

УДК 616-008.87-07.097.931

Н.М. Шабанова, С.М. Попкова, Ю.П. Джиоев, Е.Б. Ракова, И.Н. Данусевич,
Е.В. Бухарова, У.М. Немченко

МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНОВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАКТОБАЦИЛЛ ВАГИНАЛЬНОГО БИОТОПА У ЖЕНЩИН С НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ НИЖНЕГО ЭТАЖА ПОЛОВОГО ТРАКТА

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

Исследуемую выборку составили 30 женщин репродуктивного возраста с неспецифическими воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта. Проведен анализ качественного и количественного состава условно-патогенной микрофлоры и лактобацилл. Показало, что у обследованных пациенток условно-патогенная микрофлора обнаруживалась в большинстве случаев (73,3 %), а у остальных (26,7 %) при отсутствии УПМ дисбиотические изменения проявлялись в снижении концентрации нормальной микрофлоры влагалища, представленной в основном лактофлорой. Дефицит лактобацилл обнаруживался практически у всех женщин данной выборки (96,6 %), и только в одном случае (3,4 %), концентрация лактобацилл соответствовала физиологической норме. Видовая идентификация лактобацилл производилась с помощью молекулярно-генетических методов (ПЦР-амплификации) и визуализации электрофорезом в агарозном геле. Определили коэффициент постоянства (с) отдельных представителей условно-патогенной микрофлоры и индекс видовой насыщенности (ИВН) в вагинальном биотопе обследованных женщин. Показано превалирование *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus jensoni*, выделяющихся в 83 и 50 % случаев соответственно. Также было установлено, что в структуре количественной сочетаемости исследуемых видов лактобацилл, наибольшая частота характерна для ассоциаций двух видов, что составило около 53 %.

Ключевые слова: условно-патогенная микрофлора, коэффициент постоянства, видовая насыщенность, виды лактобацилл, ПЦР

MICROECOLOGICAL AND GENESPECIFIC CHARACTERISTICS OF VAGINAL BIOTOPE LACTOBACILLI IN WOMEN WITH NONSPECIFIC LOWER FEMALE REPRODUCTIVE TRACT INFLAMMATORY DISEASES

N.M. Shabanova, S.M. Popkova, Yu.P. Dzhioev, E.B. Rakova, I.N. Danusevich,
E.V. Bukharova, U.M. Nemchenko

Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

The study included 30 reproductive age women with lower female reproductive tract nonspecific inflammatory diseases. The analysis of the qualitative and quantitative pathogenic microorganisms as well as lactobacilli composition was conducted. It was shown that in women observed the opportunistic microflora detected often (73,3 %) in the rest part of patients (26,7 %) in case if opportunistic microflora was absent the disbiotic changes occurred in lower concentration of normal microflora of vagina represented mostly by lactoflora. Deficiency of lactobacilli was observed almost in all women of this group (96,6 %) and only in one case (3,4 %) the concentration of lactobacilli was consistent with normal physiological range. Molecular genetic methods (PCR amplification) with visualization by means of electrophoresis in agarose gel was made for identification of *Lactobacilli* species. Consistency index (c) and species saturation index (sri) for opportunistic microorganisms in women vaginal biotope examined were calculated. Prevalence of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus jensoni* isolating in 83 and 50 % respectively was shown. Also it was shown that in the structure of quantitative compatibility of studied species of lactobacilli the highest rate is characterized to the association of two types that makes 53 %.

