

4. de Moreno de LeBlanc A., Del Carmen S., Chatel J.M. et al. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2015;146972. doi: 10.1155/2015/146972.
5. Kim D., Yoo S.A., Kim W.U. Gutmicrobiota in autoimmunity: potential for clinical applications. *Arch Pharm Res.* 2016, 39 (11): 1565-1576.
6. Kim D., Zeng M.Y., Núñez G. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *Experimental Molecular Medicine.* 2017, 49(5): e339-. doi:10.1038/emm.2017.24.
7. Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016, 165: 1332-1345.
8. Lee S.H., Kwon J., Cho M.-L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research.* 2018, 16 (1): 26-42.
9. Levy M., Kolodziejczyk A.A., Thaïss C.A., Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, 17 (4): 219-232.
10. Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology.* 2017, 18:2. doi:10.1186/s12865-016-0187-3.
11. Llewellyn A., Foey A. Probiotic Modulation of Innate Cell Pathogen Sensing and Signaling Events. *Nutrients.* 2017, 9 (10): 1156. doi:10.3390/nu9101156.
12. Mowat A.M., Bain C.C. Mucosal Macrophages in Intestinal Homeostasis and Inflammation. *Journal of Innate Immunity.* 2011, 3 (6): 550-564.
13. Nakase H., Okazaki K., Tabata Y. et al. New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002, 301 (1): 59-65.
14. Pagliari D., Gambassi G., Piccirillo C.A. et al. The Intricate Link among Gut Immunological Niche, Microbiota, and Xenobiotics in Intestinal Pathology. *Mediators of Inflammation.* 2017:8390595. doi:10.1155/2017/8390595.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*Ю.С.Шишкова<sup>1</sup>, В.Ф.Долгушина<sup>1</sup>, Е.Д.Графова<sup>1</sup>, С.А.Завьялова<sup>2</sup>, И.В.Курносенко<sup>1</sup>, Н.П.Евстигнеева<sup>3</sup>, К.Г.Громакова<sup>1</sup>, О.Л.Колесников<sup>1</sup>, А.В.Чукичев<sup>1</sup>, И.И.Долгушин<sup>1</sup>*

## **ВЗАИМОСВЯЗЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НЕЙТРОФИЛОВ ЦЕРВИКАЛЬНОГО СЕКРЕТА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ВИДОВЫМ СОСТАВОМ ЛАКТОФЛОРЫ**

<sup>1</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>ГКП № 5, Челябинск;

<sup>3</sup>Уральский НИИ дерматовенерологии и иммунопатологии, Екатеринбург

*Цель.* Определить функциональный статус нейтрофилов цервикального секрета у женщин в I триместре беременности в зависимости от видового состава лактофлоры.

*Материалы и методы.* У обследованных 40 беременных женщин проводили масс-спектрометрическую видовую идентификацию влагалищных лактобацилл, оценивали их способность к образованию биопленок, изучали жизнеспособность, лизосомальную активность, спонтанный и индуцированный НСТ-тест, способность к поглощению частиц латекса нейтрофилами цервикальной слизи. Выделенные штаммы были разделены на 3 группы в зависимости от наличия или отсутствия инфекционного процесса влагалища и/или цервикального канала. *Результаты.* Среди выделенных 40 штаммов лактобацилл было идентифицировано 5 видов: *L.jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L.gasseri*, *L. delbrueckii*. В условиях нормоценоза показана различная интенсивность фагоцитоза частиц латекса нейтрофилами цервикального секрета в зависимости от доминирующего вида: при доминировании *L. crispatus* отмечена наименьшая интенсивность фагоцитоза, по сравнению с *L. acidophilus* и *L.jensenii*. При наличии генитальной инфекции лактобациллы способны интенсивно секретировать биоматрикс, блокируя свой антигенный потенциал, что сопровождается отсутствием НСТ-редуцирующей способности нейтрофильных гранулоцитов и снижением антимикробной защиты слизистой оболочки

генитального тракта беременной женщины. *Заключение.* Показатели функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета зависят от доминирующего вида лактобацилл влагалища у беременных женщин в I триместре.

