

glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. PLoS One. 2011;6(2):e16812.

58. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. Nat Biotechnol. 2010;28(10):1069–1078.

59. Mellingshoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. N Engl J Med. 2005;353(19):2012–2024.

60. Nagarajan RP, Costello JF. Molecular epigenetics and genetics in neuro-oncology. Neurotherapeutics. 2009;6(3):436–446.

61. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. Ann Oncol. 2001;12(6):745–760.

62. Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, et al. 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. Nat Med. 2012;18(4):624–629.

63. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, et al. DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. J Natl Cancer Inst. 2011;103(2):143–153.

64. Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. Ever since Knudson. Trends Genet. 2001;17(10):569–573.

65. Esteller M. Epigenetics in cancer. N Engl J Med. 2008;358(11):1148–1159.

66. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. Acta Neuropathol. 2010;120(6):707–718.

67. Reardon DA, Rich JN, Friedman HS, Bigner DD. Recent advances in the treatment of malignant astrocytoma. J Clin Oncol. 2006;24(8):1253–1265.

68. Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Changing paradigms – an update on the multidisciplinary management of malignant glioma.

Oncologist. 2006;11(2):165–180.

69. Prigent SA, Nagane M, Lin H, et al. Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. J Biol Chem. 1996;271(41):25639–25645.

70. von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. The next generation of glioma biomarkers: MGMT methylation, BRAF fusions and IDH1 mutations. Brain Pathol. 2011;21(1):74–87.

71. Wick W, Weller M, Weiler M, Batchelor T, Yung AW, Platten M. Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. Neuro Oncol. 2011;13(6):566–579.

Authors

Byvaltsev Vadim A.

Railway Clinical Hospital on the station Irkutsk-Passazhirskiy of Russian Railways Ltd.

Professor, MD

byval75vadim@yandex.ru

Stepanov Ivan A.

Irkutsk State Medical University, Ministry of Health, Irkutsk, Russia

Postgraduate

edmoilers@mail.ru

Belykh Evgenii G.

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia

Postgraduate

e.belykh@yandex.ru

Yarulina Anna D.

Irkutsk State Medical University, Ministry of Health, Irkutsk, Russia

Postgraduate

yarulinaai@yahoo.com

Russian Federation, Irkutsk, Red Rebellion str. 1

УДК 618.15

Зорников Д.Л., Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ С СУММАРНОЙ ДОЛЕЙ ЛАКТОФЛОРЫ В ВАГИНАЛЬНОМ МИКРОБИОЦЕНОЗЕ И ГРУППАМИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С ДИСБИОЗОМ ВЛАГАЛИЩА

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии;

Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Российская Федерация

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва, Российская Федерация

Резюме. Целью настоящего исследования было изучить особенности вагинального микробиоценоза при доминировании отдельных видов лактобацилл и оценить прогностическую значимость выявления отдельных видов лактобацилл в качестве доминирующих у женщин репродуктивного возраста.

Обследовали 608 женщин репродуктивного возраста. Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора. Исследование состояния микробиоценоза влагалища и генотипирование шести видов лактобацилл (*L. actobacillus* (*L. crispatus*), *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) у всех пациенток проводили с помощью метода ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. В зависимости от количества лактобацилл и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) выделяли четыре группы вагинального микробиоценоза — абсолютный нормоценоз, условный нормоценоз, умеренный дисбиоз и выраженный дисбиоз.

Отдельные виды лактобацилл с различной частотой обнаруживались и доминировали у пациенток с абсолютным нормоценозом, умеренным и выраженным дисбиозами. Вагинальная лактофлора чаще была представлена преимущественно *L. iners* (48,5% случаев) и *L. crispatus* (30,3% случаев), реже — *L. gasseri* и *L. jensenii* (12,3% и 7,1% случаев, соответственно).

Наивысшую вероятность доминирования для *L. crispatus* отме-

чали при абсолютном нормоценозе (85%), *L. gasseri* и *L. jensenii* — при умеренном дисбиозе (74% и 52%, соответственно), а *L. iners* — при выраженном дисбиозе (96%). На фоне доминирования *L. crispatus* и *L. gasseri* отмечали меньшие количества условно-патогенных микроорганизмов, чем при доминировании *L. jensenii* и *L. iners*.

Полученные в ходе настоящего исследования данные позволяют утверждать, что прогностически наиболее благоприятным вариантом микробиоценоза влагалища является абсолютный нормоценоз с доминированием *L. crispatus*. Нормоценоз с доминированием *L. iners*, *L. gasseri* или *L. jensenii* следует расценивать как менее благоприятный и стабильный вариант биоценоза, который потенциально может трансформироваться в дисбиоз. Роль *L. iners* в формировании различных видов биоценоза влагалища нуждается в дальнейшем осмыслении.

Ключевые слова: вагинальный микробиоценоз, вагинальный лактобациллы, дисбиоз влагалища, полимеразная цепная реакция, *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*

Введение

Микроорганизмы, населяющие влагалище, находятся в сложных и тесных взаимоотношениях, как между собой, так и с макроорганизмом. Качественный и количественный состав вагинальных микроорганизмов различается среди индивидуумов [1, 2, 3],

а также изменяется в течение жизни женщины под действием различных эндо- и экзогенных факторов [4, 5, 6] и при беременности [7]. Причем кардинальные изменения в составе вагинального микробиоценоза могут происходить за очень короткий промежуток времени [8, 9, 10].

