

# МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕТИПИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Д.С. Кутилин

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

**Резюме.** *Актуальность.* Исследования последних десятилетий показали, что классические методы микробиологии позволяют выявлять лишь незначительную, поддающуюся культивированию, часть микроорганизмов. Одним из современных подходов, позволяющих выявлять широкий спектр бактерий и архей, является разновидность метагеномного анализа, выполняемая путем высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагментов рибосомальных оперонов. Цель данного исследования — метагеномный анализ образцов из урогенитального тракта пациентов с хроническим воспалительным процессом для идентификации патогенов, не выявляемых другими методами. *Методы.* Таксономический анализ бактериального сообщества проводили путем высокопроизводительного секвенирования гипервариабельной области V3–V4 гена 16S рРНК на платформе Illumina HiSeq 3000. *Результаты.* Проведенное исследование позволило выявить таксономическое многообразие микроорганизмов в образцах из урогенитального тракта (выявлено от 197 до 794 различных микроорганизмов, относящихся к домену *Bacteria*), а также установить дифференциальные различия, касающиеся представителей родов *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sedimihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* и *Lactobacillus* из образцов, полученных от больных с хроническими воспалительными процессами и от условно здоровых индивидуумов. *Заключение.* Были обнаружены дифференциальные различия в составе микробиома образцов от больных с хроническими воспалительными процессами и условно здоровых индивидуумов, касающиеся представителей 44 родов, в том числе *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium* и *Lactobacillus*. Наблюдаемые воспалительные процессы в урогенитальном тракте пациентов могут быть ассоциированы с дисбалансом микрофлоры — снижением типичных представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* и увеличением численности представителей родов *Klebsiella* и *Citrobacter*.

**Ключевые слова:** урогенитальный тракт, инфекции, хроническое воспаление, высокопроизводительное секвенирование, 16S рРНК, дискриминантный анализ.

---

**Адрес для переписки:**

Кутилин Денис Сергеевич  
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63,  
ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр  
онкологии МЗ РФ.  
Тел.: 8 951 538-50-39.  
E-mail: k.denees@yandex.ru

**Contacts:**

Denis S. Kutilin  
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don, Liniya 14 str., 63,  
National Medical Research Oncology Center.  
Phone: +7 951 538-50-39.  
E-mail: k.denees@yandex.ru

**Для цитирования:**

Кутилин Д.С. Метагеномный анализ для идентификации возбудителей нетипичных инфекций урогенитального тракта // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 6. С. 1108–1122. doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1713

**Citation:**

Kutilin D.S. Metagenomic analysis to identify the causative agents of atypical urogenital tract infections // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 6, pp. 1108–1122. doi: 10.15789/2220-7619-MAT-1713

## METAGENOMIC ANALYSIS TO IDENTIFY THE CAUSATIVE AGENTS OF ATYPICAL UROGENITAL TRACT INFECTIONS

Kutilin D.S.

National Medical Research Oncology Center, Rostov-on-Don, Russian Federation

**Abstract.** *Background.* Research in recent decades has shown that classical microbiological methods can only detect a small, cultivable portion of microorganisms. One of the modern approaches to detect a wide range of bacteria and archaea is presented as a type of metagenomic analysis performed by high-throughput sequencing of ribosomal operon fragment libraries. Objective is to conduct metagenomic analysis of samples from the urogenital tract of patients with chronic inflammation to identify pathogens not detected by other methods. *Methods.* Taxonomic analysis of the bacterial community was performed by high-throughput sequencing of the V3–V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene by using the Illumina HiSeq 3000 platform. *Results.* The study allowed to identify the taxonomic diversity of microorganisms in samples from the urogenital tract (from 197 to 794 different microorganisms belonging to the *Bacteria* were identified), as well as to establish differential differences concerning members of the genera *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phobormidium*, *Sphing Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* and *Lactobacillus* between samples from patients with chronic inflammation and apparently healthy individuals. *Conclusion.* Differential differences were found in the composition of the microbiome from the samples of patients with chronic inflammation and apparently healthy individuals, concerning members of 44 genera, including *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium* and *Lactobacillus*. The inflammatory processes observed in the patient urogenital tract can be associated with imbalanced microflora such as decreased level of typical members of the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Lactobacillus*, but increased number of members from of the genera *Klebsiella* and *Citrobacter*.

**Key words:** urogenital tract, infections, chronic inflammation, high-throughput sequencing, 16S rRNA, discriminant analysis.

## Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к наиболее частым инфекционным заболеваниям и включают инфекции нижних (инфекции уrogenитального тракта, цистит и простатит) и верхних мочевыводящих путей [14]. Уrogenитальные инфекции — группа заболеваний органов мочеполовой системы, характеризующихся воспалительным процессом и повреждением тканей [14]. Возбудителями таких болезней являются патогенные микроорганизмы, проникающие в органы при незащищенном половом контакте, бытовом заражении, медицинских процедурах и нарушении работы иммунной системы. В литературе представлено множество сведений о влиянии подобных инфекций на развитие злокачественных опухолей мочеполовой системы (например, мочевого пузыря) [14]. Воспаление является основным фактором развития рака, но взаимосвязь между ИМП и развитием злокачественных новообразований исследована мало [4].

Инфекции мочевыводящих путей чаще всего вызывают воспаление мочевого пузыря (цистит) или уретры (уретрит). Хронические воспалительные процессы в мочеиспускательном канале, в том числе в передней уретре, являются основной причиной простатитов и снижения фертильности. Некоторые авторы считают,

что именно уретра чаще всего является входными воротами для поступления инфекции в предстательную железу [3]. Инфекции, проникающие из уретры в репродуктивные органы мужчин, приводят также к эпидидимиту (воспалению придатка яичка) и орхиту (воспалению яичка) [22]. Одним из вариантов воспалительных заболеваний уретры может быть так называемый негонококковый уретрит, характеризующийся уретральными симптомами, включая дизурию и зуд, выделения из уретры, повышение количества полиморфно-ядерных лейкоцитов в уретре. Наиболее частой причиной являются *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* и *Haemophilus influenza*, однако в ряде случаев возбудитель остается неустановленным. К осложнениям негонококкового уретрита относят эпидидимит, стриктуры уретры, простатит и реактивный артрит, а к отдаленным последствиям — рак уретры [27]. Поэтому точный диагноз и раннее лечение имеют решающее значение из-за риска долгосрочных последствий, включая хроническое заболевание [15].

В настоящее время диагноз ИМП в первую очередь основан на наличии симптомов в сочетании с результатами быстрого диагностического теста (нитритные тест-полоски) на наличие бактерий в моче и полуколичественного измерения лейкоцитов в моче. Хотя посев мочи остается золотым стандартом диагнос-

тики ИМП, он требует много времени и позволяет выявлять лишь незначительную часть микроорганизмов, поддающихся культивированию [20].

Исследованиями установлено, что во многих биологических средах присутствуют большие группы микроорганизмов, которые нельзя вырастить в лабораторной культуре. Изучение последовательностей 16S рРНК, которые довольно коротки, часто консервативны в пределах одного вида и, как правило, различаются от вида к виду, показало, что всего лишь 1% видов, обнаруживаемых в образце, принадлежит к числу культивируемых. Одним из современных подходов, позволяющих выявить намного более широкий спектр бактерий и архей, является разновидность метагеномного анализа (раздела молекулярной биологии, в котором изучается генетический материал всех микроорганизмов, находящихся в образце), выполняемая путем высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагментов рибосомальных оперонов [21, 26].

В практике онкоурологов распространены случаи, когда развитие патологии ассоциировано с хроническим инфекционным процессом в анамнезе [4]. При этом очень часто возбудитель инфекции не установлен [21], однако данные из истории болезни пациентов (общий анализ крови (ОАК), общий анализ мочи (ОАМ), биохимия крови, УЗИ, КТ) свидетельствуют об инфекционном процессе.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы стал метагеномный анализ образцов из урогенитального тракта пациентов с хроническим воспалительным процессом для идентификации патогенов, не выявляемых другими методами.