Журн. микробиол., 2018, № 4, С. 51—56

Ключевые слова: лактобациллы, функциональный статус нейтрофилов, биопленкообразование, I триместр беременности

*Yu.S.Shishkova<sup>1</sup>, V.F.Dolgushina<sup>1</sup>, E.D.Grafova<sup>1</sup>, S.A.Zavyalova<sup>2</sup>, I.V.Kurnosenko<sup>1</sup>, N.P.Evstigneeva<sup>3</sup>, K.G.Gromakova<sup>1</sup>, O.L.Kolesnikov<sup>1</sup>, A.V.Chukichev<sup>1</sup>, I.I.Dolgushin<sup>1</sup>*

## **CERVICAL MUCUS NEUTROPHILS FUNCTIONAL STATUS INTERACTION WITH THE SPECIES COMPOSITION OF VAGINAL LACTOBACILLI IN PREGNANT WOMEN**

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, <sup>2</sup>State Clinical Outpatient Clinic No. 5, Chelyabinsk; <sup>3</sup>Ural Research Institute of Dermatology, Venerology and Immunopathology, Ekaterinburg, Russia

*Aim.* Of the study is to assess cervical mucus neutrophils functional status depend on dominant lactobacillus strain in I trimester of pregnancy women. *Material and methods.* We defined 40 lactobacillus strains obtained from the genital tract of the pregnant women. We used mass spectrometry analysis to identify vaginal lactobacilli and evaluated biofilm formation. Also, we studied cervical mucus neutrophils viability, lysosomal activity, spontaneous and induced NBT test (Nitroblue Tetrazolium test), ability to absorb the latex particles. Isolated strains were divided into 3 groups depending on presence or absence of vaginal or cervical channel infectious diseases. *Results.* We identified 5 lactobacilli types: *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* among 40 defined strains. We determined different intensity of phagocytosis depending on dominant strain in normocenosis. With the *L. crispatus* prevalence demonstrated the least intensity of phagocytosis compared with *L. acidophilus* and *L.jensenii*. Lactobacilli able to intensively produce biomatrix in condition of genital infection. Thus blocking antigenic potential and result in absence of NBT-reducing power of neutrophilic granulocytes and reduction antimicrobial protection of pregnant women genital tract mucosa. *Conclusion.* The indicators of neutrophils functional status depend on dominant lactobacilli strain in I trimester of pregnancy women

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 4, P. 51—56

Key words: lactobacilli, neutrophils functional status, biofilm formation, I trimester of pregnancy

## **ВВЕДЕНИЕ**

Среди видового многообразия влагалищных микроорганизмов лидирующее место в вагинальном биоценозе занимают лактобациллы, поддерживающие нормальное его функционирование. Лактобациллы обеспечивают колонизационную резистентность влагалища, предотвращая развитие генитальной инфекции, что особенно важно во время беременности для благоприятных перинатальных исходов. В литературе имеются данные о видовом составе лактофлоры у женщин репродуктивного возраста во время и вне беременности. Известно более 10 видов лактобацилл, колонизирующих репродуктивный тракт женщин, однако ведущими являются *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* [2, 6, 8]. В литературных источниках имеются данные о том, что от вида лактобацилл зависит ста-

бильность влагалищного биотопа. Так, доминирование *L. crispatus* на ранних сроках беременности обеспечивает стабильность вагинальной нормофлоры на протяжении гестации, а присутствие вида *L. iners* на ранних сроках беременности является фактором риска преждевременных родов [5, 8]. Одним из факторов, обеспечивающих колонизационную резистентность вагинального эпителия, является способность к формированию лактобациллами биопленок, которая зависит от их видовой принадлежности [4, 7]. Кроме того, в цервикальной слизи и на поверхности вагинального эпителия функционирует значительное количество нейтрофилов, которые участвуют в формировании микробиоценозов слизистых оболочек [3].

При этом остается неясным взаимодействие нейтрофилов и лактобацилл разных видов на поверхности слизистых оболочек репродуктивной системы беременных женщин.

Целью настоящего исследования явилось определение функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета у женщин в I триместре беременности в зависимости от видового состава лактофлоры.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели были обследованы 40 женщин, вставших на учет по беременности на сроке до 12 недель в ГКП № 5 Челябинска. Все пациентки подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Всем беременным женщинам проводилось клиническое обследование, гинекологическое обследование, микробиологическое и иммунологические исследования. Взятие отделяемого влагалища для микробиологического исследования осуществляли стерильным тампоном в пробирку с транспортной средой Amies (Италия). Цервикальную слизь в количестве 30 — 50 мкл вносили в пробирки типа Эппендорф, содержащие 1,0 мл раствора Хенкса. Первичный материал доставляли в лабораторию в течение 2 часов. Для получения культур лактобацилл первичный посев вагинального содержимого проводился полуколичественным методом «тампон-петля» на 5% кровяной агар, посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях в течение 48 часов, определяли степень обсеменения пробы, результат выражали в десятичном логарифме. Идентификацию лактобацилл осуществляли с помощью масс-спектрометрического метода на базе УрНИИДВиИ (Екатеринбург) с последующей интерпретацией результатов с использованием базы данных VITEK MS. Матрикссинтезирующую способность выделенных лактобацилл определяли в лунках стерильного пластикового планшета для иммуноферментного анализа: в среде MRS суспензировали суточные культуры в концентрации микроорганизмов  $10^5$  КОЕ/мл и вносили в лунки планшета по 100 мкл, инкубировали 48 часов при  $37^\circ\text{C}$  в микроаэрофильных условиях, затем содержимое лунок удаляли, после вносили по 120 мкл 1% спиртового раствора фуксина в каждую лунку, инкубировали в течении 20 минут при комнатной температуре. Для экстракции красителя из биопленки использовали 96% этиловый спирт. Учет проводили на микропланшетном фотометре Anthos 2020. Значения оптической плотности отражали количественную оценку степени выраженности образования биопленки. При изучении функционального статуса нейтрофилов цервикального секрета оценивали их жизнеспособность, лизосомальную активность, спонтанный и индуцированный НСТ-тест, способность к поглощению частиц латекса [1]. Статистическая обработка про-

водилась с помощью статистического пакета SPSS 12.1. Полученные данные выражены в виде медианы и квартилей. Для оценки различий между группами применяли U-критерий Манна-Уитни, учитывая значения  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании масс-спектрометрического анализа у обследованных беременных женщин были обнаружены 5 видов лактобацилл — *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*. Все выделенные штаммы лактобацилл были разделены на 3 группы в зависимости от наличия или отсутствия инфекционного процесса в генитальном тракте беременных женщин. В 1 группу вошли 13 штаммов лактобацилл, выделенных от женщин с признаками бактериального вагиноза или дисбиоза влагалища. 2 группу составили 15 штаммов, полученных от пациенток с воспалительной патологией нижнего отдела генитального тракта (кольпит и/или цервицит). 12 штаммов лактобацилл, выделенных от беременных женщин с отсутствием клинико-лабораторных признаков генитальной инфекции (нормоценоз влагалища), составили 3 группу.

В результате проведенных исследований были отмечены особенности видового состава лактофлоры у женщин в 1 триместре беременности при нормоценозе и развитии инфекционного процесса нижнего отдела генитального тракта. Так, доминирующим видом при нормоценозе являлся вид *L. jensenii* (выделен в 41,6% случаев). В 33,3% случаев выделяли *L. crispatus* и в 25% — *L. acidophilus*. Во 2 группе при дисбиотических процессах влагалища в одинаковом проценте случаев (38,5%) определяли *L. jensenii* и сочетание *L. acidophilus* + *L. gasseri*, реже выделяли *L. crispatus* (23%). В 3 группе при воспалительных процессах слизистых оболочек влагалища и/или цервикального канала определяли большее видовое разнообразие лактобацилл: в 40% случаев наблюдали сочетание *L. acidophilus* + *L. gasseri*, в 26,6% случаев определяли *L. jensenii*, в 20% — *L. acidophilus*, в единичных случаях — *L. gasseri* (6,7%) и *L. delbrueckii* (6,7%).

