

8. Althaus M., Clauss W.G. Gasotransmitters: novel regulators of ion channels and transporters. *Front Physiol.* 2013, 4: 27. doi:10.3389/fphys.2013.00027.
9. Casey P.G., Casey G.D., Gardiner G.E. et al. Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004, 39: 431-438.
10. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 2008. 72: 728-764.
11. Mikelsaar M., Sepp E., Stsepetova J. et al. Biodiversity of Intestinal Lactic Acid Bacteria in the Healthy Population. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.* 2016, 4: 1-64. doi 10.1007/5584_2016_3.
12. MU 2.3.2.2789-10 Guidelines for the sanitary-epidemiological assessment of the safety and functional potential of probiotic microorganisms used for food production. *Food Raw Materials and Food Products.* 2010, Moscow (in Russia).
13. Shenderov B.A. Probiotics and Functional Foods, 2011. In *Food Engineering, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK. (<http://www.eolss.net>).
14. Sasithorn Sirilun, Chaiyavat Chaiyasut, Duangporn Kantachote, Plearnpis Luxanani. Characterisation of non-human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *African J. Microbiology Research.* 2010, 4 (10): 994-1000.
15. Tinajero-Trejo M., Jesse H.E., Poole R.K. Gasotransmitters, poisons, and antimicrobials: it's a gas, gas, gas! *F1000Prime Report.* 2013, 5: 28. doi:10.12703/P5-28.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Е.С.Ворошила^{1,2}, *Д.Л.Зорников*¹, *Л.Г.Боронина*¹

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА ЛАКТОБАЦИЛЛ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

¹Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург; ²ООО Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург

Цель. Сравнить видовой состав вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с помощью ПЦР в реальном времени в отделяемом репродуктивного тракта до и после культивирования микроорганизмов на кровяно-дрожжевом сывороточном агаре (КДСА). *Материалы и методы.* Методом ПЦР в режиме реального времени исследован видовой состав вагинальных лактобацилл в образцах от 25 условно здоровых женщин репродуктивного возраста. В качестве исследуемого материала использовали образцы отделяемого репродуктивного тракта (соскобы из влагалища и цервикального канала). Видовую идентификацию лактобацилл проводили дважды: в нативном клиническом материале и в образцах, полученных после культивирования вагинальных микроорганизмов на КДСА. *Результаты.* После культивирования влагалищных микроорганизмов на КДСА всего в 2 (8%) случаях отмечали преобладание *L. iners*, тогда как при исследовании нативного материала данный вид в качестве преобладающего выявляли в 10 (40%) образцах. *Заключение.* При культивировании лактобацилл на КДСА наблюдается замедленный рост *L. iners* в сравнении с другими видами вагинальных лактобацилл. Культуральное исследование для определения доминирующего вида лактобацилл оказалось неэффективным в случае доминирования *L. iners* — вида, ассоциированного с повышенным риском развития дисбиоза влагалища.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 17—21

Ключевые слова: микробиоценоз влагалища, вагинальные лактобациллы, вагинальный дисбиоз, нормоценоз, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, ПЦР в реальном времени

RESULTS OF DETERMINING THE SPECIES COMPOSITION OF VAGINAL LACTOBACILLI USING REAL-TIME PCR TESTING AND BACTERIOLOGICAL METHOD

¹Ural State Medical University, Yekaterinburg; ²«Garmonia» Medical Centre, Yekaterinburg, Russia

