

## Панорамный анализ микрофлоры при простатите и мужском бесплодии

Заболевания урогенитальной сферы мужчин - уретрит, простатит, орхит до сих пор занимают важное место в проблеме здоровья и продуктивности человека. На рубеже нового тысячелетия проблема простатита требует нового осмысления и вызывает необходимость поиска рациональных подходов к его диагностике и лечению. Острый и хронический бактериальный простатит занимает два первых места в классификации простатитов Национального института здоровья США. Доля инфекционного простатита при этом растет в хронологическом порядке и в настоящее время составляет до 70% - 90% по оценкам разных лабораторий. Однако определение возбудителя, а тем более микст-инфекции при простатите (уретрите, орхите, мужском бесплодии) представляет проблему при клиническом или амбулаторном бактериологическом обследовании. Многие микроорганизмы, например, анаэробы и другие трудно культивируемые (коринеформы, микобактерии, микроскопические грибы) избегают детектирования современными методами клинической микробиологии. Их присутствие в семени и жидкости простаты становится известным лишь благодаря уникальным научным исследованиям, доступным специализированным научным лабораториям. Результатом являются, соответственно, единичные публикации в научной периодике. В изъязвлениях мужских половых органов найдены аэробные и анаэробные бактерии, *Mycoplasma*, *Haemophilus ducrey*, *Treponema pallidum*, *Herpes simplex virus*, дрожжи и нитчатые грибы. В семени мужчин, страдающих бесплодием, обнаружены *E.coli*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Neisseria*, *Corinebacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Achromobacter*, а также микроскопические грибы. Электронно-микроскопические исследования выявляют простую причину нарушения функции оплодотворения - обрастание микроорганизмами жгутика сперматозоидов и снижение их подвижности. При инфекционном простатите в разных исследованиях выявлены представители семейства *Enterobacteriaceae*, бактерии рода *Pseudomonas*, энтерококки (*Enterococcus faecalis*, *E.faecium* и другие), *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, and *Escherichia*, *Flavobacterium spp.*, *Pseudomonas testosteroni*. Исследование ДНК секрета и биоптатов простаты свидетельствует о наличии в них микроорганизмов, отличающихся от микробиоты кожи и прямой кишки, и, следовательно, не обнаруживаемых традиционными методами. Действительно, генетическим методом удалось определить в семени наличие 15 видов необычных анаэробов родов *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Rubrivirax*, *Actinobacillus*, *Veilonella* и *Eubacterium*, а также трех аэробов: *Streptococcus salivarius*, *S.pneumoniae* и *Burkholderia picketii*. Как неожиданность воспринимается обнаружение в секрете простаты превалирующего количества недетектируемых в обычной клинической практике коринеформных бактерий, причем в сложном сообществе с *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus* и *Escherichia*, состав которого различен у разных пациентов. Кроме того, обнаружены микробные ассоциации и у здоровых мужчин, однако иные, чем у больных и в меньшей концентрации. Следует отметить важное для диагностики инфекции обстоятельство, которое состоит в том, что микробные колонии могут быть локализованы в полисахаридных капсулах. Как показали электронно-микроскопические исследования, они покрывают стенки простаты и протоки при хроническом бактериальном простатите.

В таких случаях бактерии не могут выходить из капсулы и, следовательно, быть обнаружены методами, использующими выделение целых микроорганизмов. Однако их присутствие можно выявить и количественно оценить путем детектирования микробных маркеров - малых молекул, составляющих материал клеточной стенки микроорганизмов - бактерий, грибов, простейших, метаболитов вирусов в семени или секрете простаты. Тканевые, клеточные и капсульные барьеры не являются преградой для таких молекул - они, в отличие от микробных клеток, свободно их проходят и могут измерены методом газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (ГХ-МС), который представлен ниже.

Обширная колонизация генитальных органов и мочевыводящих путей предполагает множественность бактериальных агентов воспалений. Ясно, что успех лечения заболеваний микробного происхождения зависит от эффективности диагностики инфекции. Однако методы микробиологического анализа, применяемые в клиниках и медицинских центрах, позволяют одновременно определять один или несколько организмов из более чем тысячи видов, агентов внешней инфекции или колонизирующих организм человека и являющихся потенциальными патогенами.

Уникальные возможности в этом отношении дает метод ГХ-МС. В отличие от других методов он является количественным, т.е. позволяет определять точно и воспроизводимо во времени количество микробных клеток каждого из микроорганизмов, колонизирующих генитальные органы. Сотни измерений концентрации микробных маркеров, проведенные нами в норме и при воспалительных процессах в генитальных органах, при соответствующей статистической обработке современными методами, позволили определить клинически значимые концентрации маркеров. Это дает возможность фиксировать переход соответствующего микроорганизма из состояния симбионта в состояние патогена и применить к нему методы антимикробной терапии. По порядку величины уровень клинически значимых (патогенных) концентраций маркеров соответствует известным измерениям и составляет  $10^4$ - $10^5$  клеток в пробе.

Достоверность отнесения данных маркерного анализа подтверждена отличием состава микроорганизмов в норме и патологии, корреляцией с клиникой патологических отклонений, уменьшением (до нуля или нормального значения) концентраций маркеров патогенов в результате лечения антибиотиками, а также адекватностью состава микроорганизмов УГТ, определенного методом маркеров и известного (по литературным данным). Предложенный метод перспективен вследствие его экспрессности (определение всех маркеров в одном цикле анализа за 5 часов), прямой количественной связи концентрации маркера с количеством микроорганизмов, отсутствия необходимости культивирования пробы, независимости от физиологических, биохимических и прочих факторов, препятствующих традиционной культурально-биохимической и молекулярной диагностике ряда условно-патогенных микроорганизмов - комменсалов человека.

В результате десяти лет научных исследований и восьми лет практического применения метода сформирована база данных по 75 маркерам более чем 450 видов микроорганизмов (большинство из них считается недектируемыми), а также разработана программа их экспрессного количественного определения методом ГХ-МС непосредственно в пробе семени, мочи (и любых других биологических жидкостей). Из практически важных микроорганизмов за пределами возможностей метода остаются (пока не найдены маркеры): вирусы (кроме герпеса и энцефалита), уреоплазмы, микоплазмы, гарднерелла, мобилункус, трихомонада и некоторые другие.

