

Межрегиональная ассоциация  
по клинической микробиологии  
и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский  
институт антимикробной  
химиотерапии

ГБОУ ВПО СГМА  
Минздрава России

Учредитель:

Межрегиональная ассоциация  
по клинической микробиологии  
и антимикробной химиотерапии

Издатель:

ООО «Издательский дом «М-Вести»  
www.m-vesti.ru

Журнал зарегистрирован  
Комитетом РФ по печати  
30.09.1999 г. (№ 019273)  
Тираж 2000 экз.

Подписные индексы:

По каталогу «Газеты. Журналы»  
агентства «Роспечать»:  
82125 – для индивид. подписчиков;  
82126 – для организаций.

Адрес для корреспонденции:  
127434, г. Москва, а/я 116.  
Тел./факс: (495)980-8928

Адрес электронной почты:  
smac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:  
www.antibiotic.ru/smac  
www.m-vesti.ru

Журнал входит в Перечень российских  
рецензируемых научных журналов,  
в которых должны быть опубликованы  
основные научные результаты  
диссертаций на соискание ученой  
степени доктора и кандидата наук

Присланные в редакцию статьи проходят  
рецензирование

Мнение редакции может не совпадать  
с точкой зрения авторов публикуемых  
материалов

Ответственность за достоверность  
рекламных публикаций несут  
рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал  
обязательна

## Содержание

### Болезни и возбудители

- С.А. Рачина, А.А. Бобылев, Р.С. Козлов, Е.П. Шаль,  
С.Б. Яцышина, О.Г. Шелякина – Особенности внебольничной  
пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*: обзор литературы  
и результаты собственных исследований ..... 4
- В.В. Привольнев, Е.А. Гусева, Е.В. Каракулина – Обзор рекомендаций  
Американского общества по инфекционным заболеваниям  
по ведению пациентов с инфекциями диабетической стопы ..... 14
- А.В. Веселов, К. Хонрает – Новый подход к топической терапии  
онихомикозов ..... 23

### Антимикробные препараты

- А.И. Синопальников, А.Г. Романовских – Левофлоксацин в лечении  
внебольничной пневмонии: 20 лет успешного применения ..... 35
- А.В. Голуб – «Респираторные» фторхинолоны –  
неоклассика антимикробной химиотерапии ..... 47

### Антибиотикорезистентность

- Я.Р. Батыршина, Т.И. Петренко, П.Н. Филимонов – Лекарственная  
устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к фторхинолонам  
в Новосибирской области: результаты популяционного  
исследования ..... 56

### Опыт работы

- Ю.А. Тюрин, Л.Т. Баязитова, О.Ф. Тюпкина, Р.С. Фассахов –  
SCC-типирование метициллинорезистентных штаммов  
*Staphylococcus aureus*, выделенных от госпитализированных  
и амбулаторных пациентов в Казани ..... 66
- А.Р. Мелкумян, Т.В. Припутневич, А.С. Анкирская,  
Д.Ю. Трофимов, В.В. Муравьева, С.М. Муллабаева,  
М.Г. Завьялова – Видовой состав лактобактерий при различном  
состоянии микробиоты влагалища у беременных ..... 72

### Информация

- Краткие правила для авторов ..... 80

ISSN 1684-4386

**Clinical  
Microbiology and  
Antimicrobial  
Chemotherapy**

**2013, Vol. 15, No 1**

Journal of:  
Interregional Association for Clinical  
Microbiology and Antimicrobial  
Chemotherapy  
Institute of Antimicrobial  
Chemotherapy

Publisher:  
«Ltd. Publishing House «M-Vesti»  
www.m-vesti.ru

Journal is registered by  
Russian Committee  
on Press and Mass Media  
30 September 1999 (No 019273)  
Print run 2,000

Corresponding Address:  
Journal «Clinical Microbiology  
and Antimicrobial Chemotherapy»,  
127434, Moscow, Russia,  
PO Box 116  
Tel./Fax: +7 (495)980-8928  
Email: cmac@antibiotic.ru

Internet address:  
www.antibiotic.ru/cmac  
www.m-vesti.ru

Peer reviewed

Opinions expressed do not necessarily  
reflect the views of the Editorial Board

The publisher and the Interregional  
Association for Clinical Microbiology and  
Antimicrobial Chemotherapy disclaim  
any responsibility for reliability  
of advertisements

All rights reserved

Proper citation is required

# Contents

## Diseases and Pathogens

- S.A. Ratchina, A.A. Bobylev, R.S. Kozlov, E.P. Shal,  
S.B. Yatsyshina, O.G. Shelyakina – Community-Acquired Pneumonia  
Caused by *Mycoplasma pneumoniae*: Literature Review  
and Results of the Regional Study . . . . . 4
- V.V. Privolnev, E.A. Guseva, E.V. Karakulina – Review of the 2012 IDSA  
Guidelines on the Management of Diabetic Foot Infections . . . . . 14
- A. Veselov, K. Honraet – The New Approach  
to the Topical Therapy of Onychomycoses . . . . . 23