Aim. To compare the species composition of lactobacilli in women of reproductive age using real time PCR on urogenital samples before and after culturing microorganisms in Blood-Serum-Yeast extract-Agar (BSYA). *Materials and methods.* Using real time PCR, we have examined the species composition of vaginal lactobacilli in 25 healthy women of reproductive age. Samples of urogenital swabs (endocervical and vaginal swabs) were studied. Species identification has been carried out twice: in the native clinical material and in the samples received after using microorganism culture technique in BSYA. *Results.* After culturing vaginal microorganisms in BSYA, *L. iners* predominance was found only in 2 cases (8%). At the same time, when using native clinical material this species predominance was discovered in 10 samples (40%). *Conclusion.* When culturing lactobacilli in BSYA, the growth of *L. iners* is stunted compared to other species of vaginal lactobacilli. The use of cultural testing turned out to be ineffective in case of predominance of *L. iners*, the species associated with an increased risk of vaginal dysbiosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 17—21

Key words: vaginal microbiocenosis, vaginal lactobacilli, vaginal dysbiosis, normocenosis, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, real-time PCR

ВВЕДЕНИЕ

Вклад микробов-комменсалов, особенно бактерий рода *Lactobacillus*, в поддержание колонизационной резистентности влагалища и репродуктивного здоровья в целом на сегодняшний день признается всеми исследователями и практикующими врачами. Неоднократно было показано, что снижение количества лактобацилл или их отсутствие во влагалище повышает вероятность инфицирования возбудителями инфекций, передаваемых половым путем, и увеличивает риск развития осложнений беременности [4, 6, 9, 11 — 13]. В рамках проекта «Human microbiome» было продемонстрировано, что населяющие влагалище микроорганизмы колонизируют новорожденного в случае естественных родов [7], что в последующем во многом определяет формирование микробиоты всех локализаций. Исследования, проведенные по всему миру, убедительно демонстрируют наличие связи между определяемыми во влагалище видами лактобацилл и риском развития дисбиоза [5, 14, 15]. Нами было показано, что в качестве индикатора стабильности вагинального микробиоценоза можно использовать преобладающий во влагалище вид лактобацилл, определяемый с помощью метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [2]. Однако при этом возникает вопрос, насколько возможно использовать эти же критерии при проведении рутинного культурального исследования.

В связи с изложенным, целью настоящей работы явилось сравнение видового состава вагинальных лактобацилл у женщин репродуктивного возраста с помощью ПЦР в реальном времени в отделяемом репродуктивного тракта до и после культивирования микроорганизмов на кровяно-дрожжевом сывороточном агаре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были отобраны 25 условно здоровых женщин репродуктивного возраста, микроскопическая картина вагинального отделяемого у которых соответствовала критериям нормоценоза [3].

С помощью стерильных тампонов отбирали образцы отделяемого репродуктивного тракта (соскобы из влагалища и цервикального канала). Материал одновременно помещали в пробирку со стерильным физиологическим раствором для определения видовой принадлежности *Lactobacillus* spp. методом ПЦР-РВ и в транспортную среду Amies для проведения культурального исследования.

Посев клинического материала для выделения и последующей идентификации культур влагалищных микроорганизмов, в том числе лактобацилл, осуществляли на кровяно-дрожжевой сывороточный агар (КДСА) [1]. После 24-48 часов культивирования отбирали все типичные для лактобацилл колонии и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе. В полученном материале повторно проводили видовую идентификацию вагинальных лактобацилл методом ПЦР-РВ с использованием тест-систем для научного применения компании ДНК-Технология. Наборы позволяли идентифицировать и определить количество 7 видов лактобацилл: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. johnsonii*.

Основным критерием оценки вагинальной лактофлоры являлся преобладающий вид лактобацилл. В качестве преобладающего принимали тот, доля которого была наибольшей среди всех идентифицированных видов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании отделяемого репродуктивного тракта методом ПЦР-РВ выявляли все виды лактобацилл, кроме *L. acidophilus*, однако в качестве преобладающих определяли только четыре: *L. crispatus* в 11 (44%), *L. iners* в 10 (40%), *L. gasseri* в 3 (12%), *L. jensenii* в 1 (4%) из 25 образцов. В дальнейшем для удобства описания выделили 4 основных группы женщин на основании преобладающего вида лактобацилл (в абсолютных цифрах): группа 1 (преобладающий вид *L. crispatus*, n=11), группа 2 (преобладающий вид *L. iners*, n=10), группа 3 (преобладающий вид *L. jensenii*, n=1), группа 4 (преобладающий вид *L. gasseri*, n=3).

