

НОРМАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА: ОЦЕНКА С СУБЪЕКТИВНОЙ, ЭКСПЕРТНОЙ И ЛАБОРАТОРНОЙ ТОЧЕК ЗРЕНИЯ

Е. С. Ворошилина^{1,2} ✉, Д. Л. Зорников¹, Е. Э. Плотко^{2,3}

¹Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

²Медико-фармацевтический центр «Гармония», Екатеринбург

³Кафедра акушерства и гинекологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург

Критерии нормы для микробиоценоза влагалища здоровой женщины остаются предметом для дальнейшего изучения. Субъективный характер формирования группы «здоровых женщин» при проведении исследований не позволяет считать получаемые результаты однозначными. В данной работе мы сравнивали частоту встречаемости нормоценозов различных типов и дисбиоза влагалища у женщин, поделенных на группы в зависимости от характера их обследования (мнение женщины, осмотр врача, микроскопическое исследование). Были обследованы 234 женщины репродуктивного возраста из г. Екатеринбурга (средний возраст — 30,3 ± 6,6 лет). Оценку микробиоценоза и определение видового состава лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) провели методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме «реального времени» с использованием тест-системы «Фемофлор» («НПО ДНК-Технология», Россия) и наборов реагентов для научного применения той же компании-производителя. У каждой пятой женщины репродуктивного возраста, считающей себя здоровой, был выявлен дисбиоз. Нормоценоз в этой группе чаще всего характеризовался преобладанием *L. iners*, а вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* определяли только у каждой третьей женщины. В то же время вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* был обнаружен у 46,2 % женщин, которые были отнесены к группе клинически здоровых на основании опроса, осмотра врача и микроскопического исследования. Это говорит о том, что клиническая оценка состояния нижних отделов гениталий без учета данных микроскопии носит субъективный характер и в ряде случаев не позволяет выявить у пациентки дисбиоз влагалища.

Ключевые слова: микробиоценоз влагалища, вагинальные лактобациллы, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, нормоценоз, дисбиоз

Благодарности: авторы благодарят Валерия Хаютина, директора Медико-фармацевтического центра «Гармония», за возможность выполнения исследования на базе центра.

✉ **Для корреспонденции:** Ворошилина Екатерина Сергеевна
ул. Фурманова, д. 30, г. Екатеринбург, 620142; voroshilina@gmail.com

Статья получена: 11.04.2017 **Статья принята к печати:** 20.04.2017

NORMAL VAGINAL MICROBIOTA: PATIENT'S SUBJECTIVE EVALUATION, PHYSICAL EXAMINATION AND LABORATORY TESTS

Voroshilina ES^{1,2} ✉, Zornikov DL¹, Plotko EE^{2,3}

¹Department of Microbiology, Virology and Immunology, Faculty of Preventive Medicine, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

²Harmony Medical and Pharmaceutical Center, Yekaterinburg, Russia

³Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine and Healthcare, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

Criteria of normality for the vaginal microbiota of healthy women are still a subject of discussion. A decision to assign a study participant to a group of healthy individuals is quite subjective if based on the absence of complaints and physical examination only, which renders study results ambiguous. Below we compare occurrence of the normal vaginal flora and vaginal dysbiosis in women divided into 3 groups according to the examination type (patient's subjective evaluation of her condition, physical examination, and laboratory tests). We examined 234 women of reproductive age from Yekaterinburg (mean age was 30.3 ± 6.6 years). Microbiota composition and lactobacillus diversity (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) were evaluated by real-time polymerase chain reaction using the Femoflor assay and reagent kits by DNA-Technology, Russia. One in 5 women of reproductive age who had no health complaints was found to have dysbiosis. The normal microbiota of those women was dominated mostly by *L. iners*, while dominant *L. crispatus* were observed in every third participant. Prevailing *L. crispatus* were also found in the normal microbiota of 46.2 % of women who were considered healthy based on the doctor's examination and laboratory tests. Thus, clinical evaluation of the female lower reproductive tract can be compromised by doctor's subjectivity if not supported by laboratory tests and may overlook vaginal dysbiosis in the patient.

