

## Information about the authors

J.E. Kantari\* – Student

E.N. Mokasheva – Department Assistant

\*Автор, ответственный за переписку (The author responsible for the correspondence):

kantari.jasmine@mail.ru

УДК 618.15

## ПОИСК ОСОБЕННОСТЕЙ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ КЛИНИКИ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ ВЛАГАЛИЩА У ПАЦИЕНТОК С НОРМОЦЕНОЗОМ

Карякина Анастасия Евгеньевна<sup>1</sup>, Кишиева Лейла Анар кызы<sup>1</sup>, Трошина Виктория Игоревна<sup>1</sup>, Зорников Данила Леонидович<sup>1,2</sup>, Ворошилина Екатерина Сергеевна<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

<sup>2</sup>Лаборатория генетических и эпигенетических основ прогнозирования нарушений онтогенеза и старения человека

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

<sup>3</sup>Медицинский центр «Гармония»

Екатеринбург, Россия

### Аннотация

**Введение.** Нормальная микробиота влагалища преимущественно представлена лактобациллами, уменьшение количества которых приводит к снижению колонизационной резистентности биотопа. В свою очередь, дисбиотические изменения во влагалище могут приводить к развитию инфекционно-воспалительной патологии. Однако в клинической практике встречаются пациентки с признаками инфекционно-воспалительной патологии влагалища даже среди женщин с нормоценозом. Вопрос об этиологии данной патологии у пациенток с нормоценозом остается открытым. **Цель исследования** – оценить связь отдельных групп микроорганизмов с наличием клиники инфекционно-воспалительной патологии влагалища у пациенток с нормоценозом. **Материал и методы.** Методом ПЦР в режиме реального времени определяли общую бактериальную массу, количества и доли 21 группы микроорганизмов в образцах вагинального отделяемого от 317 пациенток с нормоценозом. **Результаты.** Все женщины с нормоценозом влагалища были поделены на две группы: пациентки с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища (Группа 1, n = 149) и здоровые женщины (Группа 2, n = 168). У пациенток Группы 1 отмечали снижение доли лактобацилл на 0,2% (p = 0,033), двукратное увеличение количества и десятикратное увеличение доли бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (p <= 0.05). Несмотря на статистическую значимость данных различий, их реальная клиническая значимость представляется сомнительной. **Выводы.** У пациенток с сохранной долей лактобацилл отмечаются минимальные изменения вагинальной микробиоты в случае наличия клиники инфекционно-воспалительной патологии влагалища.

**Ключевые слова:** вагинальные лактобациллы, нормоценоз, инфекционно-воспалительная патология влагалища

## RESEARCH FOR THE FEATURES OF VAGINAL MICROBIOTA ASSOCIATED WITH SIGNS AND SYMPTOMS OF INFECTIOUS INFLAMMATORY PATHOLOGY IN THE VAGINA AMONG WOMEN WITH HIGH LACTOBACILLI LEVEL

Kariakina Anastasia Evgenievna<sup>1</sup>, Kishieva Leila Anar kzyzy<sup>1</sup>, Troshina Viktoriya Igorevna<sup>1</sup>, Zornikov Danila Leonidovich<sup>1,2</sup>, Voroshilina Ekaterina Sergeevna<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Virology, and Immunology

<sup>2</sup>Laboratory of Genetic and Epigenetic Basis of the Human Ontogenesis Abnormalities and Human Senescence

Ural State Medical University

<sup>3</sup>Medical Center «Garmonia»

Yekaterinburg, Russia

### Abstract

**Introduction.** The normal vaginal microbiota is mainly represented by lactobacilli. The depletion of lactobacilli compromises the colonization resistance of the vagina and leads to dysbiosis. In turn, dysbiotic changes in the vagina can predispose to the development of infectious inflammatory pathology. However, in clinical practice, there are patients with signs and symptoms of infectious inflammatory pathology in the vagina even among women with normal vaginal microbiota. The etiology of this pathology often remains unclear. **The aim of the study** was to assess the association of 21 microbial groups with the presence of signs and/or symptoms of infectious inflammatory pathology in the vagina

among patients with normocenosis. **Material and methods.** Real-time PCR was used to determine the total bacterial load, the quantities and proportions of 21 vaginal microbial groups in vaginal swabs from 317 women with normocenosis. **Results.** All women with vaginal normocenosis were divided into two groups: patients with signs and/or symptoms of infectious inflammatory pathology in the vagina (Group 1, n = 149) and healthy women (Group 2, n = 168). For Group 1, there was a decrease in the proportion of lactobacilli by 0.2% ( $p = 0.033$ ), a 2-fold increase in the number and a 10-fold increase in the proportion of bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* ( $p \leq 0.05$ ). Despite the statistical significance of these differences, their actual clinical significance is questionable. **Conclusion.** In women with a preserved proportion of lactobacilli, only minimal changes of vaginal microbiota were determined in case of signs and symptoms of infectious inflammatory pathology in the vagina.

**Keywords:** vagina, vaginal lactobacilli, normocenosis, infectious inflammatory pathology

## ВВЕДЕНИЕ

Для каждого биотопа человека характерен свой набор микроорганизмов (МО). Нормальная микробиота влагалища характеризуется преобладанием лактобацилл, доля которых составляет более 80% от общей бактериальной массы [1]. Биопленки лактобацилл препятствуют адгезии патогенных и условно-патогенных МО [2]. Кроме того, лактобациллы подавляют рост патогенных и условно-патогенных МО за счет синтеза молочной кислоты, перекиси водорода и бактериоцинов, тем самым поддерживают нормоценоз влагалища и снижают риск бактериального вагиноза [3].

Уменьшение числа лактобацилл приводит к снижению колонизационной резистентности биотопа и, как следствие, заселению патогенными микроорганизмами и/или росту числа условно-патогенных МО [4]. В свою очередь, дисбиотические изменения во влагалище могут приводить к развитию инфекционно-воспалительной патологии [5].

Однако в клинической практике встречаются пациентки с признаками инфекционно-воспалительной патологии влагалища даже среди женщин с нормоценозом (сохраной долей лактофлоры). Вопрос об этиологии данной патологии у пациенток с нормоценозом остается открытым, за исключением пациенток с повышенным содержанием генитальных микоплазм и грибов рода *Candida* [1].

**Цель исследования** – оценить связь отдельных групп микроорганизмов с наличием клиники инфекционно-воспалительной патологии влагалища у пациенток с нормоценозом

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 317 женщин, в возрасте от 18 до 52 лет (медиана - 29, Q25-Q75: 26-34), наблюдавшихся в медицинском центре Гармония (г. Екатеринбург) с 2011 по 2012 год.

Критерии включения: микробиота влагалища соответствовала критериям нормоценоза (доля лактобацилл более 80% в ОБМ).

Критерии невключения: прием местных или системных антимикробных препаратов в течение 2-х недель до исследования, наличие облигатно патогенных возбудителей (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*).

Клиническую оценку состояния нижних отделов половых путей проводили методом опроса пациенток и гинекологическим осмотром в зеркалах для объективной оценки выделений и состояния слизистой.

В качестве исследуемого материала использовали образцы вагинального отделяемого. Выделение ДНК осуществляли комплектом реагентов ПРОБА-ГС («ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Определение общей бактериальной массы, суммарного количества и доли лактобацилл, количества и доли *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *G. vaginalis/P. bivia/Porphyromonas spp.* (группа GPP), *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium spp.* (группа SLF), *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* (группа MVD), *Lachnobacterium spp./Clostridium spp.* (группа LC), *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* (группа MC), *Peptostreptococcus spp.*, *A. vaginae*, а также количества грибов рода *Candida* проводили методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов Фемофлор-16 («ДНК-технология», Россия). Определение количества шести видов лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) проводили с помощью набора реагентов для научного применения

(«ДНК-технология», Россия). Все реакции амплификации проводили в амплификаторах ДТ-96 этого же производителя.

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в R (версия 4.3.2, сборка 2023-10-31 ucrt). Нормальность распределения признаков определяли тестом Шариро-Уилка. В качестве средних величин использовали медианы; для описания вариации признаков приводили значения 0,25 и 0,75 перцентилей. Достоверность различий между сравниваемыми количественными показателями оценивали с помощью теста Манна-Уитни, между частотными показателями – точного теста Фишера (двустороннего критерия). Все различия считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В зависимости от наличия жалоб и/или клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища все обследованные женщины были поделены на две группы: пациентки с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища (Группа 1,  $n = 149$ ) и клинически здоровые женщины (Группа 2,  $n = 168$ ). Частота выявления 15 групп микроорганизмов (МО) значимо не отличалась в сравниваемых группах (рис. 1). Лактобациллы обнаруживали у всех обследованных пациенток, остальные группы МО выявляли в 20,2%-90,6% случаев.

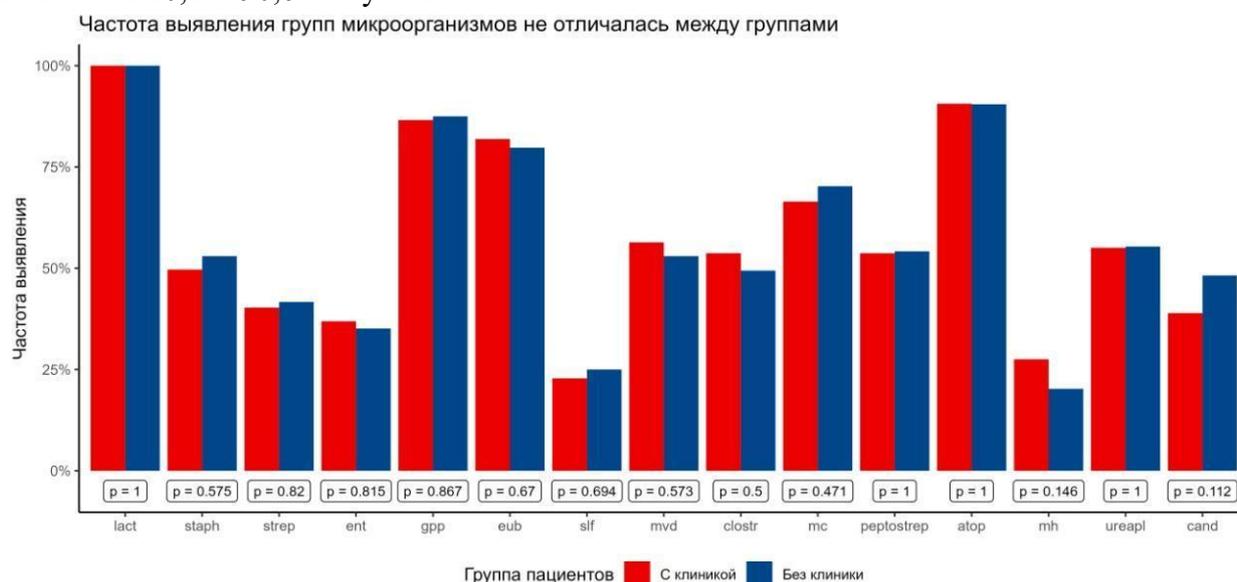


Рис. 1 Частота выявления 15 групп микроорганизмов у пациенток с нормоценозом в зависимости от наличия клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища ( $n = 317$ )

В составе лактофлоры в качестве доминирующих видов выявляли только 4 вида лактобацилл: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* и *L. gasseri* (доминирующим считали вид, выявляемый в наибольшем количестве). При этом частота доминирования достоверно не отличалась у пациенток групп 1 и 2 (рис. 2). В обеих группах в качестве доминирующих чаще выявляли *L. crispatus* (43,9% - в Группе 1, 48,8% - в Группе 2) и *L. iners* (53,4% - в Группе 1, 46,4% - в Группе 2). *L. jensenii* доминировал только у 4 (2,7%) пациенток Группы 1 и у 8 (4,8%) женщин Группы 2. *L. gasseri* преобладал только в Группе 1 у единственной пациентки.

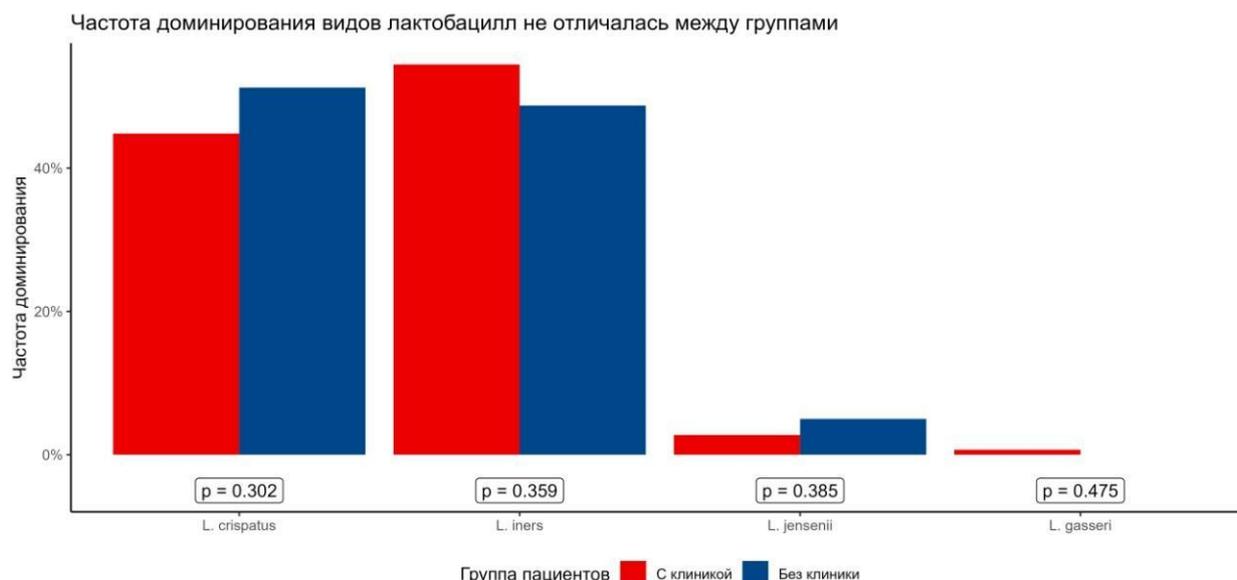


Рис. 2 Доминирующие виды лактобацилл у пациенток с нормоценозом в зависимости от наличия клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища (n = 317)

Пациентки групп 1 и 2 были сопоставимы по количеству, но отличались по доле лактобацилл (рис. 3). Доля лактобацилл для Группы 1 составила 99,7% (Q25-Q75: 98,6% - 99,9%), для Группы 2 - 99,9% (Q25-Q75: 98,9% - 100%) (p=0,033). Медианные количества и доли всех остальных групп МО, за исключением семейства *Enterobacteriaceae*, достоверно не отличались между пациентками Групп 1 и 2.

Среди положительных по *Enterobacteriaceae* женщин количество данных МО составило  $10^{3,4}$  ГЭ/образец (Q25-Q75:  $10^{3,1}$  -  $10^{3,7}$ ) для Группы 1 и  $10^{3,6}$  ГЭ/образец (Q25-Q75:  $10^{3,2}$  -  $10^{4,4}$ ) для Группы 2 (p = 0,05), доля -  $10^{-4,5}$  (Q25-Q75:  $10^{-5}$  -  $10^{-3,7}$ ) для Группы 1 и  $10^{-3,8}$  (Q25-Q75:  $10^{-4,5}$  -  $10^{-3,5}$ ) для Группы 2 (p < 0,001). Кроме того, отмечали выраженную тенденцию к большему количеству и доле бактерий группы GPP и *Ureaplasma spp.* Количество GPP составило  $10^{4,2}$  ГЭ/образец (Q25-Q75:  $10^{3,6}$  -  $10^{5,1}$ ) в Группе 1 и  $10^{3,8}$  ГЭ/образец (Q25-Q75:  $10^{3,4}$  -  $10^{4,8}$ ) в Группе 2 (p = 0,081), доля  $10^{-3,9}$  (Q25-Q75:  $10^{-4,5}$  -  $10^{-2,9}$ ) для Группы 1 и  $10^{-3,5}$  (Q25-Q75:  $10^{-4,3}$  -  $10^{-2,5}$ ) для Группы 2 (p=0,061). Количество *Ureaplasma spp.* в Группе 1 -  $10^{4,5}$  (Q25-Q75:  $10^{2,9}$  -  $10^{5,2}$ ), в Группе 2 -  $10^{3,8}$  (Q25-Q75:  $10^{2,2}$  -  $10^{5,1}$ ). Доля *Ureaplasma spp.* в Группе 1 -  $10^{-3,3}$  (Q25-Q75:  $10^{-5}$  -  $10^{-2,8}$ ), в Группе 2 -  $10^{-3,9}$  (Q25-Q75:  $10^{-5,2}$  -  $10^{-3,1}$ ) (p=0,075).

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* выявляли в достоверно больших количествах и долях в группе пациенток с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища

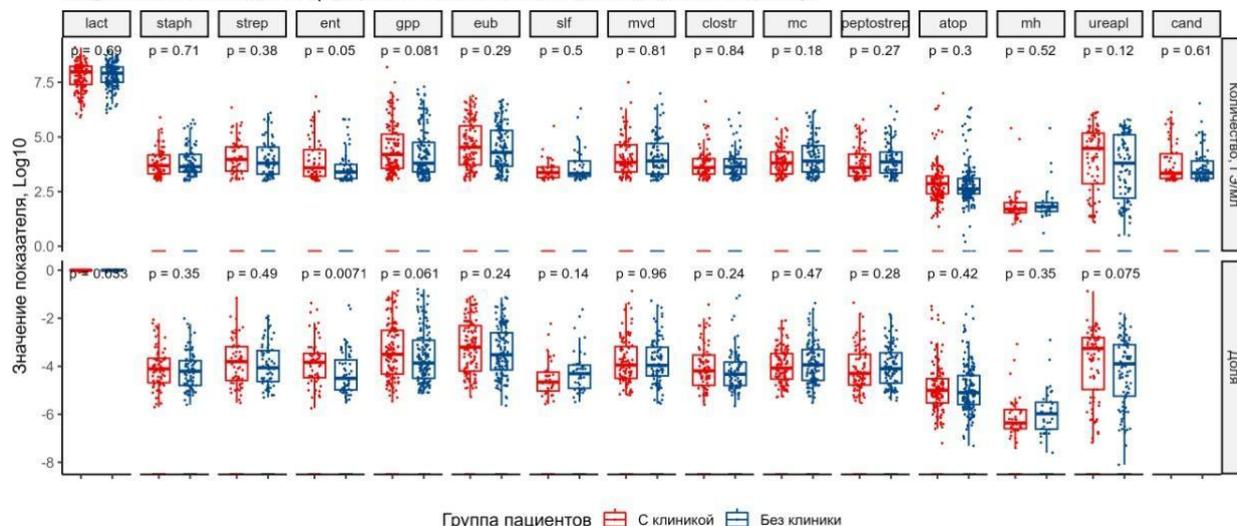


Рис. 3 Количества и доли 15 групп микроорганизмов у пациенток с нормоценозом в зависимости от наличия клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища (n = 317)

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании 47% обследованных женщин с нормоценозом имели признаки инфекционно-воспалительной патологии влагалища. Открытым остается вопрос этиологии данных проявлений. Мы предположили, что это может быть связано с определенными условно-патогенными МО, населяющими влагалище, или с особенностями вагинальной лактофлоры.

Для проверки данной гипотезы мы сравнили частоту выявления и количество 14 групп бактерий и грибов рода *Candida*, а также долю каждой группы бактерий от общей бактериальной массы у женщин Группы 1 (пациентки с клиникой) и Группы 2 (клинически здоровые женщины). Дополнительно сравнили частоту доминирования отдельных видов лактобацилл. В результате не было обнаружено значимых различий по частоте выявления 15 групп МО в группах 1 и 2. Однако было выявлено статистически значимое различие по доле лактобацилл, доля которых была снижена на 0,2% у пациенток Группы 1, а также по количеству и доле бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые были достоверно выше в Группе 1 (с патологией). Кроме того, отмечали выраженную тенденцию к большему количеству и доле бактерий группы *GPP* и *Ureaplasma spp.* у пациенток Группы 1, но без статистической значимости. Однако, несмотря на статистическую значимость, маловероятно, что полученные различия имеют реальное клиническое значение: доля лактобацилл различалась всего на 0,2%, а количество энтеробактерий - менее чем в 2 раза, при этом доля энтеробактерий в обеих группах была ниже 0,1%.

Ранее было отмечено, что преобладающий вид лактобацилл определяет значение вагинальной pH. Так средние значения pH в случае доминирования *L.crispatus* составили  $4,0 \pm 0,3$ , а в случае доминирования *L.iners* -  $4,4 \pm 0,6$  [6]. В другой работе отмечали меньшие количества условно-патогенных МО при доминировании *L.crispatus* в условиях нормоценоза, а также сделали вывод о том, что при доминировании других видов лактобацилл риск трансформации нормальной микробиоты влагалища в патологическую стоит расценивать как повышенный [2]. В нашем исследовании *L.crispatus*, *L.iners* и *L. jensenii* в качестве доминирующих выявляли с сопоставимой частотой в обеих группах пациенток, тогда как *L. gasseri* доминировали только в единственной пробе от пациентки с клиническими проявлениями. По всей видимости, наличие клиники инфекционно-воспалительной патологии влагалища у пациенток с нормоценозом не зависит от доминирующего вида лактобацилл.

Стоит отметить, что жалобы, характерные для инфекционно-воспалительной патологии влагалища являются субъективным критерием, поскольку у пациента нет объективного понятия нормы, с которой можно было бы сравнить свое состояние. Помимо этого, визуальный осмотр врачом также отчасти носит субъективный характер [7]. Не исключено, что у части пациенток клиника могла быть вызвана вирусной инфекцией, например, герпесвирусами человека [8]. Нарушения кишечного микробиоценоза могут также стать причиной инфекционно-воспалительной патологии влагалища даже у женщин с нормоценозом [9]. Нельзя также исключить аллергические реакции на средства интимной гигиены, наличие атопического дерматита и другие причины патологии нижних отделов репродуктивного тракта неинфекционной природы, заставляющие женщин обратиться к гинекологу, а врача – провести углубленное исследование вагинальной микробиоты.

Из-за особенностей используемой нами тест-системы Фемофлор-16 не было возможности дифференцировать мелкие бактериальные таксоны, например роды и виды внутри семейства *Enterobacteriaceae*. Возможно, что определенные роды или виды энтеробактерий вносят вклад в развитие инфекционно-воспалительной патологии влагалища, тогда как мы оценивали суммарное количество бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Более того, было продемонстрировано, что патогенность некоторых МО определяется даже на внутривидовом уровне. Так было показано, что разные штаммы *Gardnerella vaginalis* обладают разной способностью к продукции нейраминидазы, которая рассматривается как один из факторов патогенности данного МО [10].

## ВЫВОДЫ

1. Частота выявления отдельных групп микроорганизмов, в том числе доминирующих видов лактобацилл, статистически значимо не отличалась у пациенток с нормоценозом в группах с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища и у клинически здоровых женщин.

2. У клинически здоровых женщин с нормоценозом лактофлора чаще была представлена *L.iners* (46,4%) и *L.crispatus* (48,8%), как и у пациенток с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища - 53,4% и 43,9% соответственно.

3. У пациенток с клиникой инфекционно-воспалительной патологии влагалища и нормоценозом отмечали достоверно меньшую долю лактобацилл при достоверно более высоком количестве и доле энтеробактерий; однако, реальная клиническая значимость этих различий является сомнительной.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? / Е. Э. Плотко, А. Е. Донников, Е. С. Ворошилина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2011. – №1. – С. 66–70.
2. Зорников Д.Л. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированными с дисбиозом влагалища / Д.Л. Зорников, Л.В. Тумбинская, Е.С. Ворошилина // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2015. – № 4 (55). – С. 99-105.
3. Antonio M.A. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. / M. A. Antonio, L. K. Rabe, S. L. Hillier // *J Infect Dis.* – 2005. – №192. – P. 394-398.
4. Микробиоценоз влагалища с точки зрения ПЦР в реальном времени. Возможности коррекции дисбиотических нарушений влагалища. / Е.С. Ворошилина, И.В. Лаврентьева, Д.Л. Зорников [и др.] // Учебное пособие. – 2018. – 76 с.
5. A cluster analysis of bacterial vaginosis associated with microflora and pelvic inflammatory disease. / R. B. Ness, K. E. Kip, S. L. Hillier [et al.] // *Am J Epidemiol.* - 2005. - №15. - P. 58-90.
6. Vaginal microbiome of reproductive-age women. / Ravel, Jacques [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2011. – Vol. 108. – P. 4680–4687.
7. Voroshilina E.S. Normal vaginal microbiota: patient's subjective evaluation, physical examination and laboratory tests. / E.S. Voroshilina, D.L. Zornikov, E.E. Plotko // *Bulletin of RSMU.* – 2017;. – №2. P. 39–42.
8. Наумкина Е.В. Бактериально-вирусные ассоциации при дисбиозах вагинального биотопа. / Е.В. Наумкина, Е.В. Матущенко, Е.В. Пахалкова // *Бактериология.* – 2019. – №4(3). P. 49–52.
9. Микробиологические сочетания вагинального и кишечного биотопов у женщин с воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта и девочек-подростков с дисфункцией яичников / С.М. Попкова, Е.Б. Ракова, Е.Е. Храмова [и др.] // *Сибирский научный медицинский журнал.* – 2013. – №4. – С. 77-84.
10. Gardnerella vaginalis Subgroups Defined by cpn60 Sequencing and Sialidase Activity in Isolates from Canada, Belgium and Kenya. / J.J. Schellenberg, T. Paramel Jayaprakash, N. Withana Gamage, M.H. Patterson, M. Vaneechoutte [et al.] // *PLOS ONE.* - 2016. - №11(1). – P. 1–12.

## Сведения об авторах

А.Е. Карякина\* – студент

Л.А. Кишиева – студент

В.И. Трошина – студент

Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Е.С. Ворошилина - доктор медицинских наук, доцент

## Information about the authors

A.E. Kariakina\* – Student

L.A. Kishieva – Student

V.I. Troshina – Student

D.L. Zornikov – Candidate of (Medicine) Science, Associate Professor

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

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

kariakina05@mail.ru

УДК: 616-071

## РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ ПРОТООНКОГЕНА MTOР

Корнилов Даниил Олегович<sup>1</sup>, Симарзина Вероника Михайловна<sup>1</sup>, Тряпицын Михаил Андреевич<sup>1</sup>, Маслаков Георгий Павлович<sup>2</sup>, Бехтер Алексей Андреевич<sup>1</sup>, Зорников Данила Леонидович<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России  
Екатеринбург, Россия