

ЛАКТОБАЦИЛЛЫ (LACTOBACILLUS) В МИКРОФЛОРЕ ВЛАГАЛИЩ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН, В ПЕРВОМ ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Г. Кисс,^а Б. Коглер,^б Л. Петрицевиц,^а И. Сауэрзапф,^б С. Клайраунг,^а К. Домиг,^б Г. Вирнштайн,^а В. Кнайфель^б

^а Отделение акушерства и гинекологии, Венский медицинский университет и медицинская школа, Вена, Австрия ^б Отделение пищевой микробиологии и гигиены, кафедра пищевых наук и технологий, Университет природных ресурсов и прикладных биологических наук, Вена, Австрия ^а Кафедра фармацевтической технологии и биофармацевтики, Венский университет, Вена, Австрия.

Адрес для корреспонденции: Dr. H Kiss, Medical University of Vienna, Department of Obstetrics and Gynaecology, AKH-Wien, Wahringer Guertel 18-20, A-1090 Vienna, Austria.

E-mail: Herbert.kiss@meduniwien.ac.at

Утверждено 19 марта 2007 г. Опубликовано OnlineEarly 18 сентября 2007 г.

Цель. Исследование было проведено с целью охарактеризовать доминантные виды лактобацилл, которые колонизируют влагалище здоровых беременных женщин.

Тип. Описательное проспективное групповое исследование.

Место проведения. Отделение акушерства и гинекологии, Венский медицинский университет и медицинская школа, Вена, Австрия.

Испытуемые. В исследовании приняли участие 200 женщин, находящихся в конце первого триместра беременности без клинических признаков бактериального вагиноза. Нормальные показатели флоры влагалища были выявлены у 126 из 200 испытуемых женщин (основываясь на методе окрашивания по Граму).

Методы. Пробы культур бактерий, взятых у 126 женщин, были подвержены дальнейшей обработке для выявления видов лактобацилл. В общей сумме у 84 женщин 168 колоний были выявлены микроорганизмы рода лактобацилл (*Lactobacillus*). Основываясь на комбинированных результатах микробиологических методов и множественного видоспецифического ПЦР-анализа для определения родовой принадлежности, лактобациллы были выделены из влагалища 72 женщин.

Основные исходные показатели. Идентификация видов лактобацилл флоры влагалища у здоровых беременных женщин.

Результаты. Наиболее часто встречающимися видами оказались *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus gasseri*, за которыми следуют *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus rhamnosus*.

Выводы. Полученные результаты послужили основанием для создания уникального комплекса лактобактерий, содержащего *L.crispatus*, *L.gasseri*, *L.jensenii*, *L.rhamnosus* в количестве 100×10^9 КОЕ/г каждой, предназначенного для лечения и профилактики бактериального вагиноза. На фармацевтическом рынке Европы этот комплекс имеет название Астарте (www.astarte-probiotics.com), в Украине – Флориум (www.anantamedicare.com).

Ключевые слова. Идентификация, *Lactobacillus*, беременность, влагалище.

Ссылка на данную работу: Kiss H., Kogler B., Petricevic L., Sauerzapf I., Klayraung S., Domig K., Viernstein H., Kneifel W. Vaginal *Lactobacillus* microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy. *BJOG* 2007;114:1402-1407.

ВВЕДЕНИЕ

Во влагалище здоровой женщины в большом количестве присутствуют разнообразные виды лактобацилл, которые играют важную роль в защите от генитальных инфекций. В период беременности особо важен естественный и здоровый баланс флоры во влагалище, так как вагинальная инфекция может привести к преждевременным родам. Недостаток лактобацилл может нарушить баланс микрофлоры во влагалище, что в свою очередь часто приводит к появлению синдрома бактериального вагиноза,^{2,3} который связан с количественными и качественными изменениями флоры влагалища: уменьшением количества лактобацилл и резким увеличением количества анаэробных бактерий.⁴ По словам Ньюджента и др. бактериальный вагиноз характеризуется абсолютным снижением количества лактобацилл и одновременным увеличени-

ем количества грамвариабельных и грамтрицательных палочек, в первую очередь, таких как *Gardnerella vaginalis*, а также *Bacteroides*, *Prevotella* и *Mobiluncus*.^{2,3} Однако, уменьшение количества лактобацилл во влагалище также подвергает инфицированию небеременных женщин, что может привести к эндометриту или даже воспалению органов малого таза.^{6,7}