Определение видовой принадлежности с помощью ПЦР-РВ культуры лактобацилл, полученной на КДСА, продемонстрировало изменение количественных соотношений между разными видами лактобацилл в одной культуре по сравнению с картиной в нативном материале. Следствием этого стала смена преобладающего вида среди идентифицированных. В 8 (32%) из 25 образцов преобладающий вид лактобацилл в культуре, полученной на КДСА, отличался от такового в нативном материале. Что примечательно, у всех 8 пациенток при исследовании первичного материала в качестве преобладающего вида выявляли *L. iners*. Если преобладал любой другой вид лактобацилл, то именно его выявляли в качестве преобладающего и после культивирования.

В большинстве случаев при культивировании лактобацилл на КДСА отмечали опережающий рост других видов в сравнении с *L. iners*. Это в конечном итоге приводило к тому, что в ПЦР-РВ обнаруживалось больше копий ДНК видов *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, чем *L. iners*. При этом после культивирования абсолютное количество *L. iners* в половине случаев составляло не менее 10^5 ГЭ/мл. Однако это в десятки-сотни раз меньше в сравнении с количеством других видов.

В качестве примеров можно продемонстрировать результаты двух исследований. В пробе 432 количество *L. iners* при исследовании первичного клинического материала составляло $10^{6.7}$ (99% от суммарного количества лактобацилл в образце). После культивирования абсолютное количество *L. iners* осталось прежним — $10^{6.7}$, однако количество *L. jensenii* и *L. crispatus* возросло до $10^{7.6}$ и $10^{7.4}$ (55% и 34% удельного веса) соответственно. В итоге доля *L. iners* после культивирования составила лишь 7% от суммарного количества лактофлоры. В пробе 957 после культивирования совсем не обнаруживали *L. iners*, хотя в нативном материале выявляли данный вид в количестве $10^{7.8}$ (99% от суммарного количества лактобацилл в образце).

Обнаружение и преобладание отдельных видов лактобацилл во влагалище женщин репродуктивного возраста является дополнительным маркером устойчивости микробиоценоза к воздействию различных факторов окружающей среды [1, 14, 15]. Обнаружение *L. crispatus* коррелирует с нормоценозом и низким содержанием микроорганизмов, ассоциированных с дисбиозом влагалища. Тогда как преобладание *L. iners*, особенно при отсутствии *L. crispatus*, является неблагоприятным признаком, свидетельствующим о повышенном риске развития дисбиоза влагалища. Следовательно, исследование видового состава вагинальных лактобацилл и определение преобладающего среди них вида является прогностически значимым. При этом возникает вопрос об информативности отдельных методик исследования видового состава лактофлоры. Традиционно считается, что «золотым стандартом» для идентификации бактерий является культуральное исследование. Однако применительно к вагинальным лактобациллам еще в 1980 году была отмечена невозможность идентификации вида внутри комплекса *Lactobacillus acidophilus* по биохимическим признакам [10]. Вместе с тем, было установлено, что часто выявляемый вид *L. iners* не культивируется на селективных для лактобацилл питательных средах (агар Рогоза, MRS агар) [8]. Для выделения *L. iners* было предложено использовать кровяной агар — КА [8].