Нами описаны примеры обнаружения микроорганизмов в экологических пробах и при инфекционных процессах этим методом, в том числе для анализа микрофлоры вагинального содержимого и эякулята, а также контроля маркеров микроорганизмов в крови при перитоните, эндокардите, респираторных заболеваниях и системных воспалениях неизвестной этиологии. Метод защищен четырьмя патентами. Выпущено под эгидой Центрального научно-исследовательского кожно-венерологического института пособие для врачей по бактериальной диагностике этим методом. Опубликованы научные статьи в российских и зарубежных изданиях. Принцип и примеры использования метода ГХ-МС микробной диагностики представлены в интернет на Русском медицинском сервере

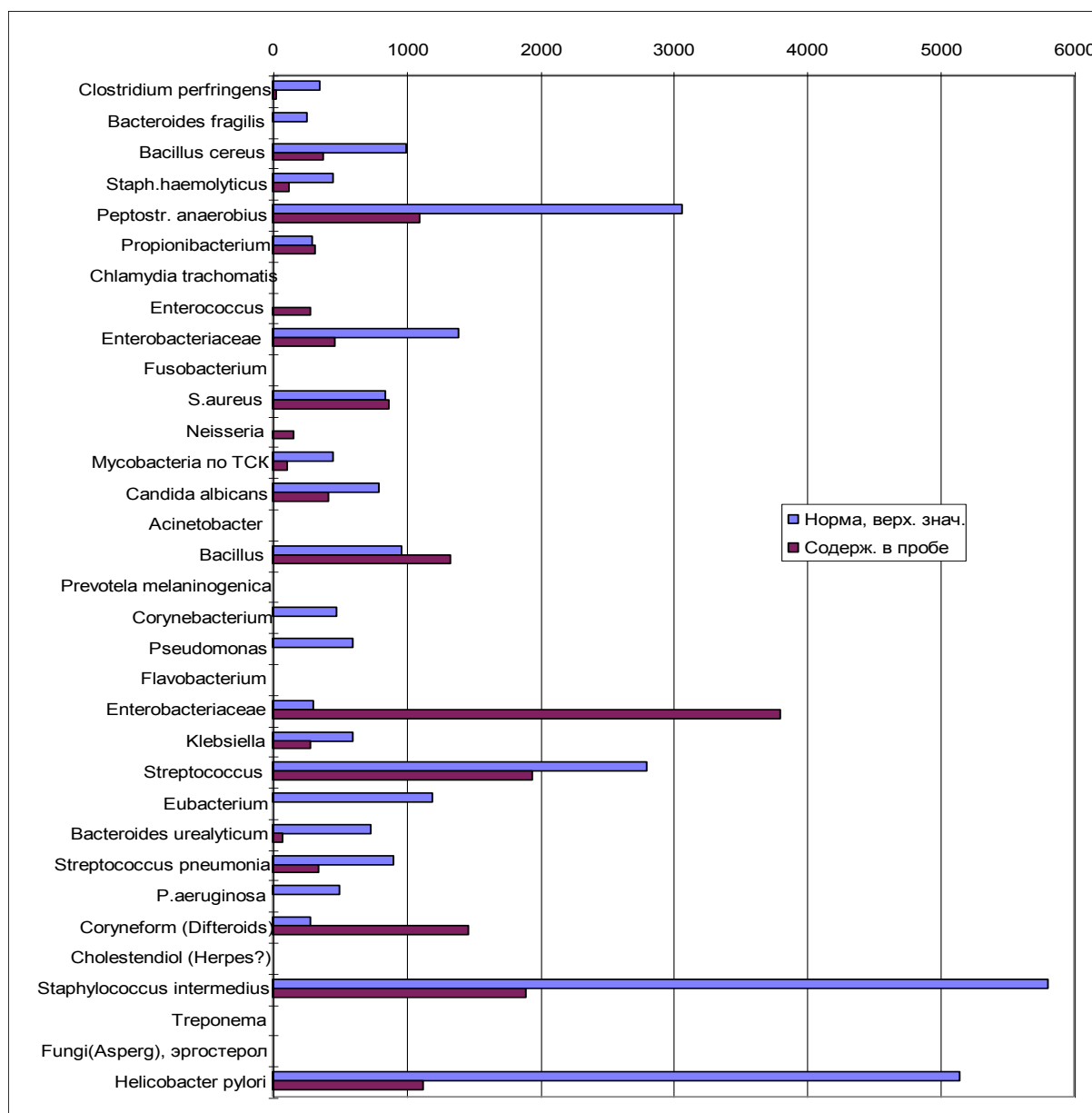
[www.rusmedserv.com/microbdiag](http://www.rusmedserv.com/microbdiag) и [www.rusmedserv.com/microbdiag/eng](http://www.rusmedserv.com/microbdiag/eng)

## **Примеры**

Нами проведен анализ состава микробных маркеров биологических жидкостей УГТ более ста пятидесяти пациентов уролога и сексопатолога. Примеры 1-4 и рис. 1-9.