## Материалы и методы

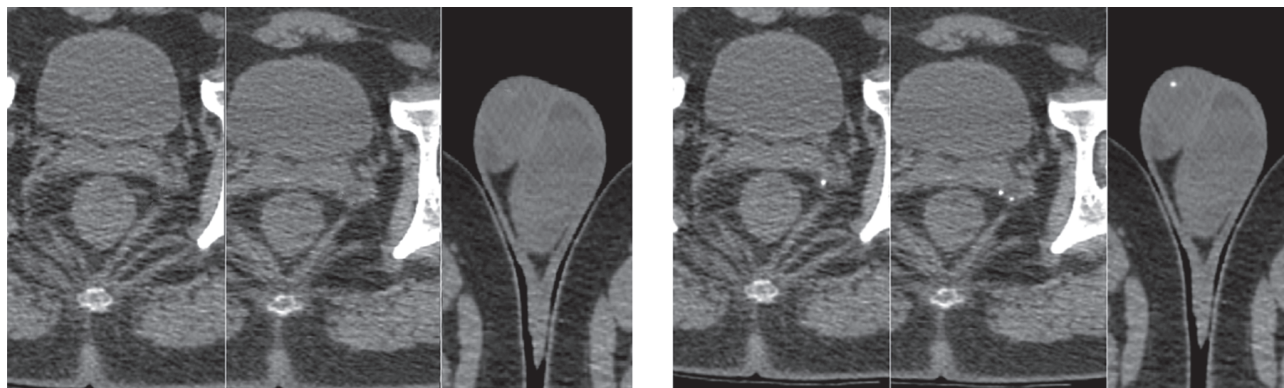
**Пациенты и клиническая картина.** Среди пациентов, обратившихся для профилактического осмотра по поводу онкопатологии предстательной железы в 2018 г., было выбрано 3 интересных клинических случая. В ходе проведенных диагностических мероприятий (ОАК, ОАМ, онкомаркеры, УЗИ, МРТ) у этих пациентов онкопатологии обнаружено не было, выявлена доброкачественная гиперплазия предстательной железы. Пациенты предъявляли жалобы на жжение и дискомфорт в области наружного отверстия мочеиспускательного канала, хронические боли в области мошонки и учащенное мочеиспускание. С этими симптомами все 3 пациента наблюдались у уролога по месту жительства в течение нескольких лет. Из истории болезни были извлечены следующие сведения: у всех пациентов на момент первичного обращения к урологу был повышен уровень лейкоцитов

в моче (> 20 в поле зрения), был проведен ПЦР-скрининг на ИППП (патогенные микроорганизмы не выявлены), всем пациентам дважды было выполнено МРТ малого таза и мошонки, УЗИ простаты, мочевого пузыря и мошонки (у всех выявлены множественные микрокисты и кальцинаты [рис. 1]), выполнены классические микробиологические исследования (микроскопирование и бакпосев: выявлены *Staphylococcus epidermidis* и *Corynebacterium* spp. в клинически незначимом количестве менее  $10^3$  КОЕ/мл, выявлен *E. faecalis*  $10^5$ – $10^8$ ). На основании данных бакпосева и чувствительности *E. faecalis* к антибиотикам урологом была назначена антибактериальная терапия (Амоксиклав). Проведенная антибактериальная терапия не оказала влияние на общую симптоматику, самочувствие пациентов не улучшилось.

Результаты ОАМ и ОАК свидетельствовали о текущем воспалении. В ОАМ (с микроскопией осадка) удельный вес был повышен в образцах всех пациентов (1,037–1,039), так же как и количество лейкоцитов (15–25 клеток в поле зрения), во всех образцах обнаружена слизь. Микроскопическое исследование мазков и осадка мочи выявило наличие кокков у всех пациентов, а также отсутствие спор или мицелия грибов. Образцы мочи и урогенитальных мазков были направлены на повторный бакпосев и ПЦР-анализ инфекций.

Для исследования микрофлоры урогенитального тракта брали соскобы, используя универсальный зонд ЗГУ ЦМ. Для исключения искажений результатов определения состава микрофлоры урогенитального тракта мужчин из-за присутствия транзитной микрофлоры в течение 3 дней перед взятием биоматериала рекомендовали пациентам и условно здоровым индивидуумам воздержаться от половых контактов. Перед взятием биоматериала рекомендовали воздержаться от мочеиспускания в течение 2 ч. Непосредственно перед взятием биоматериала наружное отверстие уретры обрабатывали стерильным тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором. Взятие урогенитальных соскобов проводилось в стерильные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с транспортной средой для ПЦР-исследований. Уретральный зонд вводился в уретру на глубину 2–3 см, затем осторожными вращательными движениями извлекался из нее.

В бакпосеве мочи и мазках обнаружено следующее: пациент 1 — *S. lentus*  $10^4$ , *E. faecalis*  $10^1$ , *S. epidermidis*  $10^7$ , *Corynebacterium* spp.  $10^5$  КОЕ/мл; пациент 2 — *E. faecalis*  $10^2$ , *S. epidermidis*  $10^7$ , *Corynebacterium* spp.  $10^5$  КОЕ/мл; пациент 3 — *S. hominis*  $10^8$ , *E. faecalis*  $10^3$ , *Corynebacterium* spp.  $10^5$  КОЕ/мл. Методом ПЦР патогенных бакте-



**Рисунок 1. Магнитно-резонансная томография (МРТ) малого таза и мошонки пациентов 1, 2 и 3**

Figure 1. Magnetic resonance imaging (MRI) of the pelvis and scrotum in patients 1, 2 and 3

**Примечания.** Слева — через две недели после начала заболевания, справа — через 37 дней после начала заболевания (отчетливо видны включения белого цвета — кальцинаты [патологические скопления солей кальция]).

Notes. Left — two weeks after the onset of the disease, right — 37 days after the onset of the disease (white inclusions are clearly visible depicting calcifications [pathological accumulations of calcium salts]).

рий (*Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*) и грибов (*Candida* spp. (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*), *Cryptococcus* spp.) выявлено не было, во всех образцах были обнаружены *Corynebacterium* spp. и группа *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp. на уровне ниже порогового (клинически не значимо) (тест «Андрофлор» [ДНК-Технология, Россия]). Также проведено комплексное исследование методом ПЦР в реальном времени на наличие вирусных инфекций HTLV (1 и 2 типов), *Adenovirus* spp., вирусов герпеса (HHV-1, -2, -4 (ВЭБ), -5 (ЦМВ), -6 и -8), определение ДНК ВПЧ (вируса папилломы человека) высокого онкогенного риска (тип 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) и *Pegivirus A* (GBV-C). Результаты отрицательные — ни у одного из трех пациентов не была обнаружена ДНК/РНК вирусов.

Контрольную группу составили двое условно здоровых мужчины, у которых были взяты соответствующие мазки и анализы (в ОАМ лейкоцитов < 5, специфические жалобы в анамнезе отсутствуют, результаты теста «Андрофлор» сопоставимы с результатами пациентов).

Возраст пациентов на момент взятия биоматериала: пациент № 1 — 33 года, пациент № 2 — 41 год и пациент № 3 — 35 лет. Возраст условно здоровых мужчины составлял 32 и 34 года. У пациентов и у лиц контрольной группы данные о наличии в анамнезе сахарного диабета отсутствовали.

**Подготовка библиотек и секвенирование.** Для выделения ДНК из образцов был использован набор реактивов «ДНК-сорб-В» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) со-

гласно инструкции производителя. Концентрацию геномной ДНК измеряли при помощи набора Quant-iT dsDNA HS Assay Kit на приборе Qubit Fluorimeter (Invitrogen, США). Качество ДНК определяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Таксономический состав бактериального сообщества устанавливали на основании анализа ампликонных библиотек фрагментов рибосомальных оперонов. Таксономический анализ бактериального сообщества проводили с универсальными праймерами 319F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') на гипервариабельную область V3-V4 гена 16S рРНК, специфичными для широкого круга микроорганизмов, включая бактерии и археи [6, 10, 12]. Все праймеры имели служебные последовательности, содержащие линкеры (необходимые для секвенирования по технологии Illumina), и особую последовательность (индекс), так называемый спейсер гетерогенности (heterogeneity spacers) длиной 12 п.н. [16]. Амплификация фрагментов гена 16S рРНК была проведена с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, представленных в табл. 1.

ПЦР была проведена в 15 мкл реакционной смеси, содержащей 0,5 ед. активности полимеразы Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США), по 5 пкМ прямого и обратного праймеров, 10 нг ДНК-матрицы и 0,2 мМ каждого dNTP (LifeTechnologies, США). Смесь денатурировали при 94°C 1 мин, после чего следовало 35 циклов: 94°C — 30 с, 50°C — 30 с, 72°C — 30 с, далее финальная элонгация при 72°C 3 мин. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле. Фрагменты были элюированы из геля с использованием QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Дальнейшую подготовку библиотек проводили

**Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные для амплификации фрагментов гена 16S рРНК [9]**

Table 1. Primers sequences used for amplification of 16S rRNA gene fragments [9]

Наименование праймера Primer name	Последовательность праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')
<b>319F1</b>	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTAAACTACGGACT CCTACGGGAGGCAGCAG
<b>319F2</b>	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCAGATCCAACACT CCTACGGGAGGCAGCAG
<b>806R1</b>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTAAACTACGGGGAC TACHVGGGTWTCTAAT
<b>806R2</b>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCAGATCCAACGGAC TACHVGGGTWTCTAAT
<b>806R3</b>	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCATCACATAGGGGAC TACHVGGGTWTCTAAT

в соответствии с инструкцией производителя HiSeq Reagent Kit Preparation Guide (Illumina, США). Библиотеки секвенировали в соответствии с инструкцией изготовителя на приборе Illumina HiSeq 3000 (Illumina, США) парно-концевым методом по 150 нуклеотидов с каждого конца. Подготовка библиотек и высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina HiSeq 3000 выполнено в компании ООО «Эльген» (Россия).

