

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КОШЕЧКИН
Станислав Игоревич

**Разработка диагностической панели для изучения видового разнообразия
вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной
микробиоты**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
В. В. Демкин

Москва 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
АКТУАЛЬНОСТЬ РАБОТЫ.....	4
СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ	5
ЦЕЛЬ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ	5
НАУЧНАЯ НОВИЗНА	6
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ	6
ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ	7
ПУБЛИКАЦИИ.....	98
ОБЪЕМ И СТРУКТУРА РАБОТЫ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. ВВЕДЕНИЕ	9
1.2. ОСОБЕННОСТИ КЛАССИФИКАЦИИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ	10
1.3. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ МИКРОБИОТ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ	15
1.3.1. Микроскопия	16
1.3.2. Микробиологические методы.....	16
1.3.3. Метод ПЦР	18
1.3.4. ДНК-чипы и методы секвенирования	20
1.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛАКТОБАКТЕРИЙ.....	22
1.5. ТИПЫ ВАГИНАЛЬНЫХ МИКРОБИОТ	24
1.5.1. Классификация вагинальных микробиот	24
1.5.2. <i>L. crispatus</i> – доминантные микробиоты.....	27
1.5.3. <i>L. iners</i> –доминантные микробиоты	30
1.5.4. Вагинальные микробиоты без доминирования лактобактерий.....	31
1.6. ПРОБИОТИКИ НА ОСНОВЕ ЛАКТОБАКТЕРИЙ	31
1.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
2.1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ И ПОИСК КОНСЕНСУСНЫХ УЧАСТКОВ	35
2.2. ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ.....	35
2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК	36

2.4. ПЦР	37
2.5. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТ-СИСТЕМ	37
2.6. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ И ИСКУССТВЕННЫЕ МАТРИЦЫ.....	38
2.7. КЛИНИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ.....	40
2.8. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ	40
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	42
3.1. АНАЛИЗ ГЕНОМОВ, ПОДБОР ПЕРСПЕКТИВНЫХ МИШЕНЕЙ.....	42
3.2. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ГЕНА RPLK	43
3.2.1. Праймеры.....	43
3.2.2. Группоспецифичный зонд.....	47
3.2.3. Аналитические характеристики тест-системы для группового определения лактобактерий.....	49
3.2.4. Видо-специфичные зонды.....	50
3.2.5. Аналитические характеристики панели тест-систем для видовой идентификации вагинальных лактобактерий.....	52
3.3. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ГЕНА TUF.....	54
3.3.1. Анализ праймеров, описанных в литературе	54
3.3.2. Разработка оригинальных праймеров для амплификации участка гена tuf.....	56
3.3.3. Видоспецифичные зонды на основе гена tuf.....	58
3.4. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ В ОБРАЗЦАХ, СОДЕРЖАЩИХ ДНК ДВУХ ВИДОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ ОДНОВРЕМЕННО	60
3.5. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ НОРМИРОВАНИЯ.....	61
3.6. ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ВАГИНАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ПО ЛАКТОБАКТЕРИАЛЬНОМУ ИНДЕКСУ.....	65
3.7. ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ВАГИНАЛЬНЫХ МИКРОБИОТАХ РОССИЙСКИХ ЖЕНЩИН	68
3.8. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДОМИНИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ В ВАГИНАЛЬНЫХ МИКРОБИОТАХ РОССИЙСКИХ ЖЕНЩИН.....	71
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	74
ВЫВОДЫ.....	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	82

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Микробиота репродуктивного тракта женщин является сложной и равновесной системой, основным компонентом которой являются лактобактерии. Доминирование лактобактерий служит показателем благополучия репродуктивной системы женщины. До середины XX века все лактобактерии, выделяемые из вагинального секрета приписывали к одному виду - *Lactobacillus acidophilus*. Исследования уже в 21 веке с использованием молекулярно-генетических методов показали, что вагинальная микробиота представляет собой сложное микробное сообщество, в котором лактобактерии представлены несколькими видами, среди которых наиболее часто встречаются 4 вида: *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. crispatus*. О закономерностях распространения различных видов и роли каждого из них в поддержании вагинального микробиоценоза имеется много противоречивых данных, и в целом эти вопросы остаются предметом активного изучения. Лактобактерии представляют интерес и как объект отбора перспективных видов для разработки пробиотических препаратов и оценки эффективности их применения в контексте персонифицированной медицины.

Видовая идентификация лактобактерий не является тривиальной задачей. Почти 100 лет морфологические, культуральные и биохимические методы идентификации оставались единственными критериями при определении видовой принадлежности микроорганизмов. Развитие лабораторной техники и молекулярно-генетических методов исследования позволило установить новые критерии для таксономии лактобактерий и предложить новые методические подходы для видовой идентификации этих микроорганизмов. Один из таких подходов, использующий метод ПЦР в реальном времени, позволяет на своей платформе разрабатывать диагностические тест-системы для детекции индивидуальных видов бактерий и определения их количественного содержания в сложных биологических образцах, в том числе в мультиплексном формате. Большая фенотипическая и генетическая гетерогенность лактобактерий, неопределенность таксономических критериев, генетический полиморфизм близкородственных видов создает немалые трудности при разработке ПЦР систем как на родовом, так и на видовом уровнях. Расшифровка полногеномных последовательностей лактобактерий предлагает новые возможности для подбора новых генетических мишеней и разработки на их основе методов детекции и идентификации вагинальных лактобактерий.

Поэтому, разработка новых методов детекции вагинальных видов лактобактерий на основе новых генетических мишеней, учитывающих современные представления о видовом разнообразии с возможностью количественной оценки общего содержания лактобактерий, является актуальной и значимой задачей для современной науки.

Степень разработанности темы

Попытки идентифицировать и количественно определить лактобактерии, используя метод ПЦР, начались достаточно давно и продолжаются и по настоящее время. В большинстве ПЦР тест-систем для амплификации лактобактериальной ДНК в качестве мишени использовали гены *16S pPHK* или спейсерный участок между генами *16S* и *23S pPHK* (далее просто «спейсер») [135]. Выбор этих мишеней определялся прежде всего доступностью нуклеотидных последовательностей этих генетических областей и использованием гена *16S pPHK* в качестве филогенетического маркера в таксономии бактерий. Хотя гены рРНК имеют повсеместное распространение и консервативны, их использование в качестве амплификационных мишеней несет в себе потенциальные проблемы. Во-первых, «излишняя» консервативность генов рРНК нередко приводит к проблемам со специфичностью ПЦР [19, 67], что особенно актуально для такого филогенетически сложного таксона как род *Lactobacillus*. Во-вторых, различные виды *Lactobacillus* имеют различное число копий рибосомальных оперонов, что может приводить к неверной количественной оценке.

В поисках более подходящих альтернатив для дифференциации или для видоспецифической детекции вагинальных лактобактерий предлагались и другие генетические мишени: *tuf* и *hsp60*, кодирующие фактор элонгации Tu и белок теплового шока HSP60 соответственно [20, 116]. Выбор этих генов не был обусловлен результатом систематического поиска соответствующей мишени у заданной группы лактобактерий. Кроме того, методы на основе амплификации генов *tuf* и *hsp60* не позволяли определять интегральный показатель общего содержания лактобактерий.

Цель диссертационной работы

Целью данной работы было на основе сравнительного анализа геномов подобрать адекватную мишень и на основе технологии ПЦР в реальном времени разработать метод детекции и идентификации вагинальных лактобактерий, предназначенный для анализа видового разнообразия лактобактерий микробиоты женского репродуктивного тракта.

Для достижения поставленной цели, были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать генетические мишени, удобные для разработки тест-систем, предназначенных для детекции и идентификации широкого круга вагинальных видов лактобактерий.
2. Разработать кандидатную тест-систему для совокупной количественной оценки вагинальных лактобацилл.
3. Разработать мультиплексные тест-системы для видовой идентификации вагинальных лактобактерий.
4. Определить аналитические характеристики разработанных –тест-систем.

5. Разработать критерии оценки состояния микробиоты урогенитального тракта на основе данных количественного содержания лактобактерий и их видового состава.

6. Определить видовое разнообразие лактобактерий доминирующих в вагинальных микробиотах женщин, проживающих в Российской Федерации.

Научная новизна

Впервые для видовой идентификации лактобактерий в качестве генетической мишени предложен ген *rplK*, кодирующий рибосомальный белок L11.

На основе метода ПЦР в реальном времени, обеспечивающего амплификацию маркерного участка гена *rplK*, разработана тест-система для количественного определения общего содержания лактобактерий.

Разработан метод определения интегрального количества вагинальных лактобактерий более специфичный, чем методы на основе амплификации гена *16S pPHK*.

На основе метода ПЦР в реальном времени, обеспечивающего амплификацию маркерного участка гена *rplK*, разработана не имеющая аналогов в мире диагностическая панель «Лактоспектр», позволяющая в двух реакциях идентифицировать 11 видов вагинальных лактобактерий: 4 индивидуальных вида - *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. acidophilus*, одной пары видов *L. gasseri* и *L. johnsonii* без дифференциации и группы лактобактерий из 5-ти видов также без дифференциации - *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*.

Показано, что независимо от региона проживания, в широком диапазоне возрастов, как при наличии, так и при отсутствии заболеваний органов малого таза, в качестве основных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин встречаются только 4 вида: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. gasseri*. Другие виды лактобактерий встречаются крайне редко и являются минорными компонентами.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанные тест-системы являются удобным инструментом для скрининговых исследований и предоставляют широкие возможности для изучения распространенности видов вагинальных лактобактерий. С помощью разработанной системы нормирования и методики математического обсчета получаемых результатов предлагается система комплексной оценки клинического состояния микробиоты. Результаты таких исследований могут быть крайне важны как для понимания фундаментальных основ функционирования микробиоценоза женского репродуктивного тракта, так и для разработки и назначения пробиотиков для коррекции дисбиотических состояний в рамках концепции персонализированной медицины.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к разработке, не имеющей аналогов, панели ПЦР тест – систем для изучения видового разнообразия вагинальных лактобактерий и оценки состояния вагинальной микробиоты. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использованы молекулярно-генетические, биологические, биоинформатические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Амплификационная мишень на основе гена *rplK*, кодирующего рибосомальный белок L11, имеет неоспоримые преимущества перед другими мишенями, для детекции и видовой идентификации вагинальных лактобактерий, для количественного определения их интегрального содержания.

2. Разработан метод рвПЦР для определения общего содержания вагинальных лактобактерий в пробе. Корректность работы системы обеспечивается тем, что в основе определения лежит амплификация гена *rplK*, который у всех потенциальных мишеней имеет одинаковое число копий.

3. На основе амплификации гена *rplK* разработана уникальная панель мультиплексных тест-систем, обеспечивающих детекцию и идентификацию 11 видов лактобактерий. Детектируемые виды лактобактерий потенциально могут присутствовать в вагинальном секрете.

4. При всем возможном разнообразии вагинальных лактобактерий только 4 вида: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. gasseri*, - встречаются в качестве основных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин. Другие виды лактобактерий встречаются крайне редко и являются минорными компонентами.

