

На правах рукописи

Зорников Данила Леонидович

**ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО СОСТАВА ВАГИНАЛЬНОЙ
ЛАКТОФЛОРЫ И ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ
ДИСБИОЗА ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО
ВОЗРАСТА**

03.02.03 – Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск – 2017

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Ворошила Екатерина Сергеевна

Официальные оппоненты:

Савичева Алевтина Михайловна доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», лаборатория микробиологии, заведующая лабораторией

Летяева Ольга Ивановна доктор медицинских наук, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра дерматовенерологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург

Защита состоится «__» _____ 2017 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.117.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: 454092, Челябинская область, город Челябинск, улица Воровского, 64.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64) и на сайте www.chelsma.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Ю.С. Шишкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время огромное внимание исследователей и практикующих врачей уделяется женскому репродуктивному здоровью. Последнее определяется множеством факторов, одним из которых является вагинальная микрофлора.

Микроорганизмы, населяющие преимущественно влагалище женщины, защищают женщин от инфицирования многими патогенными микробами. Кроме того, вагинальная микрофлора способствует нормальному протеканию беременности и обеспечивает первичную колонизацию новорожденного в случае естественных родов (Dominguez-Bello, M.G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – Vol. 107, № 26. P. 11971-11975.).

Влагалище женщин в норме населяют представители рода *Lactobacillus*, которые и обеспечивают колонизационную резистентность биотопа, во многом за счет продукции молочной кислоты и других антимикробных веществ. Однако популяция лактобацилл может истощаться и на этом фоне наблюдается увеличение количеств условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) и развивается нарушение вагинальной микрофлоры – дисбиоз. Дисбиоз влагалища лежит в основе такого клинко-лабораторного синдрома как бактериальный вагиноз (БВ), который ассоциирован с увеличением риска инфицирования организма женщины возбудителями инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), развитием воспалительных заболеваний органов малого таза и осложнениями беременности (Hay, P.E. Bacterial vaginosis and miscarriage. Curr Opin Infect Dis. – 2004. – Vol. 17, № 1. – P. 41-44.; Leitich, H. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. Am J Obstet Gynecol. – 2003. – Vol. 189, № 1. P. 139-147.; Brotman, R.M. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. J Infect Dis. – 2010. – № 202. P. 1907-1915.).

БВ выявляется у 10-20% европеоидных женщин и у 30-50% представителей негроидной расы (Sobel, J.D. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis?. Dis Clin North Am. – 2005. – Vol. 19, № 2. – P. 387-406.). Высокая частота встречаемости и тяжесть последствий БВ требуют выяснения причин развития данного патологического состояния для дальнейшей разработки эффективных мер профилактики и лечения. Несмотря на серьезные усилия мирового научного сообщества, этиология БВ до сих пор неизвестна (Schwebke, J.R. New concepts in the etiology of bacterial vaginosis. Curr Infect Dis Rep. – 2009. – Vol. 11, № 2. – P. 143-147.). Данное обстоятельство диктует необходимость выявления предикторов трансформации нормальной вагинальной микрофлоры в патологическую.

Возможно, что одним из таких предикторов является состав вагинальной лактофлоры. На сегодняшний день, идентифицировано более 20 видов вагинальных лактобацилл. Однако доминирующим обычно является один вид – *L. crispatus* или *L. iners* и реже *L. jensenii* или *L. gasseri* (Ravel, J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – Vol. 108, Suppl 1. – P. 4680-4687.). В настоящее время большинство таких исследований выполнено за пределами России, а экстраполяция результатов затруднительна по причине различий в составе микрофлоры влагалища женщин, принадлежащих к

разным антропологическим группам. Вполне возможно, что определенный доминирующий вид лактобацилл может являться показателем, позволяющим судить о стабильности микробиоценоза влагалища женщин. Для этого необходимо исследовать частоту доминирования отдельных видов лактобацилл среди женщин с различными вариантами микробиоценоза влагалища, что позволит ассоциировать определенные виды лактофлоры с нормоценозом и дисбиозом.

В лечении БВ также не достигнуто серьезных успехов. Стандартная антибактериальная терапия метронидазолом и клиндамицином не дает продолжительного терапевтического эффекта; часто наблюдаются рецидивы (Летяева, О.И. Терапия рецидивирующего бактериального вагиноза: клинико-микробиологические аспекты. *Акушерство и гинекология*. – 2014. – № 4. С. 88-92.; Bradshaw, C.S. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis*. – 2006. – № 193. – P. 1478-1486.). Кроме того, используемые препараты негативно влияют и на лактофлору. В связи с этим весьма актуальной является задача поиска новых терапевтических подходов для коррекции дисбиоза влагалища.

Трудности коррекции дисбиозов связывают с формированием УПМ биопленок, матрикс которых препятствует проникновению лекарственных препаратов к бактериям. Весьма действенным средством коррекции дисбиоза влагалища является применение кавитированных низкочастотным ультразвуком антисептических растворов, учитывая, что кавитация лекарственных растворов способствует разрушению матрикса бактериальных биопленок (Гизингер, О.А. Применение ультразвуковой кавитационной терапии в лечении воспалительных заболеваний нижнего отдела генитального тракта: учебное пособие. – Екатеринбург: Изд. А.Г. Меденков, 2015. – 44 с.). Из рекомендованных к применению в акушерстве и гинекологии антисептиков наиболее привлекательным кандидатом для коррекции дисбиоза влагалища представляется раствор хлоргексидина, который не воздействует на представителей рода *Lactobacillus* (Sari, E. Microbiological evaluation of 0.2% chlorhexidine gluconate mouth rinse in orthodontic patients / E. Sari, I. Birinci // *Angle Orthod*. – 2007. – Vol. 77, № 5. – P. 881-884.) Все это позволяет предположить, что применение кавитированного низкочастотным ультразвуком 0,05% раствора хлоргексидина (КНУЗ РХ) может оказаться весьма эффективным инструментом в коррекции дисбиоза влагалища. В связи с этим актуальным представляется изучение влияния обработки влагалища КНУЗ РХ на состав вагинальной микрофлоры.

Отдельный интерес вызывает влияние приема содержащих лактобациллы пробиотиков на состав микрофлоры влагалища. Наиболее предпочтительным кандидатом для пробиотических препаратов является *L. crispatus*, обладающий повышенными протективными свойствами и в норме доминирующий во влагалище (Balashov, S.V. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. – 2014. Vol. 78, № 4. – P. 321-327.). России в настоящее время зарегистрирован единственный пробиотический препарат, содержащий *L. crispatus* – Экофемин Флораваг (ЭФ). Данный препарат предназначен для перорального применения. В тоже время механизмы влияния пероральных

пробиотиков на состав вагинального микробного сообщества до конца не изучены. В связи с этим представляется актуальным изучение изменений вагинального микробиоценоза, возникающих после применения данного препарата с целью коррекции дисбиоза.

Цель исследования

Оценка возможности коррекции нарушений вагинального микробиоценоза с помощью кавитированного низкочастотным ультразвуком раствора хлоргексидина и пробиотического препарата для перорального применения у женщин репродуктивного возраста в зависимости от видового состава лактофлоры.

Задачи исследования

1. Изучить видовой состав лактобацилл вагинального отделяемого у женщин репродуктивного возраста с различными вариантами микробиоценоза влагалища и установить варианты лактофлоры, являющиеся благоприятным фоном для поддержания стабильности нормоценоза.

2. Изучить изменения качественного и количественного состава вагинального микробиоценоза методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, возникшие в результате воздействия кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% водным раствором хлоргексидина биглюканата.

3. Оценить эффект последовательного применения обработки влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% водным раствором хлоргексидина и пробиотического препарата для перорального применения, содержащего живые *Lactobacillus crispatus*, на вагинальную микрофлору у женщин с дисбиозом влагалища в зависимости от доминирующего во влагалище вида лактобацилл.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проведено на базе Медико-фармацевтического центра «Гармония» (г. Екатеринбург). В период с сентября 2011 по август 2014 года было обследовано 636 женщин репродуктивного возраста, у каждой из которых было взято от 1 до 3 проб вагинального отделяемого. Исследуемые группы формировали в зависимости от задач исследования. Некоторые пациентки параллельно участвовали в нескольких исследованиях.

