



Уринарная микробиота, или является ли моча стерильной?



С.П. Пасечников, д.мед.н., профессор, заведующий кафедрой урологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца, заведующий отделом воспалительных заболеваний ГУ «Институт урологии НАМН Украины»

В статье представлен обзор литературы касательно данных, полученных в результате применения новейших технологий при исследовании микрофлоры мочи. Обнаружение микробиоты в образцах мочи женщин и мужчин без клинических признаков инфекционного заболевания мочевыводящих путей обусловило изменение парадигмы стерильности мочи, что стимулировало дальнейшие исследования.

Ключевые слова: стерильность мочи, уринарная микробиота, микробиом, 16sРНК.

Каждая новая информация становится шокирующей для нас, потому что она показывает, как много еще нужно работать над тем, чтобы понять тот мир, который существует внутри нас.

Д. Рэلمان

О симбиозе человека и микроорганизмов известно на протяжении многих столетий. На сегодняшний день установлено, что в человеческом организме обитает около 100 трлн микробов, включая бактерии, вирусы и простейшие. Эта цифра в десять раз превышает число собственных клеток организма человека, массовый эквивалент микрофлоры которого оценивается приблизительно в 2 кг. Совокупность живых микроорганизмов определенной анатомической зоны, системы органов, а также макроорганизма в целом называют термином «микробиота» (синонимы: микробиоценоз, нормальная микрофлора, нормофлора, аутофлора, резидентная микрофлора). Распределение микробов в организме человека весьма неравномерно. Классически выделяют четыре биотопа (места жизни, наибольшего скопления микроорганизмов):

- желудочно-кишечный тракт, особенно толстая кишка – 60%;
- верхние дыхательные пути – 15-16%;
- кожные покровы – 15-20%;
- влагалище женщины – 9-10%.

До недавнего времени моча и мочевыводящие пути здорового человека считались средой, свободной от микроорганизмов. В современной

медицине наличие бактерий в моче отождествляется либо с инфекцией мочевыводящих путей, либо с феноменом, называемым асимптоматической бактериурией. Однако по результатам некоторых недавних исследований [1, 2, 9], в мочевом пузыре женщин, в т. ч. и здоровых, была обнаружена микрофлора – факт, заставляющий усомниться в правомерности существующего представления о стерильности мочи.

Сформировавшаяся парадигма стерильности мочи базируется на методах бактериологического исследования, обязательного в диагностическом алгоритме урологических заболеваний. Вместе с тем технологии по выделению бактериальных культур имеют весьма ограниченное значение, поскольку большая часть микроорганизмов не определяется посредством стандартных лабораторных методов. Стандартный протокол культурального исследования мочи предназначен для быстрого определения некоторых групп известных уропатогенов, в частности наиболее распространенной – *Escherichia coli*. Рутинное бактериологическое исследование не предусматривает выделение бактерий, которые требуют специальных питательных сред, растут медленно, неустойчивы к кислороду или присутствуют в малом количестве



(< 10^3 КОЕ/мл). Подтверждением инфекционной природы заболеваний мочевого тракта считается выявление в порции чисто собранной или полученной катетером мочи у мужчин > 10^4 КОЕ/мл, у женщин > 10^5 КОЕ/мл. Поскольку обычное исследование ограничивает выявление определенных микроорганизмов, клиницисты не имеют возможности выделить новые или ранее недооцененные уропатогены. Это подтверждено появившимися в научной литературе данными о выявлении ранее не культивировавшихся бактерий в моче пациентов с инфекциями мочевых путей [3, 4] и у здоровых лиц [5].

Согласно результатам недавнего исследования российских коллег, проводивших трехкратное бактериологическое исследование мочи у здоровых женщин (n=24) и мужчин (n=28), различные варианты аэробно-анаэробных ассоциаций микроорганизмов обнаружены в 100% случаев. Так, в моче женщин доминировали коагулазоотрицательные стафилококки, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Peptococcus psp.*, *Propionibacterium spp.*; у мужчин – коагулазоотрицательные стафилококки, *Corynebacterium spp.*, *Eubacterium spp.* [6]. Эти данные свидетельствуют об изменении концепции стерильности мочи и необходимости внедрения в клиническую практику новых методов выявления микроорганизмов.