### Пример 1.

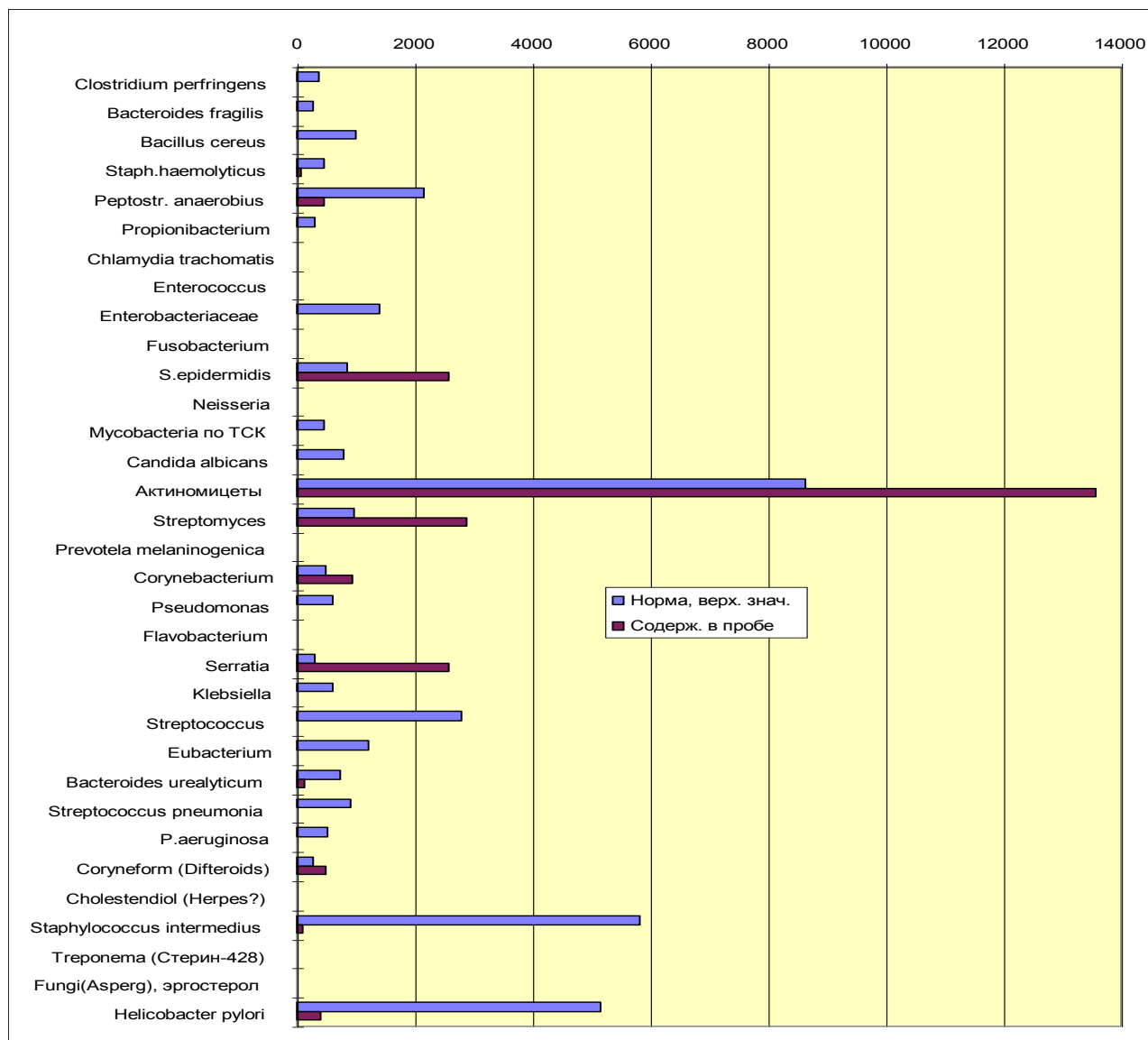
Состав микрофлоры генитальных органов при простатите по данным количественного определения микробных маркеров в эякуляте методом газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (ГХ-МС). Проба SF-106.



Комментарий. Проверено 75 маркеров, охватывающих 450 видов микроорганизмов инфицирующих и колонизирующих организм человека. Обнаружены маркеры энтерококков и гонококка, отсутствующие в норме. Из комменсалов (бактерий, колонизирующих генитальные органы в норме) превышают клинически значимый уровень (1,5 межквартильных расстояния функции распределения) представители семейства Enterobacteriaceae и коринеформные бактерии (рода Corynebacterium - группы C. betae, C. oertii; а также родов Curtobacterium, Brevibacterium). Таким образом имеет место смешанная инфекция из четырех групп бактерий, последняя из которых считается недиагностируемой в клинической практике, но актуальная в заболевании простатитом.

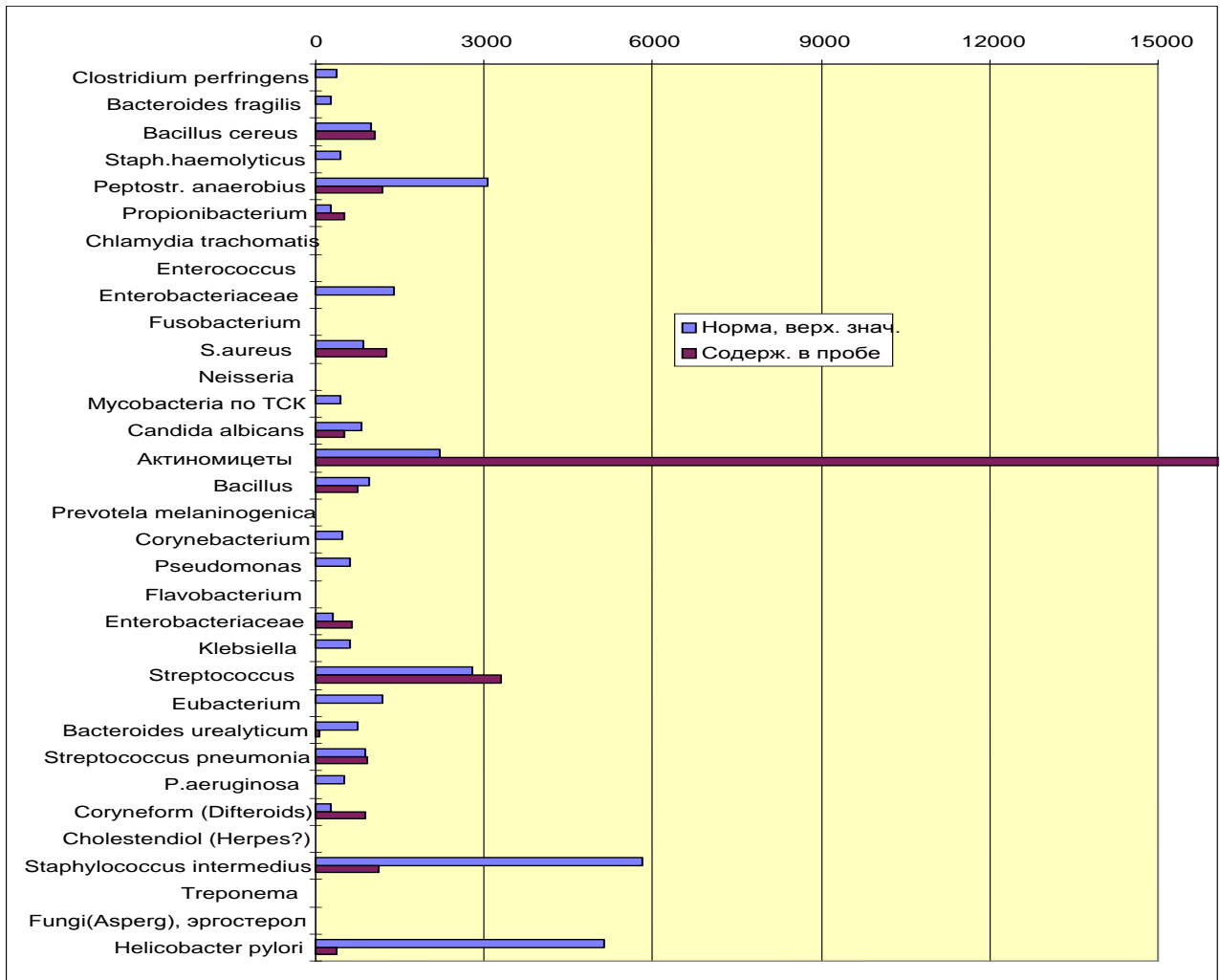
Подробные данные о составе микрофлоры, которые дает метод ГХ-МС, создают перспективу вылечивания в сложных случаях при адекватной антибиотикотерапии.