5. Доминирование *L. crispatus* ассоциировано с нормальной микрофлорой, а доминирование *L. iners* с вагинальным дисбиозом. Вид *L. jenseni* ассоциирован с *L. iners* и скорее всего является транзиторным на фоне отсутствия *L. crispatus* и/или *L. gasseri*.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук в рамках совместных научных работ с Московским центром планирования семьи и репродукции, Ивановской государственной медицинской академией и ООО «Нанодиагностика». Достоверность результатов обеспечивается проведением исследовательских работ современными методами в соответствии с международными рекомендациями. Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на ежегодных внутренних конференциях ИМГ РАН.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании и выполнении экспериментальной части работ, проведении скрининговых исследований, анализе и статистическом обсчете полученных результатов, поиске организаций для ведения совместной научной деятельности и заключении с ними договоров о научно – техническом сотрудничестве. Отдельные разделы работы выполнены совместно с к.м.н. Демкиным В.В.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в международных рецензируемых научных журналах и 7 тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 98 страницах машинопечатного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, список сокращений и список литературы, содержащий 158 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 21 рисунками.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Введение

Все части организма человека, имеющие контакт с окружающим миром, населены миллиардами бактерий, микроскопических грибов и простейших. Совокупность видов микроорганизмов населяющих определенную нишу называют микробиотой [141]. По некоторым оценкам микробиота человека включает около 40 000 видов, принадлежащих к 1 800 родам [49, 50]. Средняя масса микробиоты взрослого человека составляет 1-2 кг [49], что сопоставимо с массой его мозга (1,5 кг). В общей сложности микроорганизмами экспрессируется более 9,9 миллионов генов, не встречающихся в клетках человека [83], что примерно в 500 раз превышает количество собственных белок-кодирующих генов человеческого генома (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Homo_sapiens/108/).

Взаимосвязь между микро- и макроорганизмами находится в фокусе растущего числа исследовательских проектов и работ. Проект «Микробиом человека» и Европейский консорциум метагеномики кишечного тракта (MetaHIT) созданы около десяти лет назад и нацелены на описание качественного и количественного состава микробиот различных биотопов тела человека.

Вагинальный тракт является важной частью организма, предоставляющей возможность формирования структурированного микробного сообщества, которое принято называть вагинальной микробиотой. Изучение состава и функции данной микробиоты представляет особый интерес, так как она занимает нишу с высоким риском инвазии патогенов. Считается, что вагинальная микробиота выступает в роли защитного барьера для организма хозяина от различных патогенных бактерий, вирусов и микроскопических грибов. Кроме того, она играет важную роль при формировании микробиот новорожденных [39]. Здоровая вагинальная среда (без симптомов инфекций и с благоприятным влиянием на зачатие и беременность) характеризуется преобладанием видов *Lactobacillus*. Однако, наши представления о видовом составе лактобактерий в вагинальной микробиоте претерпевают существенную эволюцию в последние десятилетия. На данный момент считается, что у 70-80% женщин в вагинальной микробиоте доминируют виды: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* [118, 137, 157]. Влияние этих видов на вагинальное здоровье активно изучается и даже предпринимаются попытки разработки пробиотиков по принципу персонифицированной медицины [65, 66]. То есть, для лечения дисбиозов и бактериального вагиноза предлагают использовать именно те виды, которые доминировали у конкретной пациентки до развития данных состояний. Помимо основных видов, в вагинальной микробиоте описаны так называемые минорные виды

лактобактерий [118]. Могут ли эти виды доминировать в определенных условиях и как это отразится на состоянии репродуктивного здоровья неизвестно. Так же, остается объектом изучения, в какой степени индивидуальные различия в видовом составе вагинальных лактобактерий отражают расовые, возрастные, культурные, социальные, региональные и другие особенности образа жизни индивидуумов. Активно изучается феномен смены доминантного вида лактобактерий во время менструации. Продолжаются исследования ассоциации разных видов лактобактерий с исходом беременности, внутриутробной колонизацией трофобласта, распространением ИППП и бактериальным вагинозом. И это далеко не полный список фундаментальных и прикладных исследований, для которых требуется надежный инструмент видовой идентификации лактобактерий с возможностью проведения масштабных скрининговых исследований.

1.2. Особенности классификации лактобактерий

Альберт Додерлейн (1860 - 1941) был первым, кто описал вагинальные бактерии, синтезирующие молочную кислоту, которые так и стали называть «палочкой Додерлейна [38]. В 1928 эти бактерии были реклассифицированы в *Lactobacillus acidophilus* [142]. С развитием молекулярно-генетических методов, стали накапливаться данные о существенном генетическом полиморфизме штаммов, изначально приписанным к этому виду, что, в конечном итоге, привело к разделению вида *L. acidophilus* на 6 видов: *L. acidophilus sensu stricto*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, and *L. johnsonii*, - которые сформировали группу «*L. acidophilus complex*» [116]. Однако, по современным данным в вагинальной микробиоте может встречаться до двадцати видов лактобактерий [9, 118], что, возможно, отражает не истинное разнообразие вагинальных лактобактерий, а вызвано проблемами таксономии и идентификации лактобактерий.

Молочнокислые бактерии – это большая группа грамположительных бактерий, не формирующих споры, не способных к синтезу каталазы (некоторые виды способны к синтезу псевдокаталазы), относящихся к облигатным сахаролитикам и выделяющих в качестве основного конечного метаболита молочную кислоту [56]. Молочнокислые бактерии повсеместно распространены и выделяются из самых разнообразных источников, включая человека, животных и растения. Общепринятым считается, что в основе их метаболизма лежит процесс молочнокислого брожения, в результате которого образуется молочная кислота [61], однако последние молекулярные данные ставят под сомнение это утверждение [23]. Помимо молочной кислоты другими конечными метаболитами могут быть ацетат, этанол, CO₂, формиат и сукцинат [59, 61]. Молочнокислые бактерии растут в широком диапазоне температур от 2 до 53°C и

способны выдерживать рН от 3 до 8. Однако оптимальными являются температура от 30 до 40°C и рН от 5.5 до 6.2.

Для питания молочнокислых бактерий необходим определенный набор белков, аминокислот, витаминов, жирных кислот и эфиров жирных кислот. Поэтому их естественным местом обитания являются богатые среды, такие как продукты питания, вода, почва и канализация; они являются обязательным компонентом нормальной микрофлоры рта, пищевого и урогенитального трактов человека и многих животных [59].

Долгое время таксономия молочнокислых бактерий основывалась на фенотипических свойствах, таких как способ сбраживания углеводов; устойчивость к различным концентрациям NaCl; способность роста на различных средах при разных температурах и значениях рН; устойчивость к антибиотикам. Однако с появлением молекулярных методов количество критериев увеличилось: состав клеточной стенки; набор жирных кислот, изопреноидов, изопреноидных хинонов и других характерных маркеров клеток [77]. По современной классификации молочнокислые бактерии относятся к типу *Firmicutes*, классу *Bacilli*, порядку *Lactobacillales*, в котором насчитывается несколько семейств и несколько десятков родов. Предметом нашего интереса являются бактерии из рода *Lactobacillus*, относящиеся к семейству *Lactobacillaceae*. Бактерии рода *Lactobacillus* мы и будем в дальнейшем иметь в виду под термином «лактобациллы».

Изначально, лактобациллы были разделены по температуре роста и типу сбраживания гексоз [109], либо гомо-, либо гетероферментативное брожение [29, 74]. Более современная классификация [59, 61] делила лактобациллы на облигатные гомоферментативные, факультативные гетероферментативные и облигатные гетероферментативные на основании типа сбраживания сахаров и набора участвующих метаболитов. Гомоферментативные лактобациллы (объединенные под общим названием «метаболическая группа А») практически полностью (до 85%) перерабатывают гексозы в молочную кислоту используя путь Эмбдена-Мейергоффа-Парнаса или гликолиз; пентозы и глюконовая кислота ими не усваиваются. Факультативные гетероферментативные виды (метаболическая группа В) расщепляют гексозы до молочной кислоты через гликолиз, но в случае отсутствия глюкозы, способны усваивать пентозы и глюконовую кислоту при помощи, индуцированной фосфокетолазы (фермент пентозофосфатного пути) с образованием этанола, уксусной и муравьиной кислот. И, наконец, облигатные гетероферментативные лактобациллы (метаболическая группа С) используют FDB-альдозу (не фосфокетолазу) и расщепляют пентозы и гексозы только через пентозофосфатный путь (в соответствии с окислительной его частью), конечными метаболитами являются молочная кислота, этанол (иногда уксусная кислота) и CO₂ [61]. С появлением информации о видах

лактобацилл, не входящих ни в одну из метаболических групп [61], стало понятно, что классификация на основе особенностей метаболизма является недостаточной.

Колинс с соавторами [33] выполнили первый филогенетический анализ рода используя метод секвенирования гена *16S pPHK*. Виды, описанные ими, были разделены на 3 филогенетических кластера: группа *Lactobacillus delbrueckii*, группа *Lactobacillus casei-Pediococcus* (позже разделенная на 4 подгруппы) и группа *Leuconostoc*, которая так же содержит некоторые виды лактобацилл [33, 146].

Описание большого количества новых видов за последние 20 лет приводило к неоднократному пересмотру структуры рода *Lactobacillus* и формированию растущего числа различных филогенетических групп. Так, группа *Lactobacillus delbrueckii* в 1995 г была переименована в группу *Lactobacillus acidophilus* [127], однако в 2003 вновь получила свое прежнее название в связи с тем, что типовым видом группы является вид *L. delbrueckii* [60]. Тем не менее, использование обозначения «*Lactobacillus acidophilus* группа» по-прежнему встречается в научной литературе. Группа *Lactobacillus casei* была разделена на более мелкие группы, а группы *Pediococcus* и *Leuconostoc* были выделены в самостоятельные роды. Следует также заметить, что некоторые виды лактобактерий меняли свой таксономический статус в пределах семейства и перемещались из одной группы в другую, или из одного рода в другой [37, 46, 60, 124]. Несмотря на то, что исследование последовательности гена *16S pPHK* внесло большой вклад в развитие более точной классификации лактобацилл, стало очевидно, что существует лишь небольшая корреляция между традиционной классификацией, основанной на метаболических критериях, и филогенетическим родством [46, 59].

Сегодня род *Lactobacillus* является одним из самых многочисленных в бактериальном мире по видовому составу и состоит из 223-х видов. Филогенетическая структура, основанная на последовательности гена *16S pPHK*, показывает филогенетическую близость членов родов *Lactobacillus* и *Pediococcus*, как показано на Рисунок 1 - [124].