## Antimicrobials

- A.I. Sinopalnikov, A.G. Romanovskih – Levofloxacin in the Treatment  
of Community-Acquired Pneumonia: 20-Year Successful  
Clinical Experience . . . . . 35
- A.V. Golub – «Respiratory» Fluoroquinolones –  
the Neoclassics of Antimicrobial Chemotherapy . . . . . 47

## Antimicrobial Resistance

- Ya.R. Batirshina, T.I. Petrenko, P.N. Filimonov – Fluoroquinolone  
Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Novosibirsk Region:  
Results of Population-Based Study. . . . . 56

## Personal Experience

- Yu.A. Tyurin, L.T. Bayazitova, O.F. Tyupkina,  
R.S. Fassakhov – SCCmec Typing of Methicillin-Resistant  
*Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Inpatients  
and Outpatients in Kazan . . . . . 66
- A.R. Melkumyan, T.V. Pripitnevitch, A.S. Ankirskaya, D.Yu. Trofimov,  
V.V. Muravyova, S.M. Mullabaeva, M.G. Zavyalova – Lactobacilli  
Species Diversity in Different States of Vaginal Microbiota  
in Pregnant Women . . . . . 72

## Information

- Rules for Authors. . . . . 80

УДК 616.15-009.611-055.28:615.838

## Видовой состав лактобактерий при различном состоянии микробиоты влагалища у беременных

А.Р. Мелкумян, Т.В. Припутневич, А.С. Анкирская, Д.Ю. Трофимов, В.В. Муравьева, С.М. Муллабаева, М.Г. Завьялова

ФГБУ «Научный Центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

**Цель.** Определение видового состава лактобактерий при различных микробиотических состояниях влагалища у беременных с помощью культурального, масс-спектрометрического и молекулярно-генетического методов.

**Материалы и методы.** Обследованы 163 женщины от 18 до 40 лет во II–III триместрах беременности. Проведено комплексное микробиологическое исследование влагалищного отделяемого: микроскопия мазков (окрашенных по Граму и метиленовым синим) и культуральное исследование. Видовую идентификацию выделенных микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом; определение количества *Lactobacillus* spp. и генотипирование шести видов лактобактерий (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) – методом ПЦР-РВ с использованием тест-систем для научного применения.

**Результаты.** Использование масс-спектрометрии позволило идентифицировать 15 видов лактобактерий, которые были культивированы на стандартных селективных питательных средах. Среди них три вида – *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* были доминирующими по высеваемости. Среди всех видов лактобактерий *L. crispatus* по результатам обеих методик лидировал по частоте встречаемости в группе беременных с нормоценозом (>60%). ПЦР-диагностика позволила установить значительное место вида

*L. iners* среди видового разнообразия лактобактерий, обитающих во влагалище. При нормоценозе по результатам культурального исследования с помощью масс-спектрометрии идентифицировано 8 видов лактобактерий, тогда как при бактериальном вагинозе (БВ) – 15 видов. Опровергнуто представление о ведущей роли вида *L. acidophilus* в пуле молочнокислых бактерий вагинальной микробиоты.

**Выводы.** Метод MALDI TOF масс-спектрометрии позволил определить 15 видов влагалищных лактобактерий и может быть рекомендован для идентификации культивируемых лактобактерий. *L. iners* является некультивируемым микроорганизмом при использовании стандартных селективных для лактобактерий питательных сред. По данным ПЦР-диагностики вид *L. iners* при БВ присутствовал у 84,6% пациенток. Анализ видового состава влагалищных лактобактерий, выделенных у беременных с абсолютным нормоценозом, дает право считать доминирование вида *Lactobacillus crispatus* показателем стабильности нормы микроэкологии влагалища.

**Ключевые слова:** лактобактерии, *Lactobacillus iners*, беременные, масс-спектрометрия, микробиота влагалища, бактериальный вагиноз.

Контактный адрес:  
Алина Рантиковна Мелкумян  
Эл. почта: alinamelkumyan@yandex.ru

## Lactobacilli Species Diversity in Different States of Vaginal Microbiota in Pregnant Women

A.R. Melkumyan, T.V. Pripitnevitch, A.S. Ankirskaya, D.Yu. Trofimov, V.V. Muravyova, S.M. Mullabaeva, M.G. Zavyalova

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

**Objective.** To determine lactobacilli species diversity in different states of vaginal microbiota in pregnant women using culture, mass-spectrometry, and DNA-based assays.

**Material and Methods.** A total of 163 pregnant women (18 to 40 years of age) were examined in the 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> trimester. A comprehensive microbiological examination of vaginal swabs, including Gram staining, methylene blue staining, and culture was performed. All isolated microorganisms were identified to species level using mass-spectrometry. Quantification of *Lactobacillus* spp. and genotyping of 6 lactobacilli species (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) were performed by real-time PCR.

