорганизмов.

При сравнении результатов культурального исследования и ПЦР-РВ было установлено, что количество выявленных бактерий рода *Enterobacteriaceae* и *E. faecalis* по данным культурального исследования совпало с результатами ПЦР-РВ (выявление *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.*) в 8 (9,3%) из 86 образцов, в остальных случаях количества различались в 10-1000 раз в пользу ПЦР-РВ. В 14 пробах «стерильных» по данным культурального исследования пробах с помощью ПЦР-РВ была обнаружена микрофлора. В том числе *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.* были выявлены в 5 (35,7%) из 14 проб. ОБМ в «стерильных» пробах была менее  $10^4$  ГЭ/мл, что может отчасти объяснить отсутствие роста при культуральном исследовании. Таким образом, положительные результаты культурального исследования совпали с результатами ПЦР-РВ в 100% случаев – при получении роста чистой культуры определенного микроорганизма были получены положительные сигналы в соответствующей группе в тесте Андрофлор.

### **Выводы**

Параллельное исследование эякулята посредством ПЦР-РВ и культурального метода позволило оценить преимущества теста Андрофлор для выявления *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.* При использовании культурального метода *Enterobacteriaceae spp.* были выявлены в количестве более  $10^3$  ГЭ/мл в 4,6% образцов эякулята, *E. faecalis* — в 9,3% образцах. С помощью ПЦР-РВ *Enterobacteriaceae spp./Enterococcus spp.* были обнаружены в количестве более  $10^3$  ГЭ/мл в 26,7% образцов.

### Список литературы:

1. Божедомов В.А. Хронический простатит: новая парадигма лечения / В.А. Божедомов // Урология. - 2016. - №36. - С.78-90.
2. Инструкция по применению набора реагентов для исследования микрофлоры уrogenитального тракта мужчин методом ПЦР в режиме реального времени Андрофлор® Андрофлор® Скрин (ООО НПО «ДНК-Технология») // [Электронный ресурс]. URL: <http://www.dna-technology.ru/information/aboutamethod> (дата обращения:10.03.2019).
3. Почерников Д.Г. Сравнительная оценка эффективности лечения хронического бессимптомного простатита (категория IV), обусловленного *Enterococcus spp.* / Д.Г.Почерников, Н.Т. Постовойтенко, А.И. Стрельников. // Эффективная фармакотерапия. – 2017. - №34.
4. Karen S. Sfanos. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development / Srinivasan Yegnasubramanian, William G. Nelson et al. // NATURE REVIEWS, UROLOGY. - 2017.
5. Nickel, J. C. Clinical significance of nontraditional bacterial uropathogens in the management of chronic prostatitis/ J. Xiang // J. Urol. – 2008. - №179. – P.1391–1395.

УДК 579.61

**Полухинских А.Э., Асланова А.В., Катрецкая Г.Г., Быкова Л.П.  
МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ МИКРОФЛОРЫ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ  
ПУТЕЙ У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ**

Кафедра микробиологии и вирусологии  
Пермский государственный медицинский университет имени академика  
Е.А.Вагнера  
Пермь, Российская Федерация

**Polukhinskikh A.E., Aslanova A.V., Katretskaya G.G., Bykova L.P.  
MICROBIAL LANDSCAPE MICROFLORA OF LOWER RESPIRATORY  
WAYS IN HIV-INFECTED PATIENTS**

Department of microbiology and virology  
Perm state medical university named after academician E.A. Wagner  
Perm, Russian Federation

E-mail: POLUHINSKIH.DOC@mail.ru

**Аннотация.** В статье рассмотрена структура и динамика микрофлоры у ВИЧ-инфицированных пациентов, встречающаяся на территории Перми и Пермского края в период с 2014 по 2018 год.

**Annotation.** The article describes the structure and dynamics of microflora in HIV-infected patients, occurring in the territory of Perm and the Perm region in the period from 2014 to 2018.