В поддержании стабильности вагинального микробиоценоза важная роль отводится лактобациллам, которые посредством ряда механизмов обеспечивают колонизационную резистентность влагалища, тем самым снижают риск развития инфекций, передаваемых половым путем (ИППП), и бактериального вагиноза (БВ) [10, 11, 12, 13].

Однако отдельные виды лактобацилл с разной частотой выделяются у здоровых женщин и пациенток с БВ. Вид *Lactobacillus crispatus* часто выделяют от здоровых женщин [14, 15], и наоборот, крайне редко — у пациенток с БВ [16, 17], в то время как вид *Lactobacillus iners* часто и в высоких количествах выделяют у обеих категорий женщин [15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]. Вообще *L. iners* чаще других лактобацилл может сосуществовать с другими родами микроорганизмов [26]. А женщины с *L. iners* имеют большую вероятность колонизации представителями родов *Leptotrichia* и *Megasphaera*, БВ-ассоциированными бактериями, *Eggerthella*-подобными бактериями [22]. Обнаружение *Lactobacillus gasseri* в исследовании Antonio et al. было ассоциировано с четырехкратным увеличением риска развития БВ [27]. Результаты этих исследований позволяют предположить наличие различных протективных потенциалов у отдельных видов лактобацилл [7]. Открытыми, на сегодняшний день, остаются как минимум два вопроса, что является фактором или факторами, обеспечивающими колонизацию влагалища определенными видами лактобацилл, и почему риск развития дисбиотических процессов при доминировании одних видов лактобацилл превышает таковой при доминировании других.

Цель исследования — изучить особенности вагинального микробиоценоза при доминировании отдельных видов лактобацилл и оценить прогностическую значимость выявления отдельных видов лактобацилл в качестве доминирующих у женщин репродуктивного возраста.

Материалы и методы исследования

Обследовали 608 женщин, обратившихся в медицинский центр Гармония (г. Екатеринбург), в период с 2011 по 2014 год. Средний возраст пациенток составил $30,3 \pm 6,6$ лет. Все пациентки были обследованы на наличие ВИЧ-инфекции, парентеральных гепатитов, возбудителей ИППП: *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis*. При наличии любого из перечисленных возбудителей женщин исключали из исследования. Также критерием исключения являлось наличие системной или местной антимикробной терапии в течение четырех недель перед исследованием.

Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим нормативным документам. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва).

Состояние микробиоценоза влагалища у всех пациенток исследовали методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью тест-системы «Фемофлор» (ООО «НПО ДНК-технология», Москва). В зависимости от количества лактобацилл и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) выделяли четыре группы вагинального микробиоценоза — абсолютный нормоценоз, условный нормоценоз, умеренный дисбиоз и выраженный дисбиоз [28]. Микробиоценоз влагалища оценивали, как абсолютный нормоценоз в случаях, когда лактобациллы составляли более 80% от общей бактериальной массы (ОБМ) а количество микроорганизмов-ассоциантов (*Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, *Candida spp.*) при этом составляло менее 10^4 геном-эквивалентов в 1 мл — ГЭ/мл (далее все количества микроорганизмов указаны в этих единицах), если же количество ассоциантов превышало указанный порог, то такой вариант микробиоценоза расценивали как условный нормоценоз. В случаях, ког-

да доля лактобацилл составляла 20–80% от ОБМ, микробиоценоз расценивали как умеренный дисбиоз. Если доля лактобацилл не превышала 20% от ОБМ, микробиоценоз расценивали как выраженный дисбиоз.

Кроме определения варианта микробиоценоза, оценивали и количества отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов (УПМ): *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.* (группа GPP), *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium spp.* (группа SLF), *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* (группа MVD), *Lachnobacterium spp./Clostridium spp.* (группа LC), *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* (группа MC), *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium vaginae*.

Для оценки видового состава лактофлоры проводили определение количества *Lactobacillus spp.* и генотипирование шести видов лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) методом ПЦР-РВ с использованием реагентов для научного применения (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Для анализа были отобраны только те пробы, в которых сумма всех выделенных видов лактобацилл была сопоставима с общим количеством *Lactobacillus spp.* и составляла не менее 70%.

В качестве средних величин при оценке количеств отдельных групп УПМ использовали медианы. Для оценки достоверности различий между средними количествами УПМ рассчитывали критерий Манна-Уитни в программе IBM SPSS Statistics 20. Различия интерпретировали как достоверные при минимальном уровне значимости $\alpha=0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Частота выявления и доминирования отдельных видов лактобацилл

В каждой пробе одновременно присутствовали от 1 до 5 видов лактобацилл: чаще один (44,1% случаев) или два (31,9% случаев) вида, реже 3 (18,4% случаев) или 4 вида (5,3% случаев), 5 видов одновременно выявляли только в двух пробах (0,3% случаев).

Отдельные виды лактобацилл выявляли с различной частотой (рисунок 1А). Чаще других идентифицировали виды *L. iners* (60,2% случаев) и *L. crispatus* (41,6% случаев), реже — виды *L. jensenii*, *L. gasseri* и *L. vaginalis* (32,1%, 19,2% и 18,3% случаев, соответственно). Вид *L. johnsonii* выявили только у 3 пациенток (0,5% случаев).

Далее оценивали частоту выявления отдельных видов лактобацилл в качестве доминирующих. Если в пробе присутствовали одновременно несколько видов *Lactobacillus spp.*, доминирующим считали тот, доля которого была наибольшей. Примечательно, что даже при одновременном выделении 3 и более видов лактобацилл доля доминирующего вида превышала 50% (96% случаев), а часто составляла более 90% (59% случаев). Таким образом, в случаях, когда популяция лактобацилл представлена несколькими видами, один вид имеет весомое количественное преимущество над другими в данный момент времени. Что не исключает смены доминирующего вида при изменении среды. Ранее ряд исследователей продемонстрировали, что качественный и количественный состав вагинальной микрофлоры может кардинально изменяться в течение короткого промежутка времени [8, 9, 10].

Частота выявления различных видов лактобацилл в качестве доминирующих представлена на рисунке 1Б. Почти у половины женщин в качестве доминирующего вида выявляли *L. iners* (48,5% случаев), у трети — *L. crispatus* (30,3% случаев), и гораздо реже *L. gasseri* и *L. jensenii* (12,3% и 7,1% случаев, соответственно). Тогда как *L. vaginalis* и *L. johnsonii* доминировали только у 9 (1,5% случаев) и 2 (0,3% случаев) женщин, соответственно.

Таким образом, основными представителями нормофлоры влагалища являются *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и, в меньшей степени, *L. jensenii*, *L. johnsonii* и *L. vaginalis*, по всей видимости, не принимают значительного участия в формировании вагинального микробиоценоза. Первый выявляли крайне редко, всего у 3 из 608 пациенток, то есть менее чем в 1% случаев. Второй выявляли относительно часто, но, как правило, в низких количествах — в 81% случаев доля этого вида не превышала 10% от суммарного количества *Lactobacillus spp.* в исследуемой пробе.

Особенности вагинального микробиоценоза при доминировании

нии отдельных видов лактобацилл

Нами была исследована связь внутриродового доминирования отдельных видов лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii*) с отдельными вариантами микробиоценоза влагалища: абсолютным нормоценозом, умеренным и выраженным дисбиозом. Для оценки вероятности доминирования отдельных видов лактобацилл было предложено рассчитывать показатель, который мы назвали *индекс доминирования*. Данный индекс рассчитывали по следующей формуле: $x = \frac{a}{b} * 100\%$ (где, x — индекс доминирования, a — количество случаев выявления вида в качестве доминирующего, b — общее количество случаев выявления вида в каждой исследуемой группе). Полученные результаты представлены на рисунке 2. Данный показатель отражает, с какой вероятностью исследуемый вид, в случае его выявления, доминировал среди лактобацилл при абсолютном нормоценозе, умеренном или выраженном дисбиозе. Было продемонстрировано, что индекс для видов *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii* значительно различался в зависимости от вида лактобацилл и состояния микробиоценоза (его величина при этом варьировала от 16% до 96%).

Следующая задача исследования заключалась в том, чтобы оценить взаимосвязь между доминирующим видом лактобацилл (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. jensenii*) и отдельными группами УПМ. Из одиннадцати исследуемых групп УМП (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, группа GPP, *Eubacterium spp.*, группа SLF, группа MVD, группа LC, группа MC, *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium vaginae*) выбрали те, средняя доля которых при дисбиозах была не менее 1% от всех выделяемых микроорганизмов [29]. Для расчета средней доли каждой группы УПМ при дисбиозах делили средний показатель количества отдельной группы УПМ на среднее количество всех выделяемых микроорганизмов (в качестве средних величин использовали медианы). В итоге для сравнения были взяты только четыре группы УПМ: группа GPP (среднее количество — $10^{7,2}$, средняя доля — 23,7%), *Eubacterium spp.* (среднее количество — $10^{6,4}$, средняя доля — 4%), группа MVD (среднее количество — 10^6 , средняя доля — 1,6%) и *A. vaginae* (среднее количество — $10^{6,3}$, средняя доля — 3,2%). Средние доли оставшихся семи групп УПМ не превышали 0,3% от среднего количества выделенных микроорганизмов и, по всей видимости, их роль в развитии дисбиоза влагалища не так очевидна.

Связь между отдельными видами лактобацилл и группами УПМ оценивали по двум параметрам: средние количества УПМ при доминировании различных видов лактобацилл у женщин с нормоценозами (абсолютными+условными) и кратность прироста УПМ при дисбиозах (умеренных+выраженных). Средние количества отдельных групп УПМ при нормоценозах составляли от $10^{2,7}$ до $10^{4,7}$ (рисунок 3). Для оценки кратности прироста каждой группы УПМ делили их средние количества при дисбиозах на средние количества при нормоценозах (в качестве средних величин использовали медианы). Тем самым, рассчитывали, во сколько раз количество отдельных групп УПМ при дисбиозах превышает этот показатель при нормоценозах на фоне доминирования разных видов лактобацилл. Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Особенности вагинального микробиоценоза при доминировании *L. crispatus*

Вид *L. crispatus* выявляли у 253 (41,6%) пациенток, в том числе в качестве доминирующего — в 184 (30,3%) случаях (рисунки 1А, 1Б).

Индекс доминирования для *L. crispatus* был наибольшим в группе пациенток с абсолютным нормоценозом — 85% (рисунок 2). Это значит, что у женщин с абсолютным нормоценозом данный вид в случае его выявления доминировал в 85% случаев. А при дисбиозах этот показатель был ниже: 68% — при умеренном дисбиозе и всего 28% — при выраженном дисбиозе. То есть вероятность доминирования *L. crispatus* при нормоценозе была гораздо выше, чем при дисбиозе, особенно выраженном.

При нормоценозах на фоне доминирования *L. crispatus* наблюдали наименьшие количества УПМ (за исключением микроорганизмов группы MVD, количество которых было незначительно ниже при нормоценозах на фоне доминирования *L. gasseri* — $10^{2,9}$). Данную группу приняли в качестве референтной (для последующего сравнения количеств УПМ при нормоценозах на фо-

не доминирования других видов лактобацилл). При этом средние количества отдельных групп УПМ были следующими: группа GPP — $10^{3,6}$, *Eubacterium spp.* — $10^{3,7}$, группа MVD — 10^3 , *A. vaginae* — $10^{2,7}$ (рисунок 3).

При дисбиозах на фоне доминирования *L. crispatus* количество микроорганизмов группы GPP увеличивалось в среднем в 501 раз, *Eubacterium spp.* — в 158 раз, группы MVD — в 16 раз. В то время как среднее количество *A. vaginae* вообще незначительно сокращалось (рисунок 4). То есть в основном увеличивалось количество микроорганизмов группы GPP. Однако стоит отметить, что кратность прироста микроорганизмов группы GPP значительно не превышала или была ниже аналогичного показателя на фоне доминирования других видов лактобацилл.

Таким образом, вид *L. crispatus* часто выявляется (в том числе и в качестве доминирующего вида лактобацилл) во влагалище женщин репродуктивного возраста, причем, как правило, составляет большую часть от всех выделяемых бактерий. Количество УПМ при нормоценозе и кратность их прироста при дисбиозах на фоне доминирования данного вида наименьшие.

Учитывая полученные данные, можно заключить, что выявление в качестве доминирующего вида *L. crispatus* является благоприятным прогностическим фактором и вероятность развития дисбиоза влагалища на фоне доминирования данного вида наименьшая.

Особенности вагинального микробиоценоза при доминировании *L. iners*

L. iners оказался самым часто выявляемым видом лактобацилл у женщин, в том числе в качестве доминирующего (рисунки 1А, 1Б). *L. iners* выявляли у 366 (60,2%) пациенток, в том числе в качестве доминирующего — у 295 (48,5%).

Индекс доминирования для *L. iners* был наибольшим в группе пациенток с выраженным дисбиозом — 96% (рисунок 2). То есть *L. iners* при выраженном дисбиозе являлся доминирующим видом лактобацилл в 96% случаев. Несколько реже данный вид доминировал при умеренном дисбиозе (86% случаев) и еще реже при абсолютном нормоценозе (70% случаев). Таким образом, вероятность доминирования *L. iners* была выше при дисбиотических состояниях и составила 96% при выраженном и 86% при умеренном дисбиозе.

При нормоценозах на фоне доминирования *L. iners* отмечали более высокие средние количества УПМ: *Eubacterium spp.* ($10^{4,7}$ против $10^{3,7}$, $p=0,007$), микроорганизмов группы MVD ($10^{3,4}$ против 10^3 , $p=0,001$) и микроорганизмов группы GPP (10^4 против $10^{3,6}$, $p=0,001$). *A. vaginae* выявляли в среднем количестве $10^{2,9}$, что достоверно не отличилось от аналогичного показателя в референтной группе (рисунок 3).

При дисбиозах на фоне доминирования *L. iners* отмечали наибольшую кратность прироста трех из четырех групп УПМ (группы GPP и MVD, *A. vaginae*): среднее количество микроорганизмов группы GPP увеличивалось в 2512 раз, *Eubacterium spp.* — в 20 раз, группы MVD — в 5012 раз, *A. vaginae* — в 19553 раза (рисунок 4). Примечательно, что только при доминировании *L. iners* наблюдается такой колоссальный прирост сразу трех групп УПМ: группы GPP, группы MVD и *A. vaginae*.

Таким образом, в обследованной нами группе женщин *L. iners* оказался наиболее распространенным видом вагинальных лактобацилл, причем присутствовал как у женщин, состояние микробиоценоза которых соответствовало нормоценозу, так и у пациенток с дисбиотическими нарушениями. Причем вероятность его выявления, а тем более доминирования значительно повышалась именно при дисбиозах, особенно при выраженных. Означает ли это, что доминирование *L. iners* является неблагоприятным прогностическим фактором по сравнению с *L. crispatus*? Следует ли рассматривать *L. iners* как антипод *L. crispatus*?

Недавние исследования показали, что *L. iners* обладает рядом приспособительных механизмов, позволяющих ему существовать при разных состояниях вагинальной экосистемы [26, 30]. *L. iners* может использовать альтернативные питательные субстраты (например, глицерол), обладает генами целого ряда стрессовых протеинов, а также способен изменять уровень экспрессии отдельных генов в сотни раз при изменении условий внешней среды, в частности при повышении уровня pH. Полученные данные объясняют, почему данный вид лактобацилл так часто выявляется при вы-

раженных дисбиотических нарушениях, тогда как другие лактобациллы либо погибают, либо их количество становится ниже детектируемого порога.

Особенности вагинального микробиоценоза при доминировании *L. gasseri*

L. gasseri выявляли у 117 (19,2%) женщин, в том числе у 75 (12,3%) — в качестве доминирующего вида (рисунки 1А, 1Б).

Индекс доминирования для *L. gasseri* был наибольшим в группе пациенток с умеренным дисбиозом — 74% (рисунок 2). То есть, данный вид при условии его выявления доминировал у женщин с умеренным дисбиозом в 74% случаев. Тогда как при выраженном дисбиозе *L. gasseri* доминировал только у 57% женщин, у которых выявляли данный вид, а при абсолютном нормоценозе — у 53% обследованных.

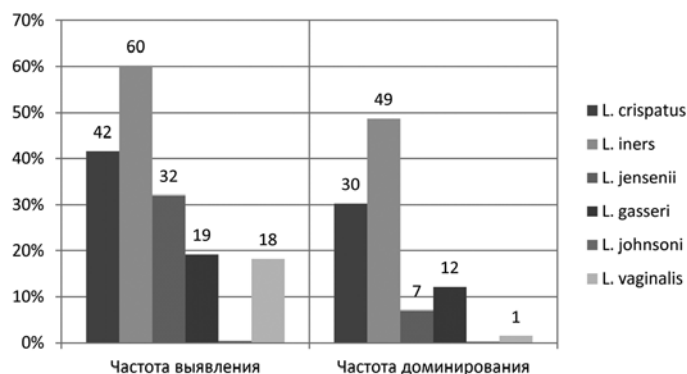


Рисунок 1. Частота выявления (А) и доминирования (Б) отдельных видов лактобацилл (n=608)

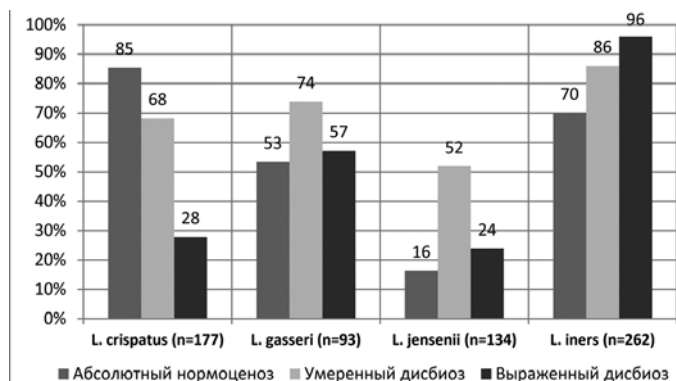


Рисунок 2. Индекс доминирования для видов *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* при абсолютном нормоценозе, умеренном и выраженном дисбиозе.

При нормоценозах на фоне доминирования *L. gasseri* не выявляли значимых различий по количеству УПМ в сравнении с референтной группой (рисунок 3). Среднее количество микроорганизмов группы GPP составило $10^{3,9}$, *Eubacterium spp.* — 10^4 , группы MVD — $10^{2,9}$, *A. vaginae* — $10^{2,8}$.

На фоне доминирования *L. gasseri* при дисбиозах отмечали увеличение количества микроорганизмов группы GPP в 501 раз, *Eubacterium spp.* — в 100 раз, группы MVD — в 6 раз. Среднее количество *A. vaginae* оставалось прежним (рисунок 4). То есть, по большому счету, при доминировании видов *L. crispatus* и *L. gasseri* наблюдали примерно одинаковую картину: неизменное количество (или даже небольшое снижение) *A. vaginae* и умеренное увеличение количества остальных УПМ, в основном за счет группы GPP.

Таким образом, *L. gasseri* является третьим по частоте выявления и доминирования видом вагинальных лактобацилл после *L. iners* и *L. crispatus*. Исключение составляют промежуточные состояния биоценоза, а именно, умеренный дисбиоз, при которых значительно повышается вероятность доминирования *L. gasseri*. Количество УПМ на фоне доминирования *L. gasseri* при нормоценозах минимальны и не отличаются от аналогичных показателей при доминировании *L. crispatus*, а при дисбиозах наблюдается умеренное увеличение количества УПМ (в основном за счет груп-

пы GPP).

Прогностическое значение выявления *L. gasseri* в качестве доминирующего вида нуждается в дополнительном осмыслении. Потенциально неблагоприятным может быть сочетание *L. gasseri* с *L. iners*, так как на фоне доминирования последнего наблюдается самый большой прирост УПМ при дисбиозах. Сочетание *L. gasseri/L. crispatus* возможно расценивать как более благоприятное, так как количества УПМ и кратность их прироста при доминировании данных видов минимальны.

Особенности вагинального микробиоценоза при доминировании *L. jensenii*

Вид *L. jensenii* выявляли у 195 (32,1%) женщин, однако доминировал данный вид только в 43 (7,1%) случаях (рисунки 1А, 1Б). В отличие от трех наиболее распространенных видов (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri*) *L. jensenii* чаще выявляли в качестве сопутствующего (или вспомогательного) вида лактобацилл. Тем не менее, данный вид являлся доминирующим у 7,1% пациенток, что обязывает рассматривать его как одного из ключевых элементов лактофлоры.

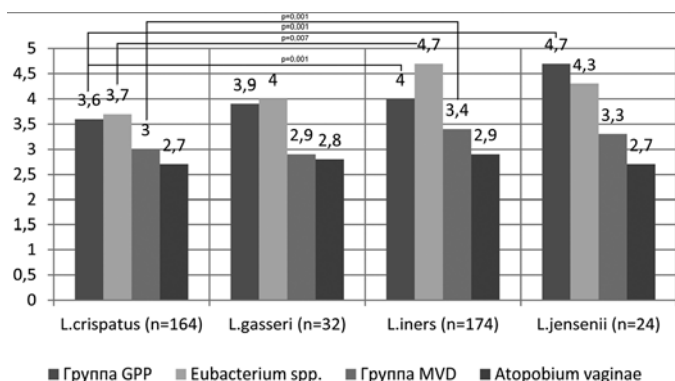


Рисунок 3. Средние количества отдельных групп УПМ в зависимости от доминирующего вида лактобацилл. Данные для всех групп представлены в lg. Соединительными линиями отмечены достоверно различающиеся показатели.

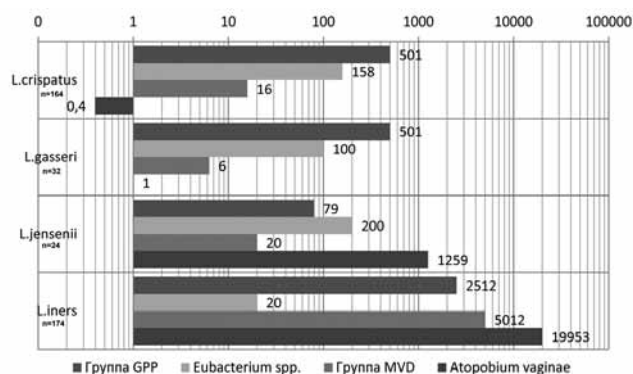


Рисунок 4. Кратность прироста отдельных групп УПМ при дисбиозах в зависимости от доминирующего вида лактобацилл. Для расчета данного показателя средние количества отдельных групп УПМ при дисбиозах делили на их средние количества при нормоценозах. Для удобства восприятия представленные данные прологарифмированы (по десятичному логарифму), все значения подписаны.

Индекс доминирования для *L. jensenii* был наибольшим в группе пациенток, состояние микробиоценоза влагалища которых отвечало критериям умеренного дисбиоза — 52% (рисунок 2). Тогда как при выраженном дисбиозе индекс доминирования *L. jensenii* составил 24%, а при абсолютном нормоценозе — лишь 16%. В целом распределение индекса доминирования *L. jensenii* повторяет таковое у *L. gasseri*. Однако в каждой отдельно взятой категории *L. gasseri* доминирует в 1,5–3 раза чаще, чем *L. jensenii*. Но при этом в случае одновременного выявления данных двух видов (22 пробы) *L. jensenii* доминировал в 9 случаях, а *L. gasseri* — всего в 1 случае.

При нормоценозах на фоне доминирования *L. jensenii* отмечали

более высокое количество микроорганизмов группы GPP в сравнении с референтной группой ($10^{4,7}$ против $10^{3,6}$, $p=0,001$). Средние количества других групп УПМ достоверно не отличались от данных значений в референтной группе: *Eubacterium spp.* выявлялись в среднем количестве $10^{4,3}$, микроорганизмы группы MVD — $10^{3,3}$, *A. vaginae* — $10^{2,7}$ (рисунок 3).

Количества всех четырех групп УПМ на фоне доминирования *L. jensenii* увеличивались при дисбиозах: среднее количество микроорганизмов группы GPP увеличивалось в 79 раз, *Eubacterium spp.* — в 200 раз, группы MVD — в 20 раз, *A. vaginae* — в 1259 раз (рисунок 4). То есть при доминировании *L. jensenii* отмечали умеренный прирост 3 групп УПМ: *Eubacterium spp.*, группы GPP и группы MVD и выраженный прирост *A. vaginae* (но тем не менее не столь выраженный как при доминировании *L. iners*).

Таким образом, доминирование *L. jensenii* следует расценивать как прогностически неблагоприятный признак. Однако данный вид редко является доминирующим и чаще выявляется как вспомогательный вид, тогда как доминирующими являются виды *L. crispatus* и *L. iners*. В случае выявления сочетания *L. iners/L. jensenii* прогноз будет менее благоприятным, чем при выявлении сочетания *L. crispatus/L. jensenii*.

Заключение

Отдельные виды лактобацилл с различной частотой обнаруживались и доминировали у пациенток с абсолютным нормоценозом, умеренным и выраженным дисбиозами. Вагинальная лактофлора чаще была представлена преимущественно *L. iners* (48,5% случаев) и *L. crispatus* (30,3% случаев), реже — *L. gasseri* и *L. jensenii* (12,3% и 7,1% случаев, соответственно). В зависимости от состояния микробиоценоза влагалища различалась вероятность присутствия микробиоценоза отдельных видов лактобацилл. Для *L. crispatus* вероятность доминирования выше всего при абсолютном нормоценозе (85%), *L. gasseri* и *L. jensenii* — при умеренном дисбиозе (74% и 52%, соответственно), а *L. iners* — при выраженном дисбиозе (96%). Различались средние количества УПМ на фоне доминирования отдельных видов лактобацилл: при доминировании видов *L. crispatus* и *L. gasseri* они минимальны, а при доминировании вида *L. jensenii* и, особенно, при доминировании *L. iners* — максимальны.

Полученные в ходе настоящего исследования данные позволяют утверждать, что прогностически наиболее благоприятным вариантом микробиоценоза влагалища является абсолютный нормоценоз с доминированием *L. crispatus*. Такой вариант нормоценоза будет обладать большей устойчивостью к воздействию различных эндогенных и экзогенных факторов. Нормоценоз с доминированием *L. iners*, *L. gasseri* или *L. jensenii* следует расценивать как менее благоприятный и стабильный вариант биоценоза, который потенциально может трансформироваться в дисбиоз.

Роль *L. iners* в формировании различных видов биоценоза влагалища нуждается в дальнейшем осмыслении. Способность данного вида доминировать при нормоценозе и сохраняться при дисбиотических состояниях с повышенным уровнем pH наводит на мысль, что адаптивный потенциал *L. iners* может обеспечивать реколонизацию влагалища другими видами лактобацилл после устранения инициирующего фактора дисбиоза [26]. В таком случае *L. iners* можно рассматривать как буфер между нормоценозом и дисбиозом, а его выявление в сочетании с *L. crispatus*, как дополнительный маркер устойчивости микробиоценоза к воздействиям факторов окружающей среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. Microbes on the human vaginal epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 31;102(22):7952-7.
2. Goldenberg RL, Klebanoff MA, Nugent R, Krohn MA, Hillier S, Andrews WW. Bacterial colonization of the vagina during pregnancy in four ethnic groups. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Am J Obstet Gynecol. 1996 May;174(5):1618-21.
3. Royce RA, Jackson TP, Thorp JM Jr, Hillier SL, Rabe LK, Pastore LM, Savitz DA. Race/ethnicity, vaginal flora patterns, and pH during pregnancy. Sex Transm Dis. 1999 Feb;26(2):96-102.
4. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T,

Lanzafame P, De Seta F, Quadrioglio F, de Aloysio D, Guaschino S. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. J Clin Microbiol. 2002a Jun;40(6):2147-52.

5. Eschenbach DA, Patton DL, Hooten TM et al. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. J Infect Dis 2001; 183: 913-918.

6. Eschenbach DA, Thwinn SS, Patton DL et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge and microflora. Clin Infect Dis 2000; 30: 901-907.

7. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vanechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. BMC Microbiol. 2009 Jun 2;9:116.

8. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4680-7.

9. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. PLoS ONE 2010;5:e10197.

10. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. J Infect Dis 2010; 202:1907–15.

11. Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. Interdiscip Perspect Infect Dis 2008;2008: 750479.

12. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. AIDS. 2008 Jul 31;22(12):1493-501.

13. Rathod SD, Krupp K, Klausner JD, Arun A, Reingold AL, Madhivanan P. Bacterial vaginosis and risk for Trichomonas vaginalis infection: a longitudinal analysis. Sex Transm Dis. 2011 Sep;38(9):882-6.

14. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2007 Oct;45(10):3270-6.

15. Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyax SE. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;78(4):321-7.

16. Kiss H, Kögler B, Petricevic L, et al. Vaginal Lactobacillus microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy. BJOG 2007; 114:1402–7.

17. Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL. Colonization of the rectum by Lactobacillus species and decreased risk of bacterial vaginosis. J Infect Dis 2005;192:394–8.

18. Fredricks DN. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. Anaerobe. 2011 Aug;17(4):191-5.

19. Wertz J, Isaacs-Cosgrove N, Holzman C, Marsh TL. Temporal Shifts in Microbial Communities in Nonpregnant African-American Women with and without Bacterial Vaginosis. Interdiscip Perspect Infect Dis 2008;2008:181253.

20. Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. Appl Environ Microbiol 2003;69:97–101.

21. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, De Backer E, Temmerman M, Vanechoutte M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. BMC Microbiol. 2005 Oct 14;5:61.

22. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Association between Lactobacillus species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. BMC Infect Dis. 2007 Nov 7;7:128.

23. Ferris MJ, Norori J, Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH. Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis

flora following metronidazole treatment. J Clin Microbiol. 2007 Mar;45(3):1016-8.

24. Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. J Obstet Gynaecol Res. 2009 Jun;35(3):525-32.

25. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1812-9.

26. 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 USA. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4688-95.

27. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. J Infect Dis. 1999 Dec;180(6):1950-6.

28. 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.

29. Ворошилина Е.С. Совершенствование методических подходов к оценке микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста: дис. ... док. мед. наук: 02.03.02/ Ворошилина Екатерина Сергеевна, ГОУВПО «Челябинская государственная медицинская академия», Челябинск, 2012, 244 с.

30. 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.

Авторская справка

Зорников Данила Леонидович

аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет, Российская Федерация, 620109, Екатеринбург, ул. Ключевская 17
phenix520@yandex.ru

Тумбинская Лидия Викторовна

к.б.н., заместитель руководителя службы организации медицинской помощи и информационного сервиса
ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова»
Российская Федерация, 117513, Москва, ул. Академика Опарина 4
l_tumbinskaya@oparina4.ru

Ворошилина Екатерина Сергеевна

д.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет заведующая лабораторией ООО МФЦ «Гармония», г. Екатеринбург
Российская Федерация, 620026, Екатеринбург, ул. Тверитина 16
voroshilina@gmail.com

Zornikov D.L., Tumbinskaya L.V., Voroshilina E.S.
RELATIONSHIP VAGINAL LACTOBACILLI SPECIES WITH COMMON PROPORTION OF LACTOBACILLUS SPP. IN VAGINAL MICROBIOCENOSIS AND AMOUNTS OF MICROORGANISMS, ASSOCIATED WITH DYSBIOSIS

Ural State medical University, Ekaterinburg;

Medical center «Garmonia», Ekaterinburg;

Academician V.I. Kulakov Research Center of Obstetrics,

Gynecology, and Perinatology MZ, Moscow

Russian Federation

Abstrakt. The aim of this research was to study the vaginal microbiocenosis with some species of lactobacilla being dominant and to evaluate the prognostic validity of finding dominating lactobacilla in

women of reproductive age.

608 women were examined. The test material was collected into the Eppendorf tube containing 1 ml of normal saline solution from the posterolateral wall of the vagina. The study of vaginal microbiocenosis and the genotyping of six different species of lactobacilla (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*) was conducted with real-time PCR. Depending on the amount of lactobacilla and opportunistic pathogens 4 groups of vaginal microbiocenosis were distinguished: absolute normocenosis, relative normocenosis, moderate dysbiosis and expressed dysbiosis.

Different species of lactobacilla were discovered in patients with absolute normocenosis, moderate and expressed dysbiosis. The dominating lactobacilla were mostly *L. iners* (48,5%) and *L. crispatus* (30,3%), or in some cases *L. gasseri* and *L. jensenii* (12,3% and 7,1% respectively).

The biggest possibility of *L. crispatus* domination was noted in patients with absolute normocenosis (85%), the possibility of *L. gasseri* and *L. jensenii* domination was noted in patients with moderate dysbiosis (74% and 52% respectively) and the biggest possibility of *L. iners* domination was noted in patients with expressed dysbiosis (96%). When *L. crispatus* and *L. gasseri* were dominant the amount of opportunistic pathogens were less than when *L. jensenii* and *L. iners* were dominant.

Data gathered in this research allows us to conclude that absolute normocenosis with *L. crispatus* being dominant is the variant with the greatest prognostic validity. Normocenosis with *L. iners*, *L. gasseri* or *L. jensenii* would be less stable and might develop into dysbiosis. Identifying the role of *L. iners* in forming different types of vaginal biocenosis requires further research.

Keywords: vaginal microbiocenosis, vaginal lactobacilla, vaginal dysbiosis, PCR, *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*

REFERENCES

1. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. Microbes on the human vaginal epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 31;102(22):7952-7.

2. Goldenberg RL, Klebanoff MA, Nugent R, Krohn MA, Hillier S, Andrews WW. Bacterial colonization of the vagina during pregnancy in four ethnic groups. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Am J Obstet Gynecol. 1996 May;174(5):1618-21.

3. Royce RA, Jackson TP, Thorp JM Jr, Hillier SL, Rabe LK, Pastore LM, Savitz DA. Race/ethnicity, vaginal flora patterns, and pH during pregnancy. Sex Transm Dis. 1999 Feb;26(2):96-102.

4. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, De Seta F, Quadrioglio F, de Aloysio D, Guaschino S. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. J Clin Microbiol. 2002a Jun;40(6):2147-52.

5. Eschenbach DA, Patton DL, Hooten TM et al. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. J Infect Dis 2001; 183: 913-918.

6. Eschenbach DA, Thwinn SS, Patton DL et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge and microflora. Clin Infect Dis 2000; 30: 901-907.

7. Verstraalen H, Verhelst R, Claeyss G, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. BMC Microbiol. 2009 Jun 2;9:116.

8. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci USA. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4680-7.

9. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. PLoS ONE 2010;5:e10197.

10. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. J Infect Dis 2010; 202:1907-15.

11. Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota

- and bacterial vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008;2008:750479.
12. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. 2008 Jul 31;22(12):1493-501.
 13. Rathod SD, Krupp K, Klausner JD, Arun A, Reingold AL, Madhivanan P. Bacterial vaginosis and risk for *Trichomonas vaginalis* infection: a longitudinal analysis. *Sex Transm Dis*. 2011 Sep;38(9):882-6.
 14. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2007 Oct;45(10):3270-6.
 15. Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, Sobel JD, Gyax SE. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;78(4):321-7.
 16. Kiss H, Kögler B, Petricevic L, et al. Vaginal *Lactobacillus* microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy. *BJOG* 2007; 114:1402-7.
 17. Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2005;192:394-8.
 18. Fredricks DN. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. *Anaerobe*. 2011 Aug;17(4):191-5.
 19. Wertz J, Isaacs-Cosgrove N, Holzman C, Marsh TL. Temporal Shifts in Microbial Communities in Nonpregnant African-American Women with and without Bacterial Vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008;2008:181253.
 20. Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:97-101.
 21. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol*. 2005 Oct 14;5:61.
 22. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect Dis*. 2007 Nov 7;7:128.
 23. Ferris MJ, Norori J, Zozaya-Hinchliffe M, Martin DH. Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. *J Clin Microbiol*. 2007 Mar;45(3):1016-8.
 24. Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009 Jun;35(3):525-32.
 25. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1812-9.
 26. 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 USA*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4688-95.
 27. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*. 1999 Dec;180(6):1950-6.
 28. Voroshilina E.S., Donnikov A.E., Plotko E.E., Tumbinskaya L.V., Hajutin L.V. Biocenoz vlagalishha s tochki zrenija kolichestvennoj polimeraznoj cepnoj reakcii: chto est' norma? [Vaginal biocenosis in terms of the quantitative polymerase chain reaction: what is the norm?], *Akusherstvo i ginekologiya*. 2011; 1: 57-65 (in Russian).
 29. Voroshilina E.S. Sovershenstvovanie metodicheskikh podhodov k ocnke mikrobiocenoza vlagalishha u zhenshhin reproduktivnogo vozrasta. Dokt. Diss. [Improvement of methodical approaches to the vaginal microbiocenosis's evaluation of reproductive age women]. Cheljabinsk 2012, 244 p.
 30. 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.

Authors

Zornikov Danila L.
postgraduate student. Department of microbiology, virology and immunology
GBOU VPO Ural State medical University
Russian Federation, 620109 Yekaterinburg, Klyuchevskaya str. 17
e-mail: phenix520@yandex.ru

Tumbinskaya Lidija V.
Candidate of biological science, Academician V. I. Kulakov Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology
Russian Federation, 117513 Moscow, Oparina str. 4,
e-mail: l_tumbinskaya@oparina4.ru

Voroshilina Ekaterina S.
Doctor of medical science, docent, GBOU VPO Ural State medical University MZ, Medical center «Garmonia», Ekaterinburg
Russian Federation, 620026 Ekaterinburg, Tveritina str. 16
e-mail: voroshilina@gmail.com.