**Results.** Using mass-spectrometry, a total of 15 lactobacilli species were identified and cultured on standard selective media. Of these, 3 species (*L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. gasseri*) were found more often than others. Based on the both assays, *L. crispatus* appeared to be the most frequent species in pregnant women with

normocenosis (>60%). PCR assay showed significant place of *L. iners* among vaginal lactobacilli species. Using mass-spectrometry, 8 lactobacilli species were identified in pregnant women with normocenosis, and 15 species in bacterial vaginosis. Conception about leading role of *L. acidophilus* among lactobacilli from vaginal microbiota was contradicted.

**Conclusions.** MALDI-TOF mass-spectrometry could identify 15 species of vaginal lactobacilli and, therefore, may be recommended for identification of cultured lactobacilli. *L. iners* is unable to be cultured on standard selective media. Based on the PCR data, *L. iners* was found in 84.6% of pregnant women with bacterial vaginosis. Analysis of vaginal lactobacilli species isolated from pregnant women with absolute normocenosis suggests that predominance of *L. crispatus* may be considered as a measure of normal vaginal microbiota.

**Key words:** lactobacilli, *Lactobacillus iners*, pregnant, mass-spectrometry, vaginal microbiota, bacterial vaginosis.

## Введение

В последние два десятилетия в связи с методологическими прорывами в клинической микробиологии открылись новые возможности для более углубленного изучения микробной экологии влагалища, многие вопросы которой остаются неизученными и являются предметом дискуссий. Долгие годы изучение микробиоты влагалища было затруднено из-за отсутствия достаточных методических возможностей для исследования микрофлоры и состава вагинального отделяемого, все еще не решены вопросы, связанные с характеристикой и классификацией физиологических и патологических состояний микроценоза влагалища [1, 2].

До середины XX века вагинальный микроценоз считался представленным, в основном, *Lactobacillus acidophilus*. К 80-м годам было показано, что нормальный микроценоз гениталий женщин репродуктивного возраста неоднороден и представлен как *Lactobacillus* spp. 85–98%, так и большой группой так называемых условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) – *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* – с частотой выявления 10–50% [3–5].

В XXI веке, как и в минувшем столетии, несмотря на бурное развитие технологий, микроскопический метод остается широко распространенным в лабораторной диагностике влагалищных инфекций. Метод микроскопии имеет ряд преимуществ, а именно: экономичность, быстрота и доступность для большинства лечебных учреждений, не требуется наличие дорогостоящего оборудования [6]. Но большим его недостатком является субъективизм, неполноценность получаемых результатов, выявление узкого спектра возбудителей, зависимость результатов от квалификации врача. Существуют и косвенные причины недоверия результатов: качество взятия мазков, правильность окраски препаратов [7, 8]. До настоящего времени в нашей стране микроскопию окрашенных метиленовым синим вагинальных мазков выполняют в клинико-диагностических лабораториях, что позволяет выявлять лишь узкий круг возбудителей (трихомонады, грибы). Одна из объективных причин малой информативности этого метода связана с разрешающей способностью оптики, которая дает возможность выявлять микроорганизмы при их количестве в биоматериале выше 5 lg КОЕ/мл. Кроме того, морфологическое сходство многих

выявляемых УПМ различных видов и родов также не позволяет делать заключение об их этиологической роли [1, 7, 9]. Например, к лактоморфотипам могут быть ложно отнесены актиномицеты, коринебактерии, листерии и др. Таким образом, микроскопический метод в ряде случаев может быть рекомендован только как начальный скрининговый этап диагностики и для выбора тактики назначения дальнейших лабораторных анализов.

Удовлетворить возросшие требования к микробиологическому исследованию возможно внедрением измерительных приборов и тест-систем нового поколения, реализующих принципы молекулярного анализа и способных в максимально короткие сроки проводить идентификацию микроорганизмов, определять их клинически значимые свойства [10]. Одним из таких методов является метод масс-спектрометрической идентификации.

Разработки по использованию масс-спектрометрического анализа в микробиологической диагностике ведутся с начала XXI века. В настоящее время масс-спектрометрическая детекция позволяет проводить точную идентификацию более 4000 видов микроорганизмов, сокращая при этом сроки идентификации на 24–72 часа. Один из важных показателей – экономичность методики, которая почти не требует затрат на реактивы и расходные материалы. С использованием данной методики впервые появилась возможность видовой идентификации микроорганизмов влагалища, ранее требовавших дорогих и длительных затрат (облигатные анаэробы, гемофилы, нейссерии, лактобактерии, коринебактерии, актиномицеты и др.). Поэтому задачи, связанные с разработкой и внедрением в рутинную практику микробиологических лабораторий новых эффективных подходов к идентификации, характеристике и типированию клинически значимых патогенов, являются актуальными и своевременными [7, 11].

В этой связи внедрение метода MALDI TOF (время-пролетной масс-спектрометрии) рибосомальных белковых фракций в практическую работу бактериологических лабораторий является крайне перспективным и открывает новые возможности диагностики микробиома различных локусов организма.

**Целью исследования** было определить видовой состав лактобактерий при различных микробиотических состояниях влагалища у беременных с помощью культурального, масс-спектрометрического и молекулярно-генетического методов.

