

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Пичугова С.В.<sup>1,2</sup>, Розанова С.М.<sup>1,2</sup>, Бейкин Я.Б.<sup>1,2</sup>

## ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИОСПЕРМИИ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМОГРАММЫ У ПОДРОСТКОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, 620049, Екатеринбург, Россия;

<sup>2</sup>ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», 620144, Екатеринбург, Россия

*Инфекционная этиология является причиной около 15% случаев мужского бесплодия. И если инфекции, передающиеся половым путём, достаточно легко диагностируются, то роль бессимптомной бактериоспермии в формировании инфертильности у мужчин, особенно у подростков на фоне имеющейся патологии репродуктивной сферы (варикоцеле), остается недостаточно изученной. При микробиологическом исследовании в эякуляте подростков выявлены следующие виды бактерий: Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Corynebacterium glucuronolyticum, Corynebacterium minutissimum, Streptococcus anginosus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus. Бактерии в эякуляте обнаружены при выполнении спермограммы и электронно-микроскопического исследования сперматозоидов. При обильном росте микроорганизмов в монокультуре или ассоциации двух микроорганизмов, представленных в умеренном количестве, во всех случаях выявлены нарушения подвижности сперматозоидов, повышение вязкости эякулята, наличие лейкоцитов в семенной жидкости, на ультраструктурном уровне зафиксированы повреждения хроматина, акросомы, митохондрий, что может свидетельствовать об активной инфекции. При обнаружении бактериальной микрофлоры в небольшом и умеренном количестве (<10 КОЕ/мл) патологические изменения эякулята не наблюдались. Микрофлора эякулята обследованных подростков представлена грамположительной микрофлорой. Одновременное исследование пробы эякулята культуральным методом, выполнение спермограммы и ЭМИС позволило повысить выявляемость бактериоспермии. Опportunистические патогены при обильном росте или их различных ассоциациях могут служить фактором развития патоспермии. Отличить активную инфекцию от комменсальной микрофлоры или контаминации образца можно не только по наличию бактерий в эякуляте и их количественному учёту, но и по степени повреждения функции сперматозоидов и патологическим изменениям параметров эякулята, комбинируя методы диагностики. Наиболее часто при наличии бактерий в эякуляте диагностирована астенозооспермия.*

**Ключевые слова:** бактериоспермия; подростки; варикоцеле; эякулят, сперматозоиды; мужское бесплодие.

**Для цитирования:** Пичугова С.В., Розанова С.М., Бейкин Я.Б. Диагностика бактериоспермии и ее влияние на показатели спермограммы у подростков с варикоцеле. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 463-470.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-463-470>

**Для корреспонденции:** Пичугова Светлана Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунопатофизиологии, зав. лаб. электронной микроскопии КДЦ; e-mail: ekb-lem@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № 122020900136-4).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.03.2022

Принята к печати 20.03.2022

Опубликовано 15.08.2022

*Pichugova S.V.<sup>1,2</sup>, Rozanova S.M.<sup>1,2</sup>, Beikin Ya.B.<sup>1,2</sup>*

### DIAGNOSIS OF BACTERIOSPERMIA AND ITS EFFECT ON SPERMOGRAM PARAMETERS IN ADOLESCENT WITH VARICOCELE

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 620049, Yekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>State Autonomous Institution of Health of the Sverdlovsk Region "Clinical and Diagnostic Center of the city of Yekaterinburg", 620144, Yekaterinburg, Russia

*Infectious etiology is the cause of about 15% of cases of male infertility. And if sexually transmitted infections are easily diagnosed, the role of asymptomatic bacteriospermia in the formation of infertility in men, and especially in adolescents against the background of the existing pathology of the reproductive sphere (varicocele), remains insufficiently studied. A microbiological study in the ejaculate of adolescents revealed the following types of bacteria: Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Corynebacterium glucuronolyticum, Corynebacterium minutissimum, Streptococcus anginosus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus. Bacteria in the ejaculate were also detected during semen analysis and electron microscopic examination of spermatozoa. With abundant growth of microorganisms in a monoculture or an association of two microorganisms present in a moderate amount, in all cases, violations of sperm motility, an increase in the viscosity of the ejaculate, the presence of leukocytes in the seminal fluid were detected, and damage to the chromatin, acrosome and mitochondria was recorded at the ultrastructural level, which may indicate active infection. When bacterial flora was detected in a small and moderate amount (<10 CFU/ml), no pathological changes in the ejaculate were observed. The microflora of the ejaculate of the examined adolescents is represented by gram-positive microflora. Simultaneous study of the ejaculate sample by bacteriological seeding, the performance of spermogram and EMIS allowed to increase the detection of bacteriospermia. Opportunistic pathogens with abundant growth or their various combinations can serve as a factor in the development of pathospermia. It is possible to distinguish an active infection from commensal microflora or sample contamination not only by the presence of bacteria in the ejaculate and their quantitative accounting, but also by the degree of damage to the function of spermatozoa and pathological changes in the parameters of the ejaculate, by combining diagnostic methods. Most often, in the presence of bacteria in the ejaculate, asthenozoospermia is diagnosed.*

**Key words:** bacteriospermia; adolescents; varicocele; ejaculate; spermatozoa; male infertility.

**For citation:** Pichugova S.V., Rozanova S.M., Beikin Ya.B. Diagnosis of bacteriospermia and its impact on spermogram parameters in adolescents with varicocele. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 463-470 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-463-470>

**For correspondence:** Pichugova S.V., Candidate of Medical Sciences, senior researcher, laboratory of immunopathophysiology; e-mail: [ekb-lem@mail.ru](mailto:ekb-lem@mail.ru)

**Information about authors:**

Pichugova S.V., <https://orcid.org/0000-0001-7983-9906>;

Rozanova S.M., <https://orcid.org/0000-0001-8668-392X>;

Beikin Ya.B., <https://orcid.org/0000-0001-8622-1602>.

**Acknowledgment.** *The work was carried out within the framework of the state task of the Institute of Physics of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (subject No. 122020900136-4).*

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

Received 03.03.2022

Accepted 20.03.2022

Published 15.08.2022

**Введение.** Во всем мире в последние десятилетия наблюдается устойчивая тенденция к увеличению количества бесплодных пар и нарастанию мужского фактора в нарушении репродуктивной функции [1-4]. Многие патологические процессы репродуктивной сферы мужчин начинают формироваться уже в раннем детстве или в подростковом периоде и одним из таких заболеваний является варикоцеле, которое развивается в результате варикозного расширения вен семенного канатика и является наиболее частой причиной мужского бесплодия [5-8]. Негативное влияние варикоцеле на тестикулярную ткань складывается из развивающейся в результате нарушения оттока венозной крови ишемии, гипоксии, гипертермии, что ведёт к нарушению сперматогенеза, снижению синтеза тестостерона, развитию инфертильности [8-13]. Дополнительную роль в формировании бесплодия при варикоцеле могут играть другие факторы, напрямую не связанные с патогенезом варикоцеле, но усугубляющие патоспермию. Таким фактором может являться бактериоспермия, причём инфекционная этиология вызывает около 15% случаев мужского бесплодия [1, 14]. Инфекции, передающиеся половым путём, имеют, как правило, выраженную клиническую картину, достаточно легко диагностируются и роль таких микроорганизмов в патологическом влиянии на сперматозоиды хорошо известна, поскольку более ранние исследования бактерий в эякуляте сосредоточены на обнаружении, идентификации и определении воздействия на параметры спермы облигатных патогенов [2, 3, 15-20].

Сперма не является стерильной и может содержать большое количество микроорганизмов, которые могут быть комменсалами или контаминатами [15, 17, 20-22]. До сих пор не известно, связан ли микробиом спермы с мужской фертильностью или качеством спермы [23]. Поскольку многие микроорганизмы, обнаруживаемые в эякуляте, являются условно-патогенными (УПМ) для доказательства их участия в патологическом процессе недостаточно только определения их присутствия в сперме [17]. Некоторыми авторами утверждается, что бессимптомная бактериоспермия может являться причиной бесплодия [24]. Предполагается, что фертильность при наличии бактерий в эякуляте может быть нарушена разными механизмами и на разных уровнях: развитие воспаления, дисфункция добавочных желез и непроходимость эпидидимиса, непосредственное действие на сперматозоиды (фрагментация ДНК, нарушение акросомной реакции, повреждение митохондрий, снижение

прогрессивной подвижности), нарушение сперматогенеза путём прямой конкуренции за питательные вещества, производство бактериями токсических промежуточных продуктов метаболизма или эндотоксинов, изменение физико-химических параметров эякулята, иммуноопосредованное действие с появлением антиспермальных антител (АСАТ) [17-19, 22, 25-33]. Убедительные доказательства, указывающие на то, что бессимптомная бактериоспермия может служить этиопатогенетическим фактором, способным оказать негативное влияние на качество эякулята и стать причиной мужского бесплодия отсутствуют и сложно оценить влияние бессимптомной инфекции на фертильность [2, 18, 27, 33, 34].

Учитывая обследуемый контингент, предполагается, что подростки ещё не получают микроорганизмы посредством половых контактов, о чём свидетельствует отсутствие клинических проявлений заболеваний передающихся половым путём, предоставляется возможность определения влияния на фертильные свойства эякулята бессимптомной бактериоспермии, обусловленной, как правило, УПМ [15, 19, 35].

Поскольку клиническое значение бессимптомной бактериоспермии остается неясным, а выявление бактерий в сперме без оценки параметров эякулята не даёт представления о степени повреждения сперматозоидов, необходима комплексная оценка не только наличия бактерий в эякуляте, но и изменений показателей спермограммы.

Цель исследования: выявить частоту встречаемости бактериоспермии у подростков с левосторонним варикоцеле, оценить видовой состав бактерий в эякуляте, определить патологические изменения параметров эякулята при бактериоспермии.

**Материал и методы.** Выполнено нерандомизированное когортное наблюдательное сравнительное неинтервенционное исследование на базе ГАУЗ СО «КДЦ». Критерии включения: возраст 17 лет, левостороннее варикоцеле. Критерии исключения: наличие признаков инфекционно-воспалительного процесса урогенитального тракта, азооспермия, отказ от исследования. Исследованы эякуляты у 100 подростков с левосторонним варикоцеле и у 30 подростков без варикоцеле в возрасте 17 лет. Все обследуемые и их законные представители дали информированное согласие на участие в исследовании. ВОЗ до сих пор не разработала руководящих принципов по показаниям для выполнения бактериологического исследования эякулята [31]. Принятый стандарт оценки

микробиома мужских половых путей использует культуральный метод [17, 18, 36]. После предварительного мочеиспускания образцы спермы собирали путём мастурбации после 3-5 дней воздержания. Перед сбором эякулята обследуемым даны инструкции о необходимости выполнения процедур для предотвращения контаминации образцов. Пациенты должны помыть руки и пенис с мылом, сперма эякулировалась в стерильный контейнер [15, 28, 37].

**Культуральный метод.** Для первичного посева методом истощающего мазка материал засеивали стерильной бактериологической петлёй на кровяно-дрожжевой и шоколадный агар. Культивировали при 35°С. Для создания анаэробных условий шоколадный агар помещали в анаэростат. Через 16-18 ч чашки просматривали и при отсутствии роста выдерживали до 48 часов. Оценку выросших колоний проводили полуколичественным методом с оценкой по крестам (табл. 1).

Для видовой идентификации использован метод время-пролётной масс-спектрометрии, позволяющий проводить протеомный анализ с предварительной деградацией лазером. Исследования выполнены на масс-спектрометре MicroFlex LT Maldi-ToF (Bruker, Германия). Колонию вносили в ячейку мишени, тщательно растирали, просушивали и наносили матрикс. Подготовленный образец подвергали воздействию лазера и учитывали показания.

Оценку параметров эякулята и структуры сперматозоидов исследовали методом спермограммы и электронно-микроскопическим исследованием сперматозоидов (ЭМИС).

Спермограмма выполнена в соответствии со стандартами 5-й редакции ВОЗ, опубликованной в 2010 г. [40]. При выполнении спермограммы оценивали такие параметры эякулята, как объём спермы (мл), концентрация сперматозоидов (млн/мл), общее количество сперматозоидов (млн), кислотность, вязкость, наличие слизи, агрегации, агглютинации, лейкоцитов, амилоидных телец, прогрессивная подвижность, общая подвижность, морфология сперматозоидов.

Для ЭМИС эякулят фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида, после чего образец центрифугировали и полученный осадок помещали для последующей дофиксации в 1% раствор 4-х окиси осмия. Затем образец проводили через спирты возрастающей концентрации и полимеризовали в аралдитовой смоле при температуре 60°С. Ультратонкие срезы получали на ультратоме Leica EM UC6, контрастировали цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе Morgagni 268 при ускоряющем напряжении 70 киловольт. Строение сперматозоидов оценивали на продольных и поперечных срезах по следующим параметрам: форма ядра и состояние

хроматина (степень компактизации, наличие вакуолей и очагов деструкции), наличие акросомы, её локализация, размер и состояние, структура центриолей и аксонемы (количественные и качественные характеристики дуплетов, денеиновых ручек), структура и локализация митохондрий, плотных фибрилл, волокон фиброзного слоя, наличие цитоплазматической капли и её локализация.

Статистический анализ выполнен с использованием компьютерной программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). С помощью критерия  $\chi^2$  определена оценка нормальности распределения. В виде средних арифметических значений и стандартных отклонений представлены количественные показатели ( $M \pm SD$ ). Коэффициент Стьюдента применялся при оценке достоверности различий, для установления корреляционных взаимосвязей показателей использован линейный коэффициент корреляции Пирсона. Различия результатов считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Культуральным методом на питательных средах у подростков с варикоцеле и без варикоцеле в эякуляте обнаружены следующие виды бактерий (табл. 2).

Частота выявления бактерий в эякуляте культуральным методом одинакова у подростков обеих групп. У подростков с варикоцеле статистически значимо чаще выявлен умеренный рост *C. glucuronolyticum* по сравнению с подростками без варикоцеле. Бактерии в монокультуре выявлены в эякуляте обследуемых обеих групп, ассоциации бактерий – только у подростков с варикоцеле. При выполнении спермограммы и ЭМИС помимо оценки параметров эякулята и морфологии сперматозоидов обнаружены бактерии.

**Подростки с варикоцеле.** Наиболее выраженные изменения показателей эякулята выявлены у трёх человек, у которых при бактериологическом исследовании определён обильный рост *Staphylococcus haemolyticus* и *Streptococcus anginosus*, при этом в спермограмме у всех троих определена астенозооспермия со снижением всех видов подвижности. Из них в одном случае нарушение подвижности сочеталось с олигозооспермией и ещё в одном – с олиготератозооспермией. Бактерии обнаружены в спермограмме, при этом отмечались признаки воспалительной реакции – наличие сегментоядерных нейтрофилов, тяжёлой слизи. При ЭМИС в сперматозоидах обнаружены повреждения хроматина, акросомы в головках и митохондрий в жгутиках, бактерии.

Снижение прогрессивной подвижности сперматозоидов зафиксировано в шести случаях, когда культуральным методом исследования эякулята выявлен обильный рост *C. glucuronolyticum*, при смешанном росте *S. epidermidis* и *C. minutissimum*, сопровождающийся вискозипатией эякулята. Методом ЭМИС обнаружены повреждения

Таблица 1

Полуколичественный учёт колоний [38, 39]

Рост на пластинчатых средах	Ответ
1-5 колоний	Единичные колонии
Рост в первом квадрате (скудный рост во втором квадрате не учитывается)	«+», скудный рост
Рост во втором квадрате (скудный рост в третьем квадрате не учитывается)	«++», умеренный рост
Рост в третьем квадрате (скудный рост в четвёртом квадрате не учитывается)	«+++», обильный рост
Рост в четвёртом квадрате	«++++», обильный рост

митохондрий и акросомы, только в трёх случаях выявлены бактерии. В тех случаях, когда бактерии методом электронной микроскопии не обнаружены, при посеве диагностирован скудный рост микроорганизмов. Это связано с различной чувствительностью методов: при микроскопии бактерии определяют при их титре  $\geq 10^5$  КОЕ/мл, культуральным методом – при  $\geq 10^2$  КОЕ/мл.

В шести случаях выявлен скудный рост *C. glucuronolyticum*, при этом в спермограмме диагностирована нормозооспермия. Бактерии в спермограмме обнаружены в трёх случаях. Методом ЭМИС в этих случаях определена типичная ультраструктура сперматозоидов, бактерии не обнаружены.

Умеренный рост выявлен у нескольких видов бактерий: *C. glucuronolyticum* (6 случаев, статистически значимое отличие от подростков без варикоцеле), *E. faecalis* (3 случая), ассоциация *E. faecalis* и *E. coli* (3 случая). В трёх случаях, когда диагностирована *C. glucuronolyticum*, определена и астенозооспермия, в остальных случаях определена олигоспермия при нормальных остальных показателях. При астенозооспермии при ЭМИС обнаружены повреждения митохондрий, обилие слизи, единичные сегментоядерные нейтрофилы и бактерии. В остальных пробах ультраструктура митохондрий без особенностей, но обнаружены тяжёлые слизи, единичные сегментоядерные нейтрофилы и клетки плоского эпителия с адгезированными на них бактериями. В случаях наличия только *E. faecalis* или ассоциации *E. faecalis* и *E. coli* диагностирована нормозооспермия, но при ассоциации бактерий единичные микроорганизмы обнаружены при ЭМИС.

Методом спермограммы (при отрицательном результате посева) бактерии в небольшом количестве обнаружены у четырёх человек, в умеренном количестве у двух человек. Вероятно, обнаружены некультивируемые формы в титре  $>10^5$  КОЕ/мл. При этом во всех этих случаях отмечается астенозооспермия, причём у двух человек с умеренной бактериоспермией снижены все категории подвижности, обнаружены лейкоциты в эякуляте. У остальных четырёх человек зафиксирована

олигоспермия и снижение категории подвижности «А». При ЭМИС во всех этих случаях бактерии не обнаружены, но определено повреждение митохондрий, наличие тяжёлой слизи, сегментоядерные нейтрофилы выявлены только у двух человек, что и в спермограмме.

Методом ЭМИС бактерии в эякуляте обнаружены у 12 человек, причём у 6-ти человек обнаружены единичные бактерии или отмечается их адгезия на эпителиальных клетках, что может расцениваться как контаминация образца эякулята бактериями кожных покровов (см. рисунок, а). При этом диагностирована нормозооспермия как в спермограмме, так и при электронно-микроскопическом исследовании эякулята. В остальных 6-ти случаях в спермограмме определена астенозооспермия, сопровождающаяся снижением всех видов подвижности сперматозоидов, вискозипатия эякулята. При ЭМИС обнаружены повреждения акросомы, митохондрий, наличие крупных колоний бактерий (см. рисунок, б) и сегментоядерных нейтрофилов.

В 3-х случаях бактерии в эякуляте обнаружены при выполнении спермограммы и ЭМИС, результаты бактериологического исследования отрицательны. При этом в спермограмме диагностирована нормозооспермия и небольшое количество бактерий. При ЭМИС выявлена типичная структура сперматозоидов, единичные бактерии адгезированы на клетках плоского эпителия.

**Подростки без варикоцеле.** У четырёх человек в посевах эякулята выявлен скудный рост *C. glucuronolyticum*, при этом только в одном из этих случаев в спермограмме зафиксировано снижение поступательного движения сперматозоидов, в остальных трёх случаях выявлена олигоспермия, все остальные параметры эякулята в пределах нормы. Методом ЭМИС диагностирована нормозооспермия. В спермограмме и при электронно-микроскопическом исследовании эякулята бактерии в этих случаях не обнаружены.

Скудный рост *S. epidermidis* определён у двух человек. В спермограмме этих подростков диагностирована нормозооспермия, но при этом выявлены единичные лейкоциты и бактерии. При ЭМИС определена типич-

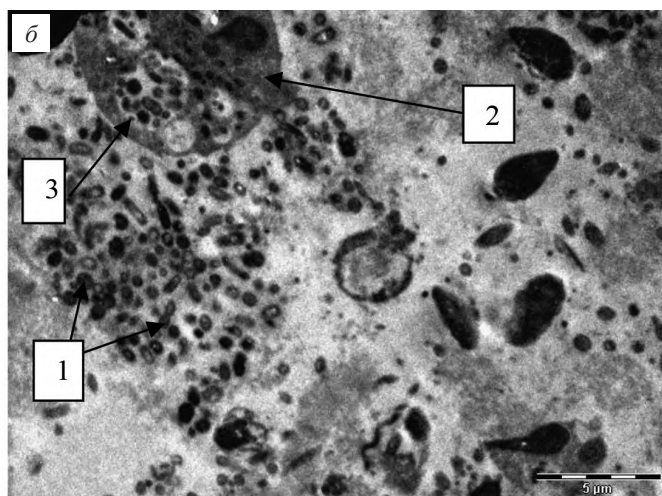
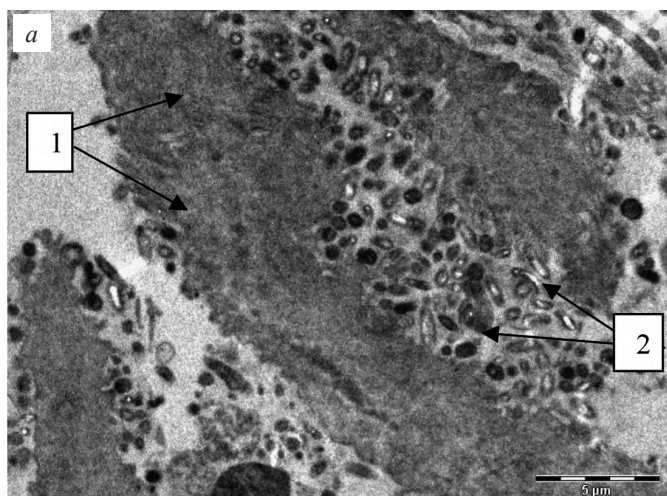
Таблица 2

Бактерии, обнаруженные в эякуляте подростков

Вид бактерий	Характер роста	Частота встречаемости	
		Подростки с варикоцеле, n=100	Подростки без варикоцеле, n=30
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> (Гр+ палочки)	«+»	6(6%)	4(13,3%)
	«++»	6(6%)*	-
	«+++»	3(3%)	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (Гр+кокки)	«++»	3(3%)	-
<i>Escherichia coli</i> (Гр-палочки)	«++»	-	2(6,6%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Гр+кокки)	«+»	-	2(6,6%)
Mixt			
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Гр+кокки)/ <i>Streptococcus anginosus</i> (Гр+кокки)	«+++»/«+++»	3(3%)	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (Гр+кокки)/ <i>Corynebacterium minitissimum</i> (Гр+ палочки)	«+»/ед. колонии	3(3%)	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (Гр+кокки)/ <i>Escherichia coli</i> (Гр-палочки)	«++»/«++»	3(3%)	-
Итого:		27(27%)	8(26,6%)

Примечание. \* - достоверно значимые различия ( $p \leq 0,05$ ).





**Бактерии в эякуляте.**

*a* – фрагмент клетки плоского эпителия (1), адгезия бактерий (2). Ув.х 3500; *б* – колония бактерий (1), сегментоядерный нейтрофил (2), фагоцитоз бактерий (3). Ув. х 2800.

Таблица 3

**Частота выявления бактериоспермии разными методами**

Метод диагностики бактериоспермии	Частота выявления бактериоспермии	
	Подростки с варикоцеле, n=100	Подростки без варикоцеле, n=30
Посев эякулята	9	4
Спермограмма	6	2
ЭМИС	12	-
Посев эякулята и спермограмма	3	2
Посев эякулята и ЭМИС	12	-
Спермограмма и ЭМИС	3	-
Посев эякулята, спермограмма, ЭМИС	3	2
Всего	48(48%)	10(33,3%)

Таблица 4

**Патологические изменения показателей спермограммы при бактериоспермии**

Вариант заключения спермограммы	Частота выявления	
	Подростки с варикоцеле, n=100	Подростки без варикоцеле, n=30
Нормозооспермия	24 (24%)	7 (23,3%)
Астенозооспермия	22(22%)	3 (10%)
Олигоастенозооспермия	1(1%)	-
Олиготератозооспермия	1(1%)	-
Олигоспермия	10 (10%)	4(13,3%)
Вискозипатия	18 (18%)*	2(6,6%)*

Примечание. \* – достоверно значимые различия ( $p \leq 0,05$ ).

ная ультраструктура сперматозоидов, единичные бактерии адгезированы на клетках плоского эпителия.

Ещё в двух случаях на питательных средах выявлены *E. coli*, умеренный рост. При оценке параметров эякуля-

та в спермограмме диагностирована астенозооспермия, вискозипатия, при ЭМИС – повреждение митохондрий в среднем отделе жгутика, при этом бактерии в эякуляте этими методами не обнаружены. Ещё у двух подростков в спермограмме в небольшом количестве обнаружены бактерии, при этом зафиксирована нормозооспермия и в одном случае олигоспермия. На ультраструктурном уровне определена нормозооспермия, бактерии при этом виде исследования не обнаружены, также, как и при посеве в этих двух случаях. Частота диагностики бактериоспермии разными методами представлена в табл. 3.

Применение нескольких методов диагностики бактериоспермии существенно повысило выявляемость микрофлоры в эякуляте у подростков обеих групп.

Патологические изменения показателей спермограммы при наличии бактерий представлены в табл. 4 (следует учитывать возможность комбинации различных видов патологических изменений параметров эякулята). При этом результаты оценки сперматозоидов методом ЭМИС не учитывались, так как они носят вспомогательный характер более детальной оценки патологических изменений сперматозоидов, а не всех параметров эякулята.

У подростков с варикоцеле в большом количестве случаев выявлены различные варианты патологических изменений параметров эякулята, но статистически значимо чаще диагностирована только вискозипатия эякулята.

**Обсуждение.** По результатам бактериологического исследования эякулята у подростков не обнаружены патогенные микроорганизмы, выявлены следующие виды бактерий: *E. coli*, *E. faecalis*, относящиеся к приоритетным уропатогенам [38,41], *C. glucuronolyticum*, *C. minutissimum*, *S. anginosus*, относящиеся к УПМ, в том числе урогенитального тракта мужчин [42–44]. Обнаружен *S. epidermidis*, являющийся, преимущественно, сапрофитной микрофлорой, но может быть и УПМ в определённых случаях [42]. Роль таких микроорганизмов как *S. haemolyticus* в возможности вызвать инфекцию урогенитального тракта недостаточно изучена [43].

Наиболее выраженные изменения сперматозоидов выявлены при наличии в эякуляте *S. haemolyticus*, *S. anginosus*, *C. glucuronolyticum*, когда отмечался обильный

рост этих микроорганизмов на питательных средах, при ассоциации *S. epidermidis* и *C. minutissimum*, хотя зафиксирован их скудный рост. В спермограмме в этих случаях диагностирована астенозооспермия, олигозооспермия, признаки воспаления (наличие сегментоядерных нейтрофилов, тяжелой слизи). При ЭМИС обнаружены повреждения хроматина и акросомы в головках сперматозоидов, набухание митохондрий, деструкция крист в среднем отделе жгутиков.

Астенозооспермия зафиксирована и в случаях умеренного роста *C. glucuronolyticum*.

Наличие УПМ *E. coli* и *E. faecalis* даже при умеренном росте не привели к патологическим изменениям параметров эякулята у подростков с варикоцеле, в то время как, у подростков без варикоцеле диагностировано нарушение подвижности сперматозоидов.

Наиболее часто при бактериоспермии диагностируется нарушение подвижности сперматозоидов, что может быть обусловлено прямым цитотоксическим действием на сперматозоиды продуктов метаболизма бактерий, и изменением в результате этого физико-химических свойств эякулята, в частности, изменением уровня pH семенной жидкости, снижением или повышением которого оказывает негативное воздействие на сперматозоиды. Подвижность сперматозоидов может быть нарушена в результате контакта между пиллями бактерий и жгутиками сперматозоидов за счёт усиления их адгезионных свойств, обусловленных активацией рецепторов маннозы на поверхности жгутиков [21, 35]. К нарушению подвижности сперматозоидов может вести и повышенное образование агглютинирующих антиспермальных антител, опосредованное перекрёстной реактивностью к антигенам бактерий и сперматозоидов [3, 25, 41]. Эндотоксины бактерий способны запускать экспрессию Toll-подобных рецепторов на мембранах сперматозоидов, что на фоне избыточной продукции АФК (активных форм кислорода) при воспалении, активации запрограммированной гибели клеток и усилении перекисного окисления липидов проводит к утечке цитохромов, активации киназ и накоплению мономеров YL-1, вызывающих деполяризацию мембран митохондрий [29]. Адгезия бактерий, воздействие их токсинов может приводить к разрыву мембран митохондрий как наиболее уязвимых, повреждению ядерной мембраны, мембраны акросомы, что и было диагностировано при выполнении ЭМИС.

Олигозооспермия и олигоспермия, диагностированные в ряде случаев, вероятнее всего не связаны с наличием бактерий в эякуляте, а обусловлены ещё не установленными в полной мере сперматогенезом и функцией добавочных половых желез у подростков. О нарушении сперматогенеза бактериями и их токсинами могло бы свидетельствовать наличие большого количества аномальных форм сперматозоидов, как результат повреждения сперматогенного эпителия в семенных канальцах. В нашем исследовании сперматозоиды, как правило, имеют нормальную морфологию, а выявленные изменения затрагивают правильно сформированные органеллы. Скорее всего, негативное влияние бактериоспермии на сперматозоиды происходит в дистальных, нестерильных отделах уrogenитального тракта.

Маркёром инфекционного процесса и воспалительной реакции любой локализации служит, как правило, наличие лейкоцитов [2, 18, 20, 35]. В проведённом исследовании лейкоциты выявлены в спермограмме и при ЭМИС, но не во всех случаях они отражали наличие

инфекционного процесса. Количество сегментоядерных нейтрофилов в семенной жидкости, помимо инфекции, может увеличиваться при курении, приёме лекарственных средств, физической активности, при варикоцеле [26]. Лейкоцитоспермия не может являться информативным прогностическим тестом, особенно в случаях бессимптомной бактериоспермии.

Повышение количества слизи в эякуляте может рассматриваться в качестве показателя присутствия бактерий и обусловленной ими воспалительной реакции, приводящей к дисфункции семенных пузырьков и предстательной железы. Вискозипатия эякулята диагностирована в 18% случаев у подростков с варикоцеле и в статистически значимо меньшем количестве случаев у подростков без варикоцеле при бактериоспермии. Чаше всего повышение вязкости эякулята отмечено в случаях выраженной бактериоспермии. У подростков вискозипатия эякулята может быть обусловлена неустановившейся функцией вспомогательных желез, о чем свидетельствует наличие повышенного количества слизи, и незначительным количеством бактерий без признаков воспалительной реакции.

Можно предположить, что выявление изменений параметров эякулята при наличии бактерий может свидетельствовать о бессимптомной инфекции, в то время как присутствие даже УПМ без изменения сперматозоидов может трактоваться как контаминация образца. Выявление патологических изменений в спермограмме при наличии УПМ, позволяет предположить, что патологический процесс обусловлен повышенным количеством бактерий (как правило, в этих случаях наблюдался обильный рост микроорганизмов) или ассоциацией различных видов бактерий, что может оказывать более неблагоприятное влияние на параметры спермы.

Необходимо учитывать, что простое присутствие бактерий в эякуляте уже может привести к ухудшению его качества, а хроническая бессимптомная инфекция может оказывать длительное негативное влияние на сперматогенез, проходимость семявыносящих и семявыбрасывающих протоков и инициировать формирование инфертильности.

У подростков с варикоцеле, сперматогенез изначально находится в неблагоприятных условиях, а наличие бактерий в эякуляте делает его ещё более уязвимым.

Выявление бактерий в эякуляте должно быть частью диагностики, и, возможно, в ряде случаев требовать лечения с целью профилактики мужского бесплодия уже в подростковом возрасте.

**Заключение.** Бактериологическим методом установлена высокая распространённость в эякуляте грамположительных кокков, относящихся к нормальной микрофлоре кожи.

Включение культуральной диагностики в комплекс исследования эякулята позволит значительно повысить выявление бактериоспермии.

УПМ при обильном росте или их различных комбинациях могут служить фактором развития патоспермии.

Отличить активную инфекцию от комменсальной микрофлоры или контаминации образца можно не только по наличию бактерий в эякуляте и их количеству, но и по степени повреждения функции сперматозоидов и патологическим изменениям параметров эякулята при использовании различных методов диагностики.

Наиболее часто при наличии бактерий в эякуляте диагностирована астенозооспермия.



ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 8, 12-32, 35,36, 38-44  
см. REFERENCES)

4. Белый Л.Е. Оплодотворяющая способность спермы у лиц с бессимптомной бактериоспермией. *Академический журнал Западной Сибири*. 2015; 4(59): 65-6.
5. Аполихин О.И., Москалева Н.Г., Комарова В.А. Современная демографическая ситуация и проблемы улучшения репродуктивного здоровья населения России. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2015; 4:4-14.
6. Евдокимов В.В., Захариков С.В., Кастрикин Ю.В. Варикоцеле у детей и подростков. *Лечение и профилактика*. 2017; 21(1):53-6.
7. Кодирова А.М., Негматова М.Н. Полиэтиология мужского бесплодия. Медицинская культура. Материалы XIX международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке», Москва; 2017:138-9.
9. Жиборев Б.Н. Варикоцеле, мужской гипогонадизм и репродуктивный прогноз. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П.Павлова*. 2008; 1:1-8.
10. Комарова С.Ю., Цап Н.А. Пути снижения риска репродуктивных потерь у детей с варикоцеле. *Медицинская наука и образование на Урале*. 2017; 1:98-101.
11. Кучеров В.А., Кравцов Ю.А., Матвеев С.В. Возможности и перспективы интраоперационного исследования половых гормонов при варикоцеле. *Уральский медицинский журнал*. 2018; 5: 102-7.
33. Годовалов А.П. Опыт изучения образцов эякулята инфертильных мужчин с бессимптомной бактериоспермией. *Электронный научно-образовательный Вестник «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2015; 17(11): 19-23.
34. Вавилов Н.В., Степанов М.С., Бушкова Е.Ю. Окислительная модификация белков и микробный пейзаж эякулята при мужском бесплодии. *Международный студенческий вестник*. 2016; 6:34.
37. Семёнов А.В., Пацановская Г.М. К вопросу о влиянии бактериоспермии на качество спермы. *Паллиативная медицина и реабилитация*. 2008; 4:29-33.
9. Zhiborev B.N. Varicocele, male hypogonadism and reproductive prognosis. *Rossiyskiy mediko-biologicheskii vestnik imeni akad. I.P. Pavlova*. 2008; 1: 1-8. (in Russian)
10. Komarova S.Yu., Tsap N.A. Ways to reduce the risk of reproductive loss in children with varicocele. *Meditsinskaya nauka I obrazovanie na Urale*. 2017; 1: 98-101. (in Russian)
11. Kucherov V.A., Kravtsov Yu.A., Matveev S.V. Possibilities and prospects of intraoperative study of sex hormones in varicocele. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 5: 102-7. (in Russian)
12. Cho C.L., Esteves S.C., Agarwal A. Indications and outcomes of varicocele repair. *Panminerva Med*. 2019; 2(61): 152-63. DOI: 10.23736/S0031-0808.18.03528-0.
13. Dabaja A.A., Goldstein M. When is a varicocele repair indicated: the dilemma of hypogonadism and erectile dysfunction? *Asian J. Androl*. 2016; 18( 2): 213-6. DOI: 10.4103/1008-682X.169560.
14. Ma Z., Li L. Semen Microbiome Biogeography: An Analysis Based on a Chinese Population Study. *Front Microbiol*. 2018; 9: 3333. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03333.
15. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L. J., Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril*. 2013; 100 (5): 1261–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991.
16. Stojanov M., Baud D., Greub G., N. Vulliamoz N. Male infertility: the intracellular bacterial hypothesis. *New Microbes New Infect*. 2018; 26: 37–41. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.08.012.
17. Pergialiotis V., Karampetsou N., Perrea D. N., Konstantopoulos P., Daskalakis G. The Impact of Bacteriospermia on Semen Parameters: A Meta-Analysis. *J. Family Reprod. Health*. 2018; 12(2): 73-83.
18. Solomon M., Henkel R. Semen culture and the assessment of genitourinary tract infections. *Indian. J. Urol*. 2017; 33(3): 188-93. DOI: 10.4103/iju.IJU\_407\_16.
19. Calogero A.E., Condorelli R.A., Russo G.I., Vignera S.L. Conservative Nonhormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *Biomed. Res. Int.*; 2017. Published online. DOI: 10.1155/2017/4650182.
20. Machen G.L., Bird E.T., Brown M.L., Ingalsbe D.A., Milaida M. East M.M. et al. Time trends for bacterial species and resistance patterns in semen in patients undergoing evaluation for male infertility. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent*. 2018; 31(2): 165-7. DOI: 10.1080/08998280.2018.1444298.
21. Štšepetova J., Baranova J., Simm J., Parm Ü., Rööp T., Sokmann S. et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 2020; 18(1):3. DOI: 10.1186/s12958-019-0562-z.
22. Pilatz A., Kilb J., Kaplan H., Fietz D., Hossain H., Schüttler C.G., Diemer T., Bergmann M., Domann E., Weidner W., Wagenlehner F., Schuppe H.C. High prevalence of urogenital infection/inflammation in patients with azoospermia does not impede surgical sperm retrieval. *Andrologia*. 2019; 51(10): e13401. DOI: 10.1111/and.13401.
23. Schoenmakers S., Steegers-Theunissen R., Faas M. The matter of the reproductive microbiome. *Obstet. Med*. 2019; 12(3): 107-15. DOI: 10.1177/1753495X18775899.
24. Saxena P., Soni R., Randhawa V.S., Singh N. Can seminal IL-8 level be used as a marker of leukocytospermia and does it have any correlation with semen parameters in infertile couples? *J. Obstet. Gynaecol. India*. 2019; 69(5): 451-6. DOI: 10.1007/s13224-018-1188-3.
25. Fijak M., Pilatz A., Hedger M.P., Nicolas N., Bhushan S., Michel V., Tung K.S.K., Schuppe H.C., Meinhardt A. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum. Reprod. Update*. 2018; 24(4): 416-41. DOI: 10.1093/humupd/dmy009.
26. Ricci S., De Giorgi S., Lazzeri E., Luddi A., Piomboni P., De Leo V., Pozzi G. Impact of asymptomatic genital tract infections on in vitro Fertilization (IVF) outcome. *PLoS One*. 2018; 13(11): e0207684. DOI: 10.1371/journal.pone.0207684.
27. Esmailkhani A., Akhi M.T., Sadeghi J., Niknafs B., Bialvaei A.Z., Farzadi L., Safadel N. Assessing the prevalence of *Staphylococcus aureus* in infertile male patients in Tabriz, northwest Iran.

REFERENCES

1. Wang F., Yang W., Ouyang S., Yuan S. The Vehicle Determines the Destination: The Significance of Seminal Plasma Factors for Male Fertility. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(22): 8499. Published online 2020. DOI: https://doi.org/10.1186/s13098-016-0192-y.
2. Damke E., Kurscheidt F. A., Irie M. M.T., Gimenes F., Conso-laro M. E. L. Male Partners of Infertile Couples With Seminal Positivity for Markers of Bacterial Vaginosis Have Impaired Fertility. *Am. J. Mens Health*. 2018; 12(6): 2104-15. DOI: 10.1177/1557988318794522.
3. Marques P.I., Gonçalves J.C., Monteiro C., Cavadas B., Nagir-naja L., Barros N., Barros A., Filipa Carvalho F., Lopes A. M., Seix-as S. Semen quality is affected by HLAclass I alleles together with sexually transmitted diseases. *Andrology*. 2019;7(6): 867-77. DOI: 10.1111/andr.12625.
4. Bely L.Ye. Fertilizing capacity of sperm in persons with asymptomatic bacteriospermia. *Akademicheskii zhurnal Zapadnoy Sibiri*. 2015; 4 (59): 65-6. (in Russian)
5. Apolikhin O.I., Moskaleva N.G., Komarova V.A. The current demographic situation and problems of improving the reproductive health of the population of Russia. *Experimental'naya I klinicheskaya urologiya*. 2015; 4: 4-14. (in Russian)
6. Evdokimov V.V., Zakhariikov S.V., Kastrikin Yu.V. Varicocele in children and adolescents. *Lechenie I profilaktika*. 2017; 21 (1): 53-6. (in Russian)
7. Kodirova A.M., Negmatova M.N. The polyethology of male infertility. Medical culture. Materials of the XIX International Congress "Health and Education in the XXI Century". Moscow; 2017: 138-9. (in Russian)
8. Alkaram A., McCullough A. Varicocele and its effect on testosterone: implications for the adolescent. *Transl. Androl. Urol*. 2014; 3(4): 413-7. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4683.2014.12.07.

MICROBIOLOGY

- Int. J. Reprod. Biomed.* 2018; 16(7): 469-74. DOI: 10.29252/ijrm.16.7.469.
28. Silago V., Mukama Y., Haule A.L., Chacha F., Igenge J., Mushi M.F., Mshana S.E. Bacteriospermia, extended spectrum beta lactamase producing Gram-negative bacteria and other factors associated with male infertility in Mwanza, Tanzania: a need of diagnostic bacteriology for management of male infertility. *Afr. Health Sci.* 2020; 20(1): 4-13. DOI: 10.4314/ahs.v20i1.4.
  29. Duracka M., Lukac N., Kacaniova M., Kantor A., Hleba L., Ondruska L., Tvrdá E. Antibiotics Versus Natural Biomolecules: The Case of In Vitro Induced Bacteriospermia by *Enterococcus faecalis* in Rabbit Semen. *Molecules.* 2019; 24(23): e 4329. DOI: 10.3390/molecules24234329.
  30. Barbagallo F., La Vignera S., Cannarella R., Crafa A., Calogero A.E., Condorelli R.A. The Relationship between Seminal Fluid Hyperviscosity and Oxidative Stress: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel).* 2021; 10(3): 356. DOI: 10.3390/antiox10030356.
  31. Jue J.S., Ramasamy R. Significance of positive semen culture in relation to male infertility and the assisted reproductive technology process. *Transl. Androl. Urol.* 2017; 6(5): 916-22. DOI: 10.21037/tau.2017.06.23.
  32. Baud D., Pattaroni C., Vulliamoz N., Castella V., Marsland B.J., Stojanov M. Sperm Microbiota and Its Impact on Semen Parameters. *Front Microbiol.* 2019;10:234. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00234.
  33. Godovalov A.P. Experience in studying ejaculate samples from infertile men with asymptomatic bacteriospermia. *Elektronnyi I obrazovatel'nyi vestnik "Zdorov'e I obrazovanie v XXI veke".* 2015; 17 (11): 19-23. (in Russian)
  34. Vavilov N.V., Stepanov M.S., Bushkova E.Yu. Oxidative modification of proteins and the microbial landscape of the ejaculate in male infertility. *Mezhdunarodnyi studencheskiy vestnik.* 2016; 6: 34. (in Russian)
  35. Berjis K., Ghiassi M., Sangy S. Study of seminal infection among an infertile male population in Qom, Iran, and its effect on sperm quality. *Iran. J. Microbiol.* 2018; 10(2): 111-6.
  36. Swanson G.M., Moskovtsev S., Librach C., Pilsner J.R., Godrich R., Krawetz S.A. What human sperm RNA-Seq tells us about the microbiome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020; 37(2): 359-68. DOI: 10.1007/s10815-019-01672-x.
  37. Semenov A.V., Patsanovskaya G.M. On the question of the effect of bacteriospermia on sperm quality. *Palliativnaya meditsina I reabilitatsiya.* 2008; 4: 29-33. (in Russian)
  38. Clinical microbiology procedures handbook. Amy L. Leber, ed. Department of Laboratory Medicine, Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio. Description: 4<sup>th</sup> ed. Washington, DC : ASM Press; 2016.
  39. Miller J.M., Binnicker M.J., Campbell S., Carroll K.C., Chapin K.C. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clinical Infectious Diseases IDSA Guideline; 2018:67 Downloaded from <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/67/6/e1/5046039> by IDSA user on 16 October 2018.
  40. WHO guidelines for the study and processing of human ejaculate. 5<sup>th</sup> ed. Transl. from English N.P. Makarov, L.F. Smoked, ed. Moscow: Publishing house Capital print; 2012.
  41. Schuppe H.C., Pilatz A., Hossain H., Diemer T., Wagenlehner F., Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. *Dtsch. Arztebl. Int.* 2017; 114(19): 339-46. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0339.
  42. Murray P.R., Barron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. Manual of clinical microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington: ASM Press; 2003.
  43. Gherardi G., Di Bonaventura G., Pompilio A., Savini V. *Corynebacterium glucuronolyticum* causing genitourinary tract infection. *Case report and review of the literature IDCases.* 2015; 2(2): 56-8.
  44. Băncescu G., Băncescu A., Constantinescu M.V. Streptococcus anginosus group – brief characterization and its contribution to the brain abscess pathogenesis. *Stoma. Edu. J.* 2015; 2(2): 153-61.