**Пример 2 Мужское бесплодие.** Состав микрофлоры генитальных органов по данным количественного определения микробных маркеров в эякуляте методом газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией (ГХ-МС). Проба SF-141.



Комментарий. Случай характеризуется резким снижением концентрации микроорганизмов, составляющих нормальную микрофлору мужских генитальных органов. Нарушение микробного гомеостаза - дисбактериоз. При этом превышают клинически значимый уровень численности содержание маркеров эпидермального стафилококка, бактерий рода Serratia, а также Corynebacterium (C.urealyticum в данном случае) и Streptomyces. Последние два рода не диагностируемы в клинической практике. С этим, видимо, связаны предыдущие неудачи пациента в лечении и его обращение к ГХ-МС диагностике через сеть интернет.

**Пример 3.** К нам часто обращаются пациенты с неустановленной микробной этиологией заболевания. Нередко оказывается, что его причиной является чрезмерное развитие актиномицетов



Комментарий. В значительной концентрации обнаружены 10-метил-разветвленные кислоты, которые характерны для актиномицетов родов *Streptomyces*, *Microtetraspora*, *Planomonospora*, *Actinomadura*. Завышена концентрация маркеров коринеформных бактерий (*Corinebacterium betae* и др.) и бактерий сем. *Enterobacteriaceae*.

Маркер *Streptomyces*, одного из основных микроорганизмов группы актиномицетов, отслеживается нами давно (рис.1).



Рис.1. Точечная диаграмма распределения концентраций изо-гексадекановой кислоты - маркера бактерий рода *Streptomyces* в эякуляте мужчин. Область клинической значимости выше ординаты 12. Это означает, что переход стрептомицетов в состояние патогенности происходит не так часто - 10 на 160 (из числа пациентов уролога), однако их доля может быть значительной в числе «неизлечимых» случаев простатита. Эта неизлечимость условна и происходит от недостатка диагностики или устойчивости стрептомицетов к большинству традиционно применяемых антибиотиков. Они сами являются их продуцентами, и, до уровня обозначенной здесь клинической значимости, полезны для организма человека. Содержание репера - гептадекановой кислоты (17:0), относительно которой построен график, - составляет 20мкг/мл эякулята (100 единиц по оси ординат).

Чаще клинически значимых величин достигает маркер бактерий сем. *Enterobacteriaceae* (наиболее вероятно, *Serratia*) (рис.2). Именно эти бактерии обычно обнаруживаются при обследовании бактериологическими методами.

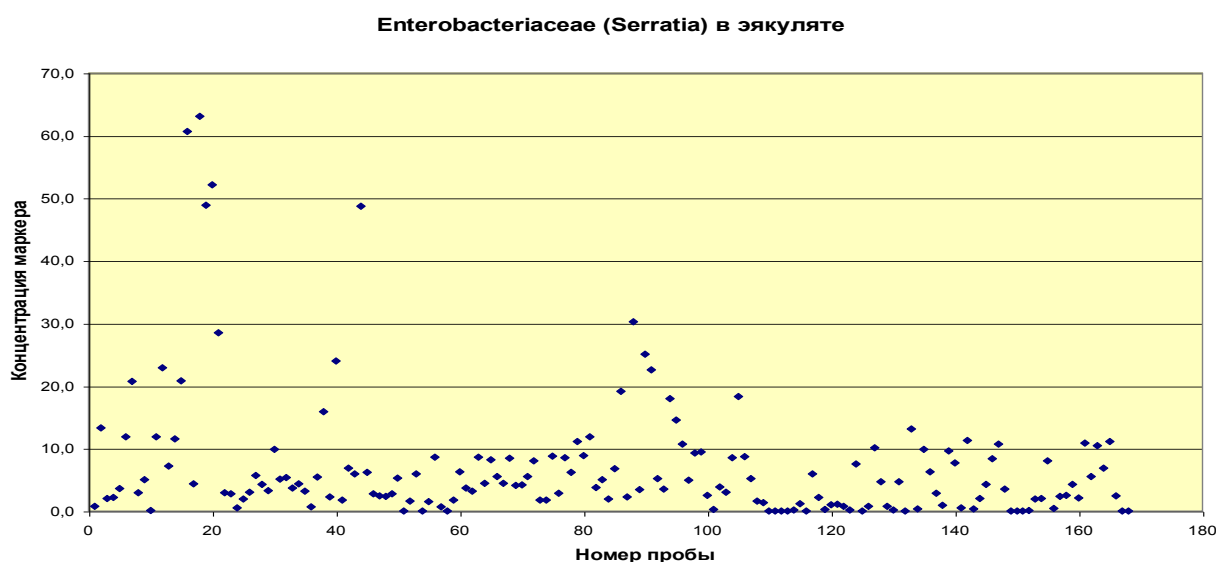


Рис.2. Точечная диаграмма распределения концентраций цис-вакценовой кислоты - маркера *Enterobacteriaceae* (наиболее вероятно, *Serratia*) в эякуляте мужчин. Область нормы ограничена ординатой 10.