Keywords: vaginal microbiota, vaginal lactobacilli, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, normal vaginal flora, dysbiosis

Acknowledgements: the authors thank Valery Khayutin, Director of Harmony Medical and Pharmaceutical Center, for the opportunity to conduct the study at the Center's facilities.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Voroshilina
ul. Furmanova, d. 30, Yekaterinburg, Russia, 620142; voroshilina@gmail.com

Received: 11.04.2017 **Accepted:** 20.04.2017

Определение критериев нормы для микробиоценоза влагалища здоровой женщины по-прежнему остается не до конца решенной задачей. При этом не всегда легко соотносить индивидуальную норму, характеризующую вариант микробиоценоза, обеспечивающий репродуктивное благополучие, с нормой популяционной. Последняя крайне зависима от дизайна исследования, т. к. описывает частоту встречаемости различных вариантов вагинальной микрофлоры у женщин, отобранных по определенным антропологическим, территориальным, возрастным, профессиональным и иным характеристикам.

В результате реализации проекта «Микробиом человека» (Human Microbiome Project) были накоплены обширные данные о состоянии вагинальной микрофлоры у женщин различных антропологических групп [1–6]. Исследования были проведены с использованием метода полногеномного секвенирования, что позволило установить все микроорганизмы, составляющие вагинальный микробиом. Для его описания ряд зарубежных авторов используют классификацию, учитывающую долю преобладающей группы микроорганизмов, а в случае доминирования лактофлоры (что рассматривают как показатель нормоценоза) — преобладающий вид лактобацилл [6]. В соответствии с этим подходом выделяют пять основных вариантов микробного сообщества, характерных для репродуктивного тракта женщин [6]:

1. вариант I — доминирование лактофлоры с преобладанием *Lactobacillus crispatus*,
2. вариант II — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. gasseri*,
3. вариант III — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. iners*,
4. вариант IV — дисбиотический тип с преобладанием облигатных анаэробов,
5. вариант V — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. jensenii*.

Несмотря на то, что перечисленные варианты микробных сообществ выявляли у здоровых женщин всех антропологических групп, их частота встречаемости различалась в зависимости от принадлежности к той или иной группе. Так, среди афроамериканок и латиноамериканок в 40,6 и 38,1 % случаев встречался дисбиотический вариант IV. У представительниц этих групп достоверно выше частота самопроизвольного прерывания беременности, которую связывают с бактериальным вагинозом (БВ) — дисбиозом вагинальной микрофлоры. В то же время вариант I чаще выявляли у европеоидов — в 45,4 % случаев. Дисбиотический вариант микрофлоры не характерен для этой антропологической группы и был выявлен только у 10,3 % обследованных. Также было отмечено, что нормоценоз с преобладанием *L. crispatus* коррелирует с более низким уровнем pH вагинального отделяемого [6]. Повышенные протективные свойства данного вида лактобацилл связывают с высокой способностью к колонизации, более высоким уровнем продукции перекиси водорода и молочной кислоты [6–8]. Стоит отметить, подобный анализ в популяции россиянок не проводился.

В большинстве случаев для описания микробиома здоровых женщин отбирали группы asymptomatic women — женщин, считавших себя здоровыми. Однако наличие или отсутствие жалоб всегда субъективно, т. к. у пациентки нет образца для сравнения, а область приемлемого для индивидуума может существенно зависеть от культурного и образовательного уровня. Клиническая оценка состояния слизистой и отделяемого влагалища врачом также

является субъективной по определению. Поэтому принцип формирования группы нормы без привлечения объективных методов лабораторной диагностики может быть подвергнут критике. Насколько различается структура микробиоценоза влагалища в зависимости от критериев, использованных при формировании группы «здоровых женщин», неизвестно.

В России в 2008 г. был внедрен в клиническую практику тест «Фемофлор» (метод — полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме «реального времени», ПЦР-РВ), были разработаны критерии оценки вагинального микробиоценоза женщины [9]. С появлением возможности генотипировать вагинальные лактобациллы возникла потребность переосмыслить разработанные ранее критерии нормы.

Настоящее исследование было нацелено на выявление особенностей микробиоценоза влагалища и видового состава лактобацилл у женщин репродуктивного возраста, проживающих в г. Екатеринбурге и считающих себя здоровыми, в зависимости от способа формирования группы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 234 женщины в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст — $30,3 \pm 6,6$ лет), обратившиеся в 2011–2015 гг. на амбулаторный прием к акушеру-гинекологу в Медицинский центр «Гармония» (Екатеринбург). Все женщины субъективно считали себя здоровыми, то есть не предъявляли жалоб, указывающих на инфекционно-воспалительную патологию влагалища. Критериями исключения были наличие облигатно патогенных возбудителей, передающихся половым путем, ВИЧ, гепатитов В и С; системная или местная антибиотикотерапия в течение предшествующих четырех недель.

Всех женщин обследовали однократно: оценивали состояние микробиоценоза влагалища с помощью метода ПЦР-РВ и тест-системы «Фемофлор-16» («НПО ДНК-Технология», Россия) и проводили количественный анализ 6 видов лактобацилл: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*, — тем же методом, но с использованием набора реагентов для научного применения того же производителя.

Микроскопическое исследование мазка вагинального отделяемого проводили с окраской по Романовскому-Гимзе, состояние микробиоценоза оценивали в соответствии с классификацией, предложенной Е. Ф. Кира в 2001 г. [10].

Клиническую оценку состояния нижних отделов гениталий проводили методом опроса, всем женщинам был выполнен осмотр в зеркалах для объективной оценки состояния слизистой влагалища и характера выделений.

Полученные данные подвергли статистической обработке с использованием программы WinPeri. Для оценки достоверности различий по частоте выявления различных микробных сообществ между исследуемыми группами рассчитывали двусторонний критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели среди всех женщин, включенных в исследование (основная группа), выделили две подгруппы в соответствии с уточняющими критериями. В подгруппу 1 включили 125 женщин, у которых наряду с отсутствием субъективных жалоб по результатам

осмотра гинекологом не были выявлены признаки инфекционно-воспалительной патологии влагалища. В подгруппу 2 включили 52 женщины из подгруппы 1, у которых при отсутствии субъективных и объективных признаков патологии влагалища микроскопическая картина вагинального отделяемого соответствовала критериям нормоценоза [10].

В зависимости от доли нормофлоры, преобладающего вида лактобацилл и доли условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) мы выделили 5 вариантов микробных сообществ:

1. нормоценоз I — доминирование лактофлоры (доля *Lactobacillus spp.* более 80 % в общей массе микробов) с преобладанием *L. crispatus*,
2. нормоценоз II — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. gasseri*,
3. нормоценоз III — доминирование лактофлоры с преобладанием *L. iners*,
4. нормоценоз IV — нормоценоз с преобладанием *L. jensenii/L. vaginalis*,
5. дисбиоз — доля лактофлоры менее 80 %, доля УПМ более 20 %.

Частота выявления различных вариантов нормоценоза и дисбиоза у обследованных групп женщин представлена на рис. 1.

Дисбиотический вариант микробиоценоза был выявлен у 19,7 % всех обследованных женщин ($n = 234$), а варианты нормоценоза были определены у 80 % обследованных женщин. Чаще других встречался вариант нормоценоза III (с преобладанием *L. iners*) — выявлен у 38,9% всех обследованных (рисунк). Вторым по частоте встречаемости был вариант нормоценоза I (с преобладанием *L. crispatus*) — обнаружен у 30,8% всех женщин, считавших себя здоровыми.

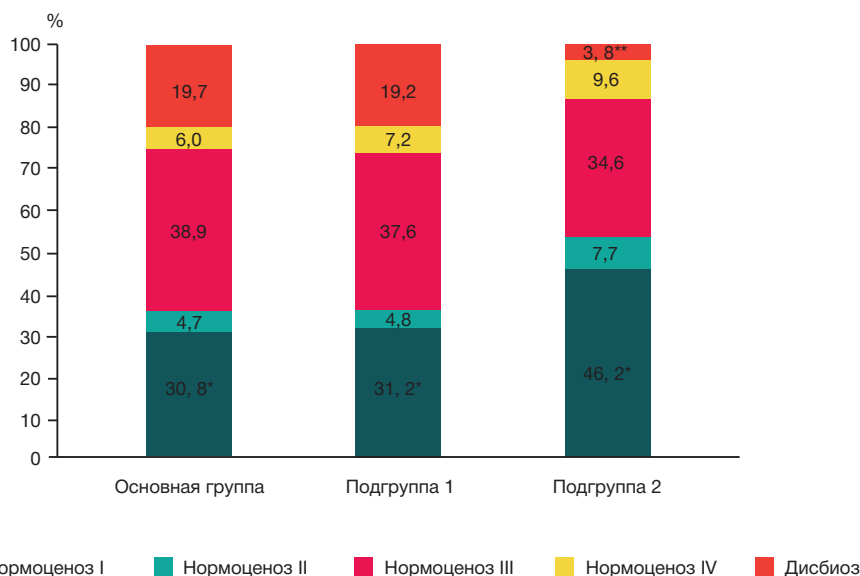
Анализ частоты встречаемости различных вариантов микробиоценоза влагалища среди женщин подгруппы 1 (клинически здоровых с точки зрения врача) не показал значимых отличий в сравнении с совокупностью обследованных женщин. Так, дисбиотический вариант был выявлен у 19,2 % женщин подгруппы, нормоценоз I — у 31,2 %, нормоценоз III — у 37,6 % женщин. Варианты нормоценоза II и IV встречались редко и среди всех обследованных, и в подгруппе 1.

Результаты в подгруппе 2 существенно отличались от результатов в основной группе и подгруппе 1: частота встречаемости дисбиотического варианта была почти в 5 раз ниже (3,8 % против 19,7 % в основной группе и 19,2 % в подгруппе 1, в обоих случаях $p < 0,01$). Также в подгруппе 2 была достоверно выше встречаемость нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* — он был определен почти у половины обследованных женщин. Частота выявления прочих вариантов: нормоценоза II (с преобладанием *L. gasseri*) и нормоценоза IV (с преобладанием *L. jensenii/L. vaginalis*), — была несколько выше, а нормоценоза III (с преобладанием *L. iners*) — ниже по сравнению с другими группами, однако различия были статистически недостоверными, что, возможно, обусловлено малым числом женщин с данными вариантами нормоценоза.

Таким образом, у каждой пятой женщины, считавшей себя здоровой (основная группа), выявили вариант микробиоценоза влагалища, соответствующий критериям дисбиоза. Аналогичный результат получили и для тех женщин, которые были признаны клинически здоровыми после осмотра врача (подгруппа 1). Принципиально иную картину наблюдали в группе женщин, которых отнесли к категории здоровых на основании не только данных опроса и осмотра, но и результатов микроскопии (подгруппа 2). Почти в половине случаев у них был выявлен нормоценоз I — наиболее благоприятный вариант микробного сообщества с преобладанием *L. crispatus*, а дисбиотический вариант микробиоценоза встретился всего в нескольких случаях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные в ходе настоящего исследования данные демонстрируют, что принцип формирования группы нормы существенно влияет на полученный результат и это необходимо учитывать при разработке дизайна подобных исследований. Восприятие своего здоровья женщиной, как и оценка ее состояния врачом, являются субъективными критериями. Ориентация на них без учета лабораторной оценки микробиоценоза влагалища может привести к гиподиагностике дисбиотических состояний и несвоевременной коррекции нарушений микробиоценоза влагалища, влияющих на репродуктивное здоровье женщины.



Частота выявления различных вариантов микробиоценоза влагалища у женщин, не имевших субъективных признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища (* — $p < 0,05$ и ** — $p < 0,01$ при сравнении между собой групп 1 и 3 и групп 2 и 3)

Частота выявления различных вариантов микробиоценоза влагалища у женщин различных антропологических групп, считавших себя здоровыми

Вариант микробиоценоза влагалища	Данные Ravel и соавт., 2011 (полногеномное секвенирование) [6]				Собственные данные (ПЦР-РВ)
	Европеоидная группа (n = 98)	Азиатская группа (n = 97)	Латиноамериканская группа (n = 97)	Афроамериканская группа (n = 104)	Россиянки, г. Екатеринбург (n = 234)
Нормоценоз I	45,4 %	25,0 %	14,4 %	22,1 %	30,8 %
Нормоценоз II	8,2 %	5,2 %	7,2 %	4,8 %	4,7 %
Нормоценоз III	26,8 %	42,7 %	36,1 %	31,5 %	38,9 %
Нормоценоз IV	9,3 %	7,3 %	4,2 %	1,0 %	6,0 %
Дисбиоз	10,3 %	19,8 %	38,1 %	40,6 %	19,7 %

В этой связи интересно сопоставить результаты, полученные нами, с данными, опубликованными Ravel и соавт. [6]. Они оценивали состояние микробиоценоза влагалища у женщин четырех антропологических групп (европеоидной, азиатской, латиноамериканской и афроамериканской), считавших себя здоровыми на момент обследования, несмотря на то, что некоторые из них не посещали врача на протяжении нескольких лет. В нашем исследовании по соответствующим критериям была сформирована группа 1. Данные сравнительного анализа представлены в таблице.

Микробиоценоз вагинального отделяемого обследованных нами женщин отличался от представительниц других антропологических групп, проживавших на момент обследования в США (исследование было проведено в клиниках Балтимора и Атланта). Мы сочли некорректным рассчитывать достоверность выявленных различий с учетом того, что были использованы разные методы оценки микробного сообщества. Тем не менее, результаты нашего исследования указывают на более высокую частоту обнаружения дисбиоза влагалища: почти в 2 раза выше по сравнению с европеоидной группой и сопоставимую с азиатской группой. Наиболее благоприятный вариант (нормоценоз I) выявляли у обследованных нами женщин в 1,5 раза реже по сравнению с европеоидной группой, но чаще, чем в других антропологических группах. В целом структура микробиоценоза влагалища обследованных нами женщин схожа с таковой у женщин азиатской группы. Вопрос о том, насколько полученные нами данные могут

быть сравнимы с результатами аналогичных исследований в других регионах России, требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

Состояние микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста, считающих себя здоровыми, характеризуется высокой частотой обнаружения дисбиоза методом ПЦР-РВ: он был выявлен у каждой пятой пациентки. Нормоценоз чаще всего сопровождался преобладанием *L. iners*, а вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* определяли только у каждой третьей женщины. При этом вариант нормоценоза с преобладанием *L. crispatus* более характерен для 46,2 % женщин, которые были отнесены к группе клинически здоровых на основании опроса, клинической оценки состояния влагалища и микроскопического исследования. Таким образом, клиническая оценка состояния нижних отделов гениталий без учета данных микроскопии носит субъективный характер и в ряде случаев не позволяет выявить у пациентки дисбиоз влагалища.

Выявленные нами особенности микробиоценоза влагалища женщин г. Екатеринбурга и их отличия от микробиоценоза влагалища женщин европеоидной группы могут быть связаны с антропологическим разнообразием жительниц Уральского региона.

Литература

1. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13: 151–70. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
2. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14. DOI: 10.1038/nature11234.
3. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome.* 2013 Apr 12; 1 (1): 12. DOI: 10.1186/2049-2618-1-12.
4. Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4688–95. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.
5. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh DW, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome.* 2013 Dec 2; 1 (1): 29. DOI: 10.1186/2049-2618-1-29.
6. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4680–7. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
7. Donnarumma G, Molinaro A, Cimini D, De Castro C, Valli V, De Gregorio V, et al. *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC Microbiol.* 2014 May 30; 14: 137. DOI: 10.1186/1471-2180-14-137.
8. McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2000; 49 (6): 543–52. DOI: 10.1099/0022-1317-49-6-543.
9. Ворошилина Е. С., Донников А. Е., Плотко Е. Э., Тумбинская Л. В., Хаютин Л. В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной полимеразной цепной реакции: что есть норма? *Акушерство и гинекология.* 2011; (1): 57–65.
10. Кира Е. Ф. Бактериальный вагиноз. С-Пб.: Нева-Люкс; 2001. 364 с.

References

1. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012; 13: 151–70. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
2. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13; 486 (7402): 207–14. DOI: 10.1038/nature11234.
3. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome.* 2013 Apr 12; 1 (1): 12. DOI: 10.1186/2049-2618-1-12.
4. Macklaim JM, Gloor GB, Anukam KC, Cribby S, Reid G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4688–95. DOI: 10.1073/pnas.1000086107.
5. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh DW, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome.* 2013 Dec 2; 1 (1): 29. DOI: 10.1186/2049-2618-1-29.
6. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15; 108 Suppl 1: 4680–7. DOI: 10.1073/pnas.1002611107.
7. Donnarumma G, Molinaro A, Cimini D, De Castro C, Valli V, De Gregorio V, et al. *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC Microbiol.* 2014 May 30; 14: 137. DOI: 10.1186/1471-2180-14-137.
8. McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2000; 49 (6): 543–52. DOI: 10.1099/0022-1317-49-6-543.
9. Voroshilina ES, Tumbinskaya LV, Donnikov AE, Plotko EA, Khayutin LV. [Vaginal biocenosis with a view to quantitative polymerase chain reaction: what is its norm?] *Obstetrics and Gynecology.* 2011; (1): 57–65. Russian.
10. Kira EF. *Bakterial'nyj vaginoz.* Sankt-Peterburg: Neva-Lyuks; 2001. 364 p. Russian.