В настоящем исследовании было установлено, что *L. iners* хуже других лактобацилл растет на используемой для выделения вагинальных микроорганизмов питательной среде — КДСА. Следовательно, первичное выделение лактофлоры на КДСА и, возможно, на КА во многих случаях может приводить к искажению действительной картины и гиподиагностике *L. iners*, преобладание которого ассоциировано с развитием дисбиоза влагалища.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боронина Л.Г., Саматова Е.В. Патент РФ № 2011128466/10, 08.07.2011. Питательная среда для выделения, культивирования и определения гемолитических свойств бактерий из клинического материала. Патент России № 2481394 С2. 2013. Бюл. №13.
2. Зорников Д.Л., Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С. Взаимосвязь отдельных видов лактобацилл с суммарной долей лактофлоры в вагинальном микробиоценозе и группами условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированными с дисбиозом влагалища. Вестник уральской медицинской академической науки. 2015, 4 (55): 99-105.
3. Кира Е.Ф., Бактериальный вагиноз. Санкт-Петербург, 2001.
4. Atashili J., Poole C., Ndumbe P.M. et al. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. AIDS. 2008 Jul 31;22(12):1493-501.
5. Balashov S.V., Mordechai E., Adelson M.E. et al. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2014 Apr;78(4):321-327.
6. Brotman R.M., Klebanoff M.A., Nansel T.R. et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. J. Infect. Dis. 2010, 202:1907-1915.

7. Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M. et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010 Jun 29;107(26):11971-11975.
8. Falsen E., Pascual C., Sjoden B. et al. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999, 49:217-221.
9. Haggerty C.L., Hillier S.L., Bass D.C. et al. PID Evaluation and Clinical Health study investigators. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin. Infect. Dis.* 2004 Oct 1;39(7):990-995.
10. Lauer E., Helming C., Kandler O. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Møcquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg. Abt.* 1980, 1:150-168.
11. Martin H.L., Richardson B.A., Nyange P.M. et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J. Infect. Dis.* 1999, 180(6):1863-1868.
12. Ness R.B., Kip K.E., Hillier S.L. et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am. J. Epidemiol.* 2005 Sep 15;162(6):585-590.
13. Rathod S.D., Krupp K., Klausner J.D. et al. Bacterial vaginosis and risk for *Trichomonas vaginalis* infection: a longitudinal analysis. *Sex. Transm. Dis.* 2011 Sep;38(9):882-886.
14. Tamrakar R., Yamada T., Furuta I., et al. Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect. Dis.* 2007 Nov 7;7:128.
15. Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G. et al. 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 Microbiol.* 2009 Jun 2;9:116.

© А.В.СГИБНЕВ, Е.А.КРЕМЛЕВА, 2018

А.В.Сгибнев¹, Е.А.Кремлева^{1,2}

МОДИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА МЕТАБОЛИТАМИ ВАГИНАЛЬНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ

¹Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, Оренбург; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Оценка влияния метаболитов вагинальных лактобацилл на ферментативную и бактерицидную активность лизоцима. *Материалы и методы.* Изучали изменение ферментативной и бактерицидной активности лизоцима после его обработки бесклеточными супернатантами лактобацилл, содержащих сурфактанты, пероксид водорода или их комбинацию. Ферментативную активность оценивали по скорости лизиса *Micrococcus luteus*, бактерицидность для тест-штаммов *Escherichia coli* и *Lactobacillus acidophilus* — по результатам посева. *Результаты.* Ферментативную активность лизоцима снижали как сурфактанты, так и H₂O₂. Под влиянием сурфактантов бактерицидная активность лизоцима снижалась и в отношении *L. acidophilus*, и *E. coli*. Под влиянием пероксида водорода и его сочетаний с сурфактантами бактерицидная активность лизоцима в отношении *L. acidophilus* снижалась, а в отношении *E. coli* повышалась. Низкие концентрации сурфактантов потенцировали влияние H₂O₂ на антибактериальную активность лизоцима. *Заключение.* Делается вывод о том, что метаболиты нормальной микрофлоры являются инструментом модификации факторов защиты хозяина с целью создания благоприятных условий собственного существования и препятствия интродукции чужеродных видов.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 21—27

Ключевые слова: лактобациллы, лизоцим, пероксид водорода, сурфактанты, факторы врожденного иммунитета