Значительно реже производится контроль анаэробов – обитателей кишечника человека. Как показывают наши исследования, концентрация их маркеров довольно часто попадает в область клинической значимости (рис.3 и 4). Учитывая значение, которое уделяют, и небезосновательно, анаэробам при воспалительных процессах, не стоит пренебрегать их чрезмерным присутствием в столь деликатном органе.

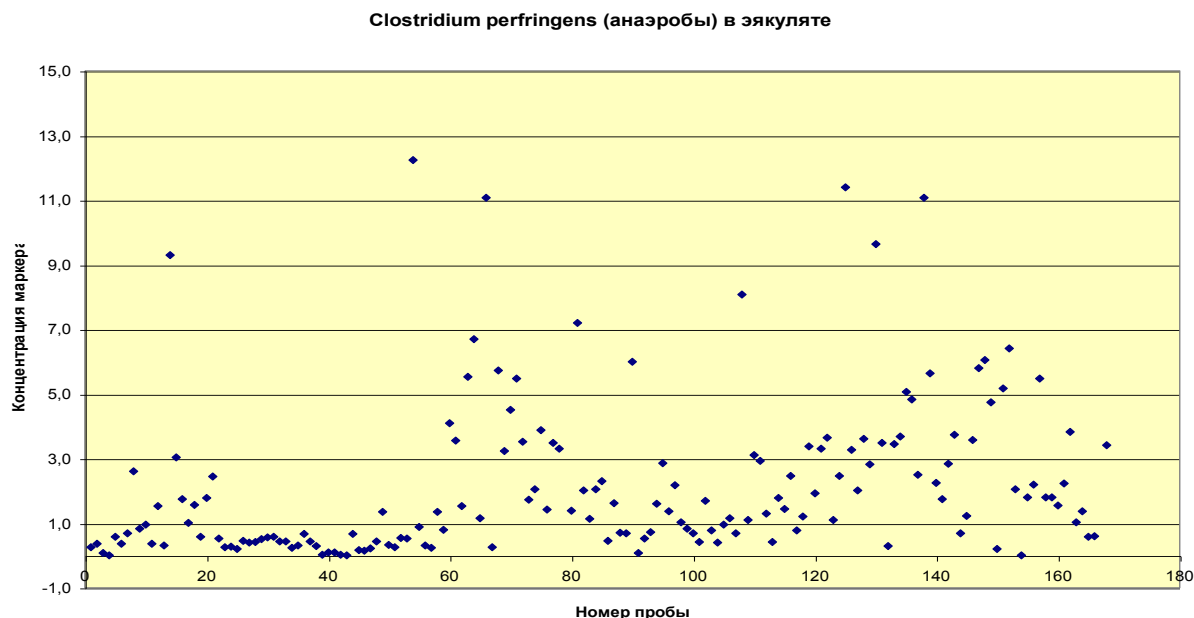


Рис.3. Точечная диаграмма распределения концентраций 10-гидрокси-октадекановой кислоты - маркера *Clostridium perfringens* в эякуляте мужчин. Область нормы ограничена ординатой 2.

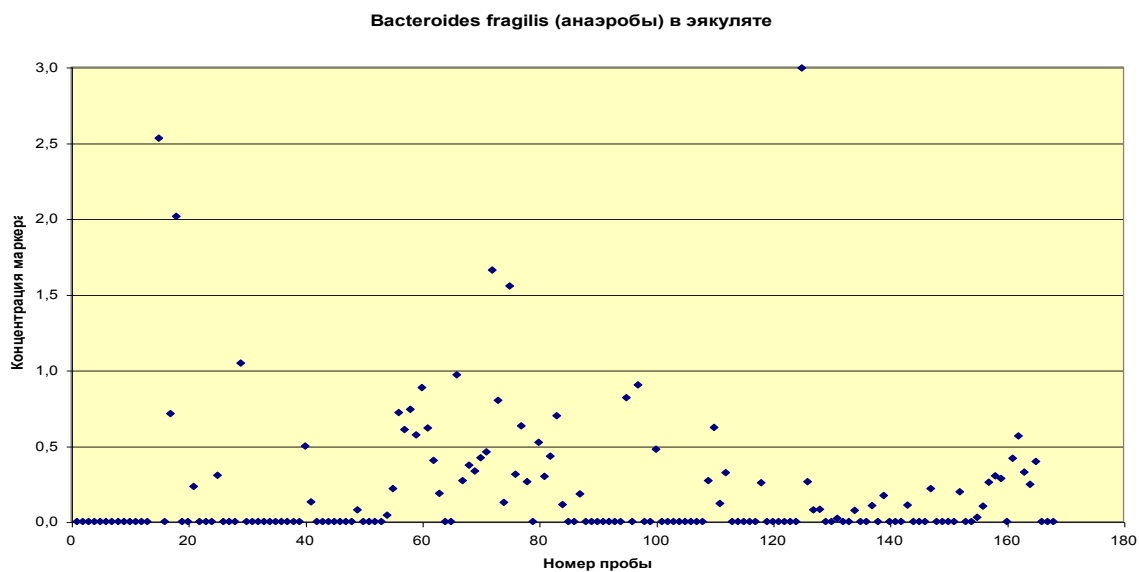


Рис.4. Точечная диаграмма распределения концентраций  $\beta$ -гидрокси-гептадекановой кислоты - маркера *Bacteroides fragilis* в эякуляте мужчин. Нормальные значения - нулевые.

Крайне проблематична ранняя диагностика туберкулезного простатита в клинической лаборатории. Методом ГХ-МС позволяет выявить микобактерии (в том числе туберкулезные) по наличию их специфического маркера - туберкулостеариновой кислоты (рис.5).

### Микобактерии (туберкулостеариновая кислота) в эякуляте

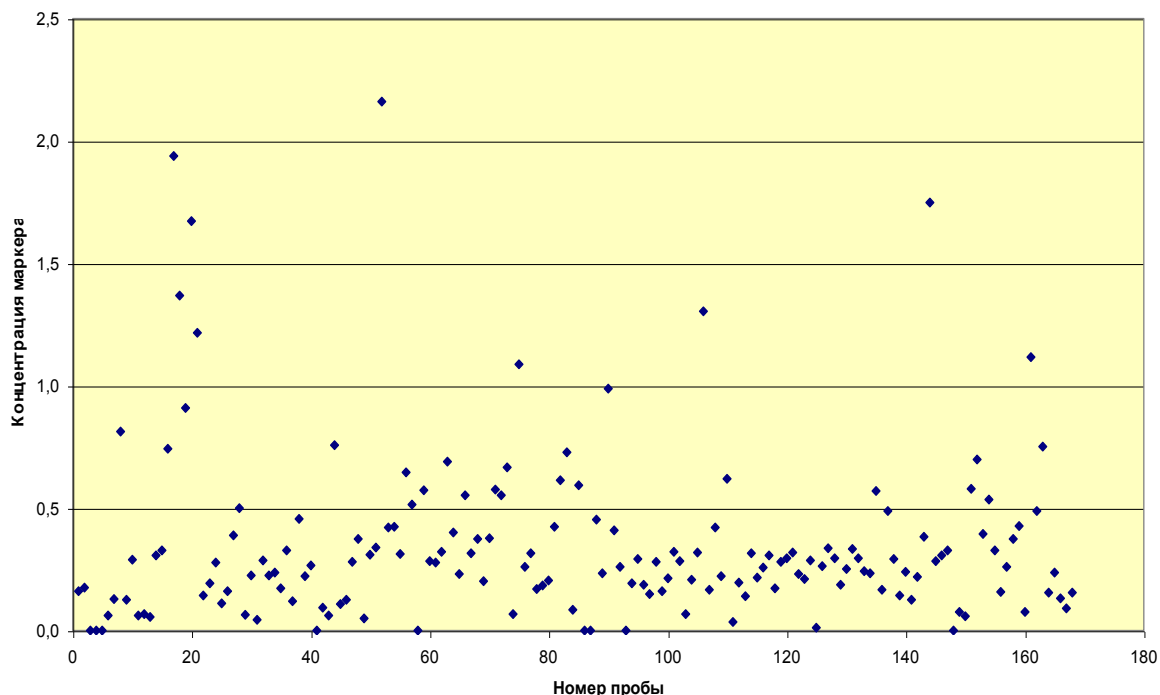


Рис. 5. Распределение концентраций туберкулостеариновой кислоты в эякуляте пациентов с различными заболеваниями. Уровень 0,7 по результатам статистической обработки является верхней границей распределения в норме. Данные выше этого уровня возможно связаны с наличием микобактерий туберкулеза.

Но, как оказалось, наиболее часто при обследовании пациентов уролога - мужчин с проблемами генитальных органов – выявляются гонококк и хламидии. Причем наличие гонококка не сопровождается клиникой гонореи. Т.е. имеет место скрытая хроническая форма инфекции, не обнаруживаемая при бактериоскопии мазка и трудно поддающаяся лечению. Метод ГХ-МС позволяет проводить не только первичную диагностику, но и контроль эрадикации (полного удаления) возбудителя в процессе лечения.



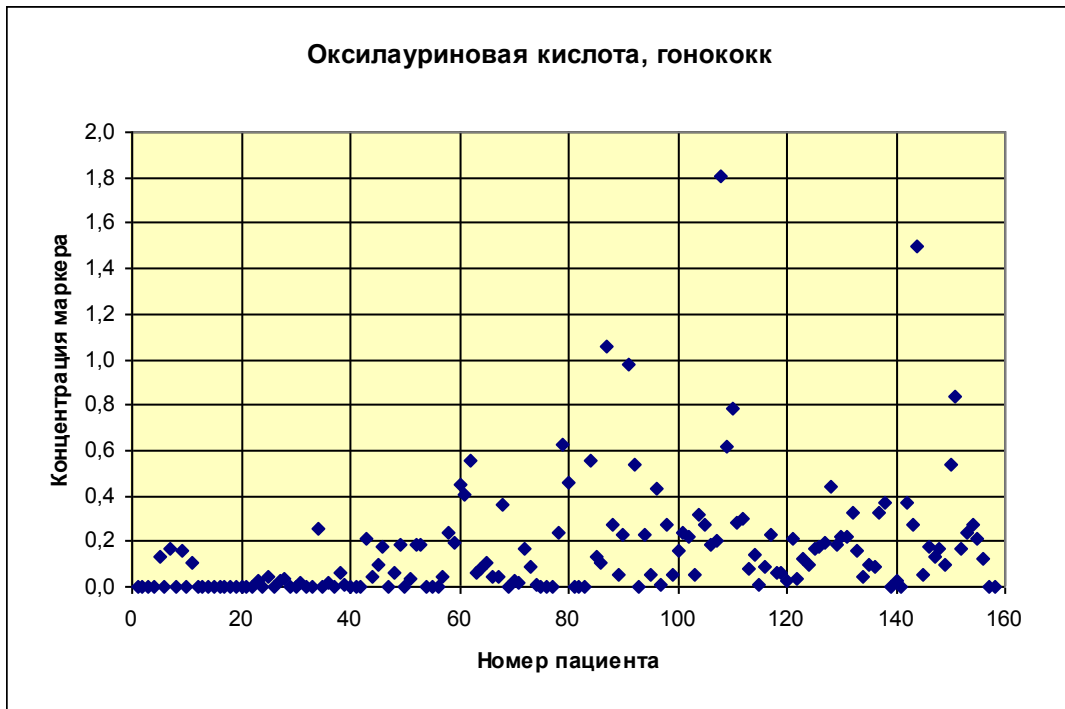


Рис.6. Точечная диаграмма распределения концентраций  $\beta$ -гидрокси-додекановой кислоты - маркера *Neisseria gonorrhoeae* (гонококк) в эякуляте мужчин. Нормальные значения - нулевые.