Значительные научные достижения в расширении знаний о бактериальном разнообразии человеческого организма получены в результате 5-летней программы Human Microbiome Project Национального института здоровья США (US National Institutes of Health). В ходе выполнения проекта установлено, что микробиота различных анатомических зон влияет на многогранность человеческого здоровья и заболеваемости.

В настоящее время в отечественной научной среде еще не широко, но уже используется термин «микробиом». По определению Джошуа Ледерберга (Joshua Lederberg), предложившего этот термин в 2001 г., микробиом – это совокупность генов всех микроорганизмов, оказывающих влияние на среду, в которой они существуют. Иными словами, микробиом – это совокупность генов микробиоты.

В исследованиях Human Microbiome Project использовались генные технологии определения последовательности нуклеотидов в ДНК бактерий, которые еще называют секвенированием следующего поколения (от лат. sequentum – последовательность). Для анализа микробного генома наиболее рациональным оказался компонент 16s субъединицы рибосомальной РНК (рРНК), так как он характерен только для бактерий, что дает возможность отделять их генетический материал от прочего.

В 2011 г. Н. Siddiqui, K.S. Jakobsen et al. опубликовали результаты исследования, в котором определялась последовательность 16s рРНК бактерий,

не выявленных культуральными методами, в моче клинически здоровых женщин. Полученные данные продемонстрировали значительное разнообразие микрофлоры, причем в большом количестве определялась последовательность условно-патогенных бактерий [7].

Данные, противоречащие догме о стерильности мочи, получены также при перекрестном исследовании пациентов с нейрогенным мочевым пузырем, имеющих риск бессимптомной бактериурии вследствие периодической катетеризации, и контрольной группы здоровых лиц [8]. Согласно результатам исследования, микробиом в контрольной группе характеризовался преобладанием *Lactobacilla* у женщин и *Corynebacterium* у мужчин.

Серию исследований, подтверждающих наличие бактерий в моче женщин, не имеющих симптоматики инфекций мочевыводящих путей, провели ученые университета Лойола (Чикаго, США). Исследователи сравнивали результаты разных методов выявления бактерий: традиционных (бакпосев, световая микроскопия) и генетических (секвенирование 16s рРНК). Во избежание вульвовагинальной контаминации пробы мочи собирали непосредственно из мочевого пузыря путем катетеризации и надлобковой аспирации. Используя этот подход, авторы установили, что определение последовательности гена 16s рРНК позволяет выявлять у некоторых женщин бактерии, не обнаруженные при культуральном исследовании [9, 10, 11].

Следует отметить, что в настоящее время существует уже целый ряд методик секвенирования следующего поколения, стоимость которых колеблется от 50 до 600 тыс. долл. США, что катастрофически ограничивает применение данного генетического метода даже в научных целях.

Основываясь на результатах собственных исследований, ученые чикагского университета Лойола разработали протокол расширенного культурального исследования мочи (expanded quantitative urine culture), следуя которому возможно выделить и идентифицировать многие микроорганизмы, не определяемые при стандартном культуральном исследовании. Новый метод включает посев в 100 раз больших объемов мочи, использование переменных сред и атмосферных условий, а также удлинение времени инкубации [10]. Применив расширенный метод, исследователи смогли выявить бактерии у 80% пациенток. При этом у большинства из них (48 из 52 случаев, 92%) при стандартном посеве мочи был получен отрицательный результат. Авторы идентифицировали 35 видов бактерий. Чаще всего обнаруживали *Lactobacillus* (15%), *Corynebacterium* (14,2%), *Streptococcus* (11,9%), *Actinomyces* (6,9%) и *Staphylococcus* (6,9%). В ходе исследования был сделан вывод о том, что многие микроорганизмы, геном которых определяется методом секвенирования 16s рРНК, могут быть выделены



с помощью модифицированного культурального метода исследования. Сравнение эффективности расширенного и стандартного протоколов показало ошибочность 90% результатов стандартного посева мочи.