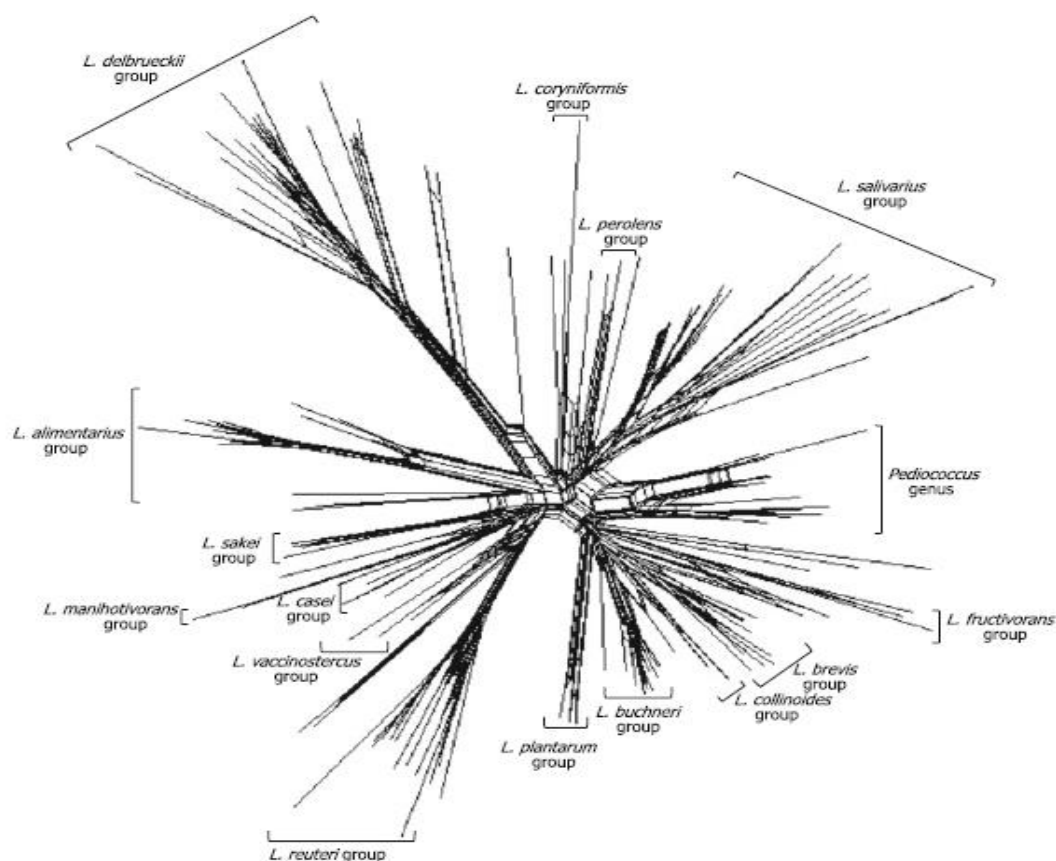


Рисунок 1 - Дендрограмма эволюционного расхождения групп рода *Lactobacillus*, построенная на основе анализа последовательностей гена *16S pPHK* [124]

В настоящее время, на основании филогенетического анализа, род *Lactobacillus* принято разделять на 15 групп:

Группа *Lactobacillus delbrueckii* состоит из 27 видов: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. amylovorus*, *L. acetotolerans*, *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylophobicus*, *L. equicursoris*, *L. fornicalis*, *L. gallinarum*, *L. gigeriorum*, *L. hamsteri*, *L. hominis*, *L. intestinalis*, *L. kalixensis*, *L. kefiranofaciens*, *L. kitasatonis*, *L. pasteurii*, *L. psittaci*, *L. taiwanensis*, *L. ultunensis* (Felis G.E. et al., 2007). Первые четыре вида из этого списка, по данным метагеномных исследований, являются основными доминирующими видами вагинальной микробиоты. Более того, большая часть видов, когда-либо описанных исследователями вагинальных микробиот, входят именно в эту группу. Таксономически это наиболее важная филогенетическая группа, из-за присутствия в ней *L. delbrueckii*, типового вида рода, с которым неразрывно связано название *Lactobacillus*. 20 из 27 видов облигатно-гомоферментативные бактерии, 6 видов факультативно-гетероферментативные и один облигатно-гетероферментативный вид. GC-насыщенность генома варьирует в пределах 33-51%, [127]. Большая часть видов содержит в клеточной стенке пептидогликан типа Lys-D-Asp. Группа демонстрирует широкую вариабельность в отношении набора синтезируемых изомеров молочной кислоты.

Так как все доминирующие вагинальные виды лактобактерий входят в группу *Lactobacillus delbrueckii*, мы не будем подробно останавливаться на характеристике видов, входящих в другие группы, а ограничимся лишь перечислением групп с указанием количества видов и основных метаболических и биохимических свойств.

Группа *Lactobacillus salivarius* включает 25 видов. Так же, как и группа *L. delbrueckii*, в основном представлена гомоферментативными (16 из 25 видов) и, иногда, факультативно-гетероферментативными бактериями (9 видов). GC-насыщенность генома составляет 32-44%.

Группа *Lactobacillus reuteri* состоит из 15 видов. В основном характеризуются как облигатно-гетероферментативные лактобациллы (за исключением *L. coleohominis* и *L. secaliphilus*, которые являются факультативно-гетероферментативными). GC-насыщенность генома составляет 38-56%.

Группа *Lactobacillus buchneri* состоит из 12 видов. Так же, как и группа *L. reuteri* в основном представлена облигатно-гетероферментативными, и, иногда, факультативно-гетероферментативными лактобациллами. GC-состав генома колеблется между 38,8 и 42%.

Группа *Lactobacillus alimentarius* включает 11 видов. Состоит из облигатно-гомоферментативных и факультативно-гетероферментативных бактерий, а GC-насыщенность генома составляет 35-40%.

Группа *Lactobacillus brevis* состоит из 10 видов. Включает в состав и факультативно- и облигатно-гетероферментативные виды. CG-состав колеблется в пределах 46-55%.

Группа *Lactobacillus collinoides* состоит из 5 видов. Все участники данной группы облигатно-гетероферментативны, а GC-состав генома варьирует в пределах 39,7-48,5%.

Группа *Lactobacillus fructivorans* состоит из 5 видов. В основном это облигатно-гетероферментативные бактерии (за исключением факультативно-гетероферментативного *L. homohiochii*). GC-насыщенность генома в пределах 35-42%.

Группа *Lactobacillus plantarum* включает 5 видов. Все представители группы обладают факультативно-гетероферментативным метаболизмом. GC-состав генома находится в рамках 44-47%.

Группа *Lactobacillus sakei* состоит из 4 видов. Все виды факультативно-гетероферментативные, а GC-состав колеблется между 41-44%.

Группа *Lactobacillus casei* состоит из 3 видов. Участники группы факультативно-гетероферментативные бактерии. GC-насыщенность генома составляет 45-47%.

Группа *Lactobacillus coryniformis* представлена тремя участниками. Все члены группы факультативно-гетероферментативные бактерии. GC-состав составляет 45%.

Группа *Lactobacillus manihotivorans* состоит из 3 видов. Представители группы гомоферментативны и характеризуются 47,6-59,2% GC-составом.

Группа *Lactobacillus perolens* состоит из 3 видов. *L. harbinensis* и *L. perolens* факультативно-гетероферментативные виды, а *L. shenzhenensis* облигатно-гетероферментативный. GC-состав колеблется в пределах 45-56%.

Группа *Lactobacillus vaccinoferus* состоит из 3 видов. Все представители группы облигатно-гетероферментативные бактерии. GC-насыщенность генома составляет 35,3-41%.

Виды, не вошедшие в группы, образуют 4 пары и 10 индивидуальных линий происхождения. Наиболее близкородственными считаются *L. rossiae* и *L. siliginis*: оба вида облигатно-гетероферментативны, GC-состав в пределах 44,6-45,5%, а их общим источником обнаружения является пшеничная закваска.

Примечательно, что виды в пределах группы не всегда проявляют одинаковые фенотипические признаки, они могут различаться типом пептидогликана в клеточной стенке, способностью к синтезу разных изомеров молочной кислоты и, что наиболее важно, метаболическим профилем, на котором основана традиционная систематика лактобацилл. И наоборот, виды из разных групп могут иметь достаточно близкие фенотипы, что ставит под сомнение возможность идентификации видов лактобактерий по данным критериям.

Последовательности гена *16S pPHK* у большинства видов *Lactobacillus* идентичны на 97-98,8% [138]. Степень идентичности гена *16S pPHK* у многих видов групп *L. delbrueckii*, *L. casei* и *L. plantarum* значительно выше, чем у остальных.

Таким образом, идентификация видов и штаммов лактобактерий представляет собой нетривиальную задачу, что стимулирует разработку новых и совершенствование имеющихся методических подходов, где ведущие позиции заняли методы, основанные на анализе генетических последовательностей. Но трудности идентификации вызваны не только несовершенством методических приемов, а также связаны и с неустойчивыми таксономическими критериями, и с расширением видового разнообразия лактобактерий. Можно отметить, что только за последние 5 лет было заявлено более 50 новых видов лактобактерий.

1.3. Методические подходы к анализу микробиот и возможности их использования для идентификации лактобактерий

Первым исследованием микробиоты человека можно считать заметки Энтони ван Левенгука про «*animalcules*» обнаруженных на внутренней стороне щеки в конце XVIII-го века, это открытие стало возможным благодаря революционному изобретению, в последствии названному «микроскоп» [115]. Последующее развитие в области микробиот человеческого организма было аналогичным образом связано с технологическими и методологическими достижениями, начиная от пионерских работ Коха и Пастера XIX-го века, заканчивая технологической

революцией XXI-го века в области омиксных и информационных технологий [99]. В результате, на сегодняшний день существуют десятки различных методов и их модификаций для идентификации микроорганизмов. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки и нуждается в исключительно правильном применении, отталкиваясь от целей и особенностей объектов исследования.

1.3.1. Микроскопия

В клинической практике, для исследования урогенитальных мазков широко используются методы микроскопии. При этом, для идентификации микроорганизмов, фиксированный препарат окрашивают различными красителями.

Самым распространенным видом окраски вагинального мазка с целью изучения микрофлоры является окраска по Граму. На основании подсчета количества морфотипов микроорганизмов в окрашенном образце, разработана методика для оценки состояния репродуктивного тракта женщин, которая нашла свое выражение в так называемых «критериях Нугента» [106]. Однако, многие виды и роды бактерий, встречающиеся в вагинальной микробиоте, имеют сходные морфотипы и, поэтому, трудно различимы при микроскопическом исследовании, это относится и к лактобактериям [1]. Более того, в зависимости от внешних условий, один вид лактобактерий может приобретать широкое морфологическое разнообразие [2]. Поэтому, возможность видовой идентификации вагинальных лактобактерий традиционными методами микроскопии отсутствует. Однако, такие возможности появились благодаря внедрению в микроскопию современных методов молекулярного анализа, в частности, метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Метод FISH был использован для изучения микробиоты кишечника [63], но он не получил широкого распространения.

1.3.2. Микробиологические методы

Культивирование на питательных средах - исторически самый первый методический подход, который, наряду с микроскопией, использовали для анализа бактерий, заселяющих вагинальную среду, и именно на его основе сложилось базовое представление о составе вагинальной микробиоты. Но основной недостаток методов культивирования – неодинаковое отношение различных видов бактерий к росту на искусственных средах. Показателен пример открытия одного из основных, как теперь известно, видов вагинальных лактобактерий – *L. iners*, который был описан лишь в 1999 г, т.к. оказалось, что этот вид не растет на твердых средах MRS и Rogosa – стандартных агаровых средах, повсеместно используемых для культивирования лактобактерий

[45]. Кроме того, последующая идентификация выращенных микроорганизмов на основании оценки культуральных и биохимических свойств плохо поддается стандартизации и требует больших трудозатрат. Различные условия культивирования (напр., состав газовой среды, температура инкубации), различия в составе сред у разных исследовательских групп могли приводить к различным результатам. Непостоянство фенотипических свойств, несовершенство критериев и методов биохимической дифференциации, на которых обычно строилась классификация лактобактерий при микробиологическом культивировании, также могли приводить к противоречивым результатам. Поэтому, микробиологические методы в чистом виде сегодня не используются для изучения видового состава вагинальных бактерий, включая лактобактерии.