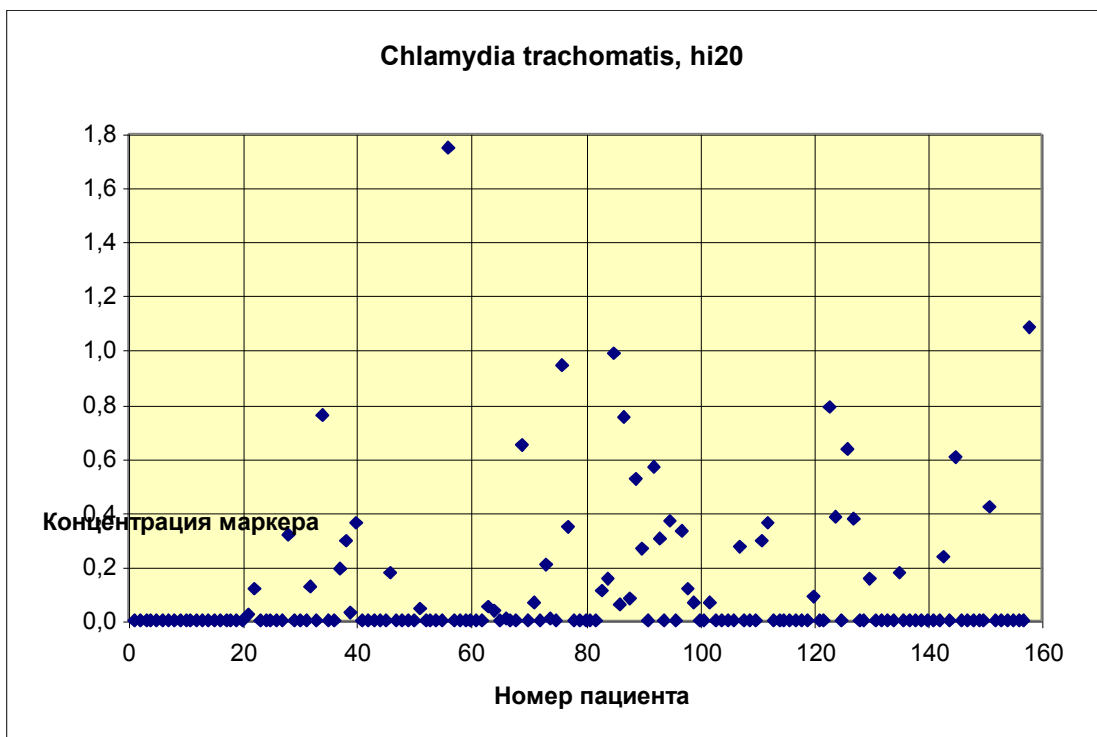


Рис 8. Точечная диаграмма распределения концентраций  $\beta$ -гидрокси-изо-эйкозановой кислоты - маркера *Chlamydia trachomatis* в эякуляте мужчин. Нормальные значения - нулевые.

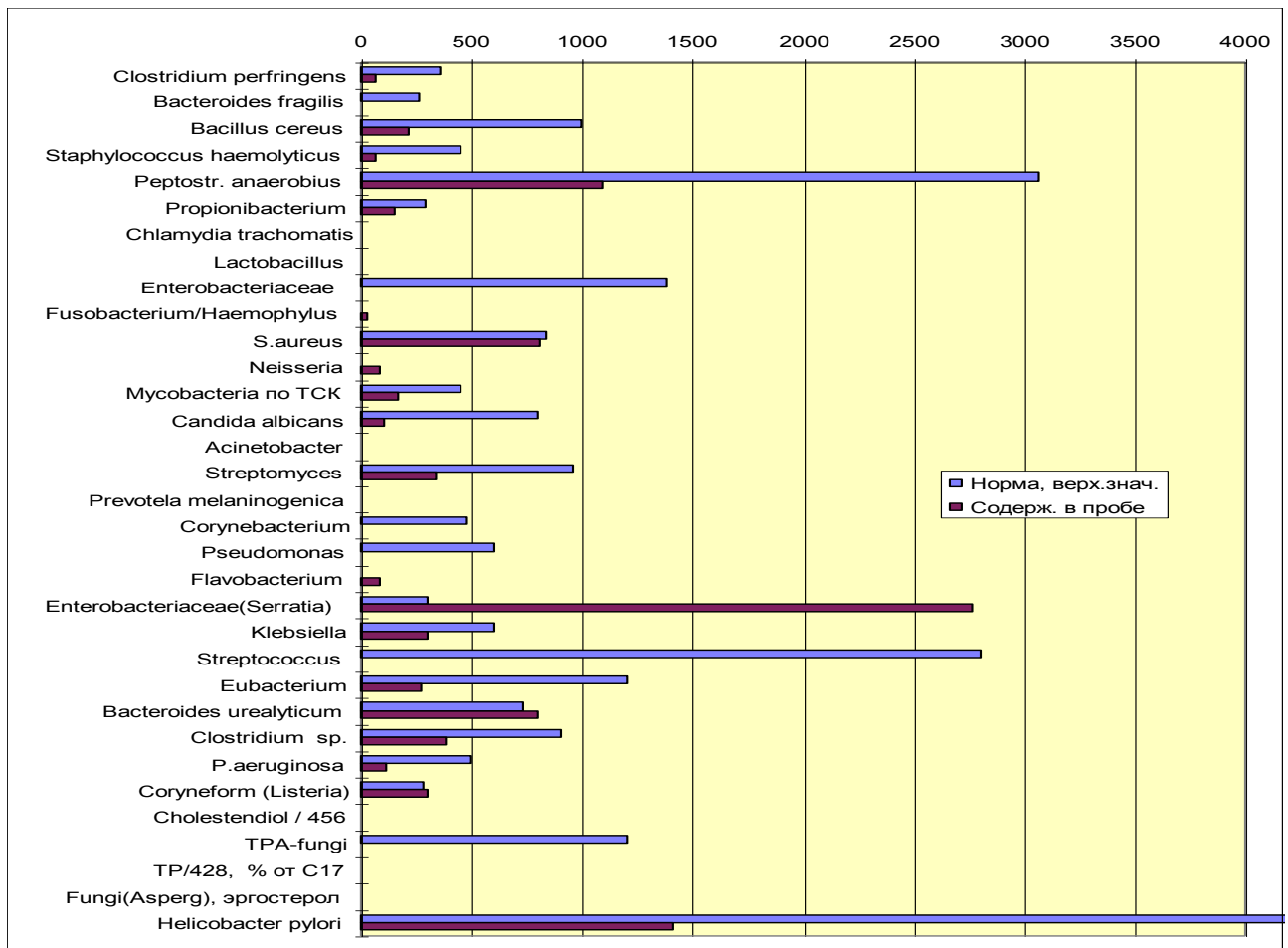
Существенная доля случаев инфекции при простатите и орхите связана с наличием стрептококковой инфекции (рис.9).



Рис.9. Точечная диаграмма распределения концентраций декановой кислоты - маркера оральных стрептококков в эякуляте мужчин. Нормальные значения - нулевые.

### Пример 3. Лечение хронической гонококковой инфекции.

К-мов, до лечения, проба SF-800

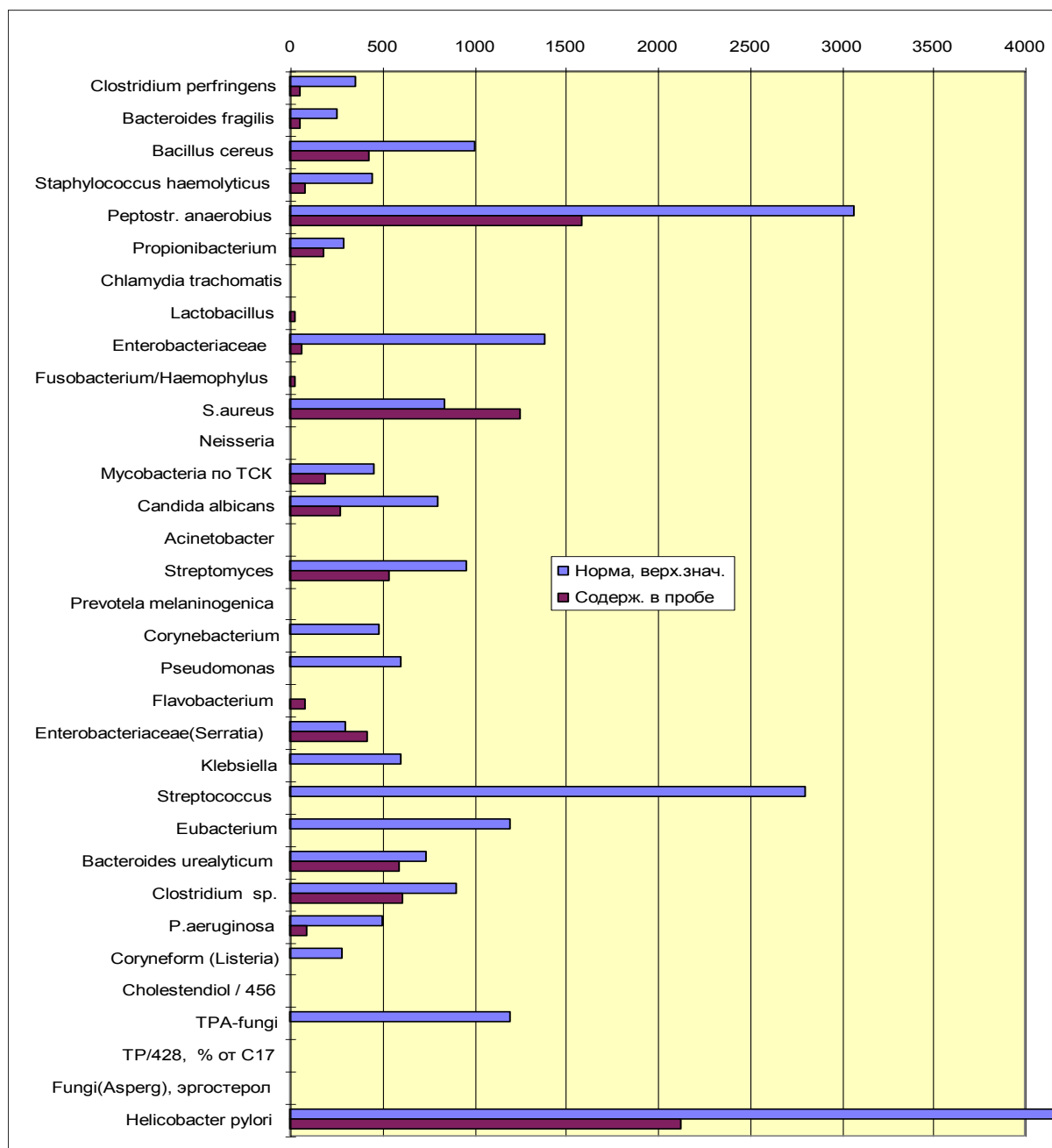


Комментарий. При первом анализе обнаружена  $\beta$ -гидрокси-додекановая кислота - маркер гонококка (*Neisseria* на диаграмме), ассоциированного с преобладающим количеством бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Других отклонений от нормы не обнаружено.

Проверено 75 маркеров, охватывающих 450 видов микроорганизмов инфицирующих и колонизирующих организм человека.

Не детектируются данным методом: вирусы (кроме герпеса и энцефалита), уреплазмы, микоплазмы, гарднерелла, мобилункус, трихомонада и некоторые другие микроорганизмы.

К-мов, после лечения



После проведения адекватного лечения профиль микроорганизмов пришел в норму. Маркер гонококка (Neisseria на диаграмме) не обнаруживается, количество энтеробактерий ниже верхнего значения нормы. Есть превышение количества стафилококка, но оно не является клинически значимым (укладывается в 1,5 межквартильных расстояния функции распределения)