У всех выделенных штаммов лактобацилл определяли матриксинтезирующую способность *in vitro*. При этом более выраженное биопленкообразование отмечено у штаммов, полученных от беременных женщин с генитальной инфекцией. Показатель оптической плотности экстрагированного красителя из биопленки лактобацилл группы пациенток с нормоценозом влагалища (3 группа) составил 0,164 (0,160...0,170); при инфекционном процессе нижних отделов генитального тракта этот показатель достоверно увеличивался: в образцах 1 исследуемой группы оптическая плотность составила 0,174 (0,171...0,180),  $p_{1-3} = 0,004$ , а во 2 группе — 0,191 (0,170...0,210),  $p_{2-3} = 0,006$ .

Оценку функционирования нейтрофилов цервикального секрета проводили в зависимости от преобладающего вида лактобацилл во влагалище беременных женщин. С этой целью сравнили показатели жизнеспособности и функционального статуса нейтрофилов в условиях нормоценоза (3 группа) и при наличии генитальной инфекции (дисбиотических процессов или воспалительных реакций — 1+2 группа). В условиях нормоценоза нами была зарегистрирована различная поглотительная способность фагоцитов в зависимости от преобладающего вида лактофлоры. Нейтрофилы цервикального секрета слабо фагоцитировали частицы латекса при наличии во влагалище *L. crispatus*, при колонизации вагинального эпителия *L. jensenii* и *L. acidophilus* данный показатель был значительно выше. Показатели НСТ-редуцирующей

**Показатели функционального статуса нейтрофилов в зависимости от видового состава лактофлоры, Ме [25; 75]**

Статус нейтрофилов	L. acidophilus		L. crispatus		L.jensenii	
	3 группа (Нормоценоз)	1+2 группа (Инфекционный процесс)	3 группа (Нормоценоз)	1+2 группа (Инфекционный процесс)	3 группа (Нормоценоз)	1+2 группа (Инфекционный процесс)
	1	2	3	4	5	6
Лизосомальная активность	21 (5...68,5)	51 (16,5...72)	55 (6,5...55)	133 (0...133)	11,5 (7,5...36,5)	35 (22...72)
Лейкоциты, % живых клеток	29 (18,2...47,6)	22,5 (20...25)	56,25 (28...80)	70,6 (0...70,6)	21,7 (18,6...57,5)	32,6 (20...57,3)
НСТ-спонтанная активность, %	19 (4,25...51,75)	9 (7,5...24,75)	13,5 (1,5...48,75)	14 (6...14)	25 (18,2...52,7)	1 (0...9)
					p5-6=0.042	
НСТ-спонтанная активность (индекс), усл.ед.	0,12 (0,05...0,38)	0,12 (0,06...0,31)	0,15 (0,015...0,57)	0,22 (0,06...0,22)	0,41 (0,19...0,75)	0 (0...0,12)
					p5-6=0.042	
НСТ-индуцированная активность, %	5 (1,35...7,75)	10 (7,75...28)	2,4 (0,2...7,7)	12 (9...12)	10,5 (3,5...55,7)	0 (0...10)
НСТ-индуцированная активность (индекс), усл.ед	0,08 (0,43...0,48)	0,15 (0,09...0,34)	0,03 (0,01...0,08)	0,15 (0,12...0,15)	0,15 (0,04...0,845)	0 (0...0,65)
Активность фагоцитоза, %	20,5 (10,75...34)	15,5 (4...27)	8 (5,5...29,2)	18 (12...18)	26,5 (14...54)	20 (14...48)
Интенсивность фагоцитоза, усл.ед.	0,38 (0,13...1,95)	0,1 (0,05...0,11)	0,075 (0,06...0,09)	0,19 (0,16...0,19)	0,65 (0,26...1,3)	0,16 (0,11...1,14)
	p1-3=0.029				p3-5=0.029	

способности нейтрофилов при нормоценозе вагинального эпителия в присутствии *L. jensenii* в нижнем отделе генитального тракта были сопоставимы с аналогичными показателями при обнаружении *L. crispatus* и *L. acidophilus*. При инфекционном процессе в генитальном тракте, в присутствии *L. jensenii* во влагалище беременных женщин, кислород-зависимая микробицидность нейтрофилов значительно снижалась (табл.).