Тем не менее, в связи с созданием большого количества гибридных технологий, объединяющих микробиологические и молекулярно-биологические подходы, сформировалась достаточно большая группа культуральнозависимых методов. Все они основаны на анализе уникальных свойств изолятов, выращенных на специализированных средах, различными молекулярными методами. Среди методов идентификации бактерий не связанных с анализом ДНК, о которых речь пойдет в отдельных главах (см. ниже), отметим метод матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации с последующим разделением ионов в вакууме (MALDI-ToF). Данная технология уже получила широкое распространение и продолжает набирать популярность в рутинных клинических исследованиях, благодаря простоте и доступности. Метод основан на определении набора определенных белков, состав которого является уникальным для каждого вида бактерий. Несмотря на то, что разработчики метода заявляют о 98% корреляции результатов типирования бактерий методами MALDI-ToF и секвенирования гена *16S rPHK*, результаты определения видового разнообразия лактобактерий в вагинальной микробиоте методом MALDI-ToF часто существенно отличаются от метагеномных и ПЦР исследований. Так, если по данным метагеномных исследований в вагинальной микробиоте обнаруживают около 10 видов лактобактерий [69, 89, 118, 136], то по данным MALDI-ToF исследований – в два раза больше [4, 8, 9]. Одна из причин такого сильного расхождения результатов может быть связана с влиянием методов культивирования, которые используются на предварительных этапах изучения биоценозов. Очевидно, что необходимо более широкое сравнение и валидация данного подхода относительно более достоверных ДНК-методов идентификации микроорганизмов.

1.3.3. Метод ПЦР

Большой группой методов видовой идентификации микроорганизмов, занимающей лидирующие позиции по достоверности и распространенности, являются методы, основанные на определении последовательностей маркерных участков генома микроорганизмов. Большинство из них основаны на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), впервые описанном в 1985 году в журнале Science [103]. Данный метод произвел революцию во всех областях молекулярной биологии, быстро вышел за рамки научного применения и твердо укоренился в практике современных диагностических лабораторий по всему миру. В основе метода ПЦР лежит принцип ферментативной амплификации определенного участка генома с помощью олигонуклеотидов (праймеров) и фермента ДНК-полимеразы. Праймеры на основе принципа комплементарной гибридизации взаимодействуют с уникальными участками анализируемого генома, что обеспечивает высокую специфичность анализа. Однако, основная сложность метода заключается в том, что, в случае несоответствия нескольких нуклеотидов в сайте посадки праймера, взаимодействие праймера с матрицей, пусть с меньшей эффективностью, но все равно происходит, и реакция амплификации запускается. Таким образом, возможно получение неспецифических продуктов реакции и, как следствие, ложноположительных результатов, что накладывает высокие требования к подбору участвующих в реакции олигонуклеотидов.

Метод ПЦР имеет различные методические интерпретации. Из основных следует упомянуть ПЦР с электрофорезной детекцией продуктов реакции и так называемую ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР, qPCR).

ПЦР с электрофорезной детекцией продуктов реакции сопровождается, как следует из названия, электрофорезом продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном геле, который обеспечивает физическое разделение ампликонов разного размера. Данный метод широко используется в научных лабораториях, так как дает возможность разделить по размерам специфические и неспецифические продукты реакции, и впоследствии выделить из геля только целевые фрагменты ДНК для дальнейшего использования.

Для дифференциации продуктов амплификации одинакового размера, но отличающихся по последовательности нуклеотидов, были разработаны такие методики как электрофорез в денатурирующем градиентном геле (T/DGGE) [104] и анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (T-RFLP) [88]. Эта группа методов позволяет добиться более детальной дискриминации полученных ампликонов, однако анализ существенно усложняется. В дополнение, все эти методы не имеют возможности количественной оценки амплифицируемой мишени и требуют больших трудозатрат.

Современным вариантом ПЦР является метод ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР). В отличие от ПЦР с электрофорезной детекцией, РТ-ПЦР позволяет регистрировать накопление продуктов амплификации в процессе реакции. Это достигается за счет добавления в реакционную смесь либо интеркалирующих флуоресцентных красителей, либо флуоресцентно-меченных зондов. Существует несколько разновидностей зондов для РТ-ПЦР, однако самым простым, наиболее распространенным, и, в тоже время, очень эффективным является Taqman зонд. Taqman зонд представляет собой олигонуклеотид, у которого 5'-нуклеотид модифицирован флуорофором, а 3'-нуклеотид модифицирован гасителем, поэтому в интактном состоянии флуоресценция, испускаемая флуорофором, поглощается гасителем. В процессе реакции амплификации зонд специфически гибридизуется с внутренним участком амплифицируемого фрагмента и разрушается за счет 5'-3' экзонуклеазной активности Taq-полимеразы. В результате флуорофор освобождается, флуоресценция перестает поглощаться гасителем, что увеличивает общий уровень флуоресценции раствора [64]. Подчеркнем, что расщепление зонда происходит только в случае амплификации специфичной последовательности ДНК, поэтому использование зонда повышает специфичность реакции в целом. В отличие от зондов, интеркалирующие флуоресцентные красители не являются специфичными для каких-либо последовательностей ДНК. Они генерируют флуоресцентный сигнал при образовании комплекса с любым дуплексом ДНК, поэтому рост флуоресценции будет наблюдаться и при образовании неспецифических продуктов реакции. Поэтому аналитические реакции с флуоресцентным красителем требуют высокоспецифичного праймирования. Тем не менее, с помощью интеркалирующих красителей, таких как Sybr Green I, появляется возможность по завершении амплификации провести анализ продуктов реакции путем определения температуры плавления ампликонов, что дает важную информацию для исследователя. Для получения более достоверных данных можно применять и краситель, и зонды в одной реакции.

В современных приборах существует 4 канала считывания флуоресценции, что позволяет использовать зонды, меченые различными флуорофорами, и мультиплексно определять до 4 видов мишеней в одной реакции. Помимо этого, РТ-ПЦР признан лучшим методом для количественной оценки содержания специфической ДНК, так как он позволяет определять концентрацию амплифицируемой мишени в диапазоне от 1 до 10^9 копий в реакции. На базе РТ-ПЦР разработаны и внедрены в клиническую практику наборы реагентов для определения большого спектра разнообразных бактериальных и вирусных агентов. Учитывая все вышеперечисленные преимущества, этот метод следует признать методом выбора для идентификации и дифференциации вагинальных лактобактерий в рутинных скрининговых исследованиях.

1.3.4. ДНК-чипы и методы секвенирования

Метод ПЦР вошел в качестве составного компонента аналитического протокола идентификации микроорганизмов с использованием микрочипов и секвенирования.

Микрочип представляет собой набор видоспецифичных олигонуклеотидов иммобилизованных на твердой поверхности в строго определенной последовательности [84]. Для проведения анализа, сначала проводят ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами, а затем гибридизуют ампликоны на поверхности микрочипа. В комбинации с родоспецифичными праймерами, такой метод был использован для проведения качественной оценки видового разнообразия вагинальных лактобактерий [53]. Однако, данная методика требует разработки дорогостоящих микрочипов, является псевдоколичественной, имеет другие негативные характеристики, что не способствовало ее распространению.

Золотым стандартом для описания бактериального вида считается метод секвенирования гена *16S рPHK*. Впервые ген *16S рPHK* в качестве филогенетического маркера для дифференциации бактерий был предложен в 1977 г [154]. С тех пор филогенетический анализ генов *16S рPHK* лег в основу таксономии бактерий, а секвенирование гена стало основным методом для идентификации и дифференциации бактерий.

В практическом плане для установления видовой принадлежности бактерий сначала проводят амплификацию мишени с использованием широкопрофильных праймеров, которые обеспечивают амплификацию широкого круга бактерий, а затем секвенируют полученные ампликоны. Современные технологии позволяют выполнять такие работы не только с выделенными изолятами, но и с образцами, содержащими сложные микробные сообщества, к которым относятся вагинальные микробиоты. В последнем случае для анализа гена *16S рPHK* нет необходимости амплифицировать ген целиком, а достаточно амплифицировать определенные фрагменты из вариабельных областей. После амплификации видовую принадлежность полученного набора ампликонов можно установить, применив высокопроизводительное секвенирование и биоинформационный анализ. Такой подход был использован для характеристики качественного и количественного состава вагинальной микробиоты в целом ряде работ [69, 118]. Стоит отметить, что количество копий *16S рPHK* различается для разных видов микроорганизмов, поэтому количественная оценка с помощью вышеописанного метода является условной и выражается в операционных таксономических единицах (OTUs). Помимо этого, следует иметь в виду, что данные секвенирования получаются лишь для тех организмов, чья ДНК была амплифицирована используемыми праймерами на первом этапе, а в случае присутствия в анализируемом образце близкородственных видов возможна ошибочная идентификация вида из-за совпадения последовательностей

секвенируемой вариабельной области. Однако, не смотря на отмеченные недостатки, в научной практике этот подход является самым распространенным при изучении микробиот.

Существует определенное различие между изучением популяций методом высокопроизводительного секвенирования предварительно амплифицированных маркерных участков и метагеномными исследованиями. При метагеномном секвенировании, в отличие от метода, описанного выше, проводят прямое (без предварительной амплификации) секвенирование случайных фрагментов тотальной ДНК, выделенной из исследуемого образца. Полученный в результате набор сиквенсов либо пытаются собрать в полногеномные последовательности всех присутствующих в образце геномов организмов биоинформатическими методами, либо используют для оценки функциональных возможностей микробиоты как единого комплекса [62]. Метагеномное секвенирование имеет целый ряд преимуществ: наилучшие характеристики по глубине анализа сложных по составу микробиот, позволяет идентифицировать новые виды микроорганизмов, не зависит ни от культуральных микробиологических методик, ни от ПЦР и, поэтому, демонстрирует наиболее приближенные к действительности количественные оценки. Есть у метода и недостатки: современные базы данных, которые используются как хранилище референс-последовательностей для сборки геномов и таксономической идентификации секвенированных последовательностей, недостаточно полные для обработки всего объема данных секвенирования [143], в результате чего, значительная часть последовательностей, полученная методом метагеномного секвенирования, может быть охарактеризована только на уровне рода или более высокого таксономического ранга. Кроме того, для выполнения и обработки результатов метагеномного секвенирования необходимы развитая приборная база, высокопроизводительная компьютерная инфраструктура и специалисты высокой квалификации, что требует значительных финансовых затрат.

Таким образом, в распоряжении современных исследователей имеется множество различных подходов для изучения микробиот, и каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Параллельная оценка объекта исследования разными методами всегда будет демонстрировать наилучший результат. Выбор методологии, вытекающий из целей и возможностей исследования, должен учитывать и экономические характеристики применяемых подходов. В этом отношении, одним из лучших предложений по соотношению информативности, надежности и экономичности представляется метод ПЦР в реальном времени.