**Биоинформационный анализ.** Данные, полученные в результате секвенирования образцов, обрабатывались с использованием пакетов ПО Trimmomatic [7] и QIIME [9]. На первом этапе производился первичный анализ качества прочтения, отбор последовательностей на основе качества чтения отдельных оснований (base pair quality), объединение парноконцевых последовательностей с участком перекрытия не менее 35 оснований (с помощью FLASH), а также удаление последовательностей, длина которых составляет менее 150 п.н. На втором этапе обработки осуществлялось удаление из библиотек всех служебных участков (праймеров), оценка на предмет химер с помощью UCLUST (режим *de novo*) [11] и проверка на наличие контаминации, связанной с *Homo sapiens*, с использованием Bowtie2 [18] (поиск по NCBI Homo sapiens Annotation Release 106 с последующим поиском BLASTN в базе данных GreenGenes 16S (v13.05) для идентификации невыровненных последовательностей, связанных с организмом-хозяином — хостом). Считывания, отнесенные RDP-классификатором [29] к контаминации генетическим материалом митохондрий (minimum confidence — 50%), были удалены.

Таксономическая идентификация последовательностей 16S высокого качества проводилась с помощью баз данных RDP (SILVA, <https://ngs.arb-silva.de>), CosmosID Metagenomics (подход, основанный на kmer и использующий платформу Genbook, [www.cosmosid.com](http://www.cosmosid.com)), KEGG

Pathogen, MicrobeNet (A CDC Virtual Reference Laboratory, <https://microbenet.cdc.gov>) и PATRIC 3.6.8 (Pathosystems Resource Integration Center, <https://www.patricbrc.org>).

Линейный дискриминантный анализ (Linear Discriminant Analysis, LDA) бактериального сообщества в группе пациентов и группе условно здоровых индивидуумов проводили на языке R (функция *lda()* базового пакета MASS). Для построения диаграмм Эдвардса—Венна использовали собственные скрипты (JavaScript).

## Результаты

В результате проведенного секвенирования у пациента № 1 обнаружено 197 различных микроорганизмов, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 13 типам (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Cloacimonetes*, *Planctomycetes*, *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *Cyanobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Saccharibacteria*, *Synergistetes*). Из 197 микроорганизмов только для 38 были установлены названия видов (19,2%). При этом количество этих 38 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 2,2%. В образце преобладали *Bacillus cereus*, *Trabulsisiella farmeri*, *Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Prevotella rumen bacterium rfn2*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putida*, *Prevotella* sp. oral clone ah125, *Prevotella* sp. 152r-1a, *Pseudomonas nitroreducens* и *Veillonella parvula*. Для 97,8% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Наиболее часто встречались представители следующих родов бактерий: *Prevotella* (78,6%), *Veillonella* (9,3%), *Megasphaera* (1,9%), *Dialister* (0,8%), *Pseudomonas* (1,1%), *Clostridium* (0,5%), *Enterococcus* (0,2%) и *Mobiluncus* (0,2%).

У пациента № 2 обнаружено 364 различных микроорганизма, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 11 типам (*Firmicutes*, *Proteobacteria*,

*Bacteroidetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes, Armatimonadetes, Synergistetes, Cyanobacteria, Spirochaetae, Tenericutes*). От состава микробиома предыдущего пациента этот состав отличался отсутствием представителей трех таксономических типов — *Cloacimonetes, Acidobacteria* и *Gemmatimonadetes*. Из 364 микроорганизмов только для 70 (19,2%) были установлены названия видов. При этом количество данных 70 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 3,1%. Наиболее часто встречались *Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Pseudomonas putida, Pseudomonas nitroreducens, S. epidermidis atcc 12228, Bacillus* sp. van12 и *Bacillus cereus*. Для 96,9% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Преобладали бактерии родов *Prevotella* (63,6%), *Dialister* (7,1%), *Veillonella* (7,5%), *Phenylobacterium* (2,1%), *Fingoldia* (3,2%), *Peptoniphilus* (1,2%), *Pseudomonas* (1,9%), *Corynebacterium* (2,5%), *Stenotrophomonas* (0,6%), *Varibaculum* (0,4%), *Megasphaera* (0,4%) и *Mobiluncus* (0,3%).

У пациента № 3 обнаружено 466 различных микроорганизмов, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 10 типам (*Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Synergistetes, Tenericutes, Fibrobacteres, Acidobacteria*). От состава микробиома предыдущего пациента этот состав отличался отсутствием представителей трех таксономических типов — *Chloroflexi, Armatimonadetes* и *Spirochaetae* — и присутствием 2 таксономических типов — *Fibrobacteres* и *Acidobacteria*. Из 466 микроорганизмов только для 100 (21,4%) были установлены названия видов. При этом количество этих 100 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 25,3%. Чаще других определялись *Pseudomonas putida, Pseudomonas nitroreducens, Serratia symbiotica, Enterobacter aerogenes, Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Bacillus cereus atcc 10987, Bacillus cereus, Bradyrhizobium* sp. и *Trabulsilla farmer*. Для 74,7% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Наиболее представленными были следующие рода бактерий: *Pseudomonas* (21,4%), *Phenylobacterium* (20,8%), *Stenotrophomonas* (9,1%), *Veillonella* (4,1%), *Bacillus* (3,9%), *Corynebacterium* (3,7%), *Escherichia* и *Shigella* (2,4%), *Dialister* (2,3%), *Bordetella* (2,2%), *Agrobacterium* (2,0%), *Serratia* (1,9%), *Enterobacter* (1,5%), *Prevotella* (0,7%) и *Megasphaera* (0,1%).

Графически результаты таксономического анализа представлены на рис. 2.

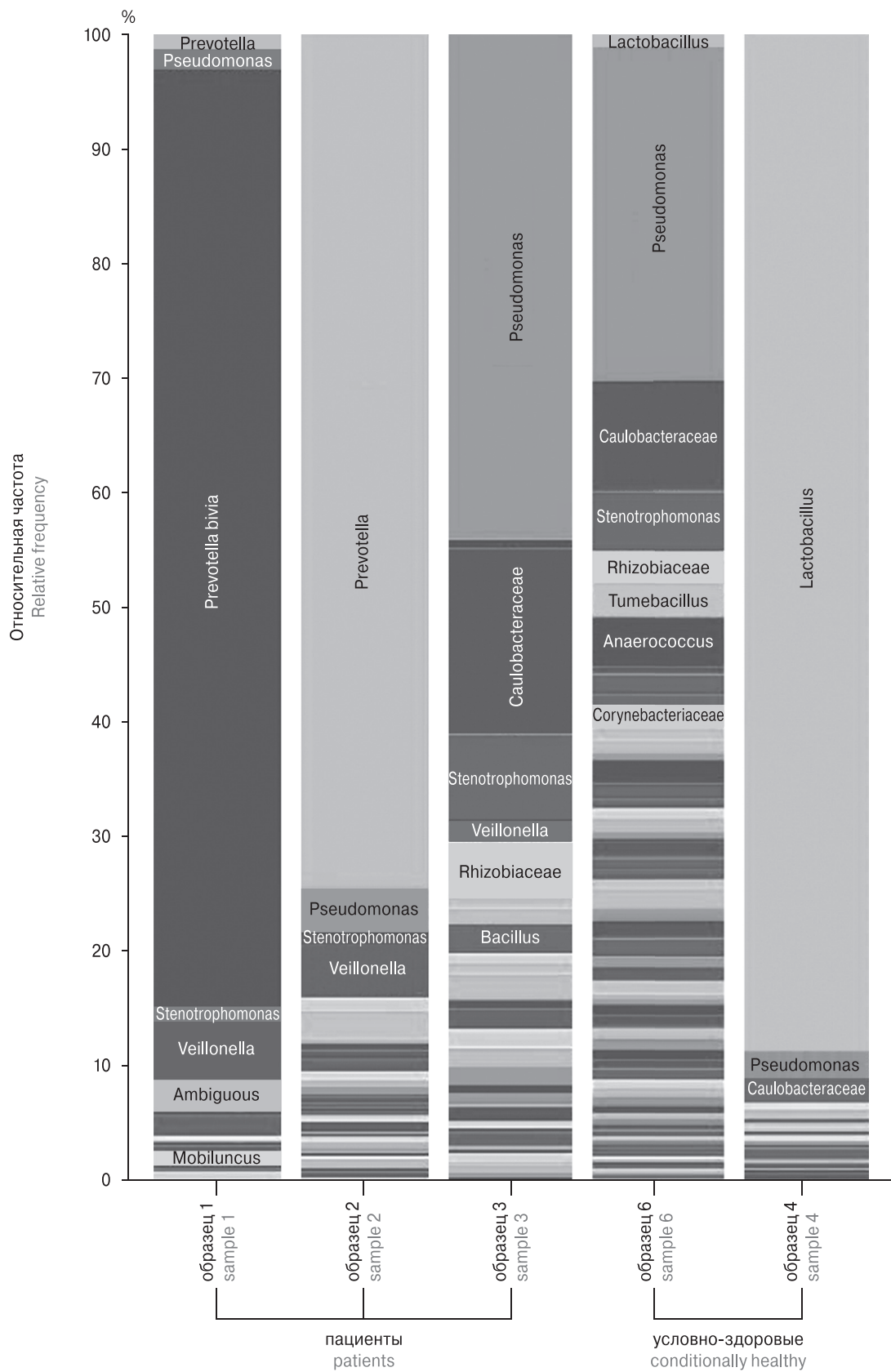
В контрольном образце № 4 обнаружен 331 различных микроорганизм, относящийся к одному домену, *Bacteria*, и 7 типам (*Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes,*