Всем пациенткам было проведено исследование микробиоценоза влагалища методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В пробах от 608 пациенток генотипировали вагинальные лактобациллы методом ПЦР-РВ. С целью оценки интенсивности воспалительной реакции во влагалище 104 пациенткам выполняли микроскопическое исследование мазка вагинального отделяемого.

Все исследования проведены в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 года (заключение Локального этического комитета при ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 15.05.2015 г.)).

В работе были использованы микробиологические (микроскопические и молекулярно-генетические) и статистические методы исследования. Результаты исследований подвергнуты статистической обработке с использованием программ IBM SPSS Statistics 20 и WinPepi.

Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом выборки, четко сформулированными критериями включения в исследование, использованием соответствующих цели и задачам методов исследования, современного оборудования, применением актуальных методов статистического анализа данных.

Основные результаты работы представлены на: 67-й, 68-й, 69-й и 70-й всероссийских научно-практических конференциях молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2012, 2013, 2014, 2015 гг.); 8-й всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (г. Москва, 2014); втором Евразийском конгрессе «Медицина, фармация и общественное здоровье» с международным участием (Екатеринбург, 2015); I международной (71 всероссийской) научно-практической конференции молодых учёных и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2016 г.).

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Разработка дизайна исследования, формулировка цели и задач исследования были выполнены автором совместно с научным руководителем д.м.н. Ворошилиной Е.С. Автором лично проведен анализ современной зарубежной и отечественной литературы по изучаемой проблеме. Автором самостоятельно проведены все молекулярно-генетические исследования, разработаны используемые в диссертационной работе показатели: индекс доминирования лактобацилл и кратность прироста условно-патогенных микроорганизмов. Статистическая обработка полученных результатов, подготовка статей и докладов, оформление диссертационной работы осуществлялись автором лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Влагилице женщин репродуктивного возраста колонизируют до пяти видов лактобацилл одновременно, однако доминирует, как правило, один. Доминирование *Lactobacillus crispatus* ассоциировано с содержанием высокой доли лактофлоры в микробиоценозе и является благоприятным фоном для поддержания нормоценоза влагилица. Доминирование *Lactobacillus iners* чаще наблюдается при сниженной доле лактофлоры в микробиоценозе, что соответствует критериям выраженного дисбиоза. Доминирование *Lactobacillus gasseri*, как правило, ассоциировано с промежуточной долей лактофлоры в микробиоценозе, что соответствует критериям умеренного дисбиоза.

2. Обработка влагилица кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина селективно воздействует на условно-патогенные микроорганизмы. Видовой состав лактофлоры при этом не изменяется, а доля

лактобацилл в микробиоценозе либо сохраняется на прежнем уровне при условии изначально высокого содержания лактобацилл, либо увеличивается, если перед обработкой лактофлора присутствовала в микробиоценозе в низких количествах.

3. После обработки влагалища пациенток с дисбиозом кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина отмечали восстановление нормоценоза у каждой второй пациентки; худшие результаты коррекции наблюдали при доминировании *Lactobacillus gasseri*. После приема перорального пробиотика, содержащего живые *Lactobacillus crispatus*, не отмечали достоверного увеличения доли пациенток с нормоценозом и не выявляли *Lactobacillus crispatus* в случае его отсутствия в микробиоценозе перед коррекцией.

Научная новизна

Впервые с помощью молекулярно-генетических методов исследования изучены особенности видового состава вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с различными вариантами микробиоценоза. Установлено, что среди популяции женщин репродуктивного возраста города Екатеринбурга чаще выявляются и доминируют виды *L. crispatus* и *L. iners*, реже – *L. gasseri* и *L. jensenii*. Впервые установлена взаимосвязь между доминирующим видом лактобацилл и долей лактофлоры в микробиоценозе. Установлено, что наиболее благоприятным является микробиоценоз с долей лактофлоры более 80%, представленной преимущественно *L. crispatus*. Продемонстрировано, что в микробиоценозах с долей УПМ более 80% лактофлора представлена почти исключительно *L. iners*.

Впервые с использованием ПЦР-РВ оценены изменения качественного и количественного состава микробиоценоза влагалища под воздействием КНУЗ РХ. Установлено, что обработка влагалища КНУЗ РХ селективно воздействует на условно-патогенные микроорганизмы, тогда как лактобациллы более устойчивы к данному воздействию, что с микробиологической точки зрения обосновывает целесообразность применения КНУЗ РХ для коррекции дисбиотических нарушений во влагалище.

Впервые с помощью метода ПЦР-РВ оценен микробиологический эффект применения двухэтапной схемы коррекции дисбиотических нарушений во влагалище, включающей обработку влагалища КНУЗ РХ и последующий прием пробиотического препарата на основе живых *L. crispatus*. Продемонстрировано, что пероральный прием пробиотического препарата не приводит к колонизации эпителия влагалища пробиотическим видом.

Теоретическая и практическая значимость работы

Данные диссертационного исследования дополняют и расширяют современные представления о лактофлоре влагалища. Демонстрируют взаимосвязь между доминированием отдельных видов лактобацилл, долей лактофлоры в микробиоценозе и количеством УПМ. Это позволяет дополнительно прогнозировать устойчивость микробиоценоза на основании выявления того или иного доминирующего вида лактобацилл у пациентки. Полученные результаты демонстрируют микробиологическую эффективность обработки влагалища КНУЗ РХ или комбинированного применения КНУЗ РХ и

пробиотического препарата, содержащего живые *L. crispatus*, в коррекции дисбиоза влагалища.

Полученные данные могут применяться при преподавании микробиологии, акушерства и гинекологии или использоваться при создании коммерческих тест-систем для генотипирования вагинальных лактобацилл. Результаты исследования обосновывают целесообразность применения двухэтапной схемы коррекции дисбиоза влагалища, заключающейся в последовательном применении КНУЗ РХ и перорального приема пробиотического препарата, содержащего живые *L. crispatus*.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследований используются в учебном процессе кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Метод оценки лактофлоры влагалища с помощью ПЦР-РВ и алгоритм коррекции дисбиоза влагалища внедрены в лечебное учреждение г. Екатеринбурга – ООО «Медицинский центр Гармония».

По результатам полученных в настоящем исследовании данных было разработано учебно-методическое пособие для врачей акушеров-гинекологов.

Полученные в ходе исследования данные были использованы компанией «ДНК-технология» для создания коммерческой тест-системы «типирование лактобактерий».

Публикации

Соискатель имеет 17 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации – 12 научных работ общим объемом 4,66 печатных листов, в том числе 5 работ опубликованы в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации (5 статей); 7 работ опубликованы в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 126 листах печатного текста и состоит из введения, главы литературного обзора, описания использованных материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 4 рисунками. Список литературы содержит 314 источников, из которых 43 опубликовано в отечественной литературе и 271 – в зарубежных изданиях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Характеристика обследованных групп женщин и дизайн исследования

Для решения первой задачи с целью изучения видового состава вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста в исследование были включены 608 женщин в возрасте от 18 до 45 лет, (средний возраст $30,3 \pm 6,6$ лет). Всех женщин обследовали однократно: оценивали состояние

микробиоценоза влагалища и проводили генотипирование 6 видов лактобацилл с помощью метода ПЦР-РВ (рисунок 1).

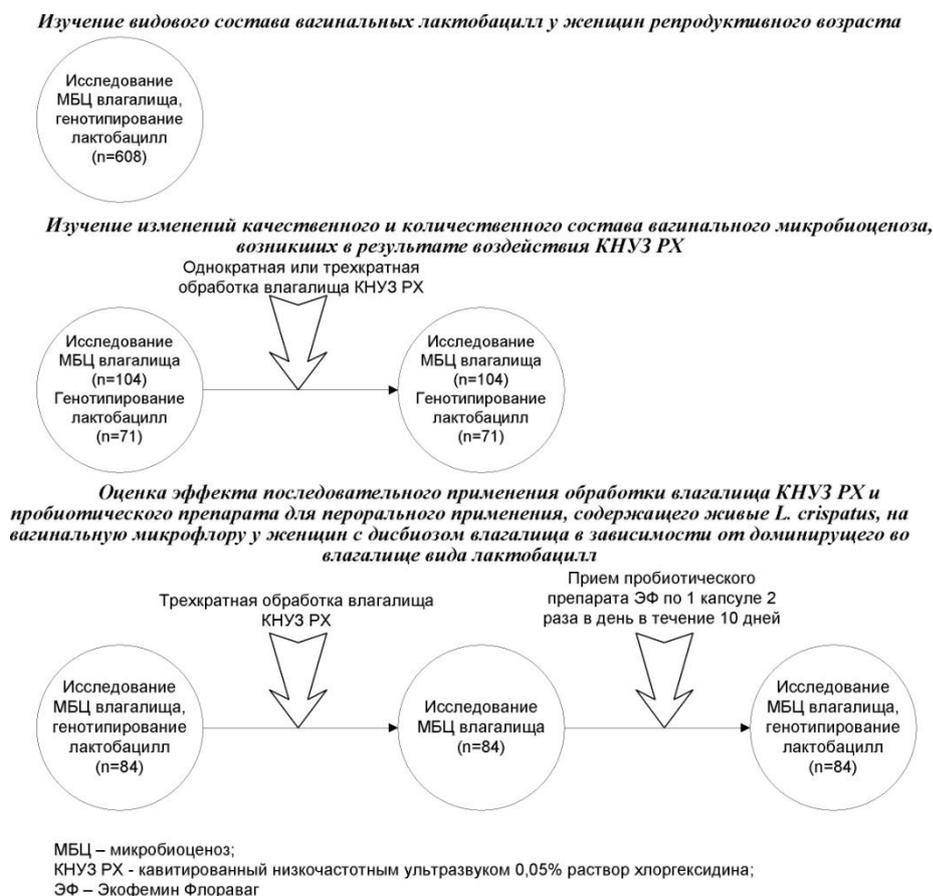


Рисунок 1 – Схема исследования

С целью изучения изменений качественного и количественного состава вагинального микробиоценоза, возникших в результате воздействия КНУЗ РХ, были обследованы 104 пациентки, планировавшие искусственное прерывание беременности (ИПБ) в сроках от 5 до 12 недель методом вакуум-аспирации. Средний возраст беременных составил $29,3 \pm 6,7$ лет. С целью профилактики воспалительных осложнений ИПБ всем женщинам, планировавшим проведение вакуум-аспирации, проводили обработку влагалища КНУЗ РХ с помощью аппарата АУЗХ-100 в соответствии с руководством (Обоскалова, Т.А. Профилактика и лечение воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии с использованием метода ультразвуковой кавитации лекарственных растворов: практическое руководство для врачей. – Екатеринбург: Изд. Vip-Ural, 2014. – 68 с.): время воздействия – 1-2 минуты, мощность – 6-8 единиц, объем используемого раствора – 150-200 мл. Беременным с клинико-лабораторными признаками вагинита или БВ назначали три процедуры, обработку проводили один раз в сутки, последнюю – за 1-2 часа до манипуляции; клинически здоровым женщинам с профилактической целью выполняли одну процедуру за 1-2 часа до манипуляции. Состояние микробиоценоза влагалища исследовали до и после обработки влагалища КНУЗ РХ микроскопическим методом и методом ПЦР-РВ. У 71 из 104 пациенток в дополнение к оценке микробиоценоза до и после обработки генотипировали вагинальные лактобациллы (рисунок 1).

Для оценки эффекта последовательного применения обработки влагалища КНУЗ РХ и пробиотического препарата для перорального применения, содержащего живые *L. crispatus*, на вагинальную микрофлору у женщин с дисбиозом влагалища в зависимости от доминирующего вида лактобацилл в исследование были включены 84 женщины в возрасте от 18 до 44 лет (средний возраст $30,7 \pm 5,5$) с дисбиозом влагалища, подтвержденным методом ПЦР-РВ. В зависимости от выраженности дисбиотических нарушений обследованные были разделены на две группы: 32 женщины с умеренным анаэробным дисбиозом и 52 женщины с выраженным анаэробным дисбиозом. С целью коррекции дисбиоза влагалища всем пациенткам на первом этапе проводили обработку влагалища КНУЗ РХ трехкратно в соответствии с ранее описанной методикой. На втором этапе все пациентки получали пробиотический препарат на основе *L. crispatus* ЭФ (Фарма Винчи, Бельгия) по 1 капсуле 2 раза в сутки в течение 10 дней перорально. Клиническую оценку состояния нижних отделов гениталий и определение видового состава лактобацилл проводили до начала и после окончания лечения. Состояние микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ исследовали трехкратно: до лечения – на этапе первичного консультирования; непосредственно после третьей обработки влагалища КНУЗ РХ; через месяц после окончания приема ЭФ (рисунок 1).

Исследование микробиоценоза влагалища и генотипирование вагинальных лактобацилл

Микробиоценоз влагалища во всех случаях исследовали методом ПЦР-РВ с помощью комплекта реагентов Фемофлор-16 (ООО «НПО ДНК-технология», Москва). Видовой состав лактобацилл также исследовали методом ПЦР-РВ. При этом использовали набор реагентов для научного применения этого же производителя, позволяющий генотипировать 6 видов лактобацилл: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*.

Обработка влагалища КНУЗ РХ

Обработку влагалища проводили кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина с помощью аппарата АУЗХ-100 (ООО «Фотек», Екатеринбург) в соответствии с руководством (Обоскалова Т.А. Профилактика и лечение воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии с использованием метода ультразвуковой кавитации лекарственных растворов: практическое руководство для врачей – Екатеринбург: Изд. Vip-Ural, 2014. – 68 с.).

Статистические методы

В качестве средних величин ОБМ и количеств отдельных групп микроорганизмов использовали медианы. Для отображения вариации признака внутри групп указывали 0,05 и 0,95 перцентили.

Для оценки достоверности различий между частотными показателями рассчитывали двусторонний критерий Фишера в программе WinPeri. Для оценки достоверности различий между средними показателями рассчитывали критерий Манна-Уитни в программе IBM SPSS Statistics 20. Во всех случаях различия интерпретировали как достоверные при минимальном уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты собственных исследований

Видовой состав вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с нормоценозом и дисбиотическими нарушениями [10]

Методом генотипирования в каждой пробе одновременно определяли от 1 до 5 видов лактобацилл [1, 2, 3, 4, 5, 10]: чаще один или два вида (у 268 (44,1%) и 194 (31,9%) обследованных, соответственно), реже 3 или 4 вида (у 112 (18,4%) и 32 (5,3%), соответственно), 5 видов одновременно выявляли только в двух пробах (0,3%).

Отдельные виды лактобацилл в обследуемой группе из 608 женщин выявляли с различной частотой. *L. iners* идентифицировали в 366 (60,2%) случаях, *L. crispatus* – в 253 (41,6%); *L. jensenii*, *L. gasseri* и *L. vaginalis* обнаружили у 195 (32,1%), 117 (19,2%) и 111 (18,3%) пациенток, соответственно. Вид *L. johnsonii* выявили только у 3 пациенток (0,5% случаев).

В качестве доминирующего вида лактобацилл почти у половины женщин выявляли *L. iners* (295 случаев – 48,5%), у трети – *L. crispatus* (184 случая – 30,3%), и гораздо реже *L. gasseri* (75 случаев – 12,3%) и *L. jensenii* (43 случая – 7,1%). *L. vaginalis* и *L. johnsonii* доминировали только у 9 (1,5%) и 2 (0,3%) женщин, соответственно.

Таким образом, основными представителями лактофлоры влагалища являлись *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и, в меньшей степени, *L. jensenii*, что согласуется с результатами других исследований (Ravel, J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – Vol. 108, Suppl 1. – P. 4680-4687.). *L. johnsonii* и *L. vaginalis*, по всей видимости, не принимают значительного участия в формировании вагинального микробиоценоза.