1.4. Использование ПЦР для детекции и идентификации лактобактерий

Попытки использовать метод ПЦР для детекции и идентификации лактобактерий начались достаточно давно и продолжают до настоящего времени. В большинстве ПЦР тест-систем для амплификации лактобактериальной ДНК в качестве мишени использовали гены *16S rPHK* или спейсерный участок между генами *16S* и *23S rPHK* (далее «спейсер»). Выбор этих мишеней определялся прежде всего доступностью нуклеотидных последовательностей этих генетических областей и использованием гена *16S rPHK* в качестве филогенетического маркера в таксономии бактерий. Несмотря на то, что гены рРНК имеют повсеместное распространение и консервативны, их использование в качестве амплификационных мишеней несет в себе потенциальные проблемы. Во-первых, чрезмерная консервативность генов рРНК нередко приводит к проблемам со специфичностью ПЦР [19, 67], что особенно актуально для такого филогенетически сложного таксона, как род *Lactobacillus*. Во-вторых, различные виды *Lactobacillus* имеют различное число копий рибосомальных оперонов, что может приводить к неверной количественной оценке при анализе образцов, содержащих несколько видов лактобактерий. В поисках более подходящих альтернатив для определения эволюционных взаимоотношений между различными видами лактобактерий, для их дифференциации или для видоспецифической детекции предлагались и другие генетические мишени: *dnaJ*, *fusA*, *gpmA*, *gyrA*, *gyrB*, *hsp60* (*groEL*, *cpn60*), *lepA*, *pheS*, *pyrG*, *recA*, *rpoA*, *rpoB*, *slp*, *tuf* [68, 71, 105, 116, 123, 130, 144]. Выбор этих генов был обусловлен принадлежностью к группе генов «домашнего хозяйства», и, следовательно, обладающих универсальностью и потенциальной консервативностью, а не был результатом систематического поиска консервативных участков геномов у заданной группы лактобактерий. Кроме того, многие из указанных генов использовали для анализа пищевых лактобактерий, и возможности использования этих мишеней для детекции и дифференциации лактобактерий, специфичных для вагинальной микробиоты, остаются неизвестными.

Первые работы, направленные на определение вагинальных видов лактобактерий методом ПЦР, появились в 2000 г. В одной из работ предлагалась многоступенчатая мультиплексная ПЦР для идентификации большой группы лактобактерий, среди которых значились и такие вагинальные виды, как *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. В качестве мишени использовали *16S - 23S* спейсерный участок рРНК, а дифференциации достигали на последнем этапе с помощью видоспецифических праймеров [135]. В других работах в качестве мишени использовали ген *16S rPHK*, а видовую принадлежность устанавливали методом секвенирования [78] или электрофореза в градиенте денатурирующего геля [151]. Предлагались также видоспецифические праймеры на ген *16S rPHK* для идентификации *L. johnsonii* [149]. Описанные

системы решали вопрос дифференциации и видовой идентификации уже культивируемых штаммов и не были предназначены для прямого определения конкретных видов лактобактерий в сложных микробных сообществах.

Возможность проводить анализ сложных бактериальных систем появилась после разработки метода ПЦР в реальном времени. В первой работе, которая была посвящена анализу лактобактерий непосредственно в вагинальных мазках, предложенные групповые праймеры амплифицировали гены *16S pPHK* нескольких видов вагинальных лактобактерий без дифференциации [155]. В 2004 г была предложена целая панель тест-систем, состоящая из групповой и видоспецифичных реакций для определения лактобактерий ротовой полости [24]. Видоспецифичные системы детекции *L. crispatus* и *L. gasseri* затем активно использовали при изучении вагинальных микробиоценозов [36, 72, 140]. На основе амплификации гена *16S pPHK* были предложены видоспецифические системы для идентификации *L. crispatus* [158], *L. jensenii* [36, 140, 158], *L. gasseri* [140, 158], *L. iners* [36, 140, 158], *L. vaginalis* с SYBR Green [72]. В первых работах принцип мониторинга реакции амплификации в реальном времени был реализован через использование интеркалирующего красителя SYBR Green. Fredricks с соавторами сначала предложили видоспецифичные пары праймеров для амплификации гена *16S pPHK L. crispatus* и *L. iners* с электрофорезной детекцией, а позднее к паре праймеров для амплификации ДНК *L. crispatus* добавили Taqman зонд [51]. Также на основе гена *16S pPHK* были предложены видоспецифичные пары праймеров и Taqman-зонды для количественной детекции *L. jensenii* и *L. iners* [137].

Группой российских авторов для идентификации вагинальных видов лактобактерий был предложен набор ПЦР тест-систем, основанных на амплификации разных участков гена *16S pPHK* [7, 10, 11]. Однако, полученные с использованием этих систем результаты отличались от общемировых данных о видовом разнообразии лактобактерий в составе вагинальной микробиоты.

Для определения лактобактерий в пробах из репродуктивного и желудочно-кишечного трактов были предложены также группоспецифичные системы на основе амплификации гена *16S pPHK* [67, 85, 121].

Все первые ПЦР- системы для детекции лактобактерий были основаны на амплификации генов рибосомальной РНК или спейсерного участка, как наиболее распространенных и доступных для того времени последовательностей ДНК известных видов лактобактерий. Со временем число возможных генетических мишеней стало расширяться. Так для таксономической дифференциации лактобактерий были использованы гены *tuf* [32], *cpn60 (groEL, hsp60)* [21, 116, 130], *rpoB*, *rplB* [130], *recA* [144], *dnaJ* [68]. На основе гена *chaperonin-60 (cpn60)* были разработаны видоспецифичные пары праймеров для детекции *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. iners*

[42], а на основе гена *tuf* были разработаны родоспецифичные праймеры [100]. Однако за исключением генов *tuf* и *crn60*, все остальные мишени не использовали для анализа вагинальных лактобактерий.

Несмотря на наличие большого количества публикаций с описанием группоспецифичных и видоспецифичных ПЦР-систем для лактобактерий, разработка альтернативных систем для выявления вагинальных лактобактерий продолжается, что косвенно свидетельствует о несовершенстве опубликованных методов. В частности, в последние годы были предложены видоспецифичные пары праймеров и Taqman-зонды для количественной детекции *L. crispatus* и *L. iners* [79], на основе амплификации гена *tuf* были разработаны группоспецифичные праймеры и видоспецифичные Taqman-зонды для мультиплексного определения основных видов *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* и *L. iners* [20].

1.5. Типы вагинальных микробиот

1.5.1. Классификация вагинальных микробиот

Первые попытки классификации вагинальных микробиот были предприняты еще в начале прошлого века. Тогда еще не применяли термин «микробиота», но суть исследований сводилась к оценке именно микробиологической составляющей вагинального биоценоза. Manu af Heurlin пытался классифицировать биоценоз репродуктивного тракта женщин разных возрастов на основании устойчивости вагинальной среды к заболеваниям [14]. Robert Schröder был первым, кто определил три бактериологически разных типа вагинальной среды, названных «Reinheitsgrade» (Степени чистоты) [129]. Otto Jirovec различал 6 типов биоценозов: здоровая, патологическая, патологическая с большим содержанием лейкоцитов, гонорея, трихомониаз и кандидоз [78]. В основе этих исследований лежали методы традиционной микроскопии и микробиологии, которые не обеспечивали глубокого анализа видового разнообразия компонентов микробиоты. В постгеномную эру идентификацию и кластеризацию микробиот начали производить молекулярными методами, такими как: секвенирование по Сенжеру гена *16S рPHK* изолированных колоний бактерий [150], T-концевой анализ (T-RFLP) гена *16S рPHK* [157], количественная ПЦР [35, 72] и различные варианты высокопроизводительного и метагеномного секвенирования [41, 48, 69, 82, 89, 118, 134, 136].

Verhelst с соавторами, обследуя 197 беременных женщин, на основании данных микроскопии мазков, окрашенных по Граму, результатов T-концевого анализа гена *16S рPHK* у выделенных и культивированных микроорганизмов, и результатов определения *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* методом ПЦР, предположили существование четырех типов микробных сообществ [150]. Микробиота в нормальном состоянии была отнесена к I группе,

которая, в свою очередь, была разбита на три кластера: Ia – в котором доминирующим видом был *L. crispatus*, Iab – с преобладанием *L. jensenii*, и Ib – где преобладающими видами являлись *L. iners* и *L. gasseri*. Так же, среди микробиот первой группы присутствовали образцы, где доминирующими организмами являлись *Bifidobacterium spp.* в комплексе с каким-либо видом лактобацилл, в большинстве случаев *L. gasseri*. Группа II представляла переходную стадию между I и III группами, и допускала присутствие в составе микробиоты *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *Actinomyces neuui* и *Peptoniphilus*. Группа III характеризовалась присутствием микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*Prevotella bivia*, *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *Bacteroides ureolyticus* и *Mobiluncus curtisii*), и низким содержанием лактобактерий, в основном *L. iners*. Особенностью IV группы являлось наличие различных видов *Streptococcus spp.* [150]. Свои выводы эта группа ученых подтвердила в более поздних работах [43, 126].

Hummelen с соавторами на основании секвенирования на платформе Illumina области V6 гена *16S pPHK* сообщили о существовании восьми типов микробиот у 132 ВИЧ-положительных женщин Танзании [69]. При этом, два типа были ассоциированы с нормальной микробиотой и характеризовались доминированием *L. iners* или *L. crispatus*. Четыре типа, представляющих из себя микробные сообщества без доминирования какого-либо вида, либо с доминированием *Prevotella bivia* или вида из семейства *Lachnospiraceae*, авторы связывали с бактериальным вагинозом. Состояние микробиот в остальных кластерах было определено как переходное. Интересно, что микроорганизмы *G. vaginalis* и *L. iners* были обнаружены во всех кластерах и были определены как «ядерные» виды вагинальной микробиоты [69].

Применив метод пиросеквенирования гипервариабельного участка V1-V2 гена *16S pPHK* для анализа вагинальных образцов от 396 асимптоматических женщин четырех этнических групп Северной Америки (белой, черной, латиноамериканской и азиатской), Ravel с соавторами поделили вагинальные микробиоты на пять больших групп [118]. В 4-х типах микробных сообществ, относящихся к группам I (26.2%), II (6.3%), III (34.1%), и V (5.3%), в качестве доминирующего вида выступал один из видов лактобактерий: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, и *L. jensenii*, соответственно, хотя общее число идентифицированных таксономических единиц в отдельных группах превышало 100. Пятый тип - группа IV, характеризовался сниженным содержанием или отсутствием лактобактерий, а в качестве доминирующего вида выступали другие микроорганизмы.

Strinivasan с соавторами используя метод пиросеквенирования амплифицированного гена *16S pPHK*, обследовали 220 женщин с симптомами и без симптомов бактериального вагиноза [136]. Авторы сообщили, что у женщин, не имеющих признаков бактериального вагиноза, в вагинальной микробиоте преобладали либо *L. iners*, либо *L. crispatus*. Кроме того, в их

исследовании описаны несколько здоровых микробиот, в которых доминантными видами являлись *L. jensenii* и *L. gasseri*. Помимо сообществ, ассоциированных с лактобактериями, встречались микробиоценозы, где преобладали другие виды бактерий, такие как *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Prevotella amii* и *Fusobacterium gonidiaformans* [136].