*Bacteroidetes, Cyanobacteria*). Из 331 микроорганизма только для 60 (18,1%) были установлены названия видов. При этом количество этих 60 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 4,2%. Преобладали следующие микроорганизмы: *Pediococcus acidilactici, Pseudomonas nitroreducens, Pseudomonas putida, Lactobacillus delbrueckii, Serratia symbiotica, Enterobacter aerogenes, Lactobacillus* sp. kc45b, *Bacillus* sp. van12, *Lactobacillus reuteri, Lactobacillus psittaci, Bacillus cereus atcc 10987, Bacillus cereus* и *S. epidermidis atcc 12228*. Для 95,8% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Наиболее часто встречались представители родов *Lactobacillus* (85,7%), *Pseudomonas* (1,7%), *Phenylobacterium* (1,5%) и *Stenotrophomonas* (1%) (рис. 2).

В контрольном образце № 6 обнаружено 794 различных микроорганизма, относящихся к одному домену, *Bacteria*, и 16 типам (*Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes, Lentisphaerae, Synergistetes, Gemmatimonadetes, Tenericutes, Nitrospirae, Deinococcus-Thermus, Cyanobacteria, Epsilonbacteraeota, Chloroflexi, Marinimicrobia (sar406 clade), Armatimonadetes*). Из 794 микроорганизмов только для 154 (19,4%) были установлены названия видов. При этом количество этих 154 видов относительно всех обнаруженных микроорганизмов не превышало 27,7%. Преобладали *Pseudomonas putida, Corynebacterium* sp. oral strain a43s, *Lactobacillus iners, Pseudomonas nitroreducens, Streptococcus luteciae, Campylobacter ureolyticus, Streptococcus gordonii, Bacillus* sp. van12 и *Serratia symbiotica*. Для 72,3% микроорганизмов с использованием соответствующих баз данных были установлены только названия родов и семейств. Чаще других встречались представители следующих родов: *Pseudomonas* (14,2%), *Phenylobacterium* (11,8%), *Alicyclobacillus* (6,4%), *Anaerococcus* (6,4%), *Bacillus* (5,8%), *Stenotrophomonas* (5,6%), *Corynebacterium* (5,4%), *Prevotella* (4,7%), *Streptococcus* (4,2%) и *Lactobacillus* (3,6%) (рис. 2).

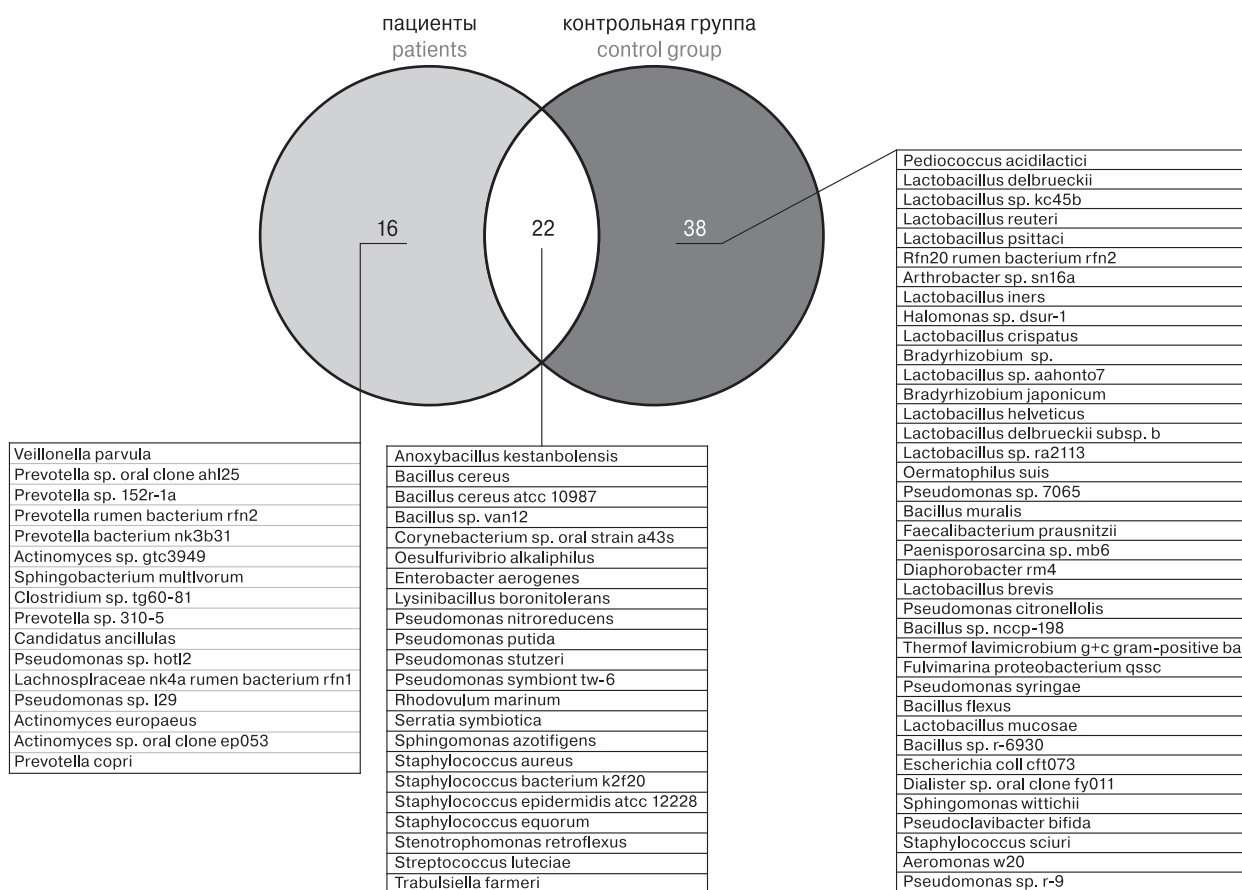
Дифференциальные особенности видового состава микробиома в группе пациентов и контрольной группе представлены на рис. 3.

Поскольку видовой состав в исследованных образцах был установлен только для 18,1–21,4% микроорганизмов, статистический анализ проводили на более высоком таксономическом уровне (род микроорганизма). Дискриминантный анализ между группой пациентов и группой условно здоровых мужчин показал, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) отличается представленность только представителей 3 родов микроорганизмов *Prevotella,*



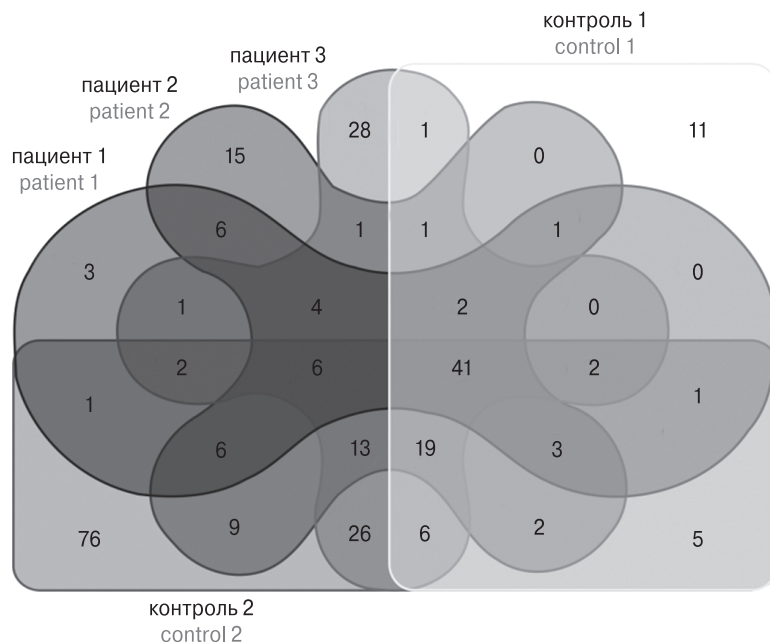
**Рисунок 2. Особенности таксономического состава микробиома уrogenитального тракта у пациентов и контрольной группы**

Figure 2. Features of microbiome taxonomic composition of the urogenital tract in patients and the control group



**Рисунок 3. Видовой состав микробиома урогенитального тракта пациентов и контрольной группы (диаграмма Эдвардса–Венна)**

Figure 3. Species composition of the urogenital tract microbiome in patients and control group (Edwards–Venn diagram)



**Рисунок 4. Отличия в таксономическом составе образцов из урогенитального тракта у пациентов с хронической инфекцией и условно здоровых индивидуумов (таксон — род, диаграмма Эдвардса–Венна)**

Figure 4. Differences in the taxonomic composition of samples from the urogenital tract from patients with chronic infection and apparently healthy individuals (taxon — genus, Edwards–Venn diagram)



*Veillonella* и *Megasphaera*. Квадрат расстояния Махаланобиса для двух сравниваемых групп составил 297,3. При этом дискриминантная функция приняла вид  $DF = 0,001x_1 - 0,0097x_2 - 0,029x_3 + 9,16$ , где  $DF$  — значение дискриминантной функции, значения 0,001, 0,0097 и 0,029 —  $b$ -коэффициенты канонической дискриминантной функции,  $x_{1,2,3}$  — численные значения количества представителей родов *Prevotella*,

*Veillonella* и *Megasphaera* соответственно, а значение 9,16 — константа ( $\chi^2 = 7,18$ ;  $p < 0,05$ ).

При сравнении по родовому составу микробиома обнаружены следующие отличия. В группе пациентов обнаружено представителей родов *Prevotella*, *Veillonella* и *Pedobacter* в 16 раз ( $p < 0,05$ ), в 1448 раз ( $p < 0,05$ ) и в 65 раз больше ( $p = 0,06$ ), чем в контрольной группе. У условно здоровых мужчин в отличие от пациентов не обнаружено

**Таблица 2. Отличия в таксономическом составе образцов из урогенитального тракта у пациентов с хронической инфекцией и условно здоровых индивидуумов**

Table 2. Differences in the taxonomic composition of samples from the urogenital tract of patients with chronic infection and apparently healthy individuals

Род Genus	FC	P P-value	Род Genus	FC	P P-value	Род Genus	FC	P P-value
<i>Prevotella</i>	16,76	0,05	<i>Uliginosibacterium</i>	0,53	0,20	<i>Candidatus</i>	0,67	0,40
<i>Veillonella</i>	1448,50	0,01	<i>Luteimonas</i>	0,84	0,44	<i>Ensifer</i>	1,04	0,49
<i>Pedobacter</i>	65,33	0,06	<i>Sphingomonas sp. qss</i>	0,64	0,39	<i>Rhodoplanes</i>	0,28	0,12
Неизвестный род	0,65	0,07	<i>Brachymonas</i>	1,33	0,43	<i>Lactobacillus</i>	0,00	0,23
<i>Pseudomonas</i>	0,82	0,44	<i>Salinarimonas</i>	0,33	0,12	<i>Lachnospiraceae</i>	1,22	0,43
<i>Dialister</i>	5,08	0,20	<i>Pseudoclavibacter</i>	0,48	0,33	<i>Aquabacterium</i>	2,33	0,25
<i>Clostridium</i>	0,50	0,33	<i>Brenneria</i>	1,04	0,49	<i>Oscillospira</i>	0,49	0,32
<i>Fingoldia</i>	3,28	0,24	<i>Aeromonas</i>	1,25	0,43	<i>Microbacterium</i>	0,96	0,48
<i>Corynebacterium</i>	0,76	0,42	<i>Virgibacillus</i>	1,05	0,49	<i>Promicromonospora</i>	2,76	0,16
<i>Stenotrophomonas</i>	0,82	0,44	<i>Cronobacter</i>	0,86	0,46	<i>Sphingobium</i>	1,33	0,41
<i>Alloprevotella</i>	0,51	0,36	<i>Diaphorobacter</i>	4,89	0,24	<i>Phenylobacterium</i>	0,92	0,47
<i>Alicyclobacillus</i>	0,15	0,26	<i>Blautia</i>	0,67	0,40	<i>Anaerococcus</i>	0,07	0,26
<i>Bacillus</i>	0,39	0,30	<i>Thermoflavimicrobium</i>	0,37	0,13	<i>Alcanivorax</i>	0,43	0,33
<i>Enterococcus</i>	1,04	0,47	<i>Amphritea</i>	1,07	0,48	<i>Brevundimonas</i>	0,24	0,29
<i>Tyzzereella 3</i>	3,11	0,12	<i>Arthrobacter</i>	0,04	0,18	<i>Lautropia</i>	1,17	0,45
<i>Ruminococcaceae ucg</i>	0,43	0,32	<i>Undibacterium</i>	2,33	0,32	<i>Mesorhizobium</i>	0,85	0,44
<i>Enterobacter</i>	1,25	0,42	<i>Anaerospira</i>	0,67	0,40	<i>Neptunomonas</i>	6,00	0,15
<i>Gallicola</i>	8,00	0,17	<i>Tolomonas</i>	0,36	0,22	<i>Paenisporosarcina</i>	0,05	0,25
<i>Bd2-13</i>	0,80	0,43	<i>Peredibacter</i>	0,36	0,32	<i>Prevotellaceae ucg-0</i>	0,10	0,27
<i>Peptoniphilus</i>	5,56	0,24	<i>Epulopiscium</i>	0,44	0,34	<i>Actinomycetospora</i>	0,67	0,40
<i>Ochrobactrum</i>	1,03	0,49	<i>Anaerofustis</i>	7,20	0,15	<i>Acinetobacter</i>	0,32	0,26
<i>Staphylococcus</i>	0,60	0,30	<i>Streptococcus</i>	0,01	0,25	<i>Gordonia</i>	0,80	0,44
<i>Trabulsiella</i>	1,11	0,46	<i>Yrc22</i>	70,00	0,21	<i>Shewanella</i>	1,11	0,47
<i>Solibacillus</i>	0,89	0,45	<i>Lysinibacillus</i>	1,12	0,46	<i>Janibacter</i>	1,11	0,47
<i>Serratia</i>	1,00	0,50	<i>Agrobacterium</i>	0,94	0,48	<i>Bifidobacterium</i>	0,67	0,40
<i>Actinomyces</i>	0,63	0,39	<i>Coxiella</i>	0,98	0,49	<i>Arthrospira</i>	1,11	0,47
<i>Escherichia-Shigella</i>	1,12	0,46	<i>Desulfurivibrio</i>	0,76	0,41	<i>Rarobacter</i>	0,67	0,40
<i>Bordetella</i>	0,92	0,47	<i>Leucobacter</i>	0,55	0,34	<i>Sporotomaculum</i>	0,61	0,38
<i>Mogibacterium</i>	42,22	0,17	<i>Abiotrophia</i>	4,00	0,15	<i>Cohnella</i>	0,53	0,24
<i>Achromobacter</i>	0,91	0,47	<i>Rhodobacter</i>	1,18	0,44	<i>Lachnospiraceae ucg</i>	3,07	0,29
<i>Desulfurispora</i>	1,78	0,24	<i>Sphingomonas</i>	1,94	0,31	<i>Novosphingobium</i>	1,49	0,39
<i>Fulvimarina</i>	0,83	0,44	<i>Coprococcus</i>	0,91	0,47	<i>Pantoea</i>	1,39	0,42
<i>Porphyromonas</i>	1,29	0,43	<i>Sanguibacter</i>	0,59	0,18	<i>Proteus</i>	0,91	0,47
<i>Renibacterium</i>	0,09	0,22	<i>Ruminococcaceae</i>	0,48	0,08	<i>Christensenellaceae</i>	0,01	0,25
<i>Erwinia</i>	1,23	0,44	<i>Aneurinibacillus</i>	0,46	0,34	<i>Paracoccus</i>	1,67	0,38
<i>Salibacterium</i>	0,20	0,25	<i>Anoxybacillus</i>	0,09	0,20	<i>Brochothrix</i>	0,83	0,45
<i>Bacteroides</i>	0,84	0,46	<i>Bradyrhizobium</i>	0,66	0,32	<i>Allobaculum</i>	1,33	0,43
<i>Marinobacter</i>	3,33	0,26	<i>Rhodovulum</i>	0,72	0,41	<i>Jannaschia</i>	1,00	0,50
<i>Limnhabitans</i>	0,50	0,32	<i>Comamonas</i>	1,06	0,48	<i>Micrococcus</i>	0,33	0,31
<i>Dermatophilus</i>	1,22	0,38	<i>Citrobacter</i>	1,75	0,33	<i>Dorea</i>	0,18	0,28

представителей рода *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia* и *Shinella*. В то же время у пациентов в отличие от условно здоровых мужчин не обнаружено представителей рода *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* и *Lactobacillus*.

Как видно из представленных данных, в образцах групп пациентов и условно здоровых индивидуумов состав микробиоты значительно отличается как по присутствию ряда таксонов (44 рода, рис. 4), так и по уровню их представленности (120 родов, табл. 2), хотя статистически значимые отличия касаются только родов *Prevotella*, *Veillonella* и *Megasphaera*.

## Обсуждение

Развитие метагеномики коренным образом изменило наши возможности характеризовать таксономический состав микробиологических экосистем [13]. Эти достижения позволили определить специфический микробиом, характерный для разных участков тела человека, которые ранее считались стерильными, включая мочевыводящие пути. Выявление определенного микробиома в мочевыводящих путях может иметь важное значение для поддержания здоровья пациентов. Это открывает новую область исследований в урологии, в том числе и с точки зрения будущего дизайна лекарств, нацеленных на определенные микроорганизмы [5].

Механизм развития воспалительного процесса в уретре определяется состоянием ее слизистой. Слизистая оболочка уретры, помимо эпителия, включает собственную ткань слизистой, образованную рыхлой соединительной тканью, богато снабженную кровеносными и лимфатическими сосудами. Противомикробная резистентность слизистой мочеиспускательного канала зависит от ее механической целостности (предотвращает проникновение микроорганизмов с поверхности), выработки достаточного количества слизи клетками секреторного эпителия, пара- и бульбоуретральными железами (обеспечивает механическое смывание микроорганизмов с поверхности уретры) и определенным биохимическим составом уретральной слизи, оказывающей непосредственное противомикробное действие (иммуноглобулины, комплемент и его компоненты, лизоцим и др.).

При нарушении целостности слизистой любого генеза (травма, внедрение микрофлоры) в зоне поражения развивается воспалительная реакция, происходит внедрение микроорганизмов и развитие патологического процесса [2].

По данным ряда авторов, наиболее важным возбудителем инфекций мочеполовых путей продолжает оставаться *E. coli* (примерно 80% случаев заболевания) и *S. saprophyticus* (15% случаев) [2]. Проведенное более 10 лет назад масштабное микробиологическое исследование отделяемого из уретры показало, что основную обсемененность мочеполовых путей составляют представители семейства *Micrococcaceae* — *S. epidermidis* (30%), *S. aureus* (10%), *S. haemolyticus* (5%), а также *Streptococcaceae* — *Enterococcus* spp. (29%), *S. agalactiae* (16%), негемолитический стрептококк (10%),  $\alpha$ -гемолитический стрептококк (7%). Небольшую группу представляют факультативные грамотрицательные палочки, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, представленные *E. coli* (15%) и *Klebsiella* spp. (1%). Из группы прочих возбудителей высевались *Gardnerella vaginalis*, *Corynebacterium* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Candida albicans*. Анализируя результаты бактериологического исследования, можно предположить, что в качестве инфекционного агента, ставшего причиной воспаления в уретре, выступали наиболее часто выявляемые микроорганизмы: *Enterococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *E. coli* и *S. aureus* [2].

По данным нашего исследования, состав микробиоты у пациентов и условно здоровых индивидуумов статистически значимо отличался по присутствию/отсутствию рода *Megasphaera* и по уровню представленности родов *Prevotella* и *Veillonella*.

Представители рода *Prevotella* являются членами микробиоты полости рта, влагалища, кишечника и часто ассоциированы с инфекциями дыхательных путей. Они также были выделены при инфекциях мочевыводящих путей, абсцессах головного мозга, остеомиелите и пародонтозе [23, 28]. Представители рода *Veillonella* — это грамотрицательные бактерии, анаэробные кокки, хорошо известные своей способностью к ферментации лактата. У млекопитающих, в том числе у человека, бактерии этого рода являются частью нормальной микрофлоры кишечника и слизистой оболочки полости рта. Однако некоторые виды *Veillonella* могут быть возбудителями раневых и гнойных инфекций. У людей они были обнаружены при остеомиелите и эндокардите [24]. Также представители рода *Veillonella* в норме присутствуют в урогенитальном тракте 5–25% женщин. При этом те же самые виды *Veillonella*, которые в одной ситуации нормально сосуществуют с организмом-хозяином, в другой могут вызывать различные

заболевания человека: синдром раздраженного кишечника, эзофагит, менингит, остеомиелит, пародонтоз и поражения урогенитального тракта [1]. Представители рода *Megasphaera* — грам-отрицательные анаэробные неподвижные коккообразные условно патогенные бактерии, возбудители заболеваний урогенитального тракта человека, в частности бактериального вагиноза. При этом они входят в резидентную микрофлору толстой кишки человека [8].

Важно отметить, что в нашем исследовании у пациентов в отличие от условно здоровых мужчин обнаружена ДНК представителей рода *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia* и *Shinella*. Также у пациентов наблюдалось значительно большее количество представителей *Pedobacter*, *Dialister*, *Finegoldia*, *Alloprevotella*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Tyzzeraella*, *Gallicola*, *Peptoniphilus*, *Mogibacterium*, *Marinobacter*, *Anaerofustis*, *Abiotrophia*, *Sphingomonas*, *Citrobacter*, *Promicromonospora* и *Neptunomonas* (табл. 2). А вот представленность рода *Enterococcus* была практически одинаковой у пациентов и здоровых индивидуумов. При этом у пациентов было снижено количество представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Renibacterium*, *Salibacterium*, *Limnhabitans*, *Uliginosibacterium*, *Anoxybacillus*, *Anaerococcus*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Tolomonas*, *Peredibacter*, *Epulopiscium*, *Micrococcus* и *Dorea*. Представителей *Lactobacillus* у пациентов обнаружено не было. Сравнивая наши данные с данными Кунгурова Н.В. и соавт. [2], точки пересечения можно обнаружить только касательно рода *Klebsiella*.

К настоящему времени многие исследования по таксономическому профилированию уже охарактеризовали микробиом мочи человека. В большинстве этих исследований использовалось 16S-секвенирование для оценки различий таксономического состава между образцами здоровых и больных (табл. 3). Основные таксоны микробиома мочи здоровых мужчин относятся к пяти типам: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* и *Proteobacteria* и часто включают роды *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Во многих исследованиях обнаружен высокий уровень вариативности между людьми по составу микробиома мочи [22].

По данным Moustafa A. и соавт. [21], при анализе метагенома урогенитального тракта (в качестве биоматериала использовали мочу)

среднее количество идентифицированных родов на образец составило 38 (от 6 до 220), при этом у индивидуумов с воспалительными процессами в мочевыводящих путях преобладали представители протеобактерий. По этим же данным у здоровых индивидуумов наиболее часто обнаруживались представители *Actinomyces*, *Anaerococcus*, *Atopobium*, *Facklamia*, *Finegoldia*, *Gardnerella*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*, а у индивидуумов с воспалительными процессами преобладают *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, а также виды с неясной или неизвестной ролью в инфекции, такие как *Acidovorax*, *Rhodanobacter* и *Oligella*.

Сравнивая данные Moustafa A. и соавт. [21], Neugent M.L. и соавт. [22], Aragon I.M. и соавт. [5], Kim M.S., Jung S.I. [17] и Кунгурова Н.В. и соавт. [2] с нашими данными, можно обнаружить определенное сходство по видовому составу микробиома и доли в нем определенных микроорганизмов. Во-первых, у здоровых индивидуумов во всех исследованиях присутствуют представители *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* и *Prevotella*. Во-вторых, при сравнении результатов нашего исследования с данными Aragon I.M. и соавт. [5] можно выделить 9 родов, представители которых присутствуют в урогенитальном тракте здоровых мужчин в обоих исследованиях: *Aerococcus*, *Anaerococcus*, *Enterococcus*, *Finegoldia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Veillonella*. В-третьих, у мужчин с воспалительными процессами в мочевыводящих путях во всех исследованиях присутствуют представители *Klebsiella*, а в нашем исследовании и работе Moustafa A. и соавт. присутствуют представители рода *Citrobacter*. При этом у мужчин с воспалительными процессами в мочевыводящих путях наблюдается снижение типичных представителей родов *Staphylococcus* и *Streptococcus* (табл. 3).

У всех пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы, включенных в данное исследование, выявлены дифференциальные отличия состава микробиома по сравнению со здоровыми мужчинами. Изменения в популяции микроорганизмов могут быть результатом повторяющихся или существующих факторов: стресса, диеты, условий окружающей среды. Патологические механизмы заболевания предстательной железы изучены недостаточно. Хроническое воспаление простаты рассматривается как возможная частая причина доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) и хронического простатита (ХП)/синдрома хронической тазовой боли (СХТБ) [17]. Известно, что воспаление предстательной же-

Таблица 3. Состав микробиома урогенитального тракта мужчин

Table 3. The microbiome composition in male urogenital tract

Исследуемая популяция A cohort examined	Основные бактериальные таксоны Main bacterial taxa	Образец Sample	Используемый метод Method used	Ссылка Reference
Здоровые мужчины Healthy males	<i>Lactobacillus</i> , <i>Sneathia</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Ureaplasma</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Gemella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Streptococcus</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[5]
Мужчины с воспалительными процессами в мочевыводящих путях Males with inflammatory process in urogenital tract	<i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Ureaplasma</i>	соскоб из уретры urethral scraping	Культуральные методы Culture methods	[2]
Здоровые мужчины Healthy males	<i>Actinomyces</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[21]
Мужчины с воспалительными процессами в мочевыводящих путях Males with inflammatory process in urogenital tract	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Acidovorax</i> , <i>Rhodanobacter</i> , <i>Oligella</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[21]
Мужчины с ДГПЖ Males with benign prostatic hyperplasia (BPH)	<i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i>	моча urine	16S-секвенирование 16S sequencing	[17]
Мужчины с воспалительными процессами в мочевыводящих путях Males with inflammatory process in urogenital tract	<i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Temperatibacter</i> , <i>Oxobacter</i> , <i>Georgenia</i> , <i>Actinobaculum</i> , <i>Varibaculum</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sediminihabitans</i> , <i>Actinobacter</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Spirochaeta</i> , <i>Enhydrobacter</i> , <i>Thermacetogenium</i> , <i>Bdellovibrio</i> , <i>Oleibacter</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lachnoclostridium</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Xanthomonas</i> , <i>Novispirillum</i> , <i>Marvinbryantia</i> , <i>Afipia</i> , <i>Shinella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Dialister</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Alicyclobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Tyzzereella</i> , <i>Gallicola</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Mogibacterium</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Anaerofustis</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Neptunomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Salibacterium</i> , <i>Limnhabitans</i> , <i>Uliginosibacterium</i> , <i>Anoxybacillus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Tolumonas</i> , <i>Peredibacter</i> , <i>Epulopiscium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Dorea</i>	соскоб из уретры urethral scraping	16S-секвенирование 16S sequencing	[данное исследование] current study

## Окончание таблицы 3. Состав микробиома урогенитального тракта мужчин

Table 3. The microbiome composition in male urogenital tract (continued)

Исследуемая популяция A cohort examined	Основные бактериальные таксоны Main bacterial taxa	Образец Sample	Используемый метод Method used	Ссылка Reference
Здоровые мужчины Healthy males	<i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Tepidimonas</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Paludibacterium</i> , <i>Aerococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Rumen</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Brevibacillus</i> , <i>Sporosarcina</i> , <i>Yaniella</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pedobacter</i> , <i>Dialister</i> , <i>Finegoldia</i> , <i>Alloprevotella</i> , <i>Alicyclobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Tyzzerella</i> , <i>Gallicola</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Mogibacterium</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Anaerofustis</i> , <i>Abiotrophia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Salibacterium</i> , <i>Limnohabitans</i> , <i>Uliginosibacterium</i> , <i>Anoxybacillus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Tolomonas</i> , <i>Peredibacter</i> , <i>Epulopiscium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Neptunomonas</i>	соскоб из уретры urethral scraping	16S-секвенирование 16S sequencing	[данное исследование] current study

**Примечание.** **St** (жирный шрифт) — сходство результатов других исследований с нашими данными по составу микробиома здоровых индивидуумов. **St** (жирный шрифт с подчеркиванием) — сходство результатов других исследований с нашими данными по составу микробиома у индивидуумов с воспалительными процессами в мочевыводящих путях.

Note. **St** (bold) — similarity of data from other studies with our data on microbiome composition in healthy individuals. **St** (bold underlined) — similarity of other studies with our data on microbiome composition of individuals with urinary tract inflammation.

лезы играет ключевую роль в патогенезе и прогрессировании ДГПЖ, но его причины до конца не изучены. Одна из возможных причин состоит в том, что бактериальная микробиота нижних мочевыводящих путей влияет на местную иммунологическую среду. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы оценить взаимосвязь между микробиотой нижней части мочевыводящих путей у мужчин и простатитом [17]. Используя секвенирование 16S рРНК, Kim M.S. и соавт. сравнили микробиом секрета предстательной железы, семенной жидкости и мочи у пациентов с ДГПЖ и раком простаты и обнаружили, что микробиота различалась в этих двух группах. У пациентов с ДГПЖ обнаружено большее количество представителей родов *Eubacterium* и *Deffluviococcus*, но меньшее содержание *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria* и *Firmicutes*, а также семейства *Lachnospiraceae* и родов *Propionicimonas*, *Sphingomonas* и *Ochrobactrum* по сравнению с онкологически больными. Эти исследования показывают, что дисбиоз оказывает сильное влияние на заболевание простаты [17].

По данным Shrestha E. и соавт. [25], в образцах злокачественных опухолей простаты выявлены виды *Streptococcus anginosus*, *Anaerococcus lactolyticus*, *Anaerococcus obesiensis*, *Actinobaculum schaalii*, *Varibaculum cambriense* и *Propionimicrobium lymphophilum*. Почти все эти виды известны в качестве возбудителей урогенитальных инфекций,

включая простатит. Также в этой работе показано, что в ряде образцов доброкачественных и злокачественных опухолей предстательной железы преобладали неклассифицированные представители *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* и *Staphylococcaceae*. Mandar R. и соавт. [19], изучая семенную жидкость мужчин с простатитом и здоровых мужчин, используя 16S-секвенирование, показали, что разница между этими двумя группами заключается в снижении относительной численности представителей рода *Lactobacillus* у пациентов с простатитом.

К сожалению, полученные данные не позволяют сделать однозначный вывод о том, какие именно микроорганизмы стали причиной урогенитальной инфекции у пациентов в нашем исследовании. Однако на их основе можно сформировать перечень наиболее вероятных патогенов для трех рассмотренных случаев. Первое место по вероятности занимают неизвестные представители рода *Megasphaera* (результаты дискриминантного анализа, отсутствие у условно здоровых индивидуумов, известный из данных литературы патогенный эффект), далее следуют представители *Prevotella*, *Veillonella* и *Pedobacter* (результаты дискриминантного анализа), а также представители родов *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sediminihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*,

*Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia* и *Shinella*.

Безусловно, наблюдаемый у пациентов клинический эффект может быть связан не просто с наличием определенных микроорганизмов, но также и с системным нарушением их конкурентных взаимосвязей (дисбалансом микрофлоры), приводящим к метаболомному нарушению и воспалительным процессам в урогенитальном тракте. Так, в нашей работе и исследованиях других авторов для индивидуумов с хроническим воспалительным процессом показано снижение количества типичных представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* и увеличение численности родов *Klebsiella* и *Citrobacter*. Дальнейшие исследования в этом направлении должны расширить представления о нормофлоре урогенитального тракта и ее нарушении, а также расширить перечень вероятных патогенных микроорганизмов — возбудителей инфекций урогенитального тракта.

## Заключение

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить таксономическое многообразие микроорганизмов, относящихся к домену *Bacteria*, в образцах из урогенитального

тракта, а также установить дифференциальные различия, касающиеся представителей родов *Megasphaera*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Pedobacter*, *Mobiluncus*, *Phormidium*, *Sphingobacterium*, *Temperatibacter*, *Oxobacter*, *Georgenia*, *Actinobaculum*, *Variabaculum*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Sedimihabitans*, *Actinobacter*, *Actinoplanes*, *Spirochaeta*, *Enhydrobacter*, *Thermacetogenium*, *Bdellovibrio*, *Oleibacter*, *Porphyromonas*, *Klebsiella*, *Lachnoclostridium*, *Caulobacter*, *Xanthomonas*, *Novispirillum*, *Marvinbryantia*, *Afipia*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Faecalibacterium*, *Paludibacterium*, *Aerococcus*, *Campylobacter*, *Pasteurella*, *Rumen*, *Psychrobacter*, *Haemophilus*, *Brevibacillus*, *Sporosarcina*, *Yaniella* и *Lactobacillus* из образцов, полученных от больных с хроническими воспалительными процессами и от условно здоровых индивидуумов. Наблюдаемый у пациентов клинический эффект может быть связан с дисбалансом микрофлоры — снижением типичных представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus* и увеличением численности представителей родов *Klebsiella* и *Citrobacter*. Это может приводить к метаболомным нарушениям и воспалительным процессам в урогенитальном тракте.

Работа выполнена при поддержке ООО «Эльген» (конкурс научных проектов «Инновация»), включавшей проведение генетического исследования методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina HiSeq 3000.

## Список литературы/References

1. Карпеева Ю.С., Новикова В.П., Хавкин А.И., Ковтун Т.А., Макаркин Д.В., Федотова О.Б. Микробиота и болезни человека: возможности диетической коррекции. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 5. С. 116–125. [Karpееva Yu.S., Novikova V.P., Khavkin A.I., Kovtun T.A., Makarkin D.V., Fedotova O.B. Microbiota and human diseases: dietary correction. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 116–125. (In Russ.)] doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-116-125
2. Кунгуров Н.В., Герасимова Н.М., Горбунов А.П., Скидан Н.И., Щербаклова Н.В., Евстигнеева Н.П., Чигвинцева Е.А., Юровских Л.И., Тамбулова В.Н. Условно-патогенная микрофлора урогенитального тракта у мужчин с воспалительными заболеваниями мочеиспускательного канала. Вестник последиplomного медицинского образования. 2010. № 2. С. 26–32. [Kungurov N.V., Gerasimova N.M., Gorbunov A.P., Skidan N.I., Shcherbakova N.V., Evstigneeva N.P., Chigvintseva E.A., Yurovskikh L.I., Tambulova V.N. Conditionally pathogenic microflora of the urogenital tract in men with inflammatory diseases of the urethra. *Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya* = *Bulletin of Postgraduate Medical Education*, 2010, no. 2, pp. 26–32. (In Russ.)]
3. Ткачук В.Н. Хронический простатит. М.: Медицина для всех, 2006. 112 с. [Tkachuk V.N. Chronic prostatitis. M.: *Meditsina dlya vsekh*, 2006. 112 p. (In Russ.)]
4. Anderson-Otunu O., Akhtar S. Chronic infections of the urinary tract and bladder cancer risk: a systematic review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2016, vol. 17, no. 8, pp. 3805–3807.
5. Aragón I.M., Herrera-Imbroda B., Queipo-Ortuño M.I., Castillo E., Del Moral J.S., Gómez-Millán J., Yucel G., Lara M.F. The urinary tract microbiome in health and disease. *Eur. Urol. Focus*, 2018, vol. 4, no. 1, pp. 128–138. doi: 10.1016/j.euf.2016.11.001
6. Bates S.T., Berg-Lyons D., Caporaso J.G., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J.*, 2010, vol. 5, pp. 908–917.
7. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
8. Bordigoni A., Lo C.I., Yimagou E.K., Diop K., Nicaise B., Raoult D., Desnues C., Fenollar F. *Megasphaera vaginalis* sp. nov. and *Anaerococcus vaginimassiliensis* sp. nov., new bacteria isolated from vagina of French woman with bacterial vaginosis. *New Microbes New Infect.*, 2020, vol. 37: 100706. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100706
9. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303

10. Drewes J.L., White J.R., Dejea C.M., Fathi P., Iyadorai T., Vadivelu J., Roslani A.C., Wick E.C., Mongodin E.F., Loke M.F., Thulasi K., Gan H.M., Goh K.L., Chong H.Y., Kumar S., Wanyiri J.W., Sears C.L. High-resolution bacterial 16S rRNA gene profile meta-analysis and biofilm status reveal common colorectal cancer consortia. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2017, vol. 3: 34. doi: 10.1038/s41522-017-0040-3
11. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, vol. 27, no. 16, pp. 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381
12. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., Sengamalai N., Ott S., Brotman R.M., Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 2014, vol. 2, no. 1: 6. doi: 10.1186/2049-2618-2-6
13. Gilbert J.A., Blaser M.J., Caporaso J.G., Jansson J.K., Lynch S.V., Knight R. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.*, 2018, vol. 24, no. 4, pp. 392–400. doi: 10.1038/nm.4517
14. Huang C.H., Chou Y.H., Yeh H.W., Huang J.Y., Yang S.F., Yeh C.B. Risk of cancer after lower urinary tract infection: a population-based cohort study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, vol. 16, no. 3: 390. doi: 10.3390/ijerph16030390
15. Jackobson S.H., Eklof O., Eriksson C.G., Lins L.E., Tidgren B., Winberg J. Development of hypertension and uremia after pyelonephritis in childhood: 27 year follow up. *BMJ*, 1989, vol. 299, no. 6701, pp. 703–706. doi: 10.1136/bmj.299.6701.703
16. Jensen E.A., Berryman D.E., Murphy E.R., Carroll R.K., Busken J., List E.O., Broach W.H. Heterogeneity spacers in 16S rDNA primers improve analysis of mouse gut microbiomes via greater nucleotide diversity. *Biotechniques*, 2019, vol. 67, no. 2, pp. 55–62. doi: 10.2144/btn-2019-0025
17. Kim M.S., Jung S.I. The urinary tract microbiome in male genitourinary diseases: focusing on benign prostate hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *Int. Neurourol. J.*, 2021, vol. 25, no. 1, pp. 3–11. doi: 10.5213/inj.2040174.087
18. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, no. 4, pp. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
19. Mändar R., Punab M., Korrovits P., Türk S., Ausmees K., Lapp E., Preem J.K., Oopkaup K., Salumets A., Truu J. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int. J. Urol.*, 2017, vol. 24, no. 3, pp. 211–216. doi: 10.1111/iju.13286
20. Masajtis-Zagajewska A., Nowicki M. New markers of urinary tract infection. *Clin. Chim. Acta*, 2017, vol. 471, pp. 286–291. doi: 10.1016/j.cca.2017.06.003
21. Moustafa A., Li W., Singh H., Moncera K.J., Torralba M.G., Yu Y., Manuel O., Biggs W., Venter J.C., Nelson K.E., Pieper R., Telenti A. Microbial metagenome of urinary tract infection. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 4333. doi: 10.1038/s41598-018-22660-8
22. Neugent M.L., Hulyalkar N.V., Nguyen V.H., Zimmermann P.E., De Nisco N.J. Advances in understanding the human urinary microbiome and its potential role in urinary tract infection. *mBio*, 2020, vol. 11, no. 2: e00218-20. doi: 10.1128/mBio.00218-20
23. Randis T.M., Ratner A.J. Gardnerella and Prevotella: co-conspirators in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.*, 2019, vol. 220, no. 7, pp. 1085–1088. doi: 10.1093/infdis/jiy705
24. Scheiman J., Luber J.M., Chavkin T.A., MacDonald T., Tung A., Pham L.-D., Wibowo M.C., Wurth R.C., Punthambaker S., Tierney B.T., Yang Z., Hattab M.W., Avila-Pacheco J., Clish C.B., Lessard S., Church G.M., Kostic A.D. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat. Med.*, 2019, vol. 25, no. 7, pp. 1104–1109. doi: 10.1038/s41591-019-0485-4
25. Shrestha E., White J.R., Yu S.H., Kulac I., Ertunc O., De Marzo A.M., Yegnasubramanian S., Mangold L.A., Partin A.W., Sfanos K.S. Profiling the urinary microbiome in men with positive versus negative biopsies for prostate Cancer. *J. Urol.*, 2018, vol. 199, no. 1, pp. 161–171. doi: 10.1016/j.juro.2017.08.001
26. Steen A.D., Crits-Christoph A., Carini P., DeAngelis K.M., Fierer N., Lloyd K.G., Thrash J.C. High proportions of bacteria and archaea across most biomes remain uncultured. *ISME J.*, 2019, vol. 13, pp. 3126–3130.
27. Srinivasan S., Chambers L.C., Tapia K.A., Hoffman N.G., Munch M.M., Morgan J.L., Domogala D., Lowens M.S., Proll S., Huang M.-L., Soge O.O., Jerome K.R., Golden M.R., Hughes J.P., Fredricks D.N., Manhart L.E. Urethral microbiota in men: association of Haemophilus influenzae and mycoplasma penetrans with nongonococcal urethritis. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, vol. 73, no. 7, pp. e1684–e1693. doi: 10.1093/cid/ciaa1123
28. Tanaka S., Yoshida M., Murakami Y., Ogiwara T., Shoji M., Kobayashi S., Watanabe S., Machino M., Fujisawa S. The relationship of Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens and Prevotella melaninogenica in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, 2008, vol. 32, no. 3, pp. 195–200. doi: 10.17796/jcpd.32.3.vp65717781561811
29. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 16, pp. 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07

**Автор:**

**Кутилин Д.С.**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии МЗ РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия.

**Author:**

**Kutilin D.S.**, PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Oncology Center, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 30.03.2021  
Отправлена на доработку 31.07.2021  
Принята к печати 12.09.2021

Received 30.03.2021  
Revision received 31.07.2021  
Accepted 12.09.2021