Key words: opportunistic microflora, consistency index, species saturation index, lactobacilli species, PCR

Нормальная микрофлора влагалища у женщин репродуктивного возраста содержит 10^6 – 10^8 КОЕ/мл микроорганизмов и состоит из постоянно обитающих и транзитных видов. Индигенная микрофлора обеспечивает колонизационную резистентность генитального тракта, препятствует заселению влагалища патогенными видами, чрезмерному размножению и транслокации в другие органы и ткани условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), входящих в состав биоценоза влагалища. Колонизационную резистентность связывают с резидентным компонентом микрофлоры, представленным разными видами лактобацилл, доминирующих среди вагинальных микроорганизмов (95–98 % всей популяции) [7]. Видовой состав и комбинации лактобацилл, коло-

низирующих влагалище, непостоянен у одной и той же женщины в разные временные интервалы [8]. Благодаря продукции органических кислот, перекисей и бактериоцинов, многие виды лактобацилл проявляют выраженную антагонистическую активность в отношении патогенных и оппортунистических микроорганизмов [9, 14–16]. В условиях кислой среды лактобациллы активно конкурируют с другими микроорганизмами за возможность продуктивного патофизиологического контакта (адгезии) с клетками эпителия влагалища, а также стимулируют иммунную систему макроорганизма. В то же время нарушения состава индигенной микрофлоры (лактобацилл, бифидобактерий), которые нередко протекают бессимптомно, патогенетически связаны с

широким спектром акушерских и гинекологических осложнений [1, 3, 12, 13]. Поэтому лактобациллы, будучи доминирующей флорой влагалища, могут служить критериями микробиологического благополучия или патологии в организме.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить видовой состав лактобацилл на фоне микробиологических характеристик вагинального биотопа у женщин с неспецифическими воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использована выборка из 30 женщин репродуктивного возраста с неспецифическими воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта, проживающих в условиях промышленного города. Бактериологическое исследование проводилось в соответствии с общепринятыми методами [1, 7]. Для интегральной оценки микробиологических характеристик в аналитической части работы были использованы следующие показатели: индекс видовой насыщенности (ИВН) – среднее количество видов, входящих в состав биоценоза; показатель постоянства (*c*), для выявления долевого участия различных видов в структуре биоценоза по формуле: $c = (p/P)100\%$ (где *c* – показатель постоянства, *p* – число наблюдений, содержащих изучаемый вид; *P* – общее число наблюдений). Интерпретация: > 50 % – постоянный вид, 25–50 % – добавочный вид; < 25 % – случайный вид [5].

Биомасса лактобацилл была выращена на виномарно-сахарном бульоне. Для выделения ДНК бактерий из культуральной среды использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). В качестве мишеней для генотипирования был выбран информационный ген 16S рРНК лактобацилл. Типирование проводили с 5 парами праймеров (табл. 1), специфичными для соответствующих видов лактобацилл [2, 4, 6]. Для ПЦР-амплификации использовали коммерческий набор AmpliSens-200-1 (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора,

Россия). Реакция амплификации для всех 5 пар праймеров была модифицирована, оптимизирована и проходила по следующей схеме: первичная денатурация ДНК – 95 °С – 2 мин, далее 35 циклов амплификации при условиях: 95 °С – 1 мин, 56 °С – 1 мин, 72 °С – 1 мин и заключительная элонгация – 72 °С – 3 мин. Электрофорез ПЦР-фрагментов ДНК лактобацилл проводили с использованием 1,0% агарозного геля в 1-кратном трис-ацетатном буфере. Размеры амплифицированных фрагментов идентифицировали в соответствии с протоколом стандартных маркеров молекулярной массы ДНК («Fermentas», Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микробиологическое исследование вагинального биотопа показало, что у обследованных пациенток условно-патогенная микрофлора (УПМ) обнаруживалась в 73,3 % случаев, а у остальных (26,7 %) при отсутствии УПМ дисбиотические изменения проявлялись в снижении концентрации нормальной микрофлоры влагалища, представленной в основном лактофлорой. Дефицит лактобацилл обнаруживался практически у всех женщин данной выборки (96,6 %), и только в одном случае (3,4 %) концентрация лактобацилл соответствовала физиологической норме.

Важным показателем, характеризующим микробиоценоз биотопа, является коэффициент видовой насыщенности (ИВН). В исследуемой группе ИВН = 1,2 ± 0,9.