Таким образом, очевидно, что вагинальные микробиоценозы при своем значительном разнообразии могут быть кластеризованы в определенные типы. Единого мнения по поводу принципов кластеризации и актуального числа типов вагинальных микробных сообществ пока не сформировано. Однако, классификация различных вагинальных микробиоценозов так или иначе строится вокруг доминирования или отсутствия такового различных видов лактобактерий. В большинстве случаев отмечается доминирование в вагинальной микробиоте *L. crispatus* и *L. iners*, реже встречаются сообщества, ассоциированные с *L. jensenii* или *L. gasseri*. Примечательно, что *L. iners* встречается у женщин, независимо от состояния микробиоты урогенитального тракта, тогда как *L. crispatus* чаще всего обнаруживали у здоровых женщин. Помимо вышеупомянутых, есть немало указаний на возможное присутствие и других видов лактобактерий: *Lactobacillus rhamnosus* [111], *Lactobacillus plantarum* [91], *Lactobacillus vaginalis* [136], *Lactobacillus salivarius* [57] и *Lactobacillus coleohominis* [136]. Более того, во многих исследованиях вагинальная микробиота описывается как смесь лактобацилл разного вида, один из которых является доминирующим.

Большинство проведенных на данный момент исследований вагинальных микробных сообществ были нацелены на определение тотального числа возможных обитателей ниши и основаны на разовой оценке их разнообразия в конкретный момент времени. Однако следует учитывать, что состав микробиоты может меняться в зависимости от гормонального статуса, сексуальной активности, фазы менструального цикла и многих других факторов. Например, во время менструации количество *L. iners* и *G. vaginalis* значительно увеличивается, а после завершения цикла возвращается к прежним значениям без какого-либо вмешательства, а количество *L. crispatus* в то же время, напротив, остается стабильным [137]. Другие авторы сообщают о 100 кратном снижении численности *L. crispatus* на фоне резкого увеличения *L. iners*, *G. vaginalis*, *A. vaginae* и *P. bivia* [125]. Так же, ими отмечено, что микробиоты ассоциированные с бактериальным вагинозом более стабильны, чем здоровые микробиоты [125]. Есть данные о том, что у одних женщин бактериальные сообщества могут переходить от одного типа к другому, тогда как у других остаются относительно стабильными [52]. В частности, *L. crispatus* – доминантные микробиоты склонны к трансформации в сообщества либо с доминированием *L. iners*, либо в те, в которых присутствуют *L. crispatus*, *L. iners* или другие виды лактобактерий в умеренной пропорции с облигатно-анаэробными микроорганизмами. Тогда как, *L. iners* – доминантные сообщества чаще переходят в тип, в котором доминирует различное число видов,

преимущественно представленное родами *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, или *Mobiluncus*. Наконец, *L. gasseri* – доминантные микробиоты проявляют стабильность чаще остальных и практически не переходят из типа в тип. Эти изменения в видовом составе вагинальной экосистемы авторы связывают с фазой менструального цикла и отчасти с сексуальной активностью [52].

Обобщая данные об изменениях в видовом составе индивидуальной микробиоты можно отметить определенные противоречия в работах разных авторов. Так, если в одной работе *L. crispatus*-доминантные сообщества проявляли высокий уровень стабильности [137], в других исследованиях сообщалось о резком снижении количества *L. crispatus* и выход на доминантную позицию *L. iners* или облигатно-анаэробных бактерий, относящихся к другим родам [52, 125]. В противовес вышеописанным, есть исследования, описывающие отсутствие каких-либо важных изменений на протяжении всего менструального цикла [30].

Таким образом, вопросы состава вагинальной микробиоты и динамики видовой вариабельности индивидуальных вагинальных микробиот, нуждаются в дальнейшем изучении. Очевидно, что отдельные противоречия между данными различных авторов могут определяться как различиями в исследуемых выборках женщин, так и в применяемых методах. Поэтому, одной из задач, стоящей перед исследователями, является объединение и объяснение данных, полученных с использованием различных методических подходов. Другой задачей является возможность определить клинически значимые типы вагинальных микробиот, которые будут служить биомаркерами состояния вагинальной среды. Это может оказаться более сложной задачей, судя по опыту исследований кишечного тракта [133], так как микробные сообщества различных сайтов локализации демонстрируют достаточно большое количество вариантов состава. Тем не менее, можно говорить о двух ключевых типах вагинальных микробиот, наличие которых признают все авторы. Это - *L. crispatus* – доминантные и *L. iners* – доминантные микробиоты. Более подробное описание этих типов вагинальных микробиот приводится в следующих главах.

1.5.2. *L. crispatus* – доминантные микробиоты

Согласно исследованиям Ravel et al., упомянутым ранее, *L. crispatus* является доминирующим видом вагинальных микробных сообществ группы I и выявляется, в основном, у европейских и азиатских женщин [118]. Так же, *L. crispatus* наряду с *L. iners* обнаружены и в IV группе, в которой виды *Lactobacillus* не являются доминирующими. Наиболее часто *L. crispatus* встречается в вагинальном микробиоценозе и в других популяциях женщин, таких как Турецкая, Шведская, Мексиканская, Бельгийская, Японская, Американская и Канадская [30,

75, 94, 118, 147, 150]. Широкое распространение этого вида было показано у беременных женщин с помощью смешанных подходов, совмещающих микробиологические методы с родоспецифичной, мультиплексной и видоспецифичной ПЦР [76]. Помимо присутствия в вагинальной микробиоте, *L. crispatus* является участником здоровой микрофлоры кишечника, что позволяет ассоциировать присутствие данного организма со снижением риска бактериального вагиноза [43].

Недавно, в результате сравнительного геномного анализа наиболее распространенных видов вагинальных лактобактерий, были открыты адаптационные механизмы, позволяющие им приспособиться к экосистеме женского урогенитального тракта [101]. По сравнению с другими вагинальными лактобактериями, *L. crispatus* имеет самый большой геном и наибольшее число экспрессирующихся белков. У штаммов *L. crispatus* найдены уникальная ДНК-полимераза, защитные системы, продуцирующие бактериоцин, а также гены, кодирующие мобильные генетические элементы, главным образом транспозазы, возможно вносящие свой вклад в большие размеры генома. Интересно, что лизогения фаговыми частицами наблюдалась ранее у большинства вагинальных изолятов *L. crispatus* [101], что может объяснить большое число генов, кодирующих мобильные генетические элементы. Van de Wijgert с соавторами освещали в своем обзоре, что *L. crispatus* - ассоциированная микробиота больше предрасположена к трансформации в *L. iners* - ассоциированную, чем в такие дисбиотические состояния как бактериальный вагиноз, и наоборот [145]. Другие исследования свидетельствуют, что вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус герпеса 2-го типа (ВПГ-2) и вирус папилломы человека (ВПЧ) реже встречаются у женщин, в вагинальной микробиоте которых *L. crispatus* является доминирующим видом [22]. Сообщалось также, что выявление *L. crispatus* было ассоциировано со снижением риска распространения ВИЧ 1-го типа на 35% [102].

Бактериальный вагиноз и отсутствие лактобацилл является одним из факторов, способствующих преждевременным родам [40]. По данным исследований, у 56% женщин, родивших в срок, в составе вагинальной микробиоты обнаруживались два или более видов лактобацилл, включая *L. crispatus* [113]. Механизм, объясняющий корреляцию между предотвращением преждевременных родов и лактобактериями неизвестен, возможно, имеет значение ингибция патогенов. Например, одной из причин преждевременных родов является инфицирование нижних отделов репродуктивного тракта *E. coli* [28], а *L. crispatus* ATCC 33197 может усиливать антимикробные свойства вагинальной среды в отношении данного вида бактерий [54]. Точный состав патоген-ингибирующего комплекса лактобактерий еще не выяснен, но наиболее перспективными компонентами считаются перекись водорода и молочная кислота.

Большая часть изолятов *L. crispatus* образуют *in vitro* перекись водорода, которая является важным фактором предотвращения развития бактериального вагиноза и разного рода инфекций

[15]. Например, было показано, что добавление 3% перекиси водорода один раз в неделю в вагинальную экосистему, может способствовать элиминации симптомов бактериального вагиноза и восстановлению нормальной *Lactobacillus* – доминирующей микробиоты [27]. Однако, по данным других исследований еженедельное спринцевание 3% H_2O_2 не давало положительных результатов, по сравнению с контрольной метранидазольной группой [31]. В другой работе не наблюдали никакой ингибирующей активности H_2O_2 против *G. vaginalis*, *P. bivia*, *M. hominis*, *M. curtsii*, *M. mulieris*, ВПГ-2, *N. gonorrhoeae* и *H. ducreyii*. Более того, в концентрации 10 мМ, перекись водорода больше влияла на вагинальные лактобациллы, чем на бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом [108]. Некоторые авторы отмечают, что для эффективного синтеза перекиси водорода *in vitro*, необходимо постоянное перемешивание для насыщения кислородом бактериальной культуры [90, 139]. В нормальном состоянии вагинальная экосистема является обедненной кислородом средой, поэтому концентрация перекиси водорода в ней *in vivo* не может обеспечить надежный антимикробный барьер. Насыщение кислородом и, как следствие, образование двуокиси водорода может быть спровоцировано половым актом, однако цервикавагинальная жидкость и сперма способны её инактивировать [55, 107].

Ravel с соавторами сообщают, что среди всех типов вагинальных биоценозов, *L. crispatus* – доминантные экосистемы демонстрируют самые низкие значения рН, что свидетельствует о самом высоком уровне синтеза молочной кислоты [118]. В условиях анаэробного роста физиологическая концентрация молочной кислоты (55 – 111 мМ) инактивирует различные бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом [108]. Установлено, что в зависимости от концентрации D-изомер молочной кислоты может ингибировать синтез активатора металлопротеиназы экстрацеллюлярного матрикса 8 (ММР-8) [153]. В результате работы вышеупомянутого фермента увеличивается проницаемость вагинального барьера для инфекций верхних половых путей, что может спровоцировать преждевременные роды. Исходя из этого, можно предположить, что молочная кислота играет большую роль в защите вагинальной экосистемы от инфекций, в сравнении с H_2O_2 .

В дополнение к описанным факторам, *L. crispatus* имеет способность к иммуномодуляции. Было доказано, что *L. crispatus* штамм ATCC 33820 может инактивировать *Candida albicans* через стимуляцию экспрессии Толл-подобных рецепторов 2 и 4, интерлейкина 8 и человеческих β -дефензинов 2 и 3 в эпителиальных клетках [122].

Все вышеописанные факторы указывают на то, что *L. crispatus* является очень перспективным кандидатом на роль маркера здоровья вагинальной экосистемы.

1.5.3. *L. iners* –доминантные микробиоты

Одним из наиболее распространенных видов вагинальных лактобацилл является *L. iners*, который не растет на традиционных для лактобактерий средах, поэтому был обнаружен только в 1999 г. [45]. В отличие от *L. crispatus*, встречающегося преимущественно у здоровых женщин, его обнаруживают как у здоровых, так и у женщин с бактериальным вагинозом.

Данный вид был обнаружен в вагинальной среде здоровых канадских [24], бразильских [92], нигерийских [18] и китайских [131] женщин. Ravel с соавторами показали, что микробные сообщества, принадлежащие к группе III, содержат *L. iners* в качестве доминирующего вида [118]. Srinivasan с соавторами в своей статье указывали, что 93% американских женщин без признаков бактериального вагиноза, имеют в качестве доминирующего компонента вагинальной микробиоты либо *L. iners*, либо *L. crispatus* [136].

Тем не менее, наличие работ, в которых описывается доминирование *L. iners* в состоянии бактериального вагиноза, свидетельствует о том, что данный вид не обеспечивает поддержание вагинального тракта в здоровом состоянии [24, 43, 69, 126]. Наблюдение, что *L. iners* доминировал в микробиоте после лечения бактериального вагиноза метронидазолом, позволяет предположить, что этот вид способствует переходу микроценоза между бактериальным вагинозом и нормоценозом [47, 70, 132, 136]. Есть данные, что во время менструации происходит сильный рост *L. iners* на фоне снижения количества *L. crispatus* [52, 125, 136, 137]. Так же сообщалось, что *L. iners*-доминантная микробиота не переходит в *L. crispatus*-доминантное состояние [80]. Некоторые авторы ассоциируют *L. iners* с преждевременными родами и сообщают, что они происходят у 40,7% беременных женщин с таким типом микробиоты [113], однако из-за малого размера выборки, описанной в данном исследовании, нельзя считать эту информацию достоверной.

Экосистемы с доминирующим *L. iners* характеризуются наименьшей концентрацией D-изомера молочной кислоты, что может быть одним из факторов, объясняющим предрасположенность такого типа биоценозов к развитию различных дисбиотических состояний [153]. Отсутствие способности *L. iners* к синтезу данного соединения подтверждено генетическими и культуральными исследованиями [153]. Интересно, что *L. iners* обладает геномом аномально малого размера (около 1,3 Мб), который, по-видимому, подвергся эволюционным событиям, приводящим к значительной потере одних генов, типичных для лактобактерий, и приобретению других, для оптимального выживания в репродуктивном тракте женщин [86]. Mendes-Soares с соавторами обнаружили, что в геноме *L. iners* на фоне отсутствия генов многих белков из семейства N-ацетилтрансфераз и различных факторов транскрипции, свойственных другим видам лактобактерий, найдены гены многочисленных ABC-транспортеров

и пермеаз, не свойственных для данного рода бактерий [101]. Так же, в геноме *L. iners* входят гены, позволяющие ему адекватно реагировать на быстро изменяющиеся условия окружающей среды, включая систему CRISPR для защиты от фагов, и опероны для расщепления гликогена, мальтозы и маннозы. Стоит отметить, что активная экспрессия вышеперечисленных генов происходит только в условиях бактериального вагиноза [87]. Еще одной интересной находкой стал ген, кодирующий холестерол-зависимый порообразующий токсин, родственник фактору вирулентности *G. vaginalis* вагинолизину [117]. В дополнение можно отметить что малый размер генома *L. iners* является индикатором симбиотического или даже паразитического поведения, в отличие от всех остальных видов вагинальных лактобактерий, имеющих размеры генома до 3 Мб и демонстрирующих независимую адаптацию.

1.5.4. Вагинальные микробиоты без доминирования лактобактерий

Как упоминалось ранее, в вагинальной микробиоте 20-30% здоровых женщин лактобациллы не являются доминирующим видом [118, 136, 157]. В таких типах вагинальных экосистем обычно доминируют бактерии, принадлежащие к родам *Gardnerella*, *Corynebacterium*, *Atopobium*, *Anaerococcus*, *Prevotella*, *Peptoniphilus*, *Mobiluncus*, *Sneathia*, *Finegoldia* и *Eggerthella* [118]. Этот тип вагинального биоценоза характерен для негроидной и латиноамериканской рас. Некоторые авторы считают, что, несмотря на отсутствие лактобактерий, виды, преобладающие в таких микробиотах, самостоятельно обеспечивают защиту репродуктивного тракта, то есть поддерживают низкий pH за счет синтеза молочной кислоты [52]. В пользу этого утверждения свидетельствуют данные, что члены родов *Atopobium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Megasphaera*, и *Leptotrichia* способны к гомо- или гетероферментативному молочнокислому брожению [156]. Является ли вагинальный биоценоз без лактобактерий стабильным или представляет транзиторную фазу перехода от одного состояния к другому, можно ли это состояние рассматривать как вариант нормы, или это признак бессимптомно протекающего заболевания - общепринятого представления на этот счет еще не сформировано. Возможно, что одни виды бактерий могут вместо лактобактерий формировать устойчивые непатогенные биотопы, тогда как другие приводят к дисбалансным состояниям или являются их результатом.

1.6. Пробиотики на основе лактобактерий

Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при введении в достаточных количествах дают макроорганизму преимущества для здоровья [128]. Так как вагинальный нормоценоз характеризуется доминированием лактобактерий, есть потенциал для использования их в

качестве пробиотиков для поддержания, или восстановления здоровой вагинальной экосистемы. Эффективное применение пробиотиков нуждается в мониторинге лактобактериального компонента как до применения, так и в процессе применения пробиотиков.

Одно из первых исследований по лечению бактериального вагиноза с помощью пробиотиков проведено в 1992 году [58]. Авторы использовали вагинальные свечи, содержащие 10^8 - 10^9 КОЕ *L. acidophilus* (Vivag®, Pharma-Vinci A/S, Denmark), для лечения дисбиоза, но, на основании оценки по критериям Амстела, сделали вывод об отсутствии положительного эффекта. Однако, около 50% пациентов из группы, принимающей пробиотики, и 86% из контрольной группы покинули исследование до его завершения, что ставит под сомнение выводы авторов. Напротив, Parent с соавторами в 1996 году сообщали, что при использовании *L. acidophilus* для лечения БВ в течение 4 недель у 88% пациентов наблюдалось значительное улучшение состояния вагинального тракта [110]. В работе использовали фармацевтический препарат «Glyconofor», содержащий не менее 10^7 КОЕ *L. acidophilus* и 0,03 мг/мл эстрадиола, для лечения беременных и не беременных женщин в сравнении с группой плацебо [110].

В 2002 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выпустила «Руководство по оценке пробиотиков в пищевых продуктах», в котором сообщается о необходимости проведения широкого спектра молекулярных исследований для установления свойств штаммов микроорганизмов для использования их в качестве пробиотиков [152]. Поэтому, в более поздних клинических исследованиях использовали пробиотические штаммы, имевшие более развернутую характеристику молекулярно-биологических свойств [17, 97].

Если в 90-х годах прошлого века в качестве кандидатов на вагинальные пробиотики предлагались прежде всего штаммы *L. acidophilus*, то в 21 веке на передний план выходят другие виды лактобактерий.

В 2006 году опубликована работа по изучению возможности использования штаммов *L. rhamnosus* GR-1 и *L. fermentum* RC-14 (так же известного как *L. reuteri* RC-14) для лечения бактериального вагиноза [17]. Оба штамма обладали развитыми способностями к адгезии на клетках вагинального эпителия, оказывали ингибирующий эффект и предотвращали распространение патогенов [119]. В дополнение, *L. reuteri* RC-14 способен синтезировать комплекс поверхностно активных соединений и значительное количество перекиси водорода [120, 148]. При сравнении стандартного метода лечения метронидазолом и пробиотикотерапии было отмечено, что пробиотикотерапия была в два раза более эффективна в отношении нормализации состояния вагинального тракта [17].

Группой итальянских исследователей проведены клинические испытания коммерческого препарата, содержащего не менее 10^9 КОЕ *L. brevis* CD2, *L. salivarius* подвид *salicinii* FV2 и *L. plantarum* FV9 [97]. Эти штаммы проявляли антимикробный эффект в отношении *C. albicans*,

G. vaginalis, ВПГ-2 и *C. trachomatis* [34, 95, 96, 97, 98]. При исследовании влияния пробиотиков на бактериальный вагиноз в сравнении с группой плацебо было отмечено, что у 67% пациентов, получавших пробиотики, наблюдали положительный эффект, тогда как в контрольной группе этот показатель был равен 12% [97].

Интересным представляется вопрос о возможности совмещения пробиотиков и антибиотикотерапии. В исследовании Eriksson et al., изучали эффективность лечения бактериального вагиноза путем использования тампонов с иммобилизованными штаммами *L. casei* подвид *rhamnosus*, *L. gasseri* и *L. fermentum* в течение менструации [44]. Каждая пациентка проходила лечение клиндамицином в течение 3 дней с последующей пробиотикотерапией в период менструации. Авторы описывают отсутствие положительного эффекта относительно предотвращения рецидивов бактериального вагиноза после следующего менструального цикла в сравнении с контрольной группой.

Anukam с соавторами совмещали лечение бактериального вагиноза метронидазолом с пероральным применением пробиотиков на основе *L. rhamnosus* GR-1 (10^9 КОЕ/мл) и *L. reuteri* RC-14 (10^9 КОЕ/мл) в течение 30 дней [16]. По завершении исследования у 88% пациенток, принимавших антибиотик и пробиотик, наблюдали значительное улучшение состояния вагинального тракта, в сравнении с 40% в группе пациенток, принимавших антибиотик и плацебо. Так же, позитивный эффект *L. rhamnosus* GR-1 и *L. reuteri* RC-14 наблюдали Martinez с соавторами, которые использовали вагинальные свечи содержащие вышеперечисленные штаммы в комбинации с единичной дозой тринидазола (2 г.) [93]. Авторы сообщают о значительном повышении эффективности лечения в группе пробиотикотерапии относительно контрольной группы - 87,5% и 50%, соответственно [93].

Описан успешный опыт восстановления вагинальной микробиоты после курса лечения антибиотиками с использованием *L. casei* Lcr35 (10^9 КОЕ/мл) [114].

Larsson с соавторами изучали эффект от 10 дневного применения двух пробиотических штаммов после менструации, в течение 3 менструальных циклов подряд. Был использован коммерческий препарат EcoVag (Bifodan A/S, Denmark), содержащий *L. gasseri* (Lba EB01-DSM 14869) и *L. rhamnosus* (Lbr PB01-DSM 14870) [81]. В течение первого месяца позитивного эффекта обнаружено не было, однако сообщается о значительном снижении числа рецидивов бактериального вагиноза в течение 6 месяцев после начала исследования [81].

Hemmerling с соавторами изучали возможности колонизации штаммом *L. crispatus* CTV-05 влажной среды при различных схемах применения у здоровых и с признаками бактериального вагиноза женщин [65, 66]. Полученные данные свидетельствовали, что штамм *L. crispatus* CTV-05 обладал хорошей способностью колонизации вагинального тракта, что создает хороший потенциал для его использования в качестве пробиотика.

Обобщая вышеизложенные исследования, обращает на себя внимание тот факт, что в большинстве исследований, посвященных применению вагинальных пробиотиков для лечения вагинальных расстройств или коррекции вагинального микробиоценоза, использовали штаммы лактобактерий, которые по современным представлениям не входят в группу видов, которые являются доминирующими в вагинальных микробиотах, и не учитывали специфики различных видов лактобактерий в определении и поддержании вагинального здоровья. Кроме того, пробиотические препараты применяли без анализа, а, следовательно, и без учета актуального лактобактериального профиля у пациенток, участвовавших в исследованиях. Возможно, что именно этим можно объяснить часто неэффективный результат применения пробиотиков и противоречивые данные, полученные разными исследователями. И только одна группа авторов стала исследовать возможность использования штамма *L. crispatus*, ассоциирующегося со здоровой вагинальной микробиотой [65, 66]. Данный подход обладает, на наш взгляд, большей перспективой, так как опирается на естественное состояние вагинальной экосистемы. Однако не стоит забывать, что есть и другие виды лактобактерий, в норме доминирующие у определенного процента женщин. Возможно, в дальнейшем этот принцип будет использоваться и для всех остальных видов вагинальных лактобактерий.

1.7. Заключение по обзору литературы

Подводя итоги, можно отметить, что на данный момент проведено большое количество научных исследований, направленных на установление бактериального состава вагинальной микробиоты и закономерностей его изменения. Описаны виды лактобактерий, играющие ключевую роль в поддержании вагинального здоровья и получены знания в области фундаментальных механизмов защиты вагинальной экосистемы лактобациллами. Понимание вышеперечисленных процессов остается далеко не полным, однако уже предпринимаются попытки на основе штаммов лактобактерий создать пробиотики в рамках концепции персонализированной медицины. Помимо этого, существует целый список нерешенных фундаментальных проблем так или иначе связанных с лактобактериями женского репродуктивного тракта. Для решения обозначенных задач в арсенале исследователей имеется широкий набор методов, некоторые из которых страдают низкой информативностью, а другие являются трудоёмкими и дорогостоящими. Поэтому разработка простых, но надежных и удобных инструментов для видовой идентификации и дифференциации с возможностью количественной оценки вагинальных лактобактерий позволит существенно продвинуться в решении стоящих проблем.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Сравнительный анализ геномов и поиск консенсусных участков

Поиск консенсусных участков выполняли путем сравнения заданного набора геномов используя программное обеспечение, разработанное в лаборатории молекулярной диагностики ИМГ РАН на платформе MS Excel [3]. Алгоритм поиска включал в себя сканирование референсной последовательности на все возможные нуклеотидные мотивы установленного размера с их последующим поиском в последовательностях сравнения в прямом и обратном направлении. Так как на начало нашей работы не для всех интересующих нас видов лактобактерий имелись полногеномные сиквенсы, то для видов *Lactobacillus iners* и *L. jensenii* для анализа были отобраны только самые большие фрагменты из частичных сборок. В результате в число анализируемых последовательностей были включены последовательности из незавершенных проектов полногеномного секвенирования для *L. iners* AB-1 (NZ_ADHG01000001, scaffold_1; 752082 п.о.), *L. jensenii* JV-V16 (NZ_CM000953.1, noncontiguous finished; 1604632 п.о.), и полногеномные последовательности *L. johnsonii* (NC_005362.1; 1992676 п.о.), *L. gasseri* (NC_008530.1; 1894360 п.о.), и *L. crispatus* (NC_014106.1; 2043161 п.о.). Последовательность *L. iners* была выбрана как референсная, а остальные как последовательности сравнения. Минимальный отрезок (рамка) искомым мотивов был определен в 20 нуклеотидов. Алгоритм анализа работал таким образом, что при нахождении гомологичного участка размеры рамки расширялись на 1 основание и сравнение повторялось. Расширение и сравнение мотивов повторялось до тех пор, пока сохранялась гомология сравниваемых последовательностей. Алгоритм анализа допускал наличие одного несовпадения в расширяемой части мотива. Обнаруженные консенсусные мотивы помещались в таблицу Excel вместе с данными об их локализации, длине, названиях генетических областей, в которых они были обнаружены. Платформа Excel обеспечивала фильтрацию и сортировку данных, что значительно облегчало финальную обработку полученных данных. В отличие от методов, основанных на выравнивании последовательностей, наш метод позволял сразу идентифицировать короткие консенсусные мотивы, достаточные для подбора праймеров и/или зондов и спектр их распространения среди анализируемых последовательностей.

2.2. Олигонуклеотиды

Специфичность праймеров и зондов проверяли *in silico* используя интернет ресурс Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Расчет

температуры отжига (T_m) праймеров и зондов проводили с помощью онлайн сервиса Exiqon LNA™ Oligo Tools (<https://www.exiqon.com/oligo-tools>). Возможность формирования вторичных структур и димеров анализировали с использованием программы Oligo Analyzer 1.5 (Gene Link).

Праймеры заказывали в ЗАО «Евроген» (Россия, Москва). Такман-зонды с включенными в последовательность LNA-нуклеотидами синтезировали в ООО «ДНК-Синтез» (Россия, Москва). Список всех использованных олигонуклеотидов представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Тип олиго-нуклеотида	Мишень	Определяемые микроорганизмы	Назначение
E782F	праймер	<i>16S pPHK</i>	Bacteria spp.	Панбактериальная амплификация
1061Rm	праймер	<i>16S pPHK</i>	Bacteria spp.	
LacI2	праймер	<i>rplK</i>	Lactobacillus spp.	
LacANr	праймер	<i>rplK</i>	Lactobacillus spp.	
PbLacAAr2	зонд	<i>rplK</i>	Lactobacillus spp.	Амплификация вагинальных лактобактерий
PbLin	зонд	<i>rplK</i>	L. iners	Детекция и количественная оценка вагинальных лактобактерий
PbLcr	зонд	<i>rplK</i>	L. crispatus	Видовая идентификация
PbLje	зонд	<i>rplK</i>	L. jensenii	Видовая идентификация
PbLjoga	зонд	<i>rplK</i>	L. gasseri / L. johnsoni	Видовая идентификация
PbLhe	зонд	<i>rplK</i>	L. helveticus и др.	Видовая идентификация
PbLaci	зонд	<i>rplK</i>	L. acidophilus	Видовая идентификация
LacBW3	праймер	<i>tuf</i>	Lactobacillus spp.	Амплификация вагинальных лактобактерий
LacCK2r	праймер	<i>tuf</i>	Lactobacillus spp.	
PbLinCIr	зонд	<i>tuf</i>	L. iners	Видовая идентификация
PbLcriCD	зонд	<i>tuf</i>	L. crispatus	Видовая идентификация
PbLjenCE	зонд	<i>tuf</i>	L. jensenii	Видовая идентификация
PbLvagCDCR	зонд	<i>tuf</i>	L. vaginalis	Видовая идентификация
PbLgasCDCE	зонд	<i>tuf</i>	L. gasseri	Видовая идентификация
PbLjonCDCE	зонд	<i>tuf</i>	L. johnsoni	Видовая идентификация

2.3. Выделение ДНК

Нуклеиновые кислоты из клинического материала выделяли при помощи набора для выделения ДНК методом лизиса с протеиназой К (Нанодиагностика, Россия). Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с использованием набора Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, США/Канада). Концентрацию нуклеиновых кислот определяли методом спектрофотометрии в микрообъеме, используя прибор Agilent 8453 (Agilent Technologies, Германия).

2.4. ПЦР

ПЦР проводили в амплификаторе с детекцией в режиме реального времени CFX96 (BioRad Laboratories inc., США).

Состав реакционной смеси: Сахароза – 8%; Tris-Buffer pH8,3 – 10 мМ; KCl – 50 мМ; Tween 20 – 0,5%; Формамид – 3%; MgCl – 3,125 мМ; dNTP – 150 мкМ; 1 е.а. Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия); по 5 пМ прямого и обратного праймеров; по 5 пМ каждого Такман зонда; 1 мкл 5x Sybr green I (Lumiprobe, США) и 5 мкл образца ДНК. Общий объем реакции – 30 мкл.

Режим амплификации: предварительный прогрев при 95°C 10 минут; 40 циклов ПЦР со следующими характеристиками: 95°C – 10 секунд, 60°C – 20 секунд, 72°C – 10 секунд; фиксацию уровня флуоресценции производили при 60°C.

2.5. Аналитические характеристики тест-систем

Завершающим этапом разработки любой тест системы является снятие аналитических характеристик. В случае количественной ПЦР в реальном времени обязательными показателями являются: М – среднее количество циклов необходимое для увеличения количества ПЦР продукта на порядок, R – коэффициент корреляции, R2 – коэффициент детерминации, E – эффективность ПЦР, LOD (*limit of detection*) – предел чувствительности [25].

Для получения аналитических характеристик готовили линейку десятикратных разведений ДНК специфичных микроорганизмов, либо искусственных матриц в диапазоне концентраций 10^8 - 10 ГЭ/мкл. В буфер для разведения добавляли препараты ДНК, выделенной из крови человека, для максимального приближения к условиям клинических исследований. С полученным набором разведений ставили две идентичные друг другу постановки ПЦР, для каждого разведения в каждой постановке ставили по 2 реакции. Полученные значения Ct экспортировали в MS Excell, где строили графики зависимости Ct от относительного количества ДНК мишени. Для полученного ряда данных строили линию регрессии, по которой Excel автоматически рассчитывает уравнение регрессии и коэффициент детерминации (R2). Классическое для ПЦР тест-систем уравнение регрессии показано в формуле (1).

$$y = -b * x + a \quad (1)$$

Где, y – значение по оси ординат (Ct образца), b – угловой коэффициент или градиент оценённой линии (он представляет собой усредненную величину, на которую увеличивается Y, если мы увеличиваем x на одну единицу - M), x – точка на оси абсцисс (условная концентрация ДНК), a – значение y, когда x равен нулю.

Эффективность ПЦР (E) – это число, показывающее во сколько раз за 1 цикл, увеличится количество фрагментов ДНК, которое вычисляется по формуле (2).

$$E = 10^{\left(\frac{1}{b}\right)} \quad (2)$$

Где b – это угловой коэффициент уравнения линейной регрессии.

Существует два подхода для расчета эффективности ПЦР-реакции. В первом используется значение, рассчитанное по формуле 2 (например, 1,85), во втором, от этого значения отнимают единицу и получают условное значение (например, 0,85). В данной работе эффективность измеряли в процентах, за 100% взято двукратное увеличение продуктов амплификации на каждом цикле.

Пределом чувствительности (LOD) считали наименьшую достоверно определяющуюся тест-системой концентрацию мишени в реакции.

Для количественной интерпретации работы тест-системы по полученным на 10-кратных разведениях усредненным C_t строили график логарифмической регрессии, где на оси x расположены реальные значения концентраций мишени в разведениях. Стандартное для ПЦР тест систем уравнение логарифмической регрессии приведено в формуле (3).

$$y = -b * \ln(x) + a \quad (3)$$

Где, y – значение по оси ординат (C_t образца), b и a – коэффициенты логарифмической регрессии, x – точная концентрация ДНК мишени в реакции.

Из полученного уравнения выводили формулу (4) для вычисления количества копий мишени в реакции по C_t .

$$x = e^{\left(\frac{a-y}{b}\right)} \quad (4)$$

Где, y – значение по оси ординат (C_t образца), a и b – коэффициенты логарифмической регрессии, e – основание натурального логарифма, x – концентрация ДНК мишени.

Воспроизводимость переменных полученной формулы при анализе клинических образцов контролировали при помощи стандартов. В качестве стандартов использовали ДНК мишени в известной концентрации разведенной в препаратах ДНК человека. На основании C_t стандартов, полученных во всех постановках с клиническими образцами, используя метод наименьших квадратов рассчитывали коэффициент корреляции (R).

2.6. Бактериальные и искусственные матрицы

Препараты геномной ДНК *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii spp Bulgaricus*, *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. lactis subsp. Cremoris*, *L. plantarum*, *L. kefirii*, *Leuconostoc mesenteroides*,

Brevibacterium linens, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium longum* были любезно предоставлены Слесаревым Алексеем (Zylacta Corporation, США).

ДНК *L. reuteri* DSM 17938 выделяли из пробиотического препарата «Рела лайф» (BioGaia, Швеция). Смесь ДНК *L. plantarum* и *L. fermentum* выделяли из пробиотического препарата «Лактобактерин» (Микроген, Россия). Выделение ДