

5. Заболеваемость COVID-19 медицинских работников. Вопросы биобезопасности и факторы профессионального риска. Платонова Т.А., Голубкова А.А., Тутельян А.В. и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2021. — Т.20, №2. — С. 4-11.
6. Внутриутробные инфекции новорожденных как маркер эпидемического неблагополучия в учреждениях родовспоможения. Смирнова С.С., Голубкова А.А., Алимов А.В., и др. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. — 2019. — Т. 18, №5. — С. 42-49.

Сведения об авторах

А.С. Нечитайло – ординатор

С.С. Смирнова – кандидат медицинских наук

А.А. Косова – кандидат медицинских наук, доцент

Informations about the authors

A.S. Nechitaylo – Postgraduate Student

S.S. Smirnova – Candidate of Sciences (Medicine)

A.A. Kosova – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

УДК: 618.15

МИКРОБНЫЙ СОСТАВ ЭЯКУЛЯТА В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Евгения Александровна Паначева¹, Екатерина Сергеевна Ворошилина²

^{1,2}ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Екатеринбург, Россия

^{1,2}МЦ «Гармония», Екатеринбург, Россия

¹evgenia.snigireva@yandex.ru

Аннотация

Введение. Роль условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в развитии бесплодия у мужчин является предметом дискуссии. Ряд авторов делают сдержанные выводы об ассоциации отдельных видов микроорганизмов (МО) эякулята с отклонениями в параметрах спермограммы и снижением наступления клинических беременностей при проведении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). В связи с этим актуальна проблема изучения микробного состава эякулята с помощью современных молекулярно-биологических методов, позволяющих определять все присутствующие бактерии, включая некультивируемые виды. **Цель работы** – описание микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ, с помощью количественной ПЦР. **Материалы и методы.** В ретроспективное одномоментное исследование включены данные о качественно-количественном микробном составе 192 образцов эякулята мужчин 19-55 лет в момент проведения лечения методом ВРТ с использованием ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). **Результаты.** В 125 пробах (65,1%) из 192 образцов спермы выявили ДНК от 1 до 15 групп МО. Численно преобладающую группу МО определили в

92 (73,6%) из 125 положительных проб. В большинстве случаев преобладали некультивируемые и трудно культивируемые облигатные анаэробы (ОА). **Обсуждение.** Настоящее исследование демонстрирует высокую частоту выявления условно-патогенных МО в надпороговых значениях в эякуляте, используемом для оплодотворения в программах ВРТ, что может оказывать влияние на развитие эмбрионов. Большинство проб эякулята были представлены сложными полимикробными сообществами, среди которых выделили численно преобладающую группу МО, что согласуется с ранее полученными данными с применением NGS-секвенирования. **Выводы.** При использовании метода ПЦР-РВ в большинстве проб эякулята, использованного для оплодотворения в программах ВРТ, выявили от 1 до 15 групп бактерий в клинически значимой концентрации. В положительных пробах выделили 6 вариантов микробиоты, каждый из которых характеризовался численным преобладанием одной из следующих групп МО: облигатные анаэробы, грамположительные факультативные анаэробы, грамотрицательные факультативные анаэробы, группа *Lactobacillus* spp., группа *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp. В части проб (26,4%) микробиота была представлена смешанными микробными сообществами.

Ключевые слова: микробный состав эякулята, Андрофлор, вспомогательные репродуктивные технологии.

MICROBIAL COMPOSITION OF SPERM IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS

Evgeniya A. Panacheva¹, Ekaterina S. Voroshilina²

^{1,2}Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

^{1,2}Medical Center “Garmonia”, Yekaterinburg, Russia

¹evgenia.snigireva@yandex.ru

Abstract

Introduction. The role of opportunistic pathogenic microorganisms in the development of infertility in men is the subject of discussion. A number of authors draw restrained conclusions about the association of certain types of microorganisms of sperm with deviations in the parameters of the spermogram and a decrease of success during assisted reproductive technologies. In this regard, the problem of studying the microbial composition of the sperm with the help of modern molecular biological methods that allow to determine all the bacteria present, including uncultivated species, is urgent. **The aim of the study** – to examine the microbial composition of the sperm used for fertilization in ART programs using quantitative PCR. **Materials and methods.** The retrospective one-stage study included data on the qualitative and quantitative microbial composition of 192 sperm samples of men aged 19-55 years at the time of ART treatment using PCR with real-time detection of results (PCR-RT). **Results.** In 125 samples (65.1%) out of 192 sperm samples, DNA from 1 to 15 MO groups was detected. The numerically predominant MO group was determined in 92 (73.6%) of 125 positive samples. In most cases, uncultivated and hard-to-cultivate obligate anaerobes were predominant. **Discussion.** The present study demonstrates a high frequency of detection of opportunistic bacteria in the

significant level in the sperm used for fertilization in ART programs, which may affect the development of embryos. Most of the ejaculate samples were represented by complex polymicrobial communities, among which a numerically predominant bacteria group was identified, which is consistent with previously obtained data using NGS sequencing. **Conclusions.** When using the PCR-RT method, from 1 to 15 groups of bacteria in clinically significant concentrations were detected in most samples of sperm used for fertilization in ART programs. In positive samples, 6 variants of the microbiota were identified, each of which was characterized by a numerical predominance of one of the following bacteria groups: obligate anaerobes, gram-positive facultative anaerobes, gram-negative facultative anaerobes, Lactobacillus spp. group, Enterobacteriaceae spp. / Enterococcus spp. group. In part of the samples (26.4%) the microbiota was represented by mixed microbial communities.

Keywords: microbial composition of sperm, Androflor, assisted reproductive technologies.

ВВЕДЕНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются краеугольным камнем современного лечения бесплодия. По данным литературы инфекции урогенитального тракта (УГТ) мужчин являются причиной бесплодия в 5-10% случаев [1]. Ряд авторов отмечают снижение функции сперматозоидов в присутствии отдельных видов микроорганизмов (МО). Отмечено, что *E.coli* способна снижать подвижность и жизнеспособность сперматозоидов, а *Anaerococcus* spp. ассоциируют с низким качеством спермы [2,3]. Однако роль инфекций УГТ, вызванных УПМ, в развитии бесплодия до сих пор не доказана. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области ВРТ, частота имплантации полученных эмбрионов остается низкой и, как было показано, зависит от многочисленных клинических и лабораторных факторов [4]. Эффективность программ ВРТ в значительной степени зависит от качества эмбриона. На развитие эмбрионов, в свою очередь, может оказать влияние бактериальная контаминация образцов спермы, используемых для оплодотворения, может привести к остановке развития эмбрионов [5]. Для понимания клинической значимости выявления МО в эякуляте мужчин репродуктивного возраста, проходящих лечение бесплодия методом ВРТ, необходим анализ частоты их выявления и особенностей микробного состава в образцах, используемых для оплодотворения в программах ВРТ.

Цель исследования – характеризовать микробный состав эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ, методом ПЦР-РВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с сентября 2019 г по сентябрь 2021 г в исследовании приняли участие 192 мужчины (средний возраст $35 \pm 5,14$ лет). Пациенты обратились в указанный период в Медицинский центр «Гармония» (г. Екатеринбург) для лечения бесплодия методом ВРТ в супружеской паре.

Критерии включения: отсутствие ИППП, отсутствие клинических проявлений инфекционно-воспалительных процессов УГТ, отсутствие системного или местного приема антибактериальных препаратов в течение 4-х недель перед исследованием, половое воздержание в течение 3-4 дней.

Для проведения ПЦР-РВ 0,5 мл эякулята помещали в пробирку Эппендорф с 0,5 мл транспортной среды («Транспортная среда с муколитиком», ООО «ИнтерЛабСервис»), встряхивали на вортексе до полного перемешивания. Пробирку центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости 50 мкл осадка использовали для последующего выделения ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва), оценку микробного состава эякулята осуществляли методом ПЦР-РВ (тест-система «Андрофлор» (ООО «НПО ДНК-технология», Москва) согласно инструкции производителя. Все результаты, полученные в ходе исследования, сводили в базу данных в программе Microsoft Office Excel 2010. Средний возраст пациентов в исследуемых группах выражали средним арифметическим и стандартным отклонением; оба показателя рассчитывали в программе Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Бактериальная ДНК, или общая бактериальная масса (ОБМ) отсутствовала или была определена в количестве менее 10^3 ГЭ/мл в 17 пробах (8,85%) из 192. В 50 пробах (26%) из 192 количество ОБМ составило более 10^3 ГЭ/мл, при этом бактерии не были идентифицированы. Отсутствие микроорганизмов (МО) в анализируемой пробе может быть связано с низкой микробной нагрузкой (менее 10^3 ГЭ/мл), которая соответствует значению отрицательного контрольного образца. В 125 пробах (65,1%) из 192 количество ОБМ составило $10^{3,1-10^7}$ ГЭ/мл, идентифицировано до 15 групп МО, представленных в разных количествах – от $10^3-10^{6,7}$ ГЭ/мл. Частота выявления отдельных групп МО представлена в таблице 1 (n= 125). Бактерии рода *Eubacterium* spp. идентифицировали в 76 пробах (60,8%) из 125 – чаще остальных УПМ. Следующими по частоте выявления были другие облигатные анаэробы (ОА): *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp., *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp. – обнаружены в 56 (44,8%) и 48 пробах (38,4%) из 125, соответственно. В каждом четвертом образце выявляли *Gardnerella* spp. Грамположительные факультативно-анаэробные микроорганизмы (ГПФА): *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp.– присутствовали в 47 (37,6%) и 31 (24,8%) образцах, соответственно. Остальные исследованные группы МО были обнаружены в меньшем количестве. Далее мы применили математический алгоритм, рассчитывающий долю каждой из групп бактерий по отношению к сумме всех выявленных в образце МО. В результате выделили 5 вариантов микробиоты по признаку численно преобладающей группы бактерий: группа ОА, группа ГПФА, группа *Lactobacillus* spp., группа *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp. и группа грамотрицательных факультативных анаэробов (ГОФА). Самой часто определяемой была группа с преобладанием ОА – 68 проб (54,4%) из 125; в 16 пробах (12,8%) из 125

численно преобладали представители нормальной микробиоты УГТ мужчин – *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. из группы ГПФА. В 6 пробах (4,8%) из 125 доминировала группа *Lactobacillus* spp.; на долю группы *Enterobacteriaceae* spp. / *Enterococcus* spp. и группы ГОФА пришлось по 1 случаю. В 33 случаях (26,4%) из 125 выявлены смешанные микробные сообщества, в которых одновременно присутствовали несколько групп МО в равных или незначительно различающихся долях, и выделить доминирующую группу бактерий не удалось.

Таблица 1

Частота выявления отдельных групп микроорганизмов в образцах эякулята, содержащих ОБМ $\geq 10^3$ ГЭ/мл, количество МО $\geq 10^3$ ГЭ/мл (n=125)

№	Группы микроорганизмов	n	%
1	<i>Eubacterium</i> spp.	76	60,8
2	<i>Bacteroides</i> spp. / <i>Porphyromonas</i> spp. / <i>Prevotella</i> spp.	56	44,8
3	<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i> spp.	48	38,4
4	<i>Corynebacterium</i> spp.	47	37,6
5	<i>Anaerococcus</i> spp.	38	30,4
6	<i>Lactobacillus</i> spp.	35	28
7	<i>Streptococcus</i> spp.	31	24,8
8	<i>Gardnerella</i> spp.	25	20
9	<i>Peptostreptococcus</i> spp. / <i>Parvimonas</i> spp.	22	17,6
10	<i>Enterobacteriaceae</i> spp. / <i>Enterococcus</i> spp.	15	12
11	<i>Atopobium</i> cluster	14	11,2
12	<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	12	9,6
13	<i>Staphylococcus</i> spp.	12	9,6
14	<i>Haemophilus</i> spp.	12	9,6
15	<i>Ureaplasma parvum</i>	11	8,8
16	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	9	7,2
17	<i>Mycoplasma hominis</i>	4	3,2
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia</i> spp. / <i>Burkholderia</i> spp.	2	1,6

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ, с помощью ПЦР (тест- система «Андрофлор») микробную ДНК в надпороговых значениях (не менее 10^3 ГЭ/мл) обнаружили в 125 (65,1%) пробах из 192. В 67 пробах (34,9%) из 192 бактериальная ДНК не определялась или была менее 10^3 ГЭ/мл. Отсутствие МО в эякуляте может быть связано с тем, что мужчины вступают в программу ВРТ после прегравидарной подготовки, включающей лечение воспалительных процессов УГТ. Ранее было показано, что отсутствие бактерий в сперме ассоциировано с благоприятными исходами ВРТ [5]. В ходе настоящего исследования МО обнаружены в 65,1%, при этом одновременно идентифицировали от 1 до 15 групп бактерий. В большинстве положительных проб численно преобладали ряд групп МО, что также согласуется с ранее

полученными данными о наличии микробных ассоциаций бактерий в сперме мужчин без проявлений инфекционно-воспалительного процесса[3,6,7]. В 33 случаях (26,4%) из 125 выделить преобладающую группу бактерий не удалось, в таких пробах одновременно присутствовали несколько групп МО в равных или незначительно различающихся долях. Выявление таких смешанных микробных сообществ демонстрирует разнородность микробного состава эякулята, которую ранее описали другие авторы, использовавшие для оценки микробного сообщества эякулята метод NGS-секвенирования[3,6]. Настоящее исследование демонстрирует высокую частоту присутствия МО в эякуляте, используемом для оплодотворения в программах ВРТ. Учитывая, что в большинстве проб МО выявлены в надпороговых значениях, необходимо проведение дальнейшего анализа для оценки потенциального влияния микробного состава на развитие эмбрионов.