Далее была исследована связь внутриродового доминирования отдельных видов лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii*) с различными вариантами микробиоценоза влагалища: абсолютным нормоценозом, умеренным и выраженным дисбиозами. Для оценки доминирования отдельных видов лактобацилл нами было предложено рассчитывать показатель, который назвали *индекс доминирования*. Для вычисления данного индекса использовали следующую формулу:

$$\text{ИД} = \frac{a}{b} * 100(\%)$$

Где ИД – индекс доминирования;
a – количество случаев доминирования данного вида;
b – общее количество выявлений данного вида

Данный показатель отражает, с какой частотой исследуемый вид, в случае его выявления, доминировал среди лактобацилл при абсолютном нормоценозе, умеренном или выраженном дисбиозе. Величина индекса для *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и *L. jensenii* при различных вариантах микробиоценоза варьировала от 16% до 96% (таблица 1) [10, 11].

Таблица 1 – Индекс доминирования для видов *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* при абсолютном нормоценозе, умеренном и выраженном дисбиозе

Вид лактобацилл	Вариант микробиоценоза		Общее количество выявленных видов	Количество выявленных видов в качестве доминирующего	ИД	Уровень значимости (двухсторонний критерий Фишера)
<i>L. crispatus</i>	Абсолютный нормоценоз	1	137	117	85%	$p_{1-2}=0,103$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,025$
	Умеренный дисбиоз	2	22	15	68%	
	Выраженный дисбиоз	3	18	5	28%	
<i>L. gasseri</i>	Абсолютный нормоценоз	4	30	16	53%	$p_{4-5}=0,122$ $p_{4-6}=1,000$ $p_{5-6}=0,293$
	Умеренный дисбиоз	5	42	31	74%	
	Выраженный дисбиоз	6	21	12	57%	
<i>L. jensenii</i>	Абсолютный нормоценоз	7	86	14	16%	$p_{7-8}=0,001$ $p_{7-9}=0,602$ $p_{8-9}=0,092$
	Умеренный дисбиоз	8	27	14	52%	
	Выраженный дисбиоз	9	21	5	24%	
<i>L. iners</i>	Абсолютный нормоценоз	10	130	91	70%	$p_{10-11}=0,028$ $p_{10-12}<0,001$ $p_{11-12}=0,081$
	Умеренный дисбиоз	11	57	49	86%	
	Выраженный дисбиоз	12	75	72	96%	

Частота доминирования *L. crispatus* при нормоценозе была выше, чем при дисбиозе [1, 4, 10]. Индекс доминирования для *L. crispatus* был наибольшим в группе пациенток с абсолютным нормоценозом – 85%. При дисбиозах этот показатель был ниже и составлял 68% при умеренном дисбиозе и всего 28% – при выраженном дисбиозе.

Для *L. iners* индекс доминирования был наибольшим в группе пациенток с выраженным дисбиозом – 96%. При умеренном дисбиозе и абсолютном нормоценозе данный вид в случае его выявления доминировал с частотой 86% и 70%, соответственно.

Индекс доминирования для *L. gasseri* был наибольшим в группе пациенток с умеренным дисбиозом – 74%. То есть, данный вид при условии его выявления доминировал у женщин с умеренным дисбиозом в 74% случаев. При выраженном дисбиозе *L. gasseri* доминировал только у 57% женщин, у которых выявляли данный вид, а при абсолютном нормоценозе – у 53% обследованных.

Индекс доминирования для *L. jensenii* был наибольшим в группе пациенток, состояние микробиоценоза влагалища которых отвечало критериям умеренного дисбиоза – 52%, тогда как при выраженном дисбиозе индекс доминирования *L. jensenii* составил 24%, а при абсолютном нормоценозе – лишь 16%. В целом распределение индекса доминирования *L. jensenii* повторяет таковое у *L. gasseri*. Однако в каждой отдельно взятой категории *L. gasseri* доминирует в 1,5-3 раза чаще, чем *L. jensenii*. Но при этом в случае одновременного выявления данных

двух видов (22 пробы) *L. jensenii* доминировал в 9 случаях, а *L. gasseri* – всего в 1 случае.

Следующая задача исследования заключалась в том, чтобы оценить взаимосвязь между доминирующим видом лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii*) и отдельными группами УПМ. Из одиннадцати исследуемых групп УМП выбрали те, средняя доля которых при дисбиозах была не менее 1% от всех выявляемых микроорганизмов (Ворошилина, Е.С. Совершенствование методических подходов к оценке микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста : дис. ... д-ра мед. наук – Челябинск, 2012. – 244 с.). В итоге для сравнения были взяты только четыре группы УПМ: *G. vaginalis/P. bivia/Porphyromonas spp.* (группа GPP), *Eubacterium spp.*, *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* (группа MVD) и *A. vaginae*.

Связь между отдельными видами лактобацилл и группами УПМ оценивали по двум параметрам: средние количества УПМ (количества УПМ оценивали в геном-эквивалентах на миллилитр – ГЭ/мл) при доминировании различных видов лактобацилл у женщин с нормоценозами и кратность прироста УПМ при дисбиозах.

Средние количества отдельных групп УПМ при нормоценозах составляли от $10^{2,7}$ до $10^{4,7}$ (рисунок 2). На фоне доминирования *L. crispatus* наблюдали наименьшие количества УПМ (за исключением микроорганизмов группы MVD, количество которых было незначительно ниже при нормоценозах на фоне доминирования *L. gasseri* – $10^{2,9}$). Данную группу приняли в качестве референтной. При доминировании *L. gasseri* количество всех групп УПМ достоверно не отличалось от аналогичных показателей на фоне доминирования *L. crispatus*. Тогда как при доминировании *L. jensenii* отмечали достоверно большее количество микроорганизмов группы GPP ($p=0,001$), а при доминировании *L. iners* фиксировали достоверно большие количества сразу трех групп микроорганизмов: группы GPP ($p=0,001$), *Eubacterium spp.* ($p=0,007$) и группы MVD ($p=0,001$).

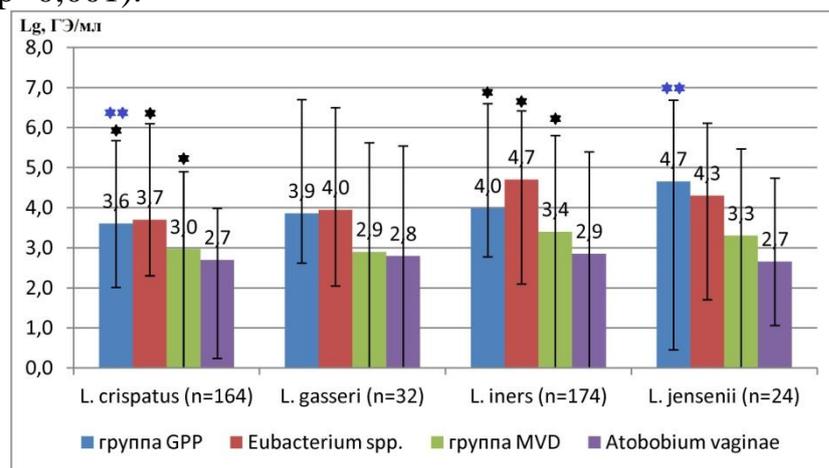


Рисунок 2 – Средние количества отдельных групп УПМ в зависимости от доминирующего вида лактобацилл у женщин с нормоценозом влагалища. Данные для всех групп представлены в lg. Одной звездочкой отмечены достоверно различающиеся показатели между пациентками с доминированием *L. crispatus* и *L. iners*, двумя звездочками – между пациентками с доминированием *L. crispatus* и *L. jensenii*

Для оценки кратности прироста каждой группы УПМ делили их средние количества при дисбиозах на средние количества при нормоценозах (в качестве средних величин использовали медианы). Таким образом рассчитывали, во сколько раз количество отдельных групп УПМ при дисбиозах превышает этот показатель при нормоценозах на фоне доминирования разных видов лактобацилл.

Наибольшую кратность прироста трех из четырех групп УПМ (группы GPP и MVD, *A. vaginae*) при дисбиозах отмечали на фоне доминирования *L. iners*: среднее количество микроорганизмов группы GPP увеличивалось в 2512 раз, группы MVD – в 5012 раз, *A. vaginae* – в 19553 раза, кроме этого в 20 раз повышалось количество *Eubacterium spp.* При доминировании других видов лактобацилл наблюдали меньший прирост количеств УПМ. Так при доминировании *L. crispatus* и *L. gasseri* отмечали увеличение количеств микроорганизмов группы GPP в 501 раз и *Eubacterium spp.* – в 158 и 100 раз, соответственно, при практически неизменившемся количестве микроорганизмов группы MVD и *A. vaginae*. На фоне доминирования *L. jensenii* кратность прироста *A. vaginae* составила 1259 раз, *Eubacterium spp.* – 200 раз, микроорганизмов группы GPP – 79 раз и микроорганизмов группы MVD – 20 раз.

Таким образом, при доминировании *L. crispatus* отмечали меньшие количества УПМ при нормоценозах и меньшую кратность прироста их количеств при дисбиозах. Кроме того частота доминирования данного вида особенно высока при нормальной доле лактофлоры в микробиоценозе. Полученные данные позволяют заключить, что обнаружение *L. crispatus* у пациенток с долей лактофлоры в микробиоценозе свыше 80% стоит расценивать как благоприятный фон для поддержания нормоценоза влагалища. При доминировании других видов лактобацилл риск трансформации нормальной микрофлоры влагалища в патологическую стоит расценивать как повышенный.

Изучение изменений качественного и количественного состава вагинального микробиоценоза после обработки влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина

Структура микробиоценоза влагалища по данным ПЦР-РВ у обследованных женщин до и после обработки КНУЗ РХ представлена в таблице 2 [6].

Таблица 2 – Структура микробиоценоза влагалища по данным ПЦР-РВ у беременных женщин в первом триместре до и после обработки влагалища КНУЗ РХ (n=104)

Состояние микробиоценоза	До обработки	После обработки	Уровень значимости (двусторонний критерий Фишера)
Абсолютный нормоценоз	39 (37,5%)	70 (67,3%)	p<0,001
Условный нормоценоз	37 (35,6%)	13 (12,5%)	p<0,001
Умеренный дисбиоз	11 (10,6%)	15 (14,4%)	p=0,530
Выраженный дисбиоз	17 (16,3%)	6 (5,8%)	p=0,025

Критериям нормоценоза соответствовало состояние микробиоценоза у 76 (73,1%) беременных при первичном обследовании; в том числе у 39 (37,5%) женщин выявили абсолютный нормоценоз и у 37 (35,6%) – условный нормоценоз. После обработки влагалища КНУЗ РХ критериям нормоценоза соответствовало состояние микробиоценоза у 83 (79,8%) из 104 обследованных женщин, причем у 70 (67,3%) выявлен абсолютный и всего у 13 (12,5%) – условный нормоценоз.

Критериям дисбиоза соответствовало состояние микробиоценоза у 28 (26,9%) беременных при первичном обследовании; в том числе критериям умеренного дисбиоза – у 11 (10,6%), выраженного дисбиоза – у 17 (16,3%) женщин. После обработки влагалища КНУЗ РХ критериям дисбиоза по данным ПЦР-РВ соответствовало состояние микрофлоры у 21 (20,2%) пациентки, при этом частота выявления выраженного дисбиоза снизилась трехкратно – это состояние определяли только у 6 (5,8%) женщин. Умеренный дисбиоз идентифицировали у 15 (14,4%) обследованных.

Данные об уровне колонизации (общей бактериальной массе – ОБМ), количестве лактобацилл и доле нормофлоры в составе вагинальной микрофлоры до и после обработки влагалища КНУЗ РХ представлены в таблице 3 [6].

Таблица 3 – ОБМ, количество и доля нормофлоры в составе вагинальной микрофлоры до и после обработки влагалища КНУЗ РХ у беременных в первом триместре (n=104)

Состояние микробиоценоза	ОБМ, lg ГЭ/мл		Лактобациллы, lg ГЭ/мл		Доля лактобацилл, %	
	До	После	До	После	До	После
1	2	3	4	5	6	7
Абсолютный нормоценоз (n=39)	7,7 (6,3-8,4)	6,2 (4,7-7,3)	7,7 (6,3-8,5)	6,2 (4,9-7,3)	99,8 (91,6-100)	98,8 (83,2-99,9) p ₆₋₇ =0,129
Условный нормоценоз (n=37)	8,0 (7,3-8,5)	6,1 (4,6-7,6)	8,0 (7,2-8,6)	6,1 (4,6-7,7)	99,5 (89,4-99,9)	97,4 (76,3-99,9) p ₆₋₇ =0,112
Умеренный дисбиоз (n=11)	7,8 (5,8-8,7)	7,6 (4,5-7,7)	6,6 (5,3-8,2)	5,9 (3,8-7,6)	49,2 (21,4-76,9)	91,6 (5,0-99,9) p ₆₋₇ =0,070
Выраженный дисбиоз (n=17)	8,3 (6,3-8,7)	6,1 (4,9-7,5)	6,5 (3,6-7,3)	5,3 (4,2-7,1)	1,4 (0-9,5)	47,0 (2,7-99,3) p ₆₋₇ <0,001

В группе женщин с абсолютным нормоценозом количество ОБМ снизилось после обработки с $10^{7,7}$ ГЭ/мл до $10^{6,2}$ ГЭ/мл. Абсолютное количество лактобацилл также снизилось с $10^{7,7}$ ГЭ/мл до $10^{6,2}$ ГЭ/мл после обработки, в результате доля нормофлоры практически не изменилась и составила 99,8% и 98,8% до и после орошений, соответственно. Аналогичные изменения зафиксированы в группе пациенток с условным нормоценозом: ОБМ и количество лактобацилл снизилось после обработки влагалища с 10^8 ГЭ/мл до $10^{6,1}$ ГЭ/мл. Доля нормофлоры в составе микробиоценоза влагалища изменилась незначительно – с 99,5% до 97,4%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у пациенток как с абсолютным, так и условным нормоценозом количество лактофлоры после обработки снижалось соответственно уменьшению ОБМ, при этом доля лактобацилл в составе микробиоценоза практически не изменялась и составляла более 90% у большинства обследованных беременных.

Среди женщин с дисбиозом наблюдалась иная картина. В группе беременных с умеренным дисбиозом снижение ОБМ было более выраженным (с $10^{7,8}$ ГЭ/мл до $10^{6,6}$ ГЭ/мл) в сравнении с лактофлорой, количество которой после обработки уменьшилось с $10^{6,6}$ ГЭ/мл до $10^{5,9}$ ГЭ/мл. В результате доля нормофлоры в составе микробиоценоза влагалища выросла с 49,2% до 91,6%. Схожие изменения отмечены у пациенток с выраженным дисбиозом: ОБМ

снизилась с $10^{8,3}$ ГЭ/мл до $10^{6,1}$ ГЭ/мл, тогда как снижение количества нормофлоры было менее значимым (с $10^{6,5}$ ГЭ/мл до $10^{5,3}$ ГЭ/мл), при этом доля лактобацилл в микробиоценозе статистически значимо возросла – с 1,4% до 47%. Однако порог в 80%, необходимый для достижения критериев нормоценоза, не был достигнут.

Таким образом, у пациенток с дисбиозом снижение общей обсемененности влагалища после обработки КНУЗ РХ происходило преимущественно за счет УПМ. Количество лактобацилл уменьшалось менее значимо (по сравнению с ОБМ), что обусловило рост доли лактофлоры в составе микробиоценоза влагалища (таблица 4) [6, 7]. Полученные данные позволяют предположить, что вагинальная лактофлора менее чувствительна к воздействию КНУЗ РХ по сравнению с условно-патогенными облигатными анаэробами, доля которых значительно повышена при дисбиозе влагалища.

Таблица 4 – Интенсивность снижения количества ОБМ и лактофлоры после обработки влагалища КНУЗ РХ у женщин с нормоценозом и дисбиозом (n=104)

Состояние вагинальной микрофлоры по данным ПЦР-РВ до обработки КНУЗ РХ	До обработки		После обработки		Снижение количества ОБМ после обработки КНУЗ РХ	Снижение количества лактобацилл после обработки КНУЗ РХ	Уровень значимости (критерий Манна-Уитни)
	Количество ОБМ	Количество лактобацилл	Количество ОБМ	Количество лактобацилл			
1	2	3	4	5	6	7	8
Нормоценоз (n=76)	$10^{7,9}$ ($10^{6,5}$ - $10^{8,5}$)	$10^{7,9}$ ($10^{6,5}$ - $10^{8,6}$)	$10^{6,2}$ ($10^{4,6}$ - $10^{7,6}$)	$10^{6,2}$ ($10^{4,2}$ - $10^{7,6}$)	$10^{1,5}$ ($10^{0,2}$ - $10^{2,7}$)	$10^{1,5}$ ($10^{0,2}$ - $10^{2,9}$)	$p_{6-7}=0,660$
Дисбиоз (n=28)	$10^{8,2}$ ($10^{6,2}$ - $10^{8,8}$)	$10^{6,6}$ ($10^{5,0}$ - $10^{8,1}$)	$10^{5,5}$ ($10^{3,3}$ - $10^{7,4}$)	$10^{5,6}$ ($10^{4,1}$ - $10^{7,4}$)	$10^{2,5}$ ($10^{0,6}$ - $10^{4,2}$)	$10^{0,8}$ (0- $10^{2,7}$)	$p_{6-7}=0,003$

Количество и перечень одновременно выявляемых видов лактобацилл после обработки КНУЗ РХ не изменились ни у одной из пациенток. Все виды, выявляемые в микробиоценозе до начала терапии, сохранялись и после нее, изменялись только их количественные соотношения [8, 12]. Данный факт имеет принципиальное значение, так как устойчивость микробного сообщества к воздействию различных факторов связана с видовым разнообразием нормофлоры. Примечательно, что у большинства наблюдаемых женщин доминирующий вид лактобацилл остался неизменным (у 55 (77,5%) из 71), и только у 16 (22,5%) женщин была отмечена смена доминирующего вида. Во всех случаях смена преобладающего вида происходила на присутствовавший ранее в микробиоценозе вид, но в меньшей доле, а ранее доминировавший вид при этом сохранялся, но уже в качестве сопутствующего.

Таким образом, было установлено, что обработка влагалища КНУЗ РХ селективно воздействует на УПМ и не приводит к элиминации отдельных видов лактобацилл.

Оценка эффекта последовательного применения обработки влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% водным раствором хлоргексидина и пробиотического препарата для перорального применения, содержащего живые *Lactobacillus crispatus*, на вагинальную микрофлору у женщин с дисбиозом влагалища в зависимости от доминирующего вида лактобацилл

У пациенток с дисбиозом восстановление доли лактофлоры до нормальных значений после обработки влагалища КНУЗ РХ было достигнуто только в 46,4% случаев. Абсолютное количество лактобацилл снижалось у всех женщин, несмотря на прирост их относительной доли. С учетом этого факта становится актуальным вопрос о сохранении достигнутого после обработки нормоценоза в долгосрочной перспективе. Все перечисленное обосновывает целесообразность назначения пробиотического препарата на втором этапе терапии. Избранный для этих целей препарат ЭФ содержит штамм *L. crispatus* (вид, доминирующий у пациенток с нормоценозом) и предназначен для перорального приема. Помимо повышения приверженности пациенток к терапии, пероральное получение пробиотических штаммов должно улучшить состояние микрофлоры желудочно-кишечного и урогенитального трактов.

Положительная динамика состояния микробиоценоза по данным ПЦР-РВ была отмечена после завершения курса орошений влагалища и через месяц после завершения приема ЭФ (таблица 5) [9].

Таблица 5 – Динамика микробиоценоза влагалища в процессе терапии дисбиоза с использованием орошений КНУЗ РХ и препарата ЭФ (n=84)

Состояние микробиоценоза влагалища	До начала коррекции	После орошений КНУЗ РХ	Через месяц после завершения приема ЭФ	Уровень значимости (двусторонний критерий Фишера)
1	2	3	4	5
Абсолютный нормоценоз	0	31 (36,9%)	30 (35,7%)	$p_{2-3}<0,001$; $p_{2-4}<0,001$; $p_{3-4}=1,000$
Условный нормоценоз	0	8 (9,5%)	13 (15,5%)	$p_{2-3}=0,007$; $p_{2-4}<0,001$; $p_{3-4}=0,351$
Умеренный дисбиоз	32 (38,1%)	21 (25,0%)	24 (28,6%)	$p_{2-3}=0,096$; $p_{2-4}=0,252$; $p_{3-4}=0,728$
Выраженный дисбиоз	52 (61,9%)	24 (28,6%)	17 (20,2%)	$p_{2-3}<0,001$; $p_{2-4}<0,001$; $p_{3-4}=0,281$

После курса орошений доля женщин с выраженным анаэробным дисбиозом снизилась с 61,9% до 28,6%, с умеренным дисбиозом – с 38,1% до 25,0% среди всех обследованных женщин. При этом у 46,4% женщин произошло восстановление микробиоценоза до нормоценоза, в том числе у 36,9% – до абсолютного нормоценоза. После приема ЭФ дальнейшего достоверного увеличения доли пациенток с нормоценозом отмечено не было, достоверного увеличения доли лактофлоры также не отмечали. Однако было зарегистрировано статистически значимое увеличение абсолютного количества вагинальных лактобацилл в сравнении с их количеством до и после обработки КНУЗ РХ. Кроме того, количество женщин с выраженным дисбиозом сократилось с 24 (28,6%) до 17 (20,2%), что может быть обусловлено приемом пробиотического препарата. Возможно, что прием пробиотического препарата вносил вклад в поддержание сформировавшегося после обработки КНУЗ РХ нормоценоза.

У пациенток с умеренным дисбиозом нормоценоз после серии орошений влагалища КНУЗ РХ и последующего приема ЭФ фиксировали достоверно чаще, чем у пациенток, состояние микробиоценоза которых до коррекции соответствовало критериям выраженного дисбиоза (таблица 6) [9].

Таблица 6 – Состояние микробиоценоза влагалища у пациенток с умеренным и выраженным анаэробным дисбиозом через 1 месяц после окончания лечения (n=84)

Состояние микробиоценоза через месяц после окончания приема ЭФ	Пациентки с исходным умеренным дисбиозом (n=32)	Пациентки с исходным выраженным дисбиозом (n=52)	Уровень значимости (двусторонний критерий Фишера)
Нормоценоз	22 (68,7%)	21 (40,4%)	p=0,021
Умеренный дисбиоз	10 (31,3%)	15 (28,8%)	p=1,000
Выраженный дисбиоз	0	16 (30,8%)	p<0,001

Восстановление доли лактофлоры до показателей, соответствующих нормоценозу, у пациенток с умеренным дисбиозом произошло в 22 (68,7%) случаях, а в 3 (9,1%) случаях был отмечен прирост доли лактофлоры в пределах 27-30%. У 7 (21,8%) женщин доля лактофлоры оставалась практически неизменной на протяжении курса лечения. Таким образом, индивидуальная положительная динамика была зафиксирована у 25 (78,1%) из 32 женщин.

Среди пациенток с выраженным дисбиозом восстановление нормоценоза спустя месяц после окончания приема ЭФ отмечали достоверно реже: у 21 (40,4%) из 52 женщин. У 15 (28,8%) пациенток выраженный дисбиоз сменился умеренным. Таким образом, положительная динамика была зафиксирована у 36 (69,2%) из 52 женщин с выраженным дисбиозом.

Была предпринята попытка установить зависимость эффекта применения обработки влагалища КНУЗ РХ и пробиотика от доминирующего вида лактобацилл. Было отмечено, что после обработки влагалища КНУЗ РХ увеличение доли лактобацилл достоверно чаще происходило среди пациенток, у которых доминировал *L. iners*, чем среди женщин, доминирующим видом у которых был *L. gasseri* (80,4% против 50,0%, p=0,024) (таблица 7). У женщин, лактофлора которых была преимущественно представлена *L. jensenii*, увеличение доли лактобацилл отмечали в 100% случаев. Однако не было выявлено достоверных различий по сравнению с другими исследуемыми группами в связи с малочисленностью пациенток в группах. Примечательно, что при доминировании *L. crispatus* увеличение доли *Lactobacillus spp.* после обработки КНУЗ РХ зарегистрировали у 3 (50%) из 6 женщин. В силу малочисленности данной группы судить о достоверности изменений невозможно. После приема ЭФ количество пациенток с возросшей долей лактофлоры было сопоставимо во всех исследуемых группах.

Таблица 7 – Частота увеличения суммарной доли лактобацилл в микробиоценозе после обработки влагалища КНУЗ РХ и приема пробиотического препарата ЭФ у пациенток, лактофлора которых была преимущественно представлена *L. iners* и *L. gasseri* (n=68)

Точка наблюдения	Пациентки с доминированием <i>L. iners</i> (n=46)	Пациентки с доминированием <i>L. gasseri</i> (n=22)	Уровень значимости (двусторонний критерий Фишера)
После обработки КНУЗ РХ	37 (80,4%)	11 (50,0%)	p=0,024
Через месяц после окончания приема ЭФ	35 (76,1%)	15 (68,2%)	p=0,682

Частота восстановления нормоценоза как после обработки влагалища КНУЗ РХ, так и после приема ЭФ, не зависела от доминирующего вида лактобацилл.

В ходе настоящего исследования не было зарегистрировано случаев обнаружения *L. crispatus* во влагалище после курса терапии ЭФ при исходном отсутствии данного вида в составе лактофлоры [9]. После проведенной терапии у 70 (86,4%) обследованных женщин доминирующий вид лактофлоры остался без изменения. У 11 (13,6%) пациенток произошла замена доминирующего вида лактобацилл на вид, представленный ранее в микрофлоре, но в меньшем количестве. У 3 пациенток лактобациллы отсутствовали во влагалище на всех этапах наблюдения. *L. crispatus* в качестве доминирующего вида выявляли в два раза чаще после лечения (таблица 8), однако у всех этих пациенток данный вид присутствовал в меньшем количестве в составе вагинальной микрофлоры до лечения. Полученные данные позволяют утверждать, что видовой состав лактофлоры у каждой конкретной женщины стабилен и мало изменяется под воздействием как физико-химических факторов, так и пробиотических штаммов микроорганизмов. Назначение перорального пробиотика на втором этапе коррекции дисбиоза влагалища скорее способствует восстановлению популяции собственной лактофлоры, чем изменению ее видового состава.

Таблица 8 – Частота доминирования отдельных видов вагинальных лактобацилл у пациенток до и после коррекции дисбиоза влагалища (n=84)

Вид лактобацилл	До коррекции	После коррекции	Уровень значимости (двусторонний критерий Фишера)
<i>L. crispatus</i>	6 (7,4%)	11 (13,6%)	p=0,306
<i>L. iners</i>	46 (56,8%)	44 (54,3%)	p=0,877
<i>L. jensenii</i>	4 (4,9%)	4 (4,9%)	p=1,000
<i>L. gasseri</i>	22 (27,2%)	20 (24,7%)	p=0,859
<i>L. vaginalis</i>	3 (3,7%)	2 (2,5%)	p=1,000
Отсутствуют	3 (3,7%)	3 (3,7%)	p=1,000

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было продемонстрировано, что влагалище каждой женщины могут колонизировать до пяти видов лактобацилл одновременно [1, 2, 3, 4, 5, 10]. Однако, доминирующее положение, как правило, занимает один вид. Наиболее часто выявляемыми видами лактобацилл являлись *L. iners* и *L. crispatus*, реже выявляли *L. jensenii* и *L. gasseri*. *L. johnsonii* и *L. vaginalis*. *L. vaginalis* и *L. johnsonii* доминировали только у 9 (1,5%) и 2 (0,3%) женщин, соответственно.

Частота доминирования отдельных видов лактобацилл зависит от суммарной доли *Lactobacillus spp.* в микробиоценозе. *L. crispatus* с большей частотой доминировал у женщин с долей лактофлоры более 80%, что соответствует критериям нормоценоза. Наибольшая частота доминирования *L. gasseri* и *L. jensenii* была отмечена у женщин с долей лактофлоры 20-80% [10, 11], данные варианты микробиоценоза расценивают как умеренный дисбиоз. Наиболее часто встречающийся вид – *L. iners* – как доминирующий выявляли при любых вариантах микробиоценоза, однако по мере снижения общей доли нормофлоры в микробиоценозе увеличивалась частота обнаружения его как единственного вида лактобацилл. При доле лактофлоры менее 20% (выраженном

дисбиозе) *L. iners*, как правило, оставался единственным детектируемым видом лактобацилл [5, 10].

Полученные в настоящем исследовании микробиологические данные позволяют заключить, что наиболее благоприятным вариантом вагинального микробиоценоза является нормоценоз (микробиоценоз с долей лактофлоры не менее 80%) с доминированием *L. crispatus*. При доминировании данного вида лактобацилл отмечается наименьшее количество УПМ и не так высок прирост их количества при развитии дисбиоза.

Роль *L. iners* в формировании различных видов микробиоценоза влагалища окончательно не ясна и требует дальнейшего изучения. С одной стороны, частота доминирования данного вида более высока при пониженной доле лактофлоры, что соответствует критериям дисбиоза, а количество УПМ при нормоценозах и их прирост при дисбиозах на фоне доминирования данного вида максимальны. Эти наблюдения позволяют предположить, что *L. iners* обладает сниженным протективным потенциалом в сравнении с другими видами лактобацилл, особенно *L. crispatus*. С другой стороны, способность данного вида доминировать при нормоценозе и сохраняться при дисбиотических состояниях с повышенным уровнем рН наводит на мысль, что адаптивный потенциал *L. iners* может обеспечивать реколонизацию влагалища другими видами лактобацилл после устранения иницирующего фактора дисбиоза (Macklaim, J.M. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1 Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – Vol. 108 Suppl 1. – P. 4688-4695.).

В ходе исследования было отмечено селективное воздействие обработки влагалища КНУЗ РХ на УПМ, тогда как видовой состав лактофлоры не изменялся: доминирующий вид лактобацилл чаще оставался прежним, а если и менялся, то на вид, ранее присутствовавший в микробиоценозе в качестве сопутствующего, количество и перечень выявляемых видов оставались прежними [12]. Доля лактобацилл в микробиоценозе оставалась неизменной у женщин с нормоценозами; у пациенток с дисбиозами доля лактобацилл увеличивалась за счет селективной элиминации УПМ [6, 7]. Стоит отметить, что при дисбиозах на фоне доминирования *L. gasseri* достоверно реже наблюдали увеличение доли лактобацилл после обработки влагалища КНУЗ РХ, чем при дисбиозах, при которых лактофлора преимущественно представлена *L. iners*.

Было показано, что серия из 3 орошений влагалища КНУЗ РХ и последующий 10-дневный курс ЭФ, позволяет добиться восстановления нормоценоза у каждой второй пациентки [9]. Однако возможности коррекции дисбиоза влагалища зависели от исходного состояния микробиоценоза. При умеренном дисбиозе восстановление нормоценоза по окончании курса терапии происходило в два раза чаще, чем при выраженном. Не было отмечено зависимости результатов коррекции дисбиоза влагалища с помощью предложенной схемы от доминирующего вида лактобацилл.

После приема ЭФ не отмечали достоверного увеличения количества женщин с нормоценозом, в сравнении с их количеством после орошений КНУЗ РХ. Однако фиксировали увеличение абсолютного количества лактофлоры через месяц после завершения приема ЭФ. Также было отмечено, что прием перорального пробиотика не приводил к колонизации эпителия влагалища

L. crispatus в случаях, если данный вид отсутствовал в микробиоценозе до коррекции.

Перспективы дальнейшего изучения вагинальной микрофлоры, в том числе и лактофлоры у женщин репродуктивного возраста заключаются в следующем:

- Выяснение механизмов колонизации эпителия влагалища новорожденных и женщин репродуктивного возраста вагинальной микрофлорой;
- Изучение устойчивости видового состава лактофлоры при воздействии различных неблагоприятных факторов среды;
- Выяснение роли *L. iners* – наиболее распространенного вида вагинальных лактобацилл, в формировании и поддержании стабильности нормального микробиоценоза влагалища;
- Выявление факторов, провоцирующих развитие дисбиоза, и изучение особенностей прогрессирования дисбиотических состояний на фоне доминирования различных видов вагинальных лактобацилл;
- Изучение вклада отдельных групп УППМ в развитие дисбиоза влагалища с использованием молекулярно-генетических методик;
- Поиск новых средств для эффективной и безопасной коррекции дисбиотических состояний во влагалище.

ВЫВОДЫ

1. У женщин репродуктивного возраста во влагалище чаще доминировали среди нормофлоры виды *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus iners*, реже – *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus jensenii*. Доминирование *Lactobacillus crispatus* было ассоциировано с высокой долей лактофлоры и низким количеством условно-патогенных микроорганизмов в микробиоценозе, что позволяет рассматривать преобладание данного вида как благоприятный фон для поддержания нормоценоза. У пациенток с выраженными дисбиотическими нарушениями, как правило, единственным детектируемым видом лактобацилл являлся *Lactobacillus iners*.

2. Обработка влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина селективно подавляет условно-патогенную микрофлору и не оказывает существенного влияния на качественный и количественный состав лактофлоры. Доля нормофлоры в микробиоценозе не изменяется на фоне изначально высокого количества лактобацилл; у пациенток с низким начальным уровнем лактобацилл – увеличивается, но не всегда достигает целевого значения. Увеличение доли лактофлоры достоверно реже отмечали при доминировании *Lactobacillus gasseri*.

3. Последовательное применение обработки влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина и пероральный прием пробиотического препарата, содержащего живые *Lactobacillus crispatus*, у женщин с дисбиозом влагалища позволили добиться увеличения доли лактобацилл в 70% случаев с восстановлением нормоценоза у каждой второй пациентки. После курса пробиотика не было зафиксировано дальнейшего роста доли лактофлоры и появления *Lactobacillus crispatus* во влагалище в случае его отсутствия перед коррекцией. Возможности коррекции дисбиоза с помощью

данной схемы зависят от выраженности дисбиотических нарушений и не зависят от доминирующего вида лактобацилл.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Перед коррекцией дисбиоза влагалища с помощью кавитированного низкочастотным ультразвуком 0,05% раствора хлоргексидина рекомендуется проведение генотипирования и определение доминирующего вида вагинальных лактобацилл, так как дисбиозы с представленной преимущественно *Lactobacillus gasseri* лактофлорой плохо поддаются коррекции с помощью данной методики.

Пациенткам с умеренным дисбиозом по данным полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, лактофлора которых представлена не *Lactobacillus gasseri*, для восстановления нормоценоза рекомендуется применение серии из 3 ежедневных орошений влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина.

Пациенткам с умеренным дисбиозом, лактофлора которых преимущественно представлена *Lactobacillus gasseri*, и пациенткам с выраженным дисбиозом для восстановления нормоценоза рекомендуется серия из 3 ежедневных орошений влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05% раствором хлоргексидина и 10-дневный курс пробиотического препарата для перорального применения, содержащего живые *Lactobacillus crispatus*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ворошилина, Е.С. Видовой состав вагинальных лактобактерий у женщин репродуктивного возраста с дисбиозом влагалища / Е.С. Ворошилина, Д.Л. Зорников, Л.В. Тумбинская, Е.В. Гончарова // Уральский медицинский журнал. – 2011. – №13 (91). – С. 75-78.

2. Зорников, Д.Л. Видовой состав вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с условным нормоценозом влагалища, ассоциированным с *Ureaplasma spp.* / Д.Л. Зорников // Материалы 67-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Екатеринбург, 2012. – С. 380-382.

3. Зорников, Д.Л. Видовой состав вагинальных лактобактерий и количество облигатных анаэробов у женщин репродуктивного возраста с абсолютным нормоценозом / Д.Л. Зорников // Материалы 68-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Екатеринбург, 2013. – С. 434-436

4. Зорников, Д.Л. Высокое количество лактобактерий как предиктор нестабильности вагинального микробиоценоза / Д.Л. Зорников // Материалы 69-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Екатеринбург, 2014. – С. 385-388.

5. Ворошилина, Е.С. Видовой состав вагинальных лактобактерий у женщин репродуктивного возраста с выраженным дисбиозом влагалища / Е.С. Ворошилина, Д.Л. Зорников // Молекулярная диагностика 2014. Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2014. – Том 1. – С. 179.

6. Ворошилина, Е.С. Коррекция дисбиоза влагалища кавитированным раствором хлоргексидина в первом триместре беременности: эффективность и безопасность / Е.С. Ворошилина, Д.Л. Зорников, Е.Э. Плотко // Журнал акушерства и женских болезней. – 2014. – Т. 63, № 5. – С. 29-37.

7. Зорников, Д.Л. Влияние кавитированного низкочастотным ультразвуком раствора хлоргексидина на количество вагинальных лактобацилл у пациенток с нормоценозом / Д.Л. Зорников, Е.С. Ворошилина // Материалы 70-й Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Екатеринбург, 2015. – С. 347-349.

8. Зорников, Д.Л. Устойчивость различных видов вагинальных лактобацилл к воздействию кавитированным низкочастотным ультразвуком раствором хлоргексидина / Д.Л. Зорников, Л.В. Хаютин, Е.С. Ворошилина, Е.Э. Плотко // Тезисы VIII Общероссийского семинара «Репродуктивный потенциал России: версии и контраверсии» (5-8 сентября 2015 года, Сочи). – Москва, 2015. – С. 37-38.

9. Плотко, Е.Э. Дисбиоз влагалища: видовой состав лактофлоры и возможности немедикаментозной коррекции / Е.Э. Плотко, Д.Л. Зорников, Л.В. Хаютин, Е.С. Ворошилина // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 10. – С. 112-117.

10. Зорников, Д.Л. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с дисбиозом влагалища / Д.Л. Зорников, Л.В. Тумбинская, Е.С. Ворошилина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2015. – № 4 (55). – С. 99-105.

11. Зорников, Д.Л. Роль *Lactobacillus gasseri* в формировании вагинального микробиоценоза / Д.Л. Зорников, Е.С. Ворошилина // Сборник статей I Международной (71 Всероссийской) научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения». – Екатеринбург, 2016. – Том 2. – С. 1316-1320.

12. Ворошилина, Е.С. Влияние кавитированного низкочастотным ультразвуком раствора хлоргексидина на количественный и видовой состав лактофлоры влагалища / Е.С. Ворошилина, Е.Э. Плотко, Л.В. Хаютин, Д.Л. Зорников // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2016. – № 4. – С. 52-60.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БВ – бактериальный вагиноз

ГЭ/мл – геном-эквивалентов на миллилитр

ИПБ – искусственное прерывание беременности

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

КНУЗ РХ – кавитированный низкочастотным ультразвуком 0,05% водный раствор хлоргексидина

МБЦ – микробиоценоз

НУЗ – низкочастотный ультразвук

ОБМ – общая бактериальная масса

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией результатов амплификации в режиме реального времени

УПМ – условно-патогенные микроорганизмы

ЭФ – биологически активная добавка «Экофемин Флораваг»

На правах рукописи

Зорников Данила Леонидович

**ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОГО СОСТАВА ВАГИНАЛЬНОЙ
ЛАКТОФЛОРЫ И ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ
ДИСБИОЗА ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО
ВОЗРАСТА**

03.02.03 – Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Челябинск - 2017