Представляет интерес еще одно исследование, в котором определяли микробиом в моче женщин, проходящих лечение по поводу гиперактивного мочевого пузыря, без клинических признаков исходных инфекций мочевых путей [11]. Наличие бактериальной ДНК выявлялось с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Бактериальная ДНК обнаружена в моче у 38,7% участниц исследования (ПЦР-позитивные). У этих пациенток ($n=60$) исходная частота эпизодов императивного недержания мочи превышала таковую у ПЦР-негативных больных ($5,71 \pm 2,60$ против $4,72 \pm 2,86$; $p=0,004$). Уровень значений количественной ПЦР не влиял ни на тяжесть симптоматики, ни на эффективность лечения. Ученые обратили внимание на то, что бактериологические посева у всех ПЦР-позитивных женщин показали отрицательный результат. Хотя авторы признают, что в исследовании не определялась видовая специфичность микроорганизмов на основании выделения ДНК, его результаты подтверждают существование в мочевых путях бактериальных колоний.

В современных литературных источниках имеется недостаточно сведений об исследованиях микробиома мужского урогенитального тракта. Предположения о влиянии бактериальной колонизации мужской уретры на риск заражения инфекциями, передающимися половым путем (ИППП) были высказаны еще в 1977 г. [12]. Данная гипотеза проверялась с помощью доступных методов бактериологического культивирования. В дальнейшем рядом авторов в образцах уретральных мазков здоровых мужчин, пациентов с хламидийным и нехламидийным негонококковым уретритом обнаруживались различные бактериальные популяции. В 1996 г. M. Willen et al. сообщили о наличии аэробных и анаэробных бактерий в утренней порции мочи здоровых взрослых мужчин [13].

В 2010 г. D.E. Nelson et al. [14] использовали метод секвенирования 16s рРНК и ПЦР, чтобы охарактеризовать микробные сообщества в первой порции утренней мочи (а не в мазках из уретры) в группе сексуально активных взрослых мужчин с высоким риском ИППП. Авторами обнаружены значительные различия бактериальных микробиомов в группах лиц, положительных и отрицательных в отношении ИППП. В моче у мужчин с ИППП преобладали анаэробные бактерии, а также микроорганизмы, требующие специальных условий для культивирования и не обнаруженные с помощью стандартных лабораторных методов.

Знания о существовании микробиоты в мочевых путях — **уринарной микробиоты** — открывает

возможность совершенствования нашего понимания нормы и патологии мочевыводящих путей. Ученым и клиницистам, по-видимому, предстоит пересмотреть свои взгляды относительно этиологии некоторых хорошо известных заболеваний и расстройств уродинамики и приступить к разработке новых подходов к их лечению и профилактики. Освободившись от теперь уже неправильного представления о стерильности мочи, мы сможем установить истинное значение уринарной микробиоты для здоровья человека и развития заболеваний; к примеру, не ограничиваясь инфекциями, получить новые знания о расстройствах нижних мочевых путей, включая, синдромы недержания мочи, гиперактивного и болезненного мочевого пузыря и т. д.

На примере наиболее изученного сегодня и самого представительного биотопа, каким является кишечник, можно констатировать, что нормальная микробиота — это тот первичный неспецифический барьер, лишь после прорыва которого инициируется включение всех последующих неспецифических и специфических факторов защиты макроорганизма. Микрофлора выступает как чуткий индикатор физиологического состояния человека, подверженного воздействию различных факторов.

Под влиянием комплекса знаний о микробиоте уже озвучивается идея о необходимости пересмотра концепции антибиотикотерапии. Ее фундамент — микробная моноэтиологичность и резистентность к антибиотикам монокультуры *in vitro* — не адекватен форме существования микробного сообщества человека в норме и патологии.

Список использованной литературы

1. Wolfe A.J., Brubaker L. «Sterile Urine» and presence of bacteria // *European Urology*, 2015 / www.sciencedirect.com.
2. Lewis D.A., Brown R., Williams J. et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013; 3: 41.
3. Oliver J.D. The viable but nonculturable state in bacteria // *J Microbiol.* 2005; 43 (Spec No): 93-100.
4. Zoetendal E.G., Vaughan E.E., de Vos W.M. A microbial world within us // *Mo. J Microbiol.* 2006; 59 (6): 1639-1650.
5. Anderson M., Bollinger D., Hagler A., Hartwell H., Rivers B., Ward K., Steck T.R. Viable but nonculturable bacteria are present in mouse and human urine specimens // *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42 (2): 753-758.
6. Коган М.И., Набока Ю.Л., Ибишев Х.С., Гудима И.А. Нестерильность мочи здорового человека — новая парадигма в медицине // *Урология*. — 2014. — № 5.
7. Siddiqui H., Nederbragt A.J., Lagesen K. et al. Assessing diversity of the female urine microbiota by high throughput sequencing of 16S rDNA amplicons // *BMC Microbiology* 2011, 11: 244.



8. Fouts D.E., Pieper R., Szpakowski S. et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and meta-proteomics differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury // Journal of Translational Medicine 2012, 10: 174.

9. Wolfe A.J., Toh E., Shibata N. et al. Evidence of Uncultivated Bacteria in the Adult Female Bladder // J Clin Microbiol. 2012 Apr; 50 (4): 1376-83.

10. Hilt E.E., McKinley K., Pearce M.M. et al. Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder // J Clin Microbiol. 2014 Mar; 52 (3): 871-876.

11. Brubaker L., Nager C.W., Richter H.E. et al. Urinary bacteria in adult women with urgency urinary incontinence // Int Urogynecol J. 2014 Sep; 25 (9): 1179-1184.

12. Bowie W.R., Pollock H.M., Forsyth P.S., Floyd J.F., Alexander E.R. et al. Bacteriology of the urethra in normal men and men with nongonococcal urethritis // J Clin Microbiol. 1977; 6: 482-488.

13. Willen M., Holst E., Myhre E.B., Olsson A.M. The bacterial flora of the genitourinary tract in healthy fertile men // Scand. J. Urol Nephrol. 1996; 30: 387-393.

14. Nelson D.E., Van Der Pol B., Dong Q., Revanna K.V., Fan B., Easwaran S. et al. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection // PLoS One 2010; 5 (11): e14116.

Уринарна мікробіота, або чи сеча є стерильною? С.П. Пасечніков

У статті представлено огляд літератури стосовно даних, отриманих в результаті застосування новітніх технологій при дослідженні мікрофлори сечі. Виявлення мікробіоти у зразках сечі жінок і чоловіків без клінічних ознак інфекційного захворювання сечовивідних шляхів зумовило зміну парадигми стерильності сечі, що стимулювало подальші дослідження.

Ключові слова: стерильність сечі, уринарна мікробіота, мікробіом, 16sPHK.

Urinary microbiota, or whether is the urine sterile? S.P. Pasechnikov

The article presents a review of the literature regarding the data obtained as a result of the application of new technologies of the study of the urinary bacterial communities. Detection of microbiota in urine samples of women and men with no clinical symptoms of the urinary tract infection has led to a shift of paradigm of sterile urine stimulating further researchers.

Keywords: sterile urine, urinary microbiota, microbiome, 16sRNA.



ДАЙДЖЕСТ

Анализ крови поможет определить биологический возраст человека

Шведские ученые научились определять биологический возраст человека с помощью анализа крови. Об этом сообщили сотрудники исследовательской группы из Уппсальского университета под руководством Ульфа Гилленстена (Ulf Gyllensten). Ученые объясняют, что на скорость старения влияет множество факторов, например курение или стресс.

Для того чтобы разработать этот тест, авторы изучили данные о концентрациях белков в крови 1000 человек. Они обнаружили, что биологический возраст курильщиков и любителей газированных напитков был больше на 6 лет, а регулярные занятия спортом,

также как и употребление жирной рыбы и кофе, снижали этот показатель, замедляя старение.

Исследователи считают, что понимание того, как те или иные привычки и факторы окружающей среды влияют на биологический возраст, позволит сделать лечение ряда заболеваний более эффективным.

Ученые отмечают, что подобный анализ может также пригодиться и криминалистам — его применение позволит после изучения биологических образцов, обнаруженных на месте преступления, составить своеобразный «портрет» преступника.

По материалам: <http://medportal.ru/>