Наиболее часто встречающимися видами УПМ (рис. 1) были коагулазонегативные стафилококки (КНС) (*c* = 50). Второе место по частоте высеваемости занимали *Enterococcus spp.* (*c* = 36,4). Далее по убыванию определялись *Candida spp.* (*c* = 31,8) и *Escherichia coli* (*c* = 27,3). По показателю постоянства (*c*) данные представители УПМ исследуемого ассоциативного микробиоценоза были отнесены к добавочным видам. К случайным видам были отнесены *Staphylococcus aureus* (*c* = 13,6) и *Klebsiella spp.* (*c* = 4,5) (рис. 1).

Практически у всех пациенток наблюдался дефицит лактобацилл с титром ниже $Lg 10^7-10^9$ КОЕ/мл, причем у 60 % из них лактобациллы определялись

Таблица 1
Нуклеотидные структуры видовых праймеров, используемых для типирования лактобацилл [15]

Виды лактобацилл	Праймеры	Структура нуклеотидных последовательностей	Размер ампликона (н.о.)
<i>L. gasseri</i>	F	5'- AGC GAG CTT GCC TAG ATG AAT TTG- 3'	320
	R	5'- TCT TTT AAA CTC TAG ACA TGC GTC- 3'	
<i>L. iners</i>	F	5'- CTC TGC CTT GAA GAT CGG AGT GC- 3'	250
	R	5'- ACA GTT GAT AGG CAT CAT CTG-3'	
<i>L. jensoni</i>	F	5'- AAG TCG AGC GAG CTT GCC TAT AGA- 3'	250
	R	5'- CTT CTT TCA TGC GAA AGT AGC- 3'	
<i>L. crispatus</i>	F	5'- AGC GAG CGG AAC TAA CAG ATT TAC- 3'	154
	R	5'- AGC TGA TCA TGC GAT CTG CTT- 3'	
<i>L. plantarum</i>	F	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3'	550

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер; н.о. – нуклеотидные основания.

культуральным методом, а в остальных случаях – только с помощью молекулярно-генетического метода (ПЦР-амплификация). Исходя из этого наблюдения, далее для микрoэкологической оценки биотопа выборка (30 человек) была разделена на 2 группы. В первую группу (18 человек) вошли женщины, у которых лактобациллы определялись культуральным методом, а вторую группу (12 человек) составили

женщины, у которых лактобациллы определялись только методом ПЦР-ампликации (рис. 2, 3).

В первой группе обследованных к добавочным видам ($c = 25-50\%$) были отнесены КНС ($c = 39,9$) и грибы рода *Candida* ($c = 38,9$). Остальные вегетирующие в биотопе представители УПМ: *E. coli* ($c = 11,1$), *Enterococcus spp.* ($c = 11,1$), *S. aureus* ($c = 5,5$), были отнесены к случайным видам ($c < 25\%$) (рис. 2).

