

Ворошилина Е.С.<sup>1,3</sup>, Зорников Д.Л.<sup>1</sup>, Тумбинская Л.В.<sup>2</sup>, Гончарова Е.В.<sup>2</sup>

## Видовой состав вагинальных лактобактерий у женщин репродуктивного возраста с дисбиозом влагалища

1 - ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г.Екатеринбург; 2 - ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; 3 - ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г.Екатеринбург

*Voroshilina E.S., Zornikov D.L., Tumbinskaya L.V., Goncharova E.V.*

### Composition of *Lactobacillus* species in women of reproductive age with vaginal dysbiosis

#### Резюме

Изучили видовой состав вагинальных лактобацилл у 43 женщин репродуктивного возраста (18-45 лет) с выраженным анаэробным дисбиозом влагалища по данным ПЦР-РВ, в качестве группы сравнения обследовали 39 клинически здоровых женщин с абсолютным нормоценозом по данным ПЦР-РВ. Для оценки видового состава нормофлоры провели определение количества *Lactobacillus* spp. и генотипирование 6-ти видов лактобактерий (*L.crispatus*, *L.iners*, *L.jensenii*, *L.gasseri*, *L.johnsonii*, *L.vaginalis*) методом ПЦР-РВ с использованием реагентов для научного применения (ООО «НПО ДНК-Технология»). Частота выявления *L. crispatus* и доля этого вида в составе нормофлоры статистически значимо выше у клинически здоровых женщин с абсолютным нормоценозом. У женщин с выраженным дисбиозом в большинстве случаев нормофлора представлена доминирующим видом лактобацилл с пониженными протективными свойствами — *L. iners*.  
**Ключевые слова:** микробиocenоз влагалища, *Lactobacillus* species, ПЦР в реальном времени

#### Summary

Composition of *Lactobacillus* spp. was determined in 43 women of reproductive age (18-45 years) with significant anaerobic dysbiosis determined by real-time PCR. Control group: 39 healthy women with absolute normocenosis determined by real-time PCR. Six *Lactobacillus* species were genotyped with the use of real-time PCR. *L.crispatus* was dominating in vaginal microbiocenosis of healthy women with normocenosis (control group). Normal microflora in women with dysbiosis was mostly presented by *L.iners*.

**Key words:** vaginal microbiocenosis, *Lactobacillus* species, real-time PCR

#### Введение

В настоящее время известно более 150 видов лактобактерий, в различных биотопах человека обитает около полутора-двух десятков видов. У женщин репродуктивного возраста нормофлора представлена, в основном, 5-6 видами *Lactobacillus* spp. и составляет основу биоценоза влагалища.

Абсолютное количество лактобактерий может колебаться в достаточно широких пределах и требует количественной оценки. По данным разных авторов количество лактобацилл во влагалище здоровой женщины составляет от  $10^7$  до  $10^9$  КОЕ/мл, что составляет от 90 до 99,9% всей микрофлоры влагалища.

Колонизируя слизистую влагалища, лактобактерии обеспечивают колонизационную резистентность, участвуют в формировании барьера для патогенных микроорганизмов и тем самым поддерживают гомеостаз ма-

кроорганизма [1]. Под колонизационной резистентностью понимается совокупность механизмов, обеспечивающих способность нормофлоры и макроорганизма, кооперативно взаимодействуя, защищать экосистему от патогенной микрофлоры. Следует отметить, что основными механизмами, обеспечивающими колонизационную резистентность вагинального биотопа, являются кислотообразование и продукция перекиси водорода. Блокируя рецепторы эпителиальных клеток, лактобациллы предупреждают адгезию потенциальных патогенных микроорганизмов.

Таким образом, становится очевидным, что лактобактерии тем эффективнее защищают влагалище, чем активнее образуют перекись водорода и блокируют рецепторы эпителиальных клеток. Hawes et al выявил взаимосвязь между развитием бактериального вагиноза и исчезновением или снижением числа  $H_2O_2$ -продуцирующих

лактобактерий [2]. Так, *L.crispatus* является сильным продуцентом  $H_2O_2$ , в отличие от *L.iners*, что может объяснить разницу в протективных свойствах этих видов [2; 3]. *L.jensenii* также является сильным продуцентом  $H_2O_2$ , однако в исследовании Verstraelen H. и соавт. [4] выявление этих лактобактерий коррелировало с высоким риском трансформации нормальной вагинальной микрофлоры в патологическую.

Применение метода ПЦР в реальном времени (тест Фемофлор) для исследования вагинального микробиоценоза позволило у женщин с бактериальным вагинозом установить, что у части пациенток при доминировании облигатно-анаэробной микрофлоры сохраняются достаточно высокие количества *Lactobacillus* spp. — более  $10^6$  ГЭ/мл [5]. Становится очевидным, что нормофлора у этих женщин полноценно не выполняет своей протективной функции. Следовательно, при обследовании пациенток с хроническими дисбиозами влагалища необходимо выяснять не только, присутствуют ли в исследуемом биоценозе представители рода *Lactobacillus*, но и проводить видовую идентификацию для выяснения свойств нормофлоры и прогнозирования течения заболевания.

**Целью** настоящей работы было определение видового состава лактобактерий, участвующих в формировании микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста с дисбиотическими нарушениями вагинальной микрофлоры.

## Материалы и методы

Для решения поставленной задачи были отобраны 43 женщины в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст 28,7 лет), состояние микробиоценоза которых по результатам исследования методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием теста Фемофлор отвечало критериям выраженного анаэробного дисбиоза (доля нормофлоры менее 20%, доля облигатных анаэробов более 80% в составе биоценоза) [6]. При этом критерием включения в исследование являлось наличие лактофлоры во влагалище в количестве не менее  $10^6$  ГЭ/мл. Критериями исключения являлись наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, гепатитов В и С, генитальных инфекций, вызванных облигатными патогенами (*C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*).

В качестве группы сравнения были отобраны 39 клинически здоровых женщин, состояние микробиоценоза влагалища которых отвечало критериям абсолютного нормоценоза (доля лактобактерий более 80%, *Ureaplasma* spp. и *Candida* spp. в количестве менее  $10^4$  ГЭ/мл).

Всем пациенткам проводили стандартное обследование, включавшее опрос, осмотр в зеркалах и бимануальное исследование органов малого таза.

Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим нормативным документам. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва).

Для оценки видового состава нормофлоры провели определение количества *Lactobacillus* spp. и генотипирование 6-ти видов лактобактерий (*L.crispatus*, *L.iners*, *L.jensenii*, *L.gasseri*, *L.johnsonii*, *L.vaginalis*) методом ПЦР-РВ с использованием реагентов для научного применения (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Для анализа были отобраны только те пробы, в которых сумма всех выделенных видов лактобактерий была сопоставима с общим количеством определенных *Lactobacillus* spp. и составляла не менее 70%.

Статистическую обработку данных проводили с помощью свободно распространяемого продукта WINPEPI версия 9.7 и SPSS 17.0 для Windows.

## Результаты и обсуждение

При типировании *Lactobacillus* spp. одновременно оценивали и вид, и количество лактобактерий. У каждой пациентки выявляли от одного до 4 видов рода *Lactobacillus* одновременно. У пациенток с дисбиозом нормофлора в большинстве случаев (28 (65,1%) из 43 случаев) типировали один вид лактобацилл; у 8 (18,6%) женщин присутствовали два вида, у 6 (14,0%) — 3 вида и только у одной женщины (2,3% случаев) выявили 4 вида. У женщин в группе сравнения в 16 (41%) из 39 случаев была представлена только одним видом лактобацилл; в 13 (33,3%) случаев выявляли два вида, в 8 (20,5%) случаев — 3 вида и у 2 (5,1%) пациенток — 4 вида. Таким образом, у пациенток с дисбиозами статистически значимо чаще определяли только один вид лактобактерий ( $p=0,037$ ,  $OR=2,68$ ,  $1,11—6,49$ ). Нормофлора у женщин группы сравнения, напротив, отличалась большим разнообразием.

Частота выявления разных видов лактобацилл представлены на Рисунке 1.

У пациенток с выраженным дисбиозом в подавляющем большинстве случаев обнаруживали *L.iners* (35 (81,4%)). *L.jensenii* идентифицировали у 11 (25,6%) женщин, у 7 (16,3%) — *L.gasseri*. *L.crispatus* типировали у 6 (14%) пациенток. Еще реже присутствовали *L.vaginalis* и *L.johnsonii* — обнаружены у 5 (11,6%) и 1 (2,3%) обследованных соответственно.

У женщин в группе сравнения чаще выявляли *L.crispatus* и *L.iners* (обнаружены в 26 (66,7%) и 20 (51,3%) случаев соответственно). Значительно реже типировали другие виды лактобактерий: *L.jensenii* обнаружили у 11 (28,2%), *L.gasseri* у 7 (17,9%), *L.vaginalis* у 5 (12,8%) обследованных. *L.johnsonii* у женщин данной группы не встречалась.

Таким образом, *L.crispatus* статистически значимо чаще выявляли у клинически здоровых женщин с абсолютным нормоценозом ( $p=7,1 \cdot 10^{-7}$ ;  $OR=12,3$  (4,2-36,2)). Тогда как *L.iners* достоверно чаще выявляли у пациенток с выраженным дисбиозом ( $p=3,4 \cdot 10^{-3}$ ;  $OR=4,16$  (1,56-11,1)).

При наличии нескольких видов лактобактерий одновременно доминирующим считали тот, доля которого была более 50% от общего количества выделенных (Рисунок 2).

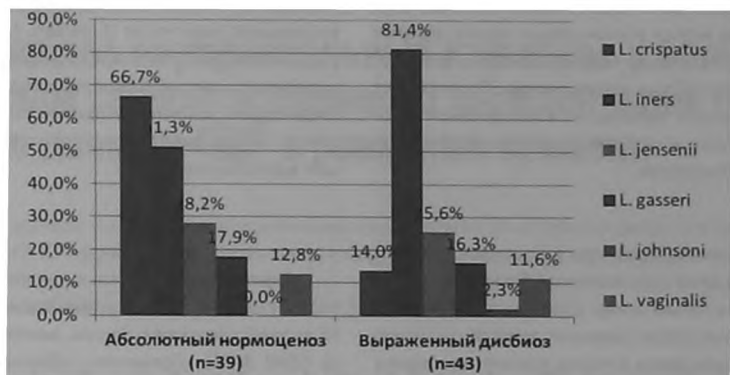


Рис.1. Частота выявления различных видов лактобактерий у пациенток с абсолютным нормоценозом и выраженным дисбиозом вагинальной микрофлоры (n=82)

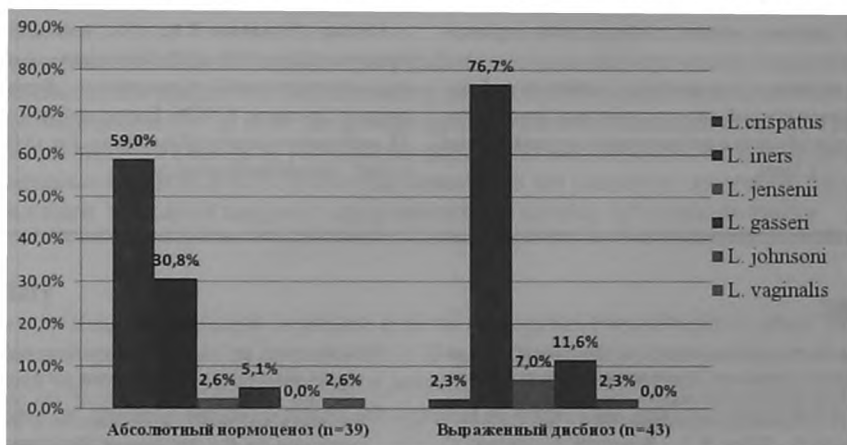


Рис.2. Частота выявления различных видов лактобактерий в качестве доминирующего микроорганизма у женщин с абсолютным нормоценозом и выраженным дисбиозом (n=82)

В группе пациенток с выраженным анаэробным дисбиозом в большинстве случаев в качестве доминирующего вида чаще выявляли *L.iners* — у 33 (76,7%) из 43 женщин. Вторым видом по частоте встречаемости был *L.gasseri*, который доминировал у 5 (11,6%) пациенток с дисбиозом. *L.crispatus*, как доминирующий вид были обнаружены лишь у одной (2,3%) пациентки. *L.jensenii*, *L.johnsoni* были идентифицированы как доминирующие виды в 3 (7%) и 1 (2,3%) случаях соответственно. *L.vaginalis* в качестве доминирующего вида лактобактерий не выявляли.

В группе сравнения в качестве доминирующего вида чаще всего выявляли *L.crispatus* — присутствовали у 23 (59%) из 39 женщин. *L. iners* в качестве доминирующего вида выявляли в два раза реже — в 12 (30,8%) случаях. *L.jensenii*, *L.gasseri*, *L.vaginalis* доминировали в составе нормофлоры в единичных случаях (выявлены в 1 (2,6%), 2 (5,1%), 1 (2,6%) случаях соответственно). *L.johnsoni* в качестве основного вида в микробиоценозе идентифицирован не был.

Таким образом, у клинически здоровых женщин,

состояние биоценоза влагалища которых отвечало критериям абсолютного нормоценоза, статистически значимо чаще лактофлора была представлена преимущественно *L.crispatus* ( $p=5 \cdot 10^{-2}$ ; OR=60,38 (7,71—473,1)). У пациенток с выраженным дисбиозом вагинальной микрофлоры статистически значимо чаще доминировали *L.iners* ( $p=3,5 \cdot 10^{-5}$ ; OR=7,43 (2,82-19,57)). Примечательно, что *L.crispatus* в качестве основного вида обнаружили в данной группе только у одной женщины.

Таким образом, у большинства клинически здоровых женщин с нормоценозом лактофлора представлена преимущественно *L.crispatus*, который является мощным продуцентом  $H_2O_2$  и обладает сильными протективными свойствами. Отсутствие этого вида лактобацилл у пациенток с дисбиозом влагалища и преобладание у них других видов еще раз подтверждает пониженные защитные свойства *L.iners*, *L.gasseri*, *L.jensenii* и *L.johnsoni*. Следует признать, что роль *L.gasseri*, *L.jensenii*, *L.vaginalis* и *L.johnsoni* в формировании нормального микробиоценоза влагалища незначительна. Примечательно, что видовой состав лактофлоры у клинически здоровых женщин

отличается большим разнообразием — у 41% обследованных выявлены виды с пониженными протективными свойствами, а в 59% случаев нормофлора была представлена двумя и более видами одновременно. Представляет интерес динамическое наблюдение за состоянием вагинального микробиоценоза у этих женщин с целью установления его стабильности.

## Выводы

1. Нормальная микрофлора влагалища у пациентов с дисбиотическими нарушениями в большинстве случаев представлена только одним видом лактобактерий, в то время как у клинически здоровых женщин состояние микробиоценоза влагалища которых отвечает критериям абсолютного нормоценоза, лактофлора в 59% представлена двумя и более видами лактобацилл.

2. Частота выявления *L. crispatus* и доля этого вида в составе нормофлоры статистически значимо выше у клинически здоровых женщин с абсолютным нормоценозом.

3. У женщин с выраженным дисбиозом в большинстве случаев нормофлора представлена доминирующим видом лактобацилл с пониженными протективными свойствами — *L. iners*.

4. Выявление лактобацилл с пониженными протективными свойствами (*L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* и *L. johnsoni*) у клинически здоровых женщин в составе нормального микробиоценоза влагалища может являться предиктором развития дисбиотических расстройств в будущем, однако данное предположение требует дальнейших исследований. ■

*Ворошилина Е.С., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России, заведующая лабораторией ООО МФЦ «Гармония», г. Екатеринбург; Зорников Д.Л., студент 5-го курса медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО УГМА Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург; Тумбинская Л.В., к.б.н. заместитель директора по науке ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; Гончарова Е.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; Автор, ответственный за переписку - Ворошилина Екатерина Сергеевна, 620026, Екатеринбург, ул. Тверитина 16, медицинский центр «Гармония». Тел. (343) 251-08-75, e-mail: voroshilina@gmail.com*

## Литература:

1. Савичева А. М., Мартижайнен З. М., Сельвин Н. К. Оценка действия препарата Тержонан на дрожжеподобные грибы рода *Candida* и вагинальные лактобациллы *in vivo* и *in vitro* // Практикующий врач 2004 - №3. С. 43-44
2. Hawes S. E., Hillier S. L., Benedetti J., Stevens C. E., Koutsky L. A., Wolner-Hanssen P., Holmes K. K. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections // The Journal of infectious diseases. - 1996. - Vol. 174. - №5. - P. 1058-1063.
3. Antonio M. A., Hawes S. E., Hillier S. L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species // The Journal of infectious diseases. - 1999. - Vol. 180. - №6. - P. 1950-1956.
4. Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G., De Backer E., Temmerman M., Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora // BMC microbiology. - 2009. - Vol. 9. - P. 116.
5. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотко Е.Э. Современные возможности диагностики бактериального вагиноза: исследование количественного и качественного состава сложных микробных сообществ // Уральский медицинский журнал, 2011, №13 (91), с70.
6. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотко Е.Э., Жаютия Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? // Акушерство и гинекология, 2011, № 1. С. 57-65.