Отмечено, что разные виды лактобацилл в разных количествах присутствуют во влагалище. Они отличаются скоростью роста и вырабатывают либо молочную кислоту, либо пероксид водорода.⁸ На данный момент выявлены следующие виды лактобактерий: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus vaginalis* и *Lactobacillus*

salivarius. В недавно проведенном и опубликованном исследовании по изучению лактобактериальной флоры влагалища Васкес и др. обнаружили, что во флоре влагалища у большинства испытуемых доминировали лактобациллы одного типа с наличием также других видов, что указывает на широкую индивидуальную вариабельность. Наиболее часто встречающимися видами оказались: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* и *L. jensenii*. В другом исследовании, проведенном ученым Рейдом и др., наиболее часто выделяемыми видами лактобацилл были *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. casei* и *L. gasseri*. Весьма очевидно, что существует значительная географическая изменчивость в составе нормальной лактобактериальной флоры влагалища.

Данное исследование было проведено с целью охарактеризовать доминантные виды лактобацилл, которые колонизируют влагалище здоровой беременной женщины, для того, чтобы изучить некоторые из их фенотипических и генотипических свойств, а также получить лучшее представление о потенциальной роли этих видов, которая может быть ассоциирована со статусом «неинфицированности».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение настоящего исследования было одобрено комитетом по этике Венского медицинского университета. В исследовании приняли участие женщины со сроком беременности от 11 до 14 недель, которые планировали рожать в отделении акушерства и гинекологии Венского медицинского университета. Условием для допущения к участию в исследовании было отсутствие субъективных жалоб, вагинального кровотечения, клинических признаков вагинальной инфекции, а также при условии диагностированной нормальной флоры влагалища. Все подготовленные материалы подвергались окрашиванию по Граму и оценивались по системе Ньюджента.

Образцы бактериологического посева, взятых у

женщин, влагалищная флора которых была классифицирована как нормальная (число баллов по Ньюдженту 0-3) и в которых не было выявлено колонизации *Candida* (споры и гифы), были помещены в транспортную среду и переданы в Венский университет природных ресурсов и прикладных биологических наук для дальнейшей обработки и видовой идентификации лактобацилл, используя фенотипические и генотипические методы. Обзор аналитических методов представлен на рисунке 1.

Все колонии, полученные на агаровых пластинах, были обследованы микроскопически и после этого обеззаражены, за исключением бактериальных изолятов, собранных с МРШ агара.

Для проведения ДНК исследований каждый изолят лактобациллы был предварительно выращен в питательной среде МРШ, при условии инкубирования в анаэробных условиях в течении 24 часов при 37°C; 1,5 мл данной бактериальной культуры центрифугировали (5415 R; Eppendorf, Гамбург, Германия) в течение 7 минут при 4°C (5900 g). Осадок был перерастворен в 900 мкл стерильном растворе хлористого натрия (0,9%), перемешан и снова подвержен центрифугированию. После этого удалили надосадочную жидкость и повторили стадию отмывания.

Колонии, которые были определены при помощи ПЦР как относящиеся к роду лактобацилл, и все типы штаммов были оценены с применением метода множественной ПЦР, как описано в работе Сонг и др. (Song et al)12,13.

RAPD анализ (произвольно амплифицированная полиморфная ДНК) проводился с преобладающими видами лактобацилл, обнаруженных в ходе исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период с января по апрель 2005 г. в данном исследовании приняли участие 200 беременных женщин. Возраст испытуемых был в пределе от 18 до 35 лет. В общей сумме у 126 женщин была диагностиро-

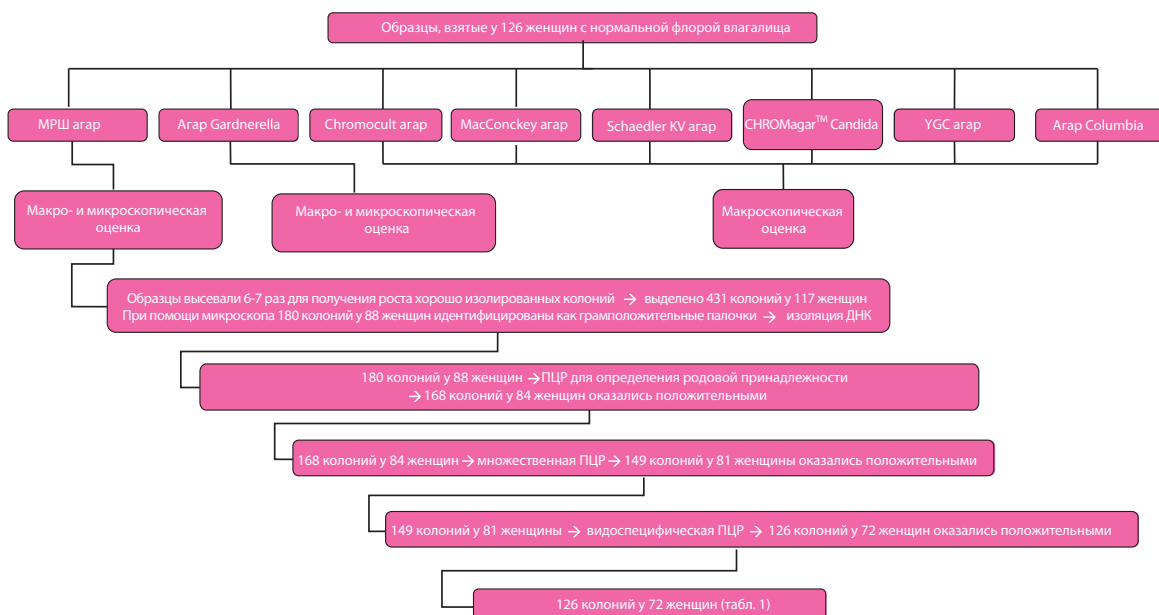


Рис. 1 Схема выделения культур из отобранного материала.

вана нормальная флора влагалища (по методу Nugent et al.⁵), также отсутствие колоний грибка *Candida*.

Из 72 женщин, у которых методом видоспецифической ПЦР были выявлены лактобациллы, у 19 (26,4%) женщин флора влагалища была колонизирована только *L. gasseri* и у 17 (23,6%) – только *L. crispatus*. У трех женщин (4,2%) вместе сосуществовали эти оба вида лактобацилл. В общем, во влагалище 10 из 72 женщин в одно и то же время были обнаружены минимум 2 разных вида *Lactobacillus*. Детальные результаты представлены в табл. 1.

В 126 колониях *Lactobacillus*, выделенных у 72 женщин, обнаружены 8 разных видов лактобацилл, которые, в свою очередь, доминировали в микрофлоре влагалища. Из них наиболее часто встречаемыми были *L. crispatus* и *L. gasseri*, обнаруженные в 20% и 18% из 126 колоний *Lactobacillus*. *L. acidophilus*, *L. plantarum* и *L. salivarius* не были выделены ни из одной колонии. Подробные результаты подытожены в табл. 2. Примеры результатов приведены на рис. 3.

Хотя в рамки проведения исследования не вошла полная регистрация всех видов бактерий, обнаруженных во влагалищных мазках, кроме молочнокислых, были также выделены другие виды бактерий, используя селективные методы, методы микроскопической и макроскопической идентификации, а также окрашивание по Граму. Результаты исследования образцов вагинальной флоры, выделенных у 126 беременных женщин, подытожены в табл. 2. Во влагалищной флоре преобладали лактобациллы. Во влагалище 40 из 126 женщин (31%) доминантными колониями бактерий являлись не лактобациллы, и у 23 из 126 женщин (18%) были обнаружены как лактобациллы, так и грам-отрицательные палочки. На фоне доминирующих лактобактерий, другие микроорганизмы, такие как кишечные палочки, *Gardnerella* и дрожжевые грибы, были представлены более низкой плотностью популяции. Было даже менее вероятно выделить *Escherichia coli* у женщин, у которых были найдены *L. crispatus* или *L. gasseri*.

Доминантные виды *Lactobacillus*, выделенные при проведении видоспецифической ПЦР, (а именно: *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*) использовались для получения генетических «отпечатков пальцев». Образцы, взятые из влагалищ женщин, колонизированных более чем одной колонией одного и того же вида *Lactobacillus*, затем были исследованы методом RAPD-ПЦР. В случае с *L. crispatus*, были исследованы 20 образцов, взятых у 9 женщин. (рис. 4).

Табл. 1 Распределение видов бактерий рода *Lactobacillus* среди 72 женщин, у которых они были обнаружены путем проведения видоспецифической ПЦР.

Виды лактобактерий или комбинации видов	Женщины, во влагалище которых были обнаружены лактобациллы, n (%)
<i>L. gasseri</i>	19 (26.4)
<i>L. crispatus</i>	17 (23.6)
<i>L. jensenii</i>	14 (19.4)
<i>L. rhamnosus</i>	7 (9.7)
<i>L. crispatus</i> and <i>L. gasseri</i>	3 (4.2)
<i>L. crispatus</i> and <i>L. rhamnosus</i>	2 (2.7)
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. jensenii</i>	1 (1.4)
<i>L. rhamnosus</i> и <i>L. gasseri</i>	1 (1.4)
Другие лактобациллы или комбинации лактобацилл	8 (11.2)
<i>L. crispatus</i> и <i>L. fermentum</i>	1 (1.4)
<i>L. crispatus</i> и <i>L. reuteri</i>	1 (1.4)
<i>L. crispatus</i> и <i>L. casei</i>	1 (1.4)

ЖЕНЩИНЫ/ИЗОЛЯТЫ

В случае с *L. gasseri* были изучены 23 колонии, выделенные у 9 женщин. Генетические «отпечатки пальцев», полученные при проведении RAPD-ПЦР, используя образцы, взятые у одной женщины, немного отличались друг от друга, но проявляли тесную взаимосвязь. Из 19 образцов было обнаружено максимум 3 RAPD типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее считалось, что в микрофлоре влагалища здоровой женщины детородного возраста преобладают бактерии *L. acidophilus* и *L. fermentum*, после ко-

М 1a 1b 2a 2b 2c 3a 3b 3c 3d 4a 4b 5a 5b 6a 6b 7a 7b 8a 8b 9a 9b

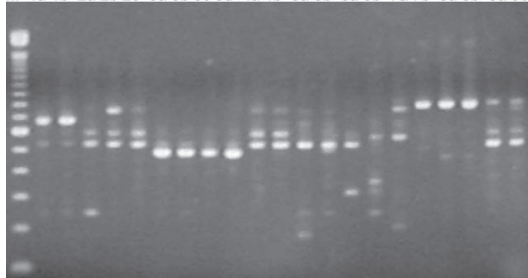


Рис. 4 Агарозный гель с RAPD продуктами, полученными из образцов, взятых у женщин, влагалище которых было колонизировано более чем одной колонией *L. crispatus*. Столбец М, молекулярный маркер (в п. н.); столбцы 1-9 отображают группы штаммов *L. crispatus*, которые имеют некоторое различие, но проявляют тесную взаимосвязь. Идентифицированы разные RAPD типы.

ВИДЫ ЛАКТОБАКТЕРИЙ ИЛИ КОМБИНАЦИИ ВИДОВ

Candida albicans была выявлена у 12 женщин. Выявленная взаимосвязь между наличием или отсутствием лактобацилл и ростом *C. albicans* не была установлена.

Табл. 2 Обзор вагинальных изолятов, извлеченных из образцов бактериальных культур

	Женщины (n=126), влагалище которых колонизировано лактобациллами, ^a n (%)
<i>Lactobacillus</i> species	72 (57.1)
<i>L. crispatus</i>	25 (19.8)
<i>L. gasseri</i>	23 (18.2)
<i>L. jensenii</i>	15 (11.9)
<i>L. rhamnosus</i>	10 (7.9)
<i>L. reuteri</i>	4 (3.2)
<i>L. fermentum</i>	2 (1.6)
<i>L. casei</i>	1 (0.8)
<i>L. paracasei</i>	1 (0.8)
Женщины (n = 126), у которых обнаружены другие вагинальные микробы, ^a n (%)	
Coliforms	23 (18.2)
<i>E. coli</i>	22 (17.4)
<i>Gardnerella</i> species	13 (10.3)
Дрожжевой грибок (без дальнейших уточнений)	40 (31.7)
<i>Candida albicans</i>	12 (9.5)
<i>Candida krusei</i>	22 (17.4)

^a У некоторых женщин во влагалище колонизировались одновременно более одного вида бактерий.

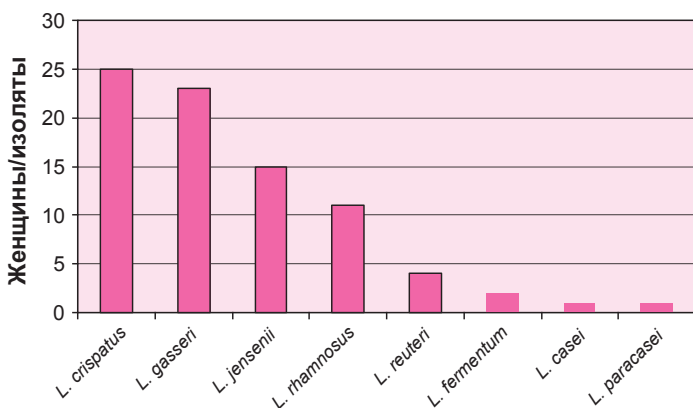


Рис. 3 Частота выявления лактобактерий.

торых по частоте встречаемости следуют *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei* со всеми подгруппами,¹⁰ а также другие виды лактобактерий. Позже молекулярные методы показали, что наиболее распространенными изолятами являются *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. iners*.^{10,19} По результатам нашего исследования *L. crispatus* и *L. gasseri* оказались наиболее часто встречаемыми видами лактобактерий во влагалище беременных женщин, за ними следуют *L. jensenii* и *L. rhamnosus* (рис. 3). Если говорить более конкретно, во флоре влагалища всех 72 участниц, у которых лактобактерии подвергались культивированию, доминировал либо один вид, либо комбинация двух видов лактобактерий. В отличие от опубликованных ранее результатов,¹⁰ бактерия *L. acidophilus* была слабо представлена в нашем исследовании. Однако эти результаты соответствуют результатам работ Васкеса (Vasquez et al.⁹) и Антонио (Antonio et al.²⁰), в которых было установлено, что *L. jensenii*, *L. crispatus* и *L. gasseri* являются доминирующими видами *Lactobacillus* во влагалище.

Есть несколько возможных причин, объясняющих противоречивость уже имеющихся данных по влагалищной флоре *Lactobacillus*, описанных в разных исследованиях. Такие факторы, как состояние здоровья носителя, беременность, возраст или географические условия могут влиять на микрофлору влагалища. Результаты, полученные посредством проведения видоспецифической ПЦР, соответствуют результатам работы Васкеса (Vasquez et al.⁹), указывая тем самым на то, что *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii* можно считать преобладающими видами лактобактерий во влагалище. Наши данные полностью соответствуют предшествующим данным исследований Васкеса (Vasquez et al.⁹), который применял RAPD анализ и множественную ПЦР для идентификации вагинальной флоры *Lactobacillus*. В своей работе Антонио (Antonio et al.²⁰) также идентифицировал эти виды на основе полнохромосомных ДНК-зондов. Таким образом, применение генотипических методов является удобным способом для классификации и дифференциации видов вагинальных лактобактерий.

Лактобактерии были обнаружены у 84 (67%) из 126 женщин, чьи образцы вагинальной флоры были взяты для характеристики (рис. 1).

Так как наша выборка пациентов состояла из здоровых женщин, находящихся в начале первого триместра беременности, вероятно, что выявленное нами распределение лактобактерий соответ-

ствует таковому у небеременных женщин в целом. В клинической практике полученные нами данные могут иметь большое значение, как для заместительной терапии, так и для диагностики бактериального вагиноза.

Отличительной чертой бактериального вагиноза является уменьшение числа или отсутствие лактобактерий во влагалищной микрофлоре, а также чрезмерный рост анаэробных и факультативно-анаэробных организмов. Анти-

биотикотерапия, хотя и уменьшает концентрацию патогенных бактерий, которые являются причиной появления симптомов бактериального вагиноза, но также под ее воздействие попадают полезные лактобактерии, что со временем приводит к угнетению уже истощенной на тот момент флоры *Lactobacillus*. Полученные нами данные указывают на то, что замещение либо *L. crispatus* и *L. gasseri*, либо *L. jensenii* и *L. rhamnosus* может быть более эффективным в вопросе восстановления нормальной влагалищной флоры *Lactobacillus* и избежании рецидива инфекции, ставя под сомнение значение вагинальных терапевтических средств, содержащих другие виды лактобактерий. Пробиотические добавки были предложены в качестве альтернативного метода поддержания и восстановления здоровой вагинальной флоры.²¹ В данном контексте полученные нами данные будут весьма полезными при дальнейшей разработке пробиотиков, предназначенных для поддержания женского здоровья.

Полученные результаты послужили основанием для создания уникального комплекса лактобактерий, содержащего *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* в количестве 100×10^9 КОЕ/г каждой, предназначенного для лечения и профилактики бактериального вагиноза. На фармацевтическом рынке Европы этот комплекс имеет название Астарте (www.astarte-probiotics.com), в Украине – Флориум (www.anantamedicare.com).