### Материалы и методы

Обследованы 163 женщины от 18 до 40 лет во II–III триместрах беременности с наличием инфор-

мированного согласия. Из исследования были исключены 8 женщин с *инфекциями, передающимися половым путем* (ИППП): ВИЧ-инфекция, сифилис (методом ИФА), гонорея, трихомониаз, хламидиоз, инфекции, вызванные *Mycoplasma genitalium* (методом ПЦР). В анализ включены 155 беременных, у которых было проведено комплексное микробиологическое исследование влагалищного отделяемого: микроскопия мазков (окрашенных по Граму и метиленовым синим) и культуральное исследование.

Комплексная оценка состояния микроценоза влагалища была проведена в соответствии с медицинской технологией «Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов»: учитывали состояние вагинального эпителия, лейкоцитарную реакцию, разнообразие морфотипов, а также видовую идентификацию с количественной оценкой роста микроорганизмов при культуральном исследовании [1]. Взятие отделяемого влагалища для посева проводили стерильным ватным тампоном из заднего свода влагалища в пробирку с транспортной средой Эймса (Medical Wire, Англия). Первичный посев с полуколичественной оценкой роста микроорганизмов проводили на селективные и дифференциально-диагностические питательные среды: колумбийский агар, маннит-солевой агар (Conda, Испания), среду Эндо, энтерококкагар и агар Сабуро (ФГУН «ГИЦПМ и Б», Оболенск, Россия). Все посева культивировали по стандартной методике при температуре 36°C в течение 24–48 часов. Лактобактерии культивировали в условиях CO<sub>2</sub> инкубатора (Jouan, Франция), в анаэробных газогенераторных пакетах (BioMerieux, Франция) и анаэроустате (Jouan, Франция) с использованием питательных сред отечественных (Лактобакагар, ФГУН «ГИЦПМиБ», Оболенск) и иностранных (агар MRS, Conda, Испания) производителей.

Видовую идентификацию всех выделенных микроорганизмов, в том числе 267 штаммов лактобактерий, проводили масс-спектрометрическим методом с использованием времяпролетного масс-спектрометра MALDI TOF MS AutoFlex III с программным обеспечением Maldi BioTyper (Bruker Daltonics, Германия).

Материал для генотипирования лактобактерий забирали из заднего свода влагалища в транспортные среды с изотоническим водно-солевым раствором и консервантом. Для оценки видового состава лактобактерий проводили определение количества *Lactobacillus* spp. и генотипирование 6 видов лактобактерий (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) методом ПЦР-РВ с исполь-

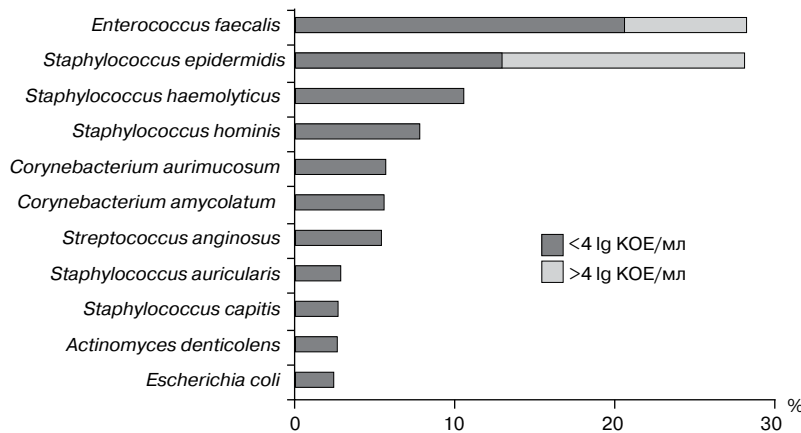


Рис. 1. Высеваемость факультативно-анаэробных микроорганизмов у беременных с нормоценозом.

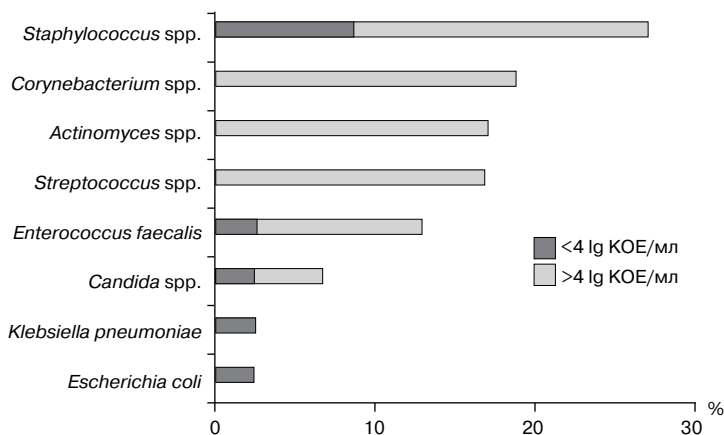


Рис. 2. Высеваемость факультативно-анаэробных микроорганизмов у беременных с бактериальным вагинозом.

зованием тест-систем для научного применения (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва).

### Результаты исследования

На основании комплексной оценки результатов микроскопии и культуральной диагностики в общей группе ( $n=155$ ) состояние микроценоза оценено как *нормоценоз* (Н) у 57 (36,8%) женщин, а у 98 (63,2%) диагностированы различные варианты вагинальных инфекций. *Кандидозный вагинит* (КВ) выявлен у 34 (21,9%) пациенток, *аэробный* (неспецифический) *вагинит* (АВ), ассоциированный с факультативно-анаэробными условно-патогенными микроорганизмами – у 22 (14,2%), *бактериальный вагиноз* (БВ) – у 26 (16,8%) беременных, промежуточный вариант микроценоза – у 3 (1,9%), бессимптомное носительство грибов – у 7 (4,5%), цитолитический вагиноз – у 6 (3,9%) беременных.

Проведен сравнительный анализ видового состава лактобактерий в каждой из 4 групп с

«микробиологическим диагнозом» нормоценоза, бактериального вагиноза, аэробного вагинита и кандидозного вагинита.

При микроскопии мазков пациенток группы с нормоценозом лейкоцитарная реакция отсутствовала (82,5%) или была слабовыраженной (17,5%). В мазках доминировали лактоморфотипы.

При посевах отделяемого влагалища беременных с нормоценозом во всех пробах в высоком титре ( $>6$  lg КОЕ/мл) были выделены лактобактерии. У 54,4% беременных, кроме того, были выделены условно-патогенные микроорганизмы, преимущественно в низких титрах (рис. 1).

Среди лактобактерий, выделенных при нормоценозе, идентифицированы 8 видов. Лидирующее положение занимали 3 вида: *L. crispatus* (63,2%), *L. jensenii* (33,4%) и *L. gasseri* (17,5%). Частота высеваемости остальных 5 видов – *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. mucosae*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* составила менее 5,3%.

При анализе частоты выявления лактобактерий методом ПЦР-РВ с учетом относительных показателей нормы (50–100% ОБМ) *L. crispatus* обнаружены у 61,4% беременных, *L. iners* – у 28,1%, *L. jensenii* – у 15,8%, *L. gasseri* – у 8,8% беременных.

В группе беременных с БВ микроскопии в 76,9% случаев в окрашенных по Граму мазках, не выявлены морфотипы лактобактерий, а в 23,1% отмечено умеренное их количество (до 100 микробных клеток в поле зрения).

При культуральной диагностике в аэробных условиях при БВ обнаружен рост широкого спектра факультативно-анаэробных УПМ (рис. 2). Доминирующее положение занимали коагулазонегативные стафилококки (*Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, *S. warneri*), коринебактерии (*Corynebacterium amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. aurimucosum*, *C. coyleae*, *C. simulans*, *C. imitans*) и актиномицеты (*Actinomyces urogenitalis*, *A. neuii*, *A. denticolens*, *A. turicensis*).

Что касается лактобактерий, то их рост обнаружен у беременных с БВ в 80,6% случаев. В низких титрах выделено 15 видов лактобактерий ( $<5$  lg КОЕ/мл): *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. mucosae*, *L. oris*,

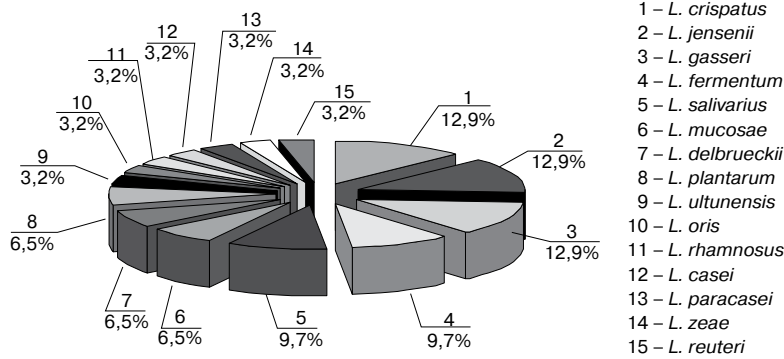


Рис. 3. Видовой спектр лактобактерий при бактериальном вагинозе. MS-идентификация.

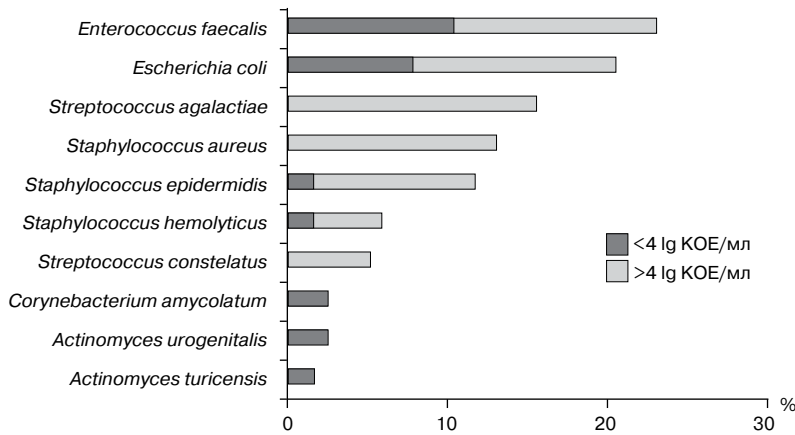


Рис. 4. Высеваемость факультативно-анаэробных микроорганизмов у беременных с аэробным вагинитом.

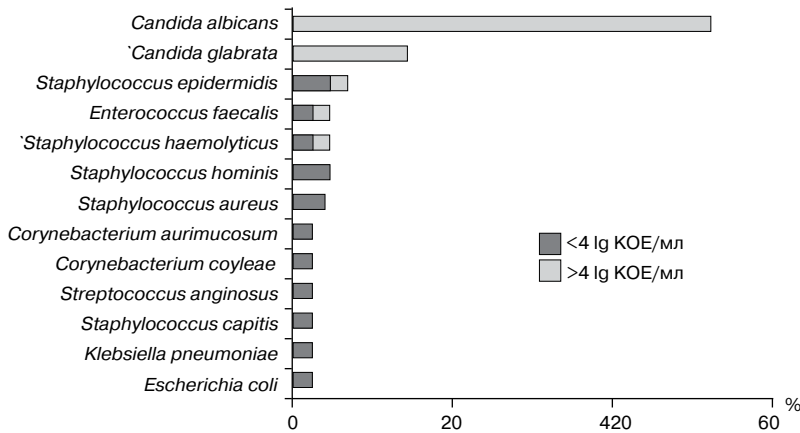


Рис. 5. Высеваемость факультативно-анаэробных микроорганизмов у беременных с кандидозным вагинитом.

*L. ultunensis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *L. reuteri* (рис. 3).

Метод ПЦР у 84,6% беременных с БВ выявил вид *L. iners*, который не был обнаружен в посевах. Этот вид оказался некультивируемым на традиционных селективных питательных средах для выде-

ления лактобактерий. Далее методом ПЦР-РВ с учетом относительных показателей (>10% ОБМ) и абсолютных показателей (>5 lg ГЭ/образец) по частоте выявления следовали *L. crispatus* (7,6%), *L. gasseri* (7,6%), *L. jensenii* (3,8%).

Беременные, в мазках которых отмечена резко выраженная лейкоцитарная реакция, а в посевах в высоких титрах выделены факультивно-анаэробные УПМ, были отнесены в группу с аэробным вагинитом (АВ). Среди возбудителей АВ преобладали в высоком титре (>5 lg КОЕ/мл) *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* (рис. 4).

Частота выделения лактобактерий различных видов в посевах у беременных с АВ составила 36,4% – *L. crispatus*, 22,7% – *L. gasseri*, по 9,1% – *L. jensenii* и *L. rhamnosus*, менее 4,5% – *L. salivarius*, *L. mucosae*, *L. ultunensis*.

Методом ПЦР-РВ у 55,5% беременных с АВ выявлены лактобактерии в низких титрах по абсолютному (<5 lg ГЭ/образец) и относительному показателю (<10% ОБМ). С относительным показателем более 10% ОБМ обнаружены: *L. crispatus* (36,4%), *L. iners* (27,3%), *L. gasseri* (22,7%). Частота индикации *L. jensenii* и *L. johnsonii* была менее 4,5%.

При микроскопии мазков беременных с КВ во всех случаях была выражена лейкоцитарная реакция (в отличие от бессимптомного носительства грибов) и наличие бластоспор. В 70,6% случаев отмечено наличие псевдомицелия.

Культуральным методом во всех пробах у беременных с КВ в высоких титрах (>5 lg КОЕ/мл) были выделены грибы рода Кандида. Частота выделения *Candida albicans* составила 94,1%, *Candida glabrata* – 14,7%.

В спектре микроорганизмов, ассоциированных с грибами, присутствовали стафилококки, стрептококки и другие УПМ, но их доля не имела диагностического значения (рис. 5).

Лактобактерии при культуральном исследовании у беременных с КВ были представлены вида-

ми: *L. jensenii* (32,3%), *L. crispatus* (26,4%), *L. gasseri* (17,6%), *L. fermentum* (11,7%) и *L. reuteri* (2,9%). В 85,3% случаев при КВ лактобактерии выявлены в высоком титре ( $>7 \lg$  КОЕ/мл).

В группе женщин с КВ методом ПЦР-РВ лактобактерии идентифицированы в 91,2% с относительным показателем более 50% ОБМ. Видовой спектр лактобактерий состоял из *L. iners* (32,4%), *L. crispatus* (29,4%), *L. jensenii* (23,6%).

### Обсуждение результатов

Для оценки видового состава лактобактерий при различных состояниях микробиоты влагалища проведено комплексное обследование 155 женщин во II и III триместрах беременности. Уникальность дизайна исследования состояла в том, что была впервые проведена видовая идентификация лактобактерий методом масс-спектрометрии после выделения штаммов на селективных питательных средах из отделяемого влагалища и параллельно были определены виды лактобактерий в первичном материале методом ПЦР. Выбор видового спектра лактобактерий, типированных ПЦР-методом, был обусловлен результатами ранних исследований, которые показали значимость 6 видов лактобактерий в общей картине лактоациллярного «пейзажа» [12].

В нашем исследовании опровергнуто представление о ведущей роли вида *L. acidophilus* в пуле молочнокислых бактерий вагинальной микробиоты. Этот вид ни разу не был идентифицирован среди 267 штаммов, выделенных у 155 обследованных беременных как с нормоценозом влагалища, так и при различных оппортунистических вагинитах. Частота выделения видов лактобактерий, которые в настоящее время используются в качестве пробиотических препаратов (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*), была минимальной и не превышала 3,6%.

Исследование показало значительное видовое разнообразие влагалищных лактобактерий. Использование масс-спектрометрии позволило идентифицировать 15 видов лактобактерий, которые были культивированы на стандартных селективных питательных средах. Среди них три вида – *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* были доминирующими по высеваемости. ПЦР-диагностика позволила установить значительное место вида *L. iners* среди видового разнообразия лактобактерий, обитающих во влагалище. Исследование подтвердило, что *L. iners* является некультивируемым микроорганизмом при использовании стандартных селективных для лактобактерий питательных сред. В то же время метод ПЦР позволил выявить этот

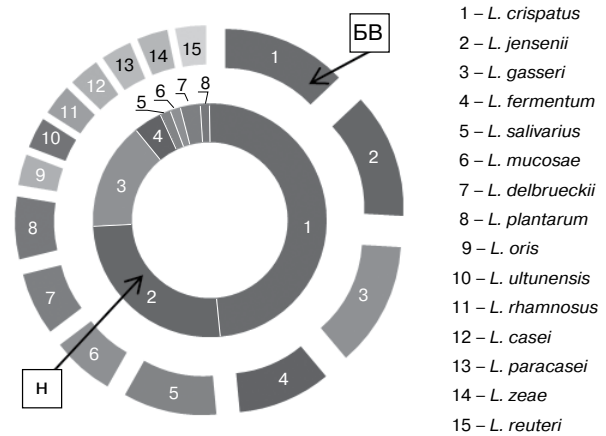


Рис. 6. Частота выделения различных видов лактобактерий при нормоценозе (Н) и бактериальном вагинозе (БВ). MS-идентификация.

вид при нормоценозе у 28,1% беременных всегда в высоком титре. По данным ПЦР-диагностики среди лактобактерий преобладали виды *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* и *L. gasseri*. Таким образом, сравнивая две методики видовой идентификации лактобактерий, можно полагать, что три вида являются ведущими по частоте выявления обоими методами и что вид *L. iners* занимает 2–3 место по частоте встречаемости среди пула влагалищных лактобактерий.

Другой итог исследования связан с полученным видовым спектром лактобактерий при нормоценозе и бактериальном вагинозе (рис. 6). При нормоценозе, по результатам культурального исследования с помощью масс-спектрометрии, идентифицировано 8 видов лактобактерий, тогда как при БВ – 15 видов. При нормоценозе лактобактерии всегда выделяли в высоком титре ( $>7 \lg$  КОЕ/мл) и чаще в монокультуре, тогда как при бактериальном вагинозе титры всегда были низкими ( $<5 \lg$  КОЕ/мл) и нередко выделяли 2–3 вида лактобактерий. По данным ПЦР-диагностики вид *L. iners* при БВ присутствовал у 84,6% пациенток. Возможно, *L. iners* при БВ приобретает патогенетическую роль (но не этиологическую), так как у 85% пациенток с БВ при относительно низкой доле в общей бактериальной массе ( $<10\%$ ), абсолютный титр их сохраняется высоким ( $>7 \lg$  ГЭ/образец).

В этом же ключе можно трактовать данные по высеваемости при БВ о многообразии видов лактобактерий, которые не встречаются при нормоценозе. На основании полученных результатов можно предположить, что индикация *L. iners* и редко встречающихся видов лактобактерий может свидетель-



ствовать о предрасположенности к развитию БВ и его рецидивированию. Подобное заключение было сделано А. Kalra и соавт. [13] и Е. Falsen и соавт. [14], которые предположили, что бактериальный вагиноз может развиваться в определенных условиях из представителей нормальной микрофлоры, и что повторное заселение *L. iners* после эпизода бактериального вагиноза может быть фактором риска развития рецидива. Полученные данные подтвердили малоинформативность результатов микроскопии мазков, окрашенных по Граму, при которых не выявляются морфотипы лактобактерий при БВ (76,9%) или их титр резко снижен (23,1%). Проведенное нами пилотное исследование с включением расширенного набора питательных и селективных сред для роста лактобактерий и облигатных анаэробов – агар Шадлера, агар MRS, бульон MRS, агар Рогозы (Conda, Испания), Лактобакагар (ФГУН «ГИЦПМиБ», Оболенск) с последующей MS идентификацией показали, что ростовые потребности *L. iners* включают дефибрированную баранью кровь и зависят от pH среды культивирования. Изучение биологических свойств *L. iners* показало, что этот вид лактобактерий очень изменчив по морфологическим (морфотип лактобактерий, гарднерелл, строгих анаэробов) и тинкториальным (грамвариабельность) свойствам (неопубликованные данные).

В нашем исследовании, благодаря масс-спектрометрической идентификации, впервые были видоидентифицированы актиномицеты и коринебактерии и показана их широкая видовая палитра при БВ. Возможно, их роль в развитии БВ также может быть пересмотрена, что требует дальнейших исследований.

## Выводы

1. Метод MALDI TOF масс-спектрометрии позволил определить 15 видов влагалищных лактобактерий: *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. mucosae*, *L. oris*, *L. ultunensis*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *L. reuteri*.

2. Совпадающие результаты двух методов идентификации лактобактерий получены по трем ведущим видам: *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* (без учета *L. iners* при нормоценозе).

3. По результатам MS-идентификации:

- при нормоценозе выделено 8 видов лактобактерий, из которых абсолютно доминировали 3 вида, а частота выявления остальных 5 видов была менее 5,3 %;

- при бактериальном вагинозе выделено 15 видов лактобактерий всегда в низком титре, частота встречаемости доминирующих трех видов (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*) составила по 15,4% каждого вида; *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. mucosae*, *L. delbrueckii* и *L. plantarum* по частоте выявления составили от 7,7 до 11,5%, остальные 7 видов встречались редко (менее 3,8% случаев).

4. ПЦР-типирование лактобактерий позволило выявить вид *Lactobacillus iners*, который не выявляется с помощью культуральной диагностики при использовании стандартных селективных питательных сред:

- *Lactobacillus iners* выявлен в высоком титре у 28,1% женщин с нормоценозом влагалища;

- *Lactobacillus iners* обнаружен в относительно большом количестве (>10% ОБМ) у 84,6% беременных с бактериальным вагинозом;

- остается открытым вопрос о патогенетической роли *L. iners* в развитии и рецидивах бактериального вагиноза.

5. При вульвовагинальном кандидозе и аэробном вагините не обнаружено большого разнообразия видов лактобактерий, как это наблюдалось при бактериальном вагинозе.

6. Проведенное исследование опровергает доминирующее положение *L. acidophilus* в видовом составе влагалищных лактобактерий, а частота выделения других пробиотических штаммов (*L. rhamnosus*, *L. reuteri*) в общей группе беременных не превышала 3,6%.

7. Анализ видового состава влагалищных лактобактерий, выделенных у беременных с абсолютным нормоценозом, дает право считать доминирование вида *L. crispatus* показателем стабильности нормы микроэкологии влагалища. По-видимому, именно этот вид лактобактерий может быть перспективным для отбора производственных штаммов в качестве пробиотиков для лечения и профилактики урогенитальных инфекций.

## Литература

1. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов (медицинская технология) – М.:Б/И, 2011.
2. Кочеровец В.И., Бунятян Н.Д. Нормальная микрофлора женских мочеполовых органов и препараты для её коррекции. Учебное пособие, М. 2012.
3. Анкирская А.С. Микробиология влагалища и профилактика акушерской патологии. Гинекология 1999; 3:80-82.
4. Петрова Н.А., Клясова Г.А., Толкачева Т.В. Этиологическая структура кандидоза у иммуносупрессированных больных. Первый съезд микологов России. - М. 2002; 371.
5. Черкасов С.В. Персистентные характеристики микрофлоры репродуктивного тракта женщин в норме и патологии. Автореф.дисс....канд. мед. наук. Оренбург, 1998. 22 с.
6. Krohn M., Hillier S., Eschenbach D. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. J Clin Microbiol 1989; 27(6):1266-71.
7. Forsum U., Jakobsson T., Larsson P., et al. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. APMIS 2002;110(11):811-18.
8. Vasquez A., Jakobsson T., Ahrne S., Forsum U., Molin G. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. J Clin Microbiol 2002; 40:2746-49.
9. Forsum U., Larsson P., Spiegel C. Scoring vaginal fluid smears for diagnosis of bacterial vaginosis: need for quality specifications. APMIS 2008; 116(2):156-59.
10. Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Зубков М.М., Припутневич Т.В., Кубанова А.А., Говорун В.М. Использование масс-спектрометрии MALDI-TOF для выявления в генах *guyA* и *parC* *Neisseria gonorrhoeae* однонуклеотидных замен, определяющих формирование устойчивости к фторхинолонам. Молекулярная биология 2005; 39(6):923-32.
11. Ильина Е.Н., Говорун В.М. Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот в молекулярной медицине. Биоорганическая химия 2009; 35(2):149-64.
12. Ворошилина Е.С., Сергеев А.Г., Тумбинская Л.В. Полиморфизм генов системы цитокинов и видовой состав вагинальных лактобактерий у женщин репродуктивного возраста с сохранной нормофлорой. Уральский медицинский журнал 2011; 3(81):58.
13. Kalra A., Palcu C., Sobel J., Akins R. Bacterial vaginosis: culture- and PCR-based characterizations of a complex polymicrobial disease's pathobiology. Curr Infect Dis Rep 2007; 9(6):485-500.
14. Falsen E., Pascual C., Sjoden B., Ohlen M., Collins M. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. Nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49:217-21.