ВЫВОДЫ

1. Применение ПЦР-РВ позволило установить присутствие от 1 до 15 групп МО в надпороговых значениях в 65,1% проб эякулята, использованного для оплодотворения в программах ВРТ.
2. Были выделены 6 вариантов микробиоты эякулята в зависимости от преобладающей группы МО, чаще других определяли вариант с преобладанием некультивируемых и трудно культивируемых облигатных анаэробов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Urogenital infection as a risk factor for male infertility/Schuppe H. C., Pilatz A., Hossain H. et al. // Deutsches Ärzteblatt International. – 2017; 114(19): 339.
2. Escherichia coli attaches to human spermatozoa: Affecting sperm parameters/ Kala S., Singh A., Prabha V. et al. // Archives of Applied Science Research. – 2011; 3(5): 618-23.
3. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men/ Hou D., Zhou X., Zhong X. et al. // Fertility and sterility. – 2013; 100(5): 1261-1269.
4. Национальный регистр РАРЧ// Российская ассоциация репродукции человека: ежегодн. отчет. – 2019. URL: https://rahr.ru/d_registr_otchet/RegistrART2019.pdf (Дата обращения: 01.02.2022).
5. Transfer of IVF-contaminated blastocysts with removal of the zona pellucida resulted in live births/ Shu Y., Prokai D., Berga S. et al. // Journal of assisted reproduction and genetics. – 2016; 33(10): 1385-1388.
6. Sperm microbiota and its impact on semen parameters/ Baud D., Pattaroni C., Vulliamoz N. et al. // Frontiers in microbiology. – 2019; 10: 234.
7. Impact of asymptomatic genital tract infections on in vitro fertilization (IVF) outcome / Ricci S., De Giorgi S., Lazzeri E. et al. // PloS one. – 2018; 13(11): e0207684.

Сведения об авторах

Е.А. Паначева – аспирант

Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

E.A. Panacheva – postgraduate student

E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

УДК: 618.7-002

РОЛЬ ДАННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА В ОЦЕНКЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ В УЧРЕЖДЕНИИ РОДОВСПОМОЖЕНИЯ

Валерия Алексеевна Панченко¹, Светлана Сергеевна Смирнова²

¹ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Минздрава России, Екатеринбург, Россия

² ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

¹valeriapanchenko98@gmail.com

Аннотация

Введение. Состояние микрофлоры влагалища во время беременности играет важную роль в поддержании физиологического микробиоценоза родовых путей, создании условий для нормального течения беременности, формировании микрофлоры кишечника новорожденного. Данные о результатах микробиологического мониторинга имеют большое значение в оценке эпидемиологической ситуации в учреждении родовспоможения. **Цель исследования** – изучить результаты микробиологического мониторинга биологического материала родильниц и новорожденных и определить их значимость при оценке эпидемиологической ситуации в учреждении родовспоможения. **Материалы и методы.** Проанализированы результаты микробиологических исследований биологического материала родильниц (посев лохий – 545 проб) и новорожденных (посев ректальных мазков – 462 пробы) за календарный год. В работе использованы эпидемиологический и статистический методы. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office 2010. **Результаты.** Доля положительных проб составила у родильниц – 80,6%, у новорожденных – 95,7%. Нормальная микрофлора влагалища у родильниц была выделена в 20,8% случаев, в структуре условно-патогенной микрофлоры преобладали микроорганизмы порядка Enterobacteriales, семейств Enterococcaceae и Staphylococcaceae. Их суммарная доля составила 61,8%. В структуре условно-патогенной микрофлоры, выделенной от новорожденных, также преобладали микроорганизмы порядка Enterobacteriales, семейств Staphylococcaceae и Enterococcaceae. Их суммарная доля была выше и составила 93,9%. Отмечено, что у новорожденных и родильниц не было выявлено резистентных штаммов стафилококков (MRSA, MRSE) и энтерококков (VRE). **Обсуждение.** Полученные данные позволяют оценить структуру микрофлоры здоровых родильниц и новорожденных, оценить имеющиеся различия. Результаты микробиологического мониторинга отражают циркуляцию наиболее значимых штаммов микроорганизмов. **Выводы.** Микробиологический мониторинг является важной составляющей эпидемиологического мониторинга. Полученные в ходе мониторинга данные