Таким образом, нами отмечено изменение лидирующих позиций и повышение матрикссинтезирующей способности резидентной флоры вагинального эпителия у женщин в 1 триместре беременности при генитальной инфекции на *L. acidophilus* и *L. gasseri*, тогда как при нормоценозе доминируют *L. jensenii* и *L. crispatus*. Определены особенности функционирования нейтрофильных гранулоцитов цервикального секрета у беременных женщин в зависимости от видовой принадлежности вагинальных лактобацилл. Нейтрофилы цервикального секрета слабо фагоцитируют частицы латекса при наличии во влагалище *L. crispatus*, при колонизации вагинального эпителия *L. jensenii* и *L. acidophilus* данный показатель был значительно выше. В условиях нормоценоза и при доминировании *L. jensenii* во влагалище нейтрофилы активно функционируют, проявляя фагоцитарную и микробицидную способность. При наличии генитальной инфекции лактобациллы способны интенсивно секретировать биоматрикс, блокируя свой антигенный потенциал, что сопровождается отсутствием НСТ-редуцирующей способности нейтрофильных гранулоцитов и снижением антимикробной защиты слизистой оболочки генитального тракта беременной женщины.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Долгушин И.И., Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф., Савочкина А.Ю., Абрамовских О.С., Шишкова Ю.С., Гизингер О.А., Колбина Е.В., Мезенцева Е.А., Прокопьева О.Б., Маркова В.А. Методы изучения факторов врожденного иммунитета репродуктивной системы женщин. Учебно-методическое пособие для аспирантов. Челябинск: Изд-во ЮУГМУ, 2015.
2. Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В., Анкирская А.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Муллабаева С.М., Завьялова М.Г. Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных. Клиническая микробиология, анти-микробная химиотерапия. 2013, 15 (1): 72-79.
3. Шишкова Ю.С. Роль нейтрофилов в формировании колонизационной резистентности слизистых оболочек. Диссертация доктора мед. наук. Челябинск, 2010.
4. Leccesse Terraf M.C. et al. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. J. Applied Microbiology. 2012, 113: 1517-1529.
5. Petricevic L., Domig K.J., Nierscher F.J. et al. Characterisation of the vaginal Lactobacillus microbiota associated with preterm delivery. Sci. Rep. 2014, 4: 5136.
6. Romero R., Hassan S.S., Gajer P. et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. Microbiome. 2014, 2: 4.
7. Ventolini G. Update on Vaginal Lactobacilli and Biofilm Formation. J. Bacteriology Mycology. 2014, 1 (1): 2.
8. 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 Microbiology. 2009, 9: 116.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*В.А.Гриценко<sup>1</sup>, А.Р.Мавзютов<sup>2</sup>, Т.М.Пашкова<sup>1</sup>, О.Л.Карташова<sup>1</sup>, Я.В.Тяпаева<sup>3</sup>,  
Ю.П.Белозерцева<sup>3</sup>*

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ И БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

<sup>1</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза, <sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа; <sup>3</sup>Оренбургский государственный медицинский университет

*Цель.* Сравнительная генетическая оценка патогенного потенциала штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. *Материалы и методы.* Методом ПЦР исследовано наличие генов патогенности (*ssp*, *sra*, *clfA* и *clfB*) у 163 штаммов *S. aureus*, выделенных со слизистой оболочки носовой полости бактерионосителей, из отделяемого влагалища женщин с миомой матки, содержимого пустул новорожденных с перинатальной пиодермией, трансудата венозно-трофических язв нижних конечностей и гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы. *Результаты.* Показано, что частота встречаемости генов *ssp*, *sra*, *clfA* и *clfB* у клинических штаммов *S. aureus* зависела от источника их выделения. У всех культур *S. aureus* (кроме вагинальных изолятов) наиболее часто обнаруживался ген *ssp* (в 66,7 — 94,6% случаев), который встречался изолированно или в разных комбинациях с другими генами (*sra*, *clfA*, *clfB*). Установлено, что по наличию генов *ssp*, *sra*, *clfA* и *clfB* генетические профили штаммов *S. aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией (перинатальная пиодермия, гнойные раны при синдроме диабетической стопы) проявляют выраженное сходство. *Заключение.* Обсуждается возможная роль бессимптомного носительства