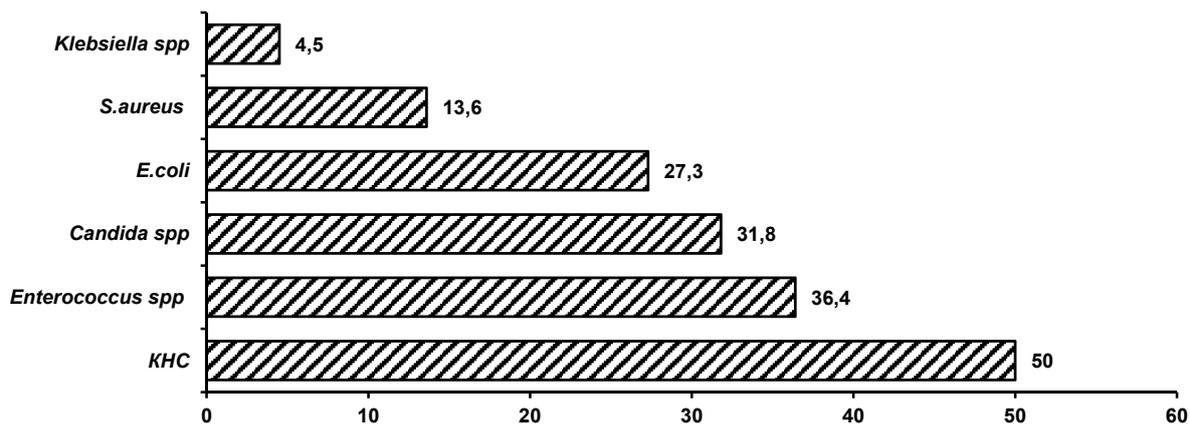


Рис. 1. Коэффициент постоянства представителей условно-патогенной микрофлоры (КНС – коагулазонегативные стафилококки).

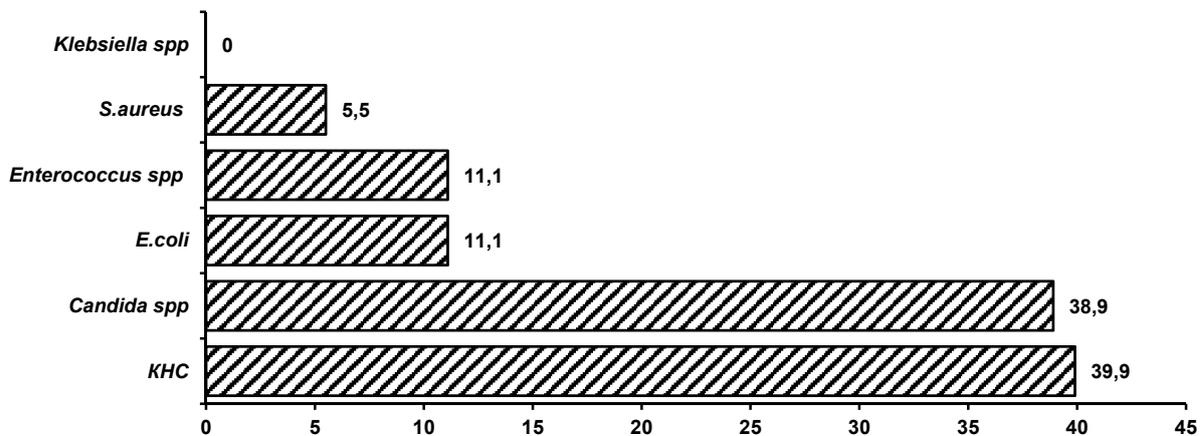


Рис. 2. Коэффициент постоянства представителей УПМ в группе женщин с индикацией лактобацилл культуральным методом.

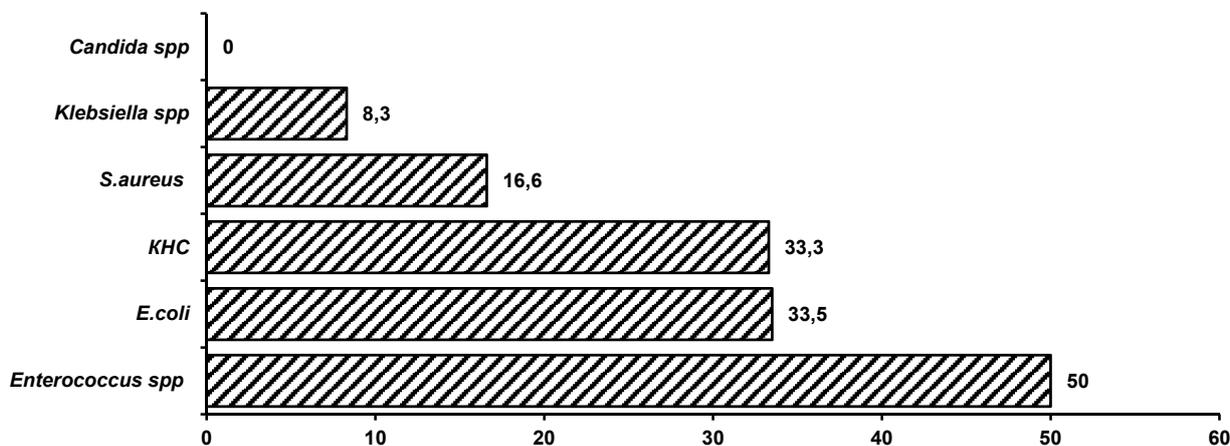


Рис. 3. Коэффициент постоянства представителей УПМ в группе женщин с индикацией лактобацилл только методом ПЦР.

Во второй группе женщин, у которых наличие лактобацилл установлено только методом ПЦР-амплификации, микрoэкологические характеристики были иные (рис. 3). К добавочным видам были отнесены *Enterococcus spp.* ($c = 50$), *E. coli* ($c = 33,5$) и КНС ($c = 33,3$). В разряд случайных видов попали *S. aureus* ($c = 16,6$) и *Klebsiella spp.* ($c = 8,3$).

Таким образом, в сравниваемых группах наблюдалось изменение микрoэкологических характеристик биоценоза. Так, если в первой группе к случайным видам относились *E. coli* ($c = 11,1$) и *Enterococcus spp.* ($c = 11,1$), то во второй группе они присутствовали как добавочные ($c = 50$ и $c = 33,5$ соответственно). Кроме того, во второй группе в качестве случайного вида дополнительно определялась *Klebsiella pneumoniae* ($c = 8,3$). Такие изменения, вероятно, обусловлены снижением кислотности среды за счет резкого дефицита лактобацилл, что способствует созданию благоприятных условий для развития условно-патогенной микрофлоры [9]. К тому же в данной группе отсутствие *Candida* было замечено энтерококками ($c = 50$), имеющими, по нашим данным, высокий патогенный потенциал [11]. Тогда как в первой группе *Candida* относились к разряду добавочных видов ($c = 38,9$).

Кроме этого, вторая группа характеризовалась более высоким по сравнению с первой индексом видовой насыщенности ($1,25 \pm 0,9$ и $1,05 \pm 0,8$ соответственно).

Вероятно, большее количество добавочных видов и более высокий индекс видовой насыщенности во второй группе – следствие слабой антагонистической активности лактобацилл, обусловленной их низкой плотностью в составе влагалищного биоценоза и определяемой только с помощью ПЦР-метода.

ПЦР-амплификация с визуализацией электрофорезом в агарозном геле представлена ниже (рис. 4): используемые праймеры достаточно четко разделяют соответствующие виды лактобацилл в общей массе микроорганизмов вагинального биотопа, что свидетельствует как об их высокой видоспецифичности, так и технической и информационной достоверности полученных результатов. В изучаемой выборке были выявлены все 5 исследуемых видов лактобацилл. Показано, что подобранный в ходе исследования общий режим амплификации для всех 5 пар праймеров, специфичных к видам лактобацилл, является оптимальным и результативным (рис. 4, табл. 1).

В результате ПЦР-амплификации с 30 образцами нативного материала в общем получены 64 положительных анализа. Из них 25 по размеру амплицированного ПЦР-фрагмента соответствовали виду *L. plantarum* (83%), 13 определялись как *L. crispatus* (43,3%), 4 – как *L. iners* (13,3%), 15 – как *L. jensoni* (50%) и 7 – как *L. gasseri* (23,3%). Таким образом, доминировали виды *L. plantarum* и *L. jensoni*, соста-

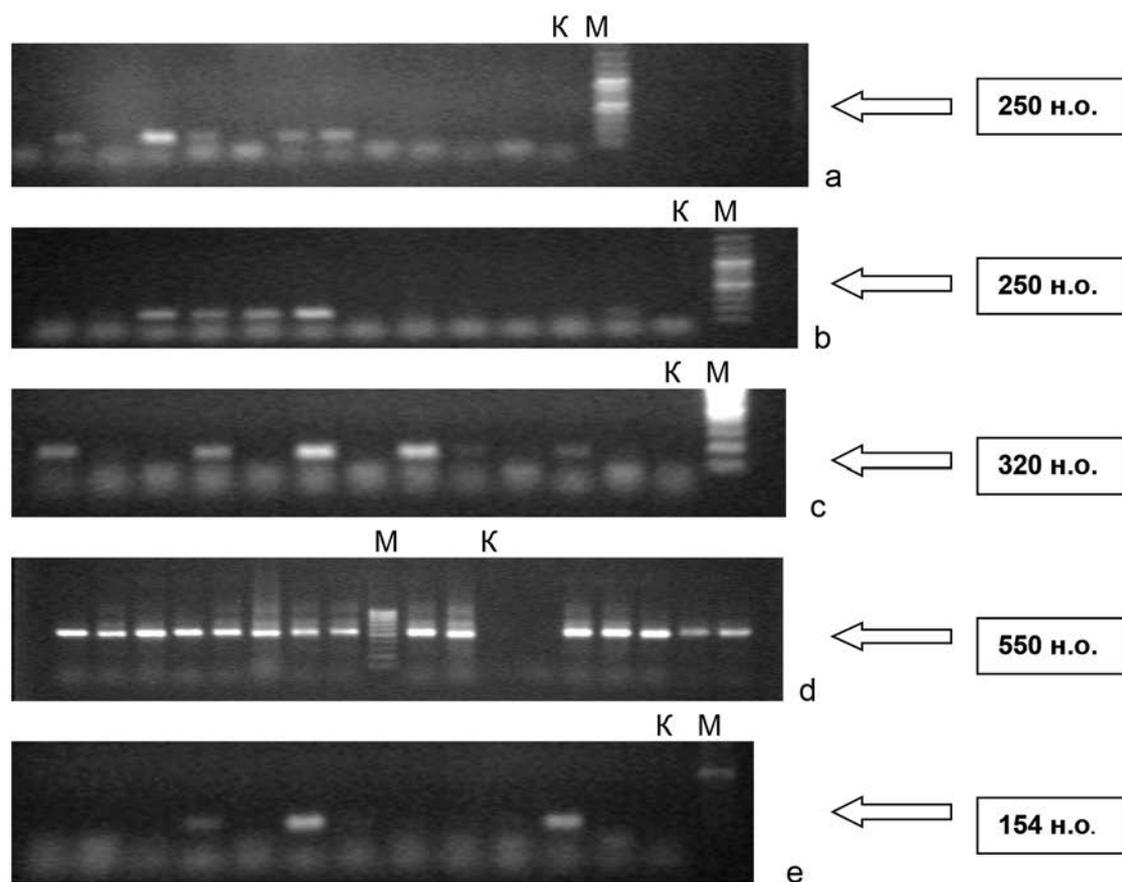


Рис. 4. Образцы электрофореграмм результатов ПЦР-анализа с видовыми праймерами на 16S r RNA: а – *L. jensoni* ~ 250 нуклеотидных оснований (н.о.); б – *L. iners* ~250 н.о.; в – *L. gasseri* ~ 320.; д – *L. plantarum* ~ 550 н.о.; е – *L. crispatus* ~154 н.о.; М – маркер длины ДНК фрагментов; –К – отрицательный контроль.

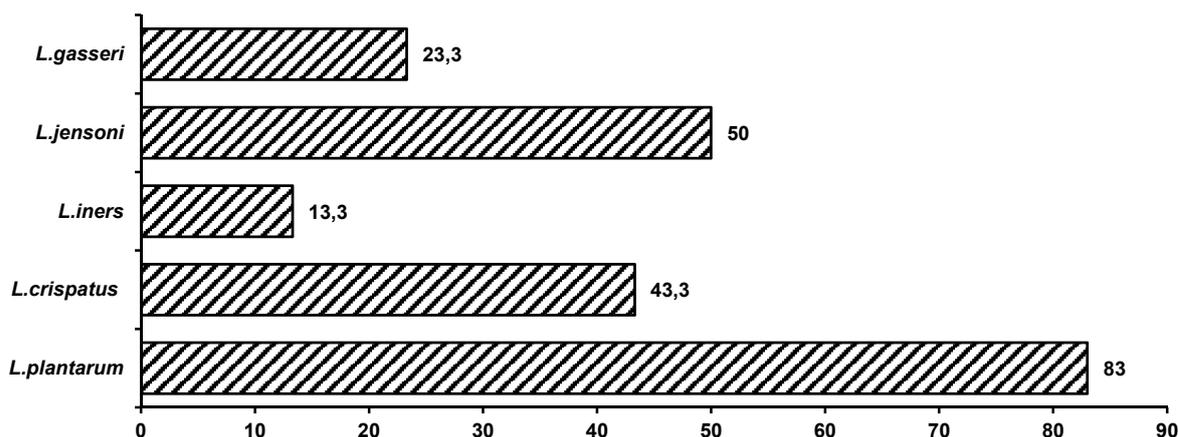


Рис. 5. Частота присутствия отдельных видов лактобацилл в вагинальном биотопе.

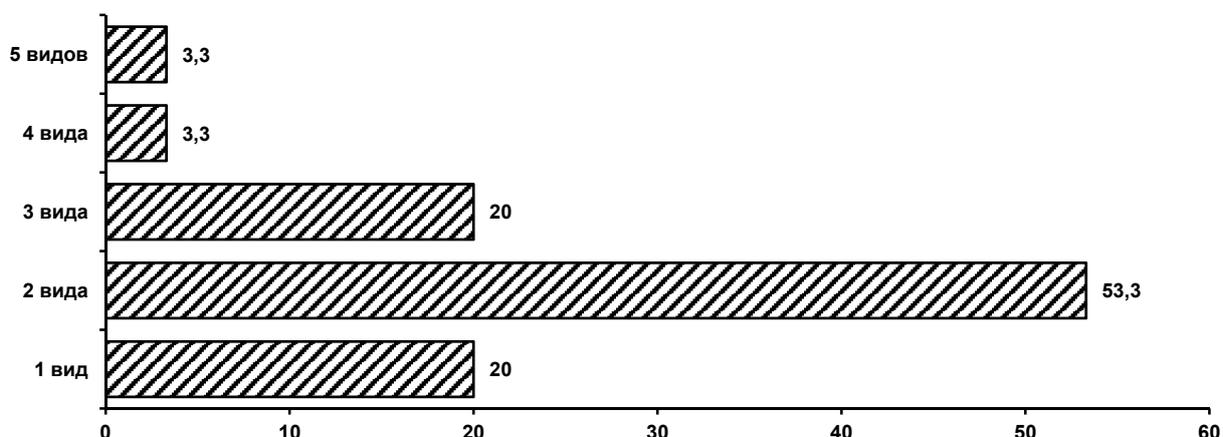


Рис. 6. Вариабельность сочетаемости видов лактобацилл вагинального биотопа.

вившие 83 и 50 % образцов исследуемой выборки (рис. 5).

Структура количественной сочетаемости исследуемых видов лактобацилл, свидетельствовала о том, что наибольшая частота характерна для ассоциаций двух видов (53,3 ± 9,1 %), реже встречались сочетания из четырех и пяти видов по 3,3 ± 3,3 % каждое. Промежуточное положение занимает сочетание трех видов лактобацилл (20 ± 7,3 %) (рис. 6). Индекс видовой насыщенности лактобацилл составил 2,1 ± 0,9.

Таким образом, в работе представлены характеристика видового, ценотипического и комбинационного разнообразия лактобацилл в вагинальном биотопе с использованием методов молекулярно-генетического типирования. Представлена микроэкологическая картина влагалищного биотопа на фоне различной популяционной плотности лактобацилл. Полученная информация является отражением, как межвидовых связей лактобацилл, так и характеристик ассоциативно-симбиотических взаимоотношений между макроорганизмом и представителями его микробиома [8].

ВЫВОДЫ

1. У женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта микроэкологический дисбиоз влагалища ха-

рактеризовался низкой популяционной плотностью лактобацилл.

2. У 40 % пациенток лактобациллы определялись только с помощью ПЦР-диагностики.

3. Была установлена связь микроэкологических характеристик УПМ (индекс видовой насыщенности, коэффициент постоянства) с плотностью вегетирующих лактобацилл.

4. У лиц с наиболее низкой концентрацией лактобацилл изменялись симбиотические взаимоотношения внутри ассоциативного симбиоза: грибы рода *Candida* замещались энтерококками с высоким уровнем патогенности [11].

5. В исследуемой выборке представлены все 5 определяемых видов лактобацилл, в качестве доминирующих видов вагинального биотопа определены *L. plantarum* и *L. jensoni*. Причем, более половины лактобацилл (53,3 ± 9,1 %) персистировали в виде дву-видовых ассоциаций, и только у 3,3 ± 3,3 % женщин встречались сочетания лактобацилл из 4 и 5 видов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Акушерство: Национальное руководство / Э.К. Айламазян [и др.]. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 1200 с.
2. Бондаренко В.М. Молекулярно-генетические и молекулярно-биологические исследования предста-

вителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* // Вестн. РАМН. – 2006. – № 1. – С. 18–23.

3. Гарден А.С. Детская и подростковая гинекология. – М.: Медицина, 2001. – 238 с.

4. Глушанова Н.А. Лактобациллы в исследовании и коррекции резидентной микрофлоры человека: дис. ... канд. мед. наук. – 1999. – 177 с.

5. Захаров Е.А., Азизов И.С. Микроэкологическая характеристика кишечного микробиоценоза часто болеющих детей // Журн. микроб., эпидемиол. и иммунол. – 2012. – № 2. – С. 63–68.

6. Исследование молекулярно-генетических методов для типирования бифидобактерий и анализ видов архитектуры кишечного микробиоценоза у жителей промышленного города / Ю.П. Джиоев [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 68–74.

7. Методики клинических лабораторных исследований / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.

8. Мусаева З.М. Микробиоценоз влагалища и его коррекция // Проблемы женского здоровья. – 2008. – Т. 3, № 3. – С. 43–53.

9. Новые подходы к изучению и оценке микробиоценоза влагалища. Аутофлора человека в норме и в патологии / К.Я. Соколова [и др.]. – Горький: Медицина. – 1988. – С. 5–10.

10. Попкова С.М. и др. Ассоциации вводов и генов патогенности бактерий рода *Enterococcus*, выделен-

ных из различных биотопов у жителей г. Иркутска // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 14–24.

11. Структура видового разнообразия лактобацилл из вагинального биотопа женщин, проживающих в г. Иркутске / П.А. Медведева [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 11–19.

12. Уварова Е.В., Султанова Ф.Ш. Влагалище как микроэкосистема в норме и при воспалительных процессах гениталий различной этиологии // Гинекология: Журн. для практических врачей. – 2002. – № 4. – С. 189–195.

13. Факторы риска и математическое прогнозирование материнской смертности от основных акушерских причин в Приморском крае / С.Н. Лещанкина [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – № 5 (43). – С. 60–66.

14. Brown W.J. Variations in the vaginal bacteria flora: a preliminary report. // Ann. Intern. Med. – 1982. – Vol. 96, N 6. – P. 931–934.

15. Quadri L.E. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – Aug; 82 (1–4). – P. 133–145.

16. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries / R. Byun [et al.] // J. of Clinical Microbiology. – 2007. – N 7. – P. 3128–3136.

Сведения об авторах

Шабанова Наталья Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952)33-34-41; e-mail: smpopkova@gmail.com).

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3 тел. (3952) 33–39–52, e-mail: alanir07@mail.ru)

Ракова Елена Борисовна – научный сотрудник лаборатории микроэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Данусевич Ирина Николаевна – врач-акушер-гинеколог, кандидат медицинских наук, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: (3952) 20-76-32)

Бухарова Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН

Немченко Ульяна Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН