

Диагностические возможности исследования осадка эякулята с помощью амплификации нуклеиновых кислот методом полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени и микробиологического исследования при поиске причин нарушения мужской репродуктивной функции

© Ж.Ю. САПОЖКОВА^{1,2}, Г.А. МИЛОВАНОВА^{2,3}, Д.Г. ПОЧЕРНИКОВ⁴, Н.Т. ПОСТОВОЙТЕНКО⁵

¹Международная Школа Цитологии и Медицинская Школа Инноваций, Москва, Россия;

²ООО «Подольский диагностический центр», Подольск, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Россия;

⁵ООО «Мать и дитя Владимир», Владимир, Россия

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Провести анализ диагностических возможностей метода амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и микробиологического исследования осадка эякулята при установлении причин нарушения мужской репродуктивной функции.

Материал и методы. За период с 2017 по 2021 г. обследовано 529 образцов осадка эякулята мужчин в возрасте от 18 до 59 лет с бесплодием и инфекцией мужских добавочных половых желез (Male Accessory Gland Infection/MAGI). Сравнительную идентификацию микроорганизмов для микробиологического (МБА) и молекулярного анализа проводили матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией время-пролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) и МАНК ПЦР в режиме реального времени, реализуемой в тесте «Андрофлор» (МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор).

Результаты. Значимую бактериоспермию осадка эякулята чаще удавалось выявить по данным молекулярного теста «Андрофлор» по сравнению с МБА — 402 (76%) и 237 (44,8%) соответственно ($p < 0,01$). Анализ структуры биотопа образцов, установленный двумя методами, указывает на полное совпадение микробного статуса только в 40 (7,6%) из 529 случаев; в остальном микробиота при МБА либо отсутствовала 83 (15,7%), либо спектры выявленных микроорганизмов различались. Отмечены различия в структуре выделенных групп микроорганизмов в кластере преобладающей группы облигатно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов ($p < 0,01$), в группе грамположительных факультативно-анаэробных микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa/Ralstonia* spp./*Burkholderia* spp. ($p < 0,01$) и *Haemophilus* spp. ($p < 0,01$), а также по монокультуре *Enterobacteriaceae* spp./*Enterococcus* spp. ($p < 0,01$). В группе с нормальной флорой по результатам МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор чаще выявляли ассоциации микроорганизмов — 103 (81,1%), при МБА — монокультуру — 216 (74%) ($p < 0,01$).

Заключение. Для эффективного лабораторного обследования и своевременного лечения мужчин с нарушением репродуктивной функции рекомендовано использование молекулярного теста «Андрофлор» в осадке эякулята. Актуальность применения микробиологического исследования сохраняется, так как с помощью этого метода можно определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и обнаружить различные энтеробактерии, медикаментозная терапия которых может отличаться.

Ключевые слова: исследование осадка эякулята, ПЦР-РВ, «Андрофлор», микробиологический анализ, инфекции мужских добавочных половых желез, мужское бесплодие.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сапожкова Ж.Ю. — <https://orcid.org/0000-0003-3068-2260>

Милованова Г.А. — <https://orcid.org/0000-0002-0919-7271>

Почерников Д.Г. — <https://orcid.org/0000-0002-8944-7524>

Постовойтенко Н.Т. — <https://orcid.org/0000-0001-7573-6942>

Автор, ответственный за переписку: Сапожкова Ж.Ю. — e-mail: icsschool.2019@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Сапожкова Ж.Ю., Милованова Г.А., Почерников Д.Г., Постовойтенко Н.Т. Диагностические возможности исследования осадка эякулята с помощью амплификации нуклеиновых кислот методом полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени и микробиологического исследования при поиске причин нарушения мужской репродуктивной функции. *Медицинские технологии. Оценка и выбор.* 2022;44(2):62–71. <https://doi.org/10.17116/medtech20224402162>

Diagnostic capabilities of ejaculate sediment examination with the help of nucleic acid amplification by polymerase chain reaction and microbiologic examination in searching for causes of male reproductive dysfunction

© Zh.Yu. SAPOZHKOVA^{1, 2}, G.A. MILOVANOVA^{2, 3}, D.G. POCHERNIKOV⁴, N.T. POSTOVOITENKO⁵

¹International Cytology School and Medical School of Innovations, Moscow, Russia;

²Podolsk Diagnostic Center LLC, Podolsk, Russia;

³Russian Medical Academy of Postgraduate Professional Education, Moscow, Russia;

⁴Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, Russia;

⁵Mother and Child Vladimir LLC, Vladimir, Russia

ABSTRACT

Objective. To analyze the diagnostic capabilities of nucleic acid amplification (NAA) by real-time polymerase chain reaction (PCR) and microbiological examination of ejaculate sediment in determining the causes of male reproductive dysfunction.

Material and methods. We examined 529 samples of ejaculate sediment from men aged 18–59 years with infertility and male accessory gland infection (Male Accessory Gland Infection/MAGI) between 2017 and 2021. Microorganisms for microbiological and molecular analysis were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and real-time PCR (Androflor test, NAAT/PCR-RV/Androflor).

Results. As a rule, significant bacteriospermia in ejaculate sediment was detected in Androflor molecular test compared to microbiological examination (402 (76%) and 237 (44.8%), respectively, $p < 0.01$). Analysis of biotope by two methods indicates complete coincidence of microbial status only in 40 (7.6%) out of 529 cases. Otherwise, microbiological examination found no microbiota (83 (15.7%) sample) or spectrum of detected microorganisms differed. There were differences in the structure of isolated groups of microorganisms in cluster of predominant obligate anaerobic conditionally pathogenic microorganisms ($p < 0.01$), gram-positive facultative anaerobic microorganisms *Pseudomonas aeruginosa/Ralstonia* spp./*Burkholderia* spp. ($p < 0.01$), *Haemophilus* spp. ($p < 0.01$) and monoculture *Enterobacteriaceae* spp./*Enterococcus* spp. ($p < 0.01$). In the group with normal flora, NAA/RT-PCR/Androflor test revealed common associations of microorganisms (103 (81.1%)), microbiological examination revealed monoculture in most cases (216 (74%)) ($p < 0.01$).

Conclusion. The Androflor molecular test is recommended for effective laboratory examination and timely treatment of men with reproductive dysfunction. Microbiological examination is also important since this method is valuable to analyze sensitivity of microorganisms to antibiotics and detect various enterobacteria requiring different therapeutic regimens.

Keywords: ejaculate sediment analysis, RT-PCR, Androflor, microbiological analysis, male accessory gland infection, male infertility.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Sapozhkova Zh.Yu. — <https://orcid.org/0000-0003-3068-2260>

Milovanova G.A. — <https://orcid.org/0000-0002-0919-7271>

Pochernikov D.G. — <https://orcid.org/0000-0002-8944-7524>

Postovoitenko N.T. — <https://orcid.org/0000-0001-7573-6942>

Corresponding author: Sapozhkova Zh.Yu. — e-mail: icsschool.2019@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:

Sapozhkova ZhYu, Milovanova GA, Pochernikov DG, Postovoitenko NT. Diagnostic capabilities of ejaculate sediment examination with the help of nucleic acid amplification by polymerase chain reaction and microbiologic examination in searching for causes of male reproductive dysfunction. *Medical Technologies. Assessment and Choice*. 2022;44(2):62–71. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/medtech20224402162>

Введение

По оценке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), 48 млн пар и 186 млн человек в мире не способны зачать ребенка без медицинской помощи, что составляет 15–20% всего населения репродуктивного возраста [1]. Распространенность мужского бесплодия различается в различных регионах мира и, по разным источникам, составляет от 20 до 70% [2]. За последние 40 лет наблюдается снижение на 50–60% концентрации сперматозоидов в эякуляте мужчин репродуктивного возраста, поэтому установление причин мужского бесплодия приобрело большую актуальность и стало предметом ряда

исследований [3]. Среди возможных факторов, связанных с патоспермией, отмечены острые и хронические инфекции мужских добавочных половых желез (Male accessory gland infection, MAGI), поскольку на них приходится от 6,6 до 50% инфекционных заболеваний урогенитального тракта [4, 5]. Однако этиология большинства скрытых и рецидивирующих MAGI, как и причины бесплодия супружеской пары остаются в 30–50% случаев неясными ввиду отсутствия информативных лабораторных данных [6].

На протяжении нескольких десятилетий микробиологический анализ (МБА) был стандартом диагностики для идентификации и оценки чувствитель-

ности к антибиотикам микроорганизмов, которые хорошо растут на традиционных питательных средах. Однако большинство этиологических агентов инфекционно-воспалительных процессов являются некультивируемыми или плохо культивируемыми в силу своих биологических свойств [7, 8]. Определение количества облигатно-анаэробных условно-патогенных микроорганизмов (ОАУПМО) и их соотношение в биотопе, а также выделение устойчивых типов бактериальных сообществ, связанных с нарушением мужской фертильности, не предоставляется возможным с помощью МБА ввиду ограничения диагностических возможностей метода. Как следствие, возникает риск получения ложноотрицательных результатов, что в дальнейшем определяет трудности в подборе этиотропной терапии, переход заболевания в хроническую форму и рецидивирующий характер течения [9].

Внедрение в лабораторную практику метода амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) полимеразно-цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени, реализуемого в тесте «Андрофлор», позволило выявлять ДНК/РНК бактерий вне зависимости от их культуральных и морфологических особенностей. К тому же идентификация ОАУПМО, количественная оценка структуры микробиоты соответствующего биотопа на предмет диагностически незначимой нормальной флоры и бактериоспермии с определением преобладающих групп (микробных ассоциаций) предусматривает последующую бережную коррекцию и выбор таргетной терапии, минуя применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия.

Получение точного результата анализа любым лабораторным методом напрямую зависит от обязательного соблюдения требований внелабораторного преаналитического этапа, в том числе от выбора и взятия материала для исследования. Для идентификации микроорганизмов у мужчин бесплодных пар и у пациентов с подозрением на MAGI клиническими рекомендациями Европейской ассоциации урологов (European Association of Urology (EAU, 2022) наряду с секретом предстательной железы (СПЖ) и пост-массажной порцией мочи предложено использовать эякулят [7]. Согласно нормативным правовым актам для поиска возбудителей инфекций рекомендуется использовать уретральный соскоб (УС) и/или эякулят¹. В настоящее время на пути поиска этиологического фактора MAGI в сочетании с мужским бесплодием представляются сомнительными существующие лабораторные алгоритмы исследования уретрального отделяемого (УО)/УС и СПЖ ввиду отсутствия

заявленной диагностической ценности [8, 9] в связи с невозможностью воспроизводства и стандартизации по количеству и качеству взятого биоматериала. Более того, инвазивный процесс получения этих видов биоматериала связан с дискомфортом и, зачастую, с болевыми ощущениями у пациента.

Цель исследования — провести анализ диагностических возможностей МАНК с помощью ПЦР в режиме реального времени и микробиологического исследования осадка эякулята при установлении причин нарушения мужской репродуктивной функции.

Материал и методы

За период с 2017 по 2021 г. проведено одномоментное исследование, в котором диагностические методы применялись в одинаковых условиях ко всем 529 обследуемым пациентам мужского пола со средним возрастом 38 лет (стандартное отклонение 8,56; медиана возраста — 38 лет, минимальный возраст — 18 лет, максимальный — 59 лет). Мужчины обращались с целью прегравидарной подготовки, по поводу бесплодия или направлены гинекологом для исключения MAGI у сексуальных партнеров.

У 389 (73,54%) из 529 обследуемых мужчин отмечены различные урогенитальные жалобы у супруги, а также первичное либо вторичное бесплодие. У 6 (1,13%) из 529 обследуемых мужчин установлено первичное бесплодие и пограничная лейкоспермия, у 6 (1,13%) из 529 обследуемых мужчин установлено вторичное бесплодие и пограничная лейкоспермия. У 128 (24,20%) мужчин были неудачные попытки зачатия, в том числе с помощью вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), у партнерш — прерывание беременности на ранних или поздних сроках.

Критерии включения в исследование: наличие у пациентов жалоб на отсутствие беременности у партнерши, соблюдение полового воздержания в течение 3—5 суток до исследования для исключения возможной контаминации материала транзитной микробиотой полового партнера; отсутствие активных жалоб, характерных для MAGI и/или в анамнезе MAGI, а именно специфический или неспецифический уретрит, хронический или острый простатит, орхит, эпидидимит.

Критерии исключения: применение антибактериальных, противовирусных препаратов в последние 4 недели до обследования; использование местных лекарственных препаратов в течение 3 нед, предшествующих обследованию, наличие у пациентов синдрома хронической тазовой боли, симптомов нижних мочевых путей, синдрома хронической мошоночной боли, наличие эректильной дисфункции, отсутствие нарушений кариотипа, микроделеций AZF локуса Y-хромосомы, мутаций гена *CFTR*; наличие у пациентов сексуальных партнеров — женщин с рецидивирующими нарушениями влагалищ-

¹Приказ Минздрава России от 31.07.20 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

ного биоценоза, с воспалительными заболеваниями органов малого таза.

Выбывших из исследования пациентов не было.

В соответствии с рекомендациями ВОЗ 6-го издания по лабораторному исследованию эякулята человека (WHO 2021), сперму, полученную путем мастурбации, помещали в одноразовые широкогорлые контейнеры, избегая касания стенок и крышки контейнера руками [10]. Непосредственно перед сбором материала пациенту требовалось помочиться, полностью опорожнив мочевой пузырь, предварительно провести туалет наружных половых органов. Транспортировку проб эякулята в лабораторию осуществляли в термоконтAINERе в течение не более 3 ч с момента сбора образца. В лабораторных условиях эякулят переносили из транспортировочных контейнеров в конусовидные стерильные одноразовые полипропиленовые пробирки, центрифугировали при 1500 об/мин 15 мин на центрифуге медицинской серии СМ (ELMI SIA, Латвия), регистрационное удостоверение (РУ) №РЗН 2016/4617 от 26.08.16; после чего удаляли надосадочную жидкость стерильной пипеткой Пастера, 50 мкл осадка эякулята переносили стерильным наконечником с помощью дозатора пипеточного одноканального объемом 20—200 мкл в пробирку типа Eppendorf с транспортной средой для теста «Андрофлор». Не менее 10 мкл оставшегося осадка эякулята переносили другим стерильным наконечником с помощью дозатора пипеточного одноканального объемом 20—200 мкл в транспортный контейнер (тупфер) с угольной средой для МБА.

Оценка микробного состава осадка эякулята проведена в коммерческих лабораториях г. Москвы: медицинской лаборатории ООО «Мобил Медикал Лаб», медицинской лаборатории ООО Лаборатория «Литех», международной сети медицинских лабораторий «СИТИЛАБ», а также в Научно-исследовательской лаборатории клинических разработок Международной Школы Цитологии и Медицинской Школы Инноваций (Москва).

Идентификацию полученных колоний микроорганизмов производили в медицинской лаборатории ООО «Мобил Медикал Лаб» и международной сети медицинских лабораторий «СИТИЛАБ» методом время-пролетной матрично-ассоциированной лазерной десорбционной/ионизационной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) на анализаторе Vitek MS (BioMerieux, Франция), РУ №ФСЗ 2012/12091 от 23.06.21; в медицинской лаборатории ООО Лаборатория «Литех» на анализаторе микробиологическом VastoSCREEN (ООО «НПФ "ЛИТЕХ"», Россия), РУ №РЗН 2016/5127 от 20.12.16.

Для идентификации и количественного определения структуры бактериального микробиома во всех медицинских лабораториях использовали МАНК/ПЦР-РВ с тестом «Андрофлор» согласно ин-

струкции производителя [11], РУ №РЗН 2016/4490 от 25.07.16 на детектирующих амплификаторах ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) (амплификатор детектирующий «ДТпрайм», РУ №ФСР 2011/10229 от 03.03.11 и/или «ДТлайт» в модификации 5S, РУ №ФСР 2011/10228 от 03.03.11).

После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) проводили автоматический расчет общей бактериальной массы (ОБМ) и каждого из микроорганизмов в представленном образце осадка эякулята в геном-эквивалентах на 1 мл (ГЭ/мл). Расчет доли отдельных видов и преобладающих групп бактерий проводили относительно суммы всех выявленных в образце микроорганизмов. Спектр условно-патогенных микроорганизмов, определяемых набором «Андрофлор», представлен: 1) грамположительными факультативными анаэробными микроорганизмами (ГПФАМО) — *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp.; 2) грамотрицательными факультативными анаэробными микроорганизмами (ГОФАМО) — *Haemophilus* spp., *Pseudomonas aeruginosa/Ralstonia* spp./*Burkholderia* spp.); 3) группой *Enterobacteriaceae/Enterococcus* spp (ЭЭ); 4) ОАУПМО — *Gardnerella vaginalis*, *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Bacteroides* spp./*Porphyromonas* spp./*Prevotella* spp., *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium cluster*; 5) микоплазмами (МКП) — *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*; 6) грибами рода *Candida* (КАНД).

По результатам МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор за норму принимали образцы осадка эякулята с отсутствием или наличием в них монокультуры ГПФАМО или их микробных ассоциаций. Дисбаланс между нормофлорой и ГОФАМО, ЭЭ, ОАУПМО, МКП и КАНД принимали за нарушение структуры бактериального микробиома или диагностически значимую бактериоспермию при концентрации бактерий $\geq 10^3$ ГЭ/мл.

По результатам МБА за нормальную флору исследуемых образцов осадка эякулята принимали наличие в них ГПФАМО, а именно монокультуры *Staphylococcus epidermididis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus group viridans*, *Streptococcus oralis* и другой резидентной флоры или ее микробных ассоциаций.

Статистический анализ данных выполнен с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2013 и Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Описательная статистика количественных признаков представлена средними и среднеквадратическими отклонениями, медианами и квартилями. Сравнение несвязанных групп по качественным признакам проведено с использованием теста χ^2 Пирсона. При проверке гипотез статистически значимыми результаты считали при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Значимая бактериоспермия осадка эякулята статистически значимо чаще выявлена по данным МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор, чем по данным МБА — 402 (76%) и 237 (44,8%) соответственно ($p < 0,01$) (рис. 1).

У пациентов с нормальной флорой по результатам МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор статистически значимо чаще выявляли ассоциации микроорганизмов — 103 (81,1%), при МБА чаще выявляли монокультуру — 216 (74%) (рис. 2).

Анализ структуры образцов с диагностически значимой выраженной бактериоспермией в осадке эякулята, установленной двумя методами, указывает на пол-

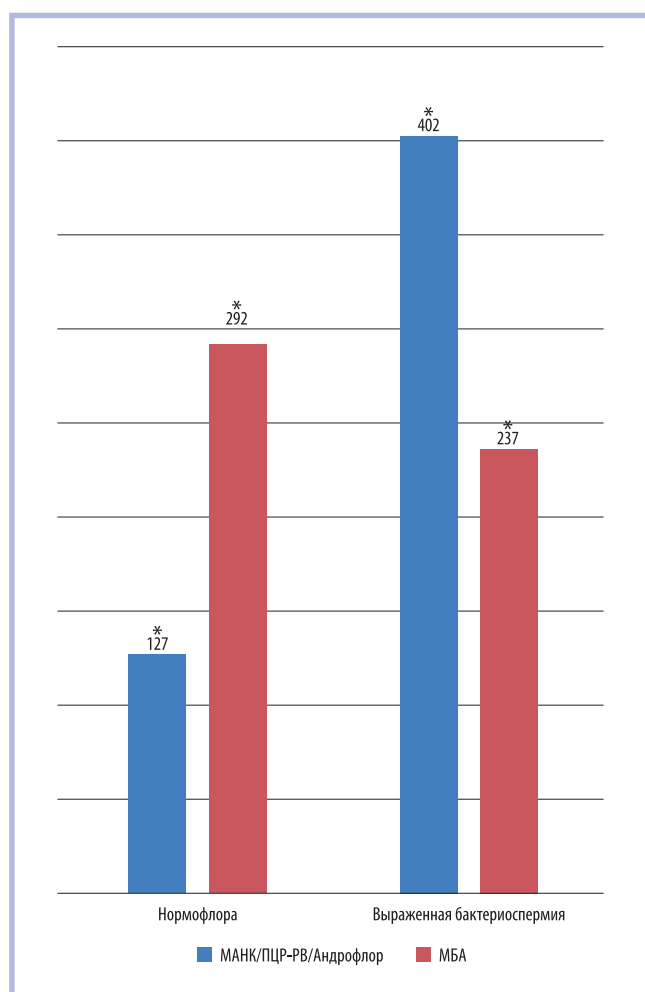


Рис. 1. Микробиологический статус осадка эякулята мужчин с инфекцией мужских добавочных половых желез (Male Accessory Gland Infection, MAGI) и бесплодием, установленный путем амплификации нуклеиновых кислот методом полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени, тестом «Андрофлор» (МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор) и микробиологическим анализом (МБА).

* — $p < 0,01$ (χ^2).

Fig. 1. Microbiological status of ejaculate sediment in men with male accessory gland infection and infertility established by NAA/RT-PCR/Androflor test and microbiological analysis.

* — $p < 0,01$ (χ^2).

ное совпадение микробного статуса только в 40 (7,6%) из 529 случаев (Приложение <https://u.to/cp4qNA>).

Совпадения прослеживались по преобладающим группам: МКП — *U. urealyticum* и *M. hominis*; КАНД — *Candida* spp. По преобладающей группе ЭЭ также наблюдалось полное совпадение, но с разным микробным пейзажем, который представлен другими бактериями ввиду различия диагностических панелей методов: МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор — *Enterobacteriaceae* spp./*Enterococcus* spp.; МБА — *Enterococcus faecalis* и *Enterobacter cloacae*.

В остальных случаях микробиота при МБА либо отсутствовала — 83 (15,7%) случаев, либо спектр выявленных микроорганизмов отличался.

При сравнении структуры диагностически значимой выраженной бактериоспермии двумя технологиями не выявлены статистически значимые различия по выделенным группам микроорганизмов, кроме кластеров преобладающей группы ОАУПМО, бактерии которой являются некультивируемыми или плохо культивируемыми на стандартных питательных средах (рис. 3).

Отмечены статистически значимые различия МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор и МБ между следующими преобладающими группами в структуре диагностически значимой бактериоспермии осадка эякулята: 1) ГОФАМО — *Pseudomonas aeruginosa*/*Ralstonia* spp./*Burkholderia* spp. ($p < 0,01$) и *Haemophilus* spp. ($p < 0,01$), что связано с трудностями культивирования

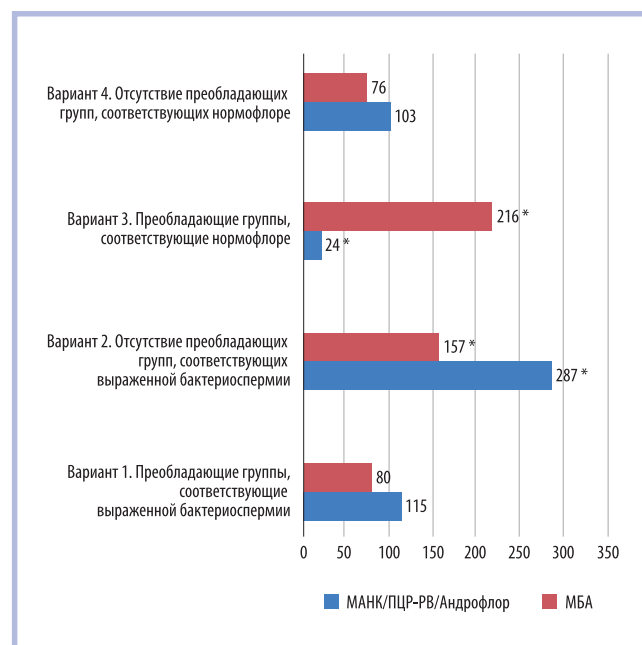


Рис. 2. Преобладающие группы микроорганизмов при нормоценозе и диагностически значимой бактериоспермии осадка эякулята.

* — $p < 0,01$ для варианта 3 и 4 (χ^2).

Fig. 2. Predominant groups of microorganisms in normoocenosis and diagnostically significant bacteriospermia of ejaculate sediment.

* — $p < 0,01$ for variants 3 and 4 (χ^2).

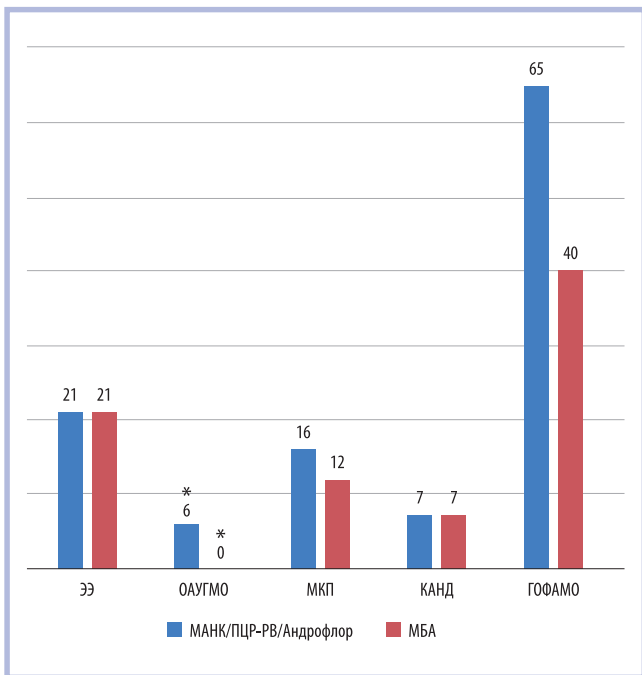


Рис. 3. Структура диагностически значимой бактериоспермии осадка эякулята по преобладающим группам микроорганизмов.

ЭЭ — энтеробактерии; ОАУПМО — облигатно-анаэробные условно-патогенные микроорганизмы; МКП — микоплазмы; КАНД — грибы; ГОФАМО — грамотрицательные факультативные анаэробные микроорганизмы; * — $p < 0,01$ (χ^2).

Fig. 3. Structure of bacteriospermia of ejaculate sediment by predominant groups of microorganisms.

* $p < 0.01$ (χ^2).

данных микроорганизмов на стандартных питательных средах; 2) ЭЭ в монокультуре *Enterobacteriaceae* spp./*Enterococcus* spp. — по данным МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор встречались значительно реже по сравнению с МБ ($p < 0,01$).

Между технологиями прослеживаются статистически значимые различия в преобладающей группе ГПФАМО с нормальной флорой осадка эякулята: не выявляется монокультура *Corynebacterium* spp. ($p < 0,01$) в виду трудностей культивирования; а монокультура *Staphylococcus* spp. ($p < 0,01$) и *Streptococcus* spp. ($p < 0,01$) чаще выявляются с помощью МБА; данные микроорганизмы выделяются в большинстве случаев также в составе ассоциаций микроорганизмов с помощью МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор.

Различия частоты выявления других микроорганизмов статистически незначимы.

Следует отметить статистически значимые различия в оценке общего статуса осадка эякулята (нормофлора/выраженная бактериоспермия) между двумя лабораторными методами. Так, количественную оценку ОБМ, характерной для нормофлоры, с большей частотой отражает МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор ($p < 0,01$) (рис. 4).

Обсуждение

Причинно-следственные связи между МАГИ и мужским бесплодием еще изучаются [12, 13], к тому же

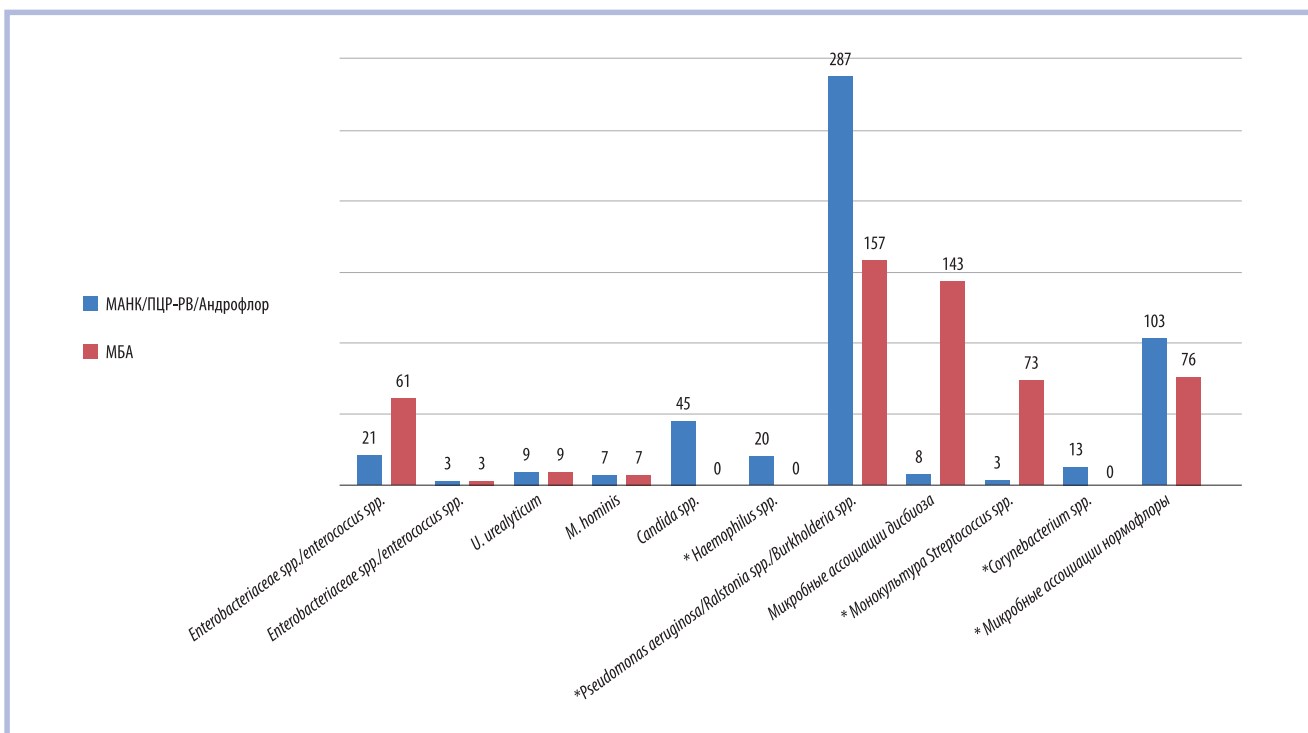


Рис. 4. Структура биотопа осадка эякулята по выявленным микроорганизмам.

* — $p < 0,01$ (χ^2).

Fig. 4. Structure of ejaculate sediment biotope by the identified microorganisms.

* — $p < 0.01$ (χ^2).

действующие международные и российские НПА не содержат четких указаний о выборе референсного метода и наиболее информативного мужского биологического образца для лабораторного обследования при репродуктивных нарушениях^{2,3,4,5,6} [12, 13—15]. В этом контексте результаты научных публикаций за последние 5 лет все же позволяют проследить эволюцию диагностических возможностей МАНК/ПЦР-РВ и МБА в оценке структуры биотопа эякулята у мужчин с бесплодием [7—9, 16—24].

Исследования последних лет демонстрируют необходимость применения молекулярно-генетических исследований (секвенирование нового поколения/Next Generation Sequencing/NGS или ПЦР-РВ) наряду с МБА, который на протяжении многих десятилетий являлся традиционным методом верификации диагноза при инфекционно-воспалительных заболеваниях урогенитального тракта [16, 18—21]. Преимущества использования технологий NGS или ПЦР-РВ связаны с возможностью выявления микроорганизмов из биопленок, микробов, трансформированных в L-формы и некультивируемой анаэробной микрофлоры [16—21].

За рубежом структуру микробиома урогенитального тракта принято оценивать с помощью технологии NGS, массовое использование которой ограничено недостатками: дорогостоящее оборудование, технологические сложности исполнения анализа и высокая стоимость (несколько тысяч евро/анализ). В этой связи секвенирование молекул ДНК и РНК урогенитального биотопа нецелесообразно ни в научных исследованиях в Российской Федерации, ни в рутинной практике медицинских лабораторий России, в которых представлена широкая линейка отечественных тест-систем на основе недорогой ПЦР-РВ.

Для решения клинических задач в медицинских лабораториях России широко используется технология МАНК/ПЦР-РВ, основанная на идентификации фрагментов генома микроорганизмов, с чув-

ствительностью и специфичностью метода 98—99%, сокращении времени оборота теста (ТАТ/turnaround time) до 3—4 ч с момента поступления биоматериала в лабораторию, низкой стоимости теста.

Молекулярный тест «Андрофлор» — это российская разработка на основе ПЦР-РВ, не имеющая аналогов в мире, представляет количественную оценку нарушения структуры микробиома в заявленном локусе. Результаты молекулярного теста не зависят от культуральных свойств и морфологических особенностей микроорганизма, позволяют с одинаковой эффективностью выявлять аэробные и анаэробные, трудно культивируемые и некультивируемые бактерии, вирусы, простейшие; тест делает возможным рутинное определение широкого перечня клинически значимых микроорганизмов. Использование некультивационной технологии не требует сохранения жизнеспособности микробов и, как следствие, упрощает требования к хранению и транспортировке биоматериала.

Важность исследования микробного состава семенной жидкости мужчин с бесплодием подчеркивается во многих публикациях [1, 2, 4, 5, 7—10, 16—18, 22—27]. В настоящее время осадок эякулята является приоритетным биологическим образцом для понимания инфекционно-воспалительных причин репродуктивных нарушений [16, 23], так как представляет собой свободный от спермоплазмы концентрированный материал, включающий клеточное содержимое всех мужских добавочных половых желез. Процесс неинвазивного получения эякулята в целях диагностики различными лабораторными методами можно отнести к конкурентным преимуществам по сравнению с процессом сбора образца СПЖ и УС/УО [24]. Отмечено, что образцы цельного эякулята значительно отличаются по вязкости, гомогенности и уступают по выявляемости микроорганизмов, что может приводить к неравномерному распределению микробных клеток в объеме исследуемого биоматериала. К примеру, перед проведением ПЦР-РВ для снижения вязкости образца необходимо дополнительно обрабатывать цельный эякулят средой с муколитиком [27], что может приводить к потере диагностических находок, к повышению себестоимости теста и увеличению ТАТ. Заранее подготовленный осадок эякулята представляет собой очищенный от белковых примесей материал, что способствует заведомо полноценному протеканию ПЦР-РВ, исключая ингибирование TAG-полимеразы.

Уже на исходе XX века исследования К. Jarvi и соавт. отражали преимущества ПЦР перед МБА в диагностике инфекционных возбудителей в осадке эякулята фертильных и инфертильных мужчин [27]. Результаты, полученные с помощью ПЦР, показали, что в сперме у 66% бессимптомных бесплодных мужчин и у 66% доноров спермы обнаружены бактерии в клинически значимой концентрации

²Приказ Минздрава России от 31.07.20 №803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

³Приказ Минздрава России от 29.12.12 №1673 н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при хроническом простатите (обследование в целях установления диагноза и лечения)».

⁴Приказ Минздрава России №1675н от 29.12.12 «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при неспецифическом и другом уретрите».

⁵Приказ Минздрава России от 09.11.12 №696н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при острых простатите, орхите и эпидидимите».

⁶Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30.10.12 №556н «Об утверждении стандарта медицинской помощи при бесплодии с использованием вспомогательных репродуктивных технологий».

$>10^4$ /мкл, в то время как с помощью МБА выявлена бактериоспермия только у 27% бесплодных мужчин и ни у одного из доноров спермы. В 4 из этих образцов осадка эякулята анализ секвенирования ДНК выявил в среднем 9 видов бактерий на образец, из которых почти 90% видов — анаэробы [8]. Эти данные указывают на риск получения ложноотрицательных результатов с помощью МБА, особенно в отношении анаэробных бактерий. Альтернативная технология на основе молекулярно-биологических методов может безошибочно подтвердить или опровергнуть роль инфекции в мужском бесплодии. Авторами также получены результаты по составу бактериального профиля у мужчин с бесплодием: 1) анаэробы: 6 видов *Peptostreptococcus*, 2 вида *Prevotella*, 2 вида *Veillonella*, *Corynebacterium* group, *Rubrivirax*, *Actinobacillus* spp. и *Eubacterium* spp.; 2) аэробы: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pneumoniae* и *Burkholderia pickettii*.

Спустя два десятка лет мировые научные публикации по оценке микробного статуса эякулята дополнили наблюдения российских разработчиков, ученых и практикующих врачей по проведению ПЦР-РВ с тестом «Андрофлор».

Исследование Д.Г. Почерникова и соавт. демонстрирует преимущество метода молекулярных тестов, а именно ПЦР-РВ, по сравнению со стандартным МБА эякулята. ПЦР-РВ может быть рекомендована как скрининговый метод. Для повышения точности выявления микроорганизмов перед сбором образца эякулята целесообразно назначение препарата Лонгидаза, который способствует дренированию ацинусов предстательной железы [8].

Работы Е.С. Ворошилиной и соавт. также подтверждают преимущества молекулярного теста «Андрофлор» перед моно-МБА для комплексной оценки микробиоты эякулята [7, 9]. Использование только МБА для определения структуры биотопа позволило выявить лишь часть присутствующих в образце микроорганизмов, при этом каждый 6-й образец был «стерильным», то есть ложноотрицательным. Применение ПЦР-РВ позволило идентифицировать от 8 до 15 групп микроорганизмов в количестве 10^2 — 10^6 ГЭ/мл во всех исследованных пробах эякулята, где в большинстве проб преобладала одна из групп микроорганизмов. Во всех 86 образцах спермы, кроме вида, выявленного МБА, обнаружены представители других групп бактерий. Согласно данным МБА, преобладающая группа микроорганизмов в эякуляте полностью соответствовала результатам теста «Андрофлор» только в 21 (24,4%) из 86 проб; в остальных случаях микробиота при МБА либо отсутствовала 14 (16,8%), либо спектр выявленных микроорганизмов отличался. Получение дискордантных результатов обусловлено невозможностью выявить при МБА некультивируемые и трудно культивируемые группы ОАУПМО [27]. Авторам удалось про-

вести кластерный анализ микробиоты эякулята пациентов с нарушением репродукции и эректильной дисфункцией с помощью «Андрофлор», что указывало на гетерогенность микробиома спермы, в котором выделяются 4 устойчивых кластера с преобладанием укрупненной группы микроорганизмов: ОАУПМО (20,7% *Bacteroides* spp./*Porphyromonas* spp./*Prevotella* spp., в 17% — *Eubacterium* spp., в 16,9% — *Peptostreptococcus* spp.); ЭЭ (11,7% *Enterobacteriaceae/Enterococcus* spp.) и представители нормофлоры — ГПФАМО (21% *Corynebacterium* spp.) и в 19,7% *Lactobacillus* spp. [9].

Согласно данным процитированных исследований, у пациентов с бесплодием имеются нарушения структуры бактериального микробиома эякулята, преобладающей группой в котором является ОАУПМО, некоторые микроорганизмы ГОФАМО (*Pseudomonas aeruginosa/Ralstonia* spp./*Burkholderia* spp. и *Haemophilus* spp.), а также представители монокультуры ЭЭ.

Настоящее исследование подтверждает и дополняет данные процитированных российских публикаций. Следует отметить, что в отличие от МБА, технология МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор позволяет количественно идентифицировать другие клинически значимые микроорганизмы и их ассоциации, в частности, характерные для выраженной бактериоспермии — ОАУПМО, ГОФАМО и ЭЭ в составе микробных ассоциаций; для нормофлоры — ГПФАМО в виде монокультуры *Corynebacterium* spp.; *Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp. в составе микробных ассоциаций. Большинство микроорганизмов, определяемых с помощью МАНК/ПЦР-РВ/Андрофлор, не обнаруживаются на стандартных питательных средах, являются трудно культивируемыми или некультивируемыми в силу своих биологических свойств, но, как удалось установить, доминируют в микробном пейзаже осадка эякулята мужчин с МАГИ и бесплодием, что может объяснять причину недостоверной диагностики и некорректного назначения лекарственной терапии.

К другим преимуществам теста «Андрофлор» следует отнести максимально укороченное ТАТ, что позволяет за 3—4 ч получить представление о расширенном микробиоме осадка эякулята с установлением доминирующих групп микроорганизмов.

Важность применения МБА по-прежнему остается актуальной, так как с помощью этого метода можно определить чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и обнаружить различные энтеробактерии, медикаментозная терапия которых может отличаться. Необходимо подчеркнуть, что только с помощью МБА возможно обнаружить *E. coli*, которая, по данным литературы, является одной из вероятных причин МАГИ и репродуктивных нарушений у мужчин, и в случае ее выявления требуется принципиально иная антибактериальная терапия в отличие от других ГОФАМО [7—9, 12, 13].

Заключение

Согласно полученным результатам, лабораторные методы, микробиологический анализ и молекулярное исследование осадка эякулята могут являться взаимодополняющими. Введение теста «Андрофлор» в рутинную лабораторную практику наряду с микробиологическим анализом расширит диагностические возможности врача, будет способствовать полноценному обследованию мужчин с нарушением репродуктивной функции. Многолетний опыт практикующих врачей лабораторной диагностики и урологов по работе с осадком эякулята с помощью обеих технологий представляется профессиональным обоснованием для пересмотра протоколов лабораторного обследования пациентов мужского пола в прегравидарной подго-

товке супружеской пары, в том числе рекомендуемым для обсуждения и пересмотра действующих клинических рекомендаций и нормативных правовых актов в Российской Федерации. Важность своевременной и правильной диагностики количественного состава биотопы осадка эякулята поможет избежать проведения дополнительных лабораторных методов, инструментальных диагностических процедур и необоснованной антибиотикотерапии, что отражает концепцию управления здоровьем и долголетием на основе корректного планирования медицинской и экономической эффективности в здравоохранении.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- WHO Health Topics. *Infertility*. Accessed January 28, 2022. https://www.who.int/health-topics/infertility#tab=tab_1
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*. 2015;13:37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Levine H, Jorgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update*. 2017;23(6):646-659. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>
- Moretti E, Figura N, Campagna MS, Iacoponi F, Gonnelli S, Colodiel G. Infectious Burden and Semen Parameters. *Urology*. 2017;100:90-96. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.10.032>
- Ahmadi MH, Mirsalehian A, Sadighi Gilani MA, Bahador A, Talebi M. Asymptomatic Infection with *Mycoplasma hominis* Negatively Affects Semen Parameters and Leads to Male Infertility as Confirmed by Improved Semen Parameters After Antibiotic Treatment. *Urology*. 2017;100:97-102. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.11.018>
- Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, Henkel R, Shah R, Homa ST, et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *The World Journal of Men's Health*. 2019;37(3):296-312. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190055>
- Ворошилина Е.С., Зорников Д.Л., Паначева Е.А. Сравнительное исследование микробиоты эякулята методом количественной ПЦР и культуральным методом. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2019;1:44-49. Voroshilina ES, Zornikov DL, Panacheva EA. Comparative study of the microbiota of ejaculate by quantitative PCR and culture method. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2019;1:44-49. (In Russ.). <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2019.009>
- Почерников Д.Г., Постовойтенко Н.Т., Стрельников А.И. Сравнительный анализ культурального и молекулярно-генетического методов в исследовании микробиоты эякулята при мужской инфертильности. *Андрология и генитальная хирургия*. 2019;20(2):40-47. Pochernnikov DG, Postovoitenko NT, Strelnikov AI. Comparative analysis of cultural and molecular genetic methods in the study of the microbiota of ejaculate in male infertility. *Andrologiya i genital'naya hirurgiya*. 2019;20(2):40-47. (In Russ.). <https://doi.org/10.17650/2070-9781-2019-20-2-40-47>
- Ворошилина Е.С., Зорников Д.Л., Иванов А.В., Почерников Д.Г., Паначева Е.А. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных методом ПЦР-РВ. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2020;5:66-73. Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernnikov DG, Panacheva EA. Microbiota of ejaculate: cluster analysis of the results obtained by PCR-RV. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2020;5:66-73. (In Russ.).
- WHO *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. Sixth edition. 2021. Accessed January 28, 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
- Инструкция по применению набора реагентов для исследования микрофлоры урогенитального тракта мужчин методом ПЦР в режиме реального времени*. Фасовка стандартная (S). Варианты комплектации: Андрофлор и Андрофлор Скрин (ООО НПО «ДНК-Технология», Россия). Ссылка активна на 28.01.22. *Instrukciya po primeneniyu nabora reagentov dlya issledovaniya mikroflory urogenital'nogo trakta muzhchin metodom PCR v rezhime real'nogo vremeni*. Fasovka standartnaya (S). Varianty komplektsacii: Androflor i Androflor Skrin (OOO NPO «DNK-Tekhnologiya», Rossiya). Accessed January 28, 2022. (In Russ.). https://www.dna-technology.ru/sites/default/files/393-4_s_androflorskrin_ivd_b_2021-06-21_0.pdf EAU
- Guidelines on Urological Infections*. 2022. Accessed January 28, 2022. <https://d56bochluxqz.cloudfront.net/documents/full-guideline/EAU-Guidelines-on-Urological-Infections-2022.pdf>
- EAU *Guidelines on Male Infertility*. 2019. Accessed January 28, 2022. <https://d56bochluxqz.cloudfront.net/media/EAU-Guidelines-on-Male-Infertility-2019.pdf>
- Мужское бесплодие. Клинические рекомендации*. Одобрены Научно-практическим Советом Минздрава России. 2021. *Muzhskoe besplodie. Klinicheskie rekomendacii*. Odobreny Nauchno-prakticheskim Sovetom Minzdrava Rossii. 2021. (In Russ.).

15. *Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. Федеральные клинические рекомендации*. М.: Деловой экспресс; 2016. Ссылка активна на 28.01.22. *Dermatovenerologiya 2015: Bolezni kozhi. Infekcii, peredavaemye polovym putem. Federal'nye klinicheskie rekomendacii*. М.: Delovoj ekspress; 2016. Accessed January 28, 2022. https://cnikvi.ru/docs/2335_maket_30.pdf
16. Cregger M, Lenz KM, Leary E, Leach RE, Fazleabas AT, White BA, et al. Reproductive Microbiomes: Using the Microbiome as a Novel Diagnostic Tool for Endometriosis. *Reproductive Immunology: Open Access*. 2017;2(3):36. <https://doi.org/10.21767/2476-1974.100036>
17. Mändar R, Punab M, Borovkova N, Lapp E, Kiiker R, Korrovits P, et al. Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Research in Microbiology*. 2015;166(5):440-447. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.009>
18. Tao X, Franasiak JM, Zhan Y, Scott RT, Rajchel J, Bedard J, et al. Characterizing the endometrial microbiome by analyzing the ultra-low bacteria from embryo transfer catheter tips in IVF cycles: Next generation sequencing (NGS) analysis of the 16S ribosomal gene. *Human Microbiome Journal*. 2017;3:15-21. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIC.2017.01.004>
19. Freitas AC, Chaban B, Bocking A, Rocco M, Yang S, Hill JE, et al.; VOGUE Research Group. The vaginal microbiome of pregnant women is less rich and diverse, with lower prevalence of Mollicutes, compared to non-pregnant women. *Scientific Reports*. 2017;7(1):9212. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07790-9>
20. Budd WT, Harwich MD, Meyers G, Dilts JR, Woody JR, Reynolds T. Metagenomics Analysis Using Next Generation Sequencing of Vaginal Samples from Community Practices in the US. *MOJ Cell Science and Report*. 2015;2(2):16-25. <https://doi.org/10.15406/mojcsr.2015.02.00020>
21. García-Velasco JA, Menabrito M, Catalán IB. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. *Reproductive Biomedicine Online*. 2017;35(1):103-112. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.04.005>
22. Сапожкова Ж.Ю. *Способ микроскопической диагностики качества спермы после седиментации эякулята*. Патент РФ на изобретение №2686685/30.04.2019. Бюл. №13. Ссылка активна на 28.01.22. Sapozhkova ZhYu. *Sposob mikroskopicheskoy diagnostiki kachestva spermy posle sedimentacii eyakulyata*. Patent RF na izobretenie №2686685/30.04.2019. Byul. №13. Accessed January 28, 2022. (In Russ.). <https://test2.fips.ru/ofpstorage/Doc/IZPM/RUNWC1/000/000/002/686/685/%D0%98%D0%97-02686685-00001/DOCCLAIM.PDF>
23. Sapozhkova Z, Kasoyan K, Kovalchuk E, Shabalova I. Sperm Sediment Cytology: A New Technique for Diagnosing Occult Urologic Infections. *Acta Cytologica*. 2017;61(3):247-251. <https://doi.org/10.1159/000469653>
24. Сапожкова Ж.Ю., Милованова Г.А., Пацап О.И. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Маркеры и методы. Часть II. *Лабораторная и клиническая медицина. Фармация*. 2021;1(2):65-79. Sapozhkova ZhYu, Milovanova GA, Patsap OI. Laboratory diagnostics of male infertility. Biomarkers and methods. Part II. *Laboratornaya i klinicheskaya medicina. Farmaciya*. 2021;1(2):65-79. (In Russ). <https://doi.org/10.14489/lcmp.2021.02.pp.065-079>
25. Сапожкова Ж.Ю., Шабалова И.П., Касоян К.Т. *Исследование осадка эякулята в диагностике инфекций, передаваемых половым путем: учебное пособие*. М.—Тверь: Триада; 2017. Sapozhkova ZhYu, Shabalova IP, Kasoyan KT. *Issledovanie osadka eyakulyata v diagnostike infekcii, peredavaemyh polovym putem: uchebnoe posobie*. М.—Tver': Triada; 2017. (In Russ.).
26. Сапожкова Ж.Ю., Милованова Г.А., Пацап О.И. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Маркеры. Часть I. *Лабораторная и клиническая медицина. Фармация*. 2021;1(1):57-68. Sapozhkova ZhYu, Milovanova GA, Patsap OI. Laboratory diagnostics of male infertility. Biomarkers. Part I. *Laboratornaya i klinicheskaya medicina. Farmaciya*. 2021;1(1):57-68. (In Russ). <https://doi.org/10.14489/lcmp.2021.01.pp.057-068>
27. Jarvi K, Lacroix JM, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertility and Sterility*. 1996;66(3):463-467.

Поступила 21.02.2022

Received 21.02.2022

Принята к печати 25.03.2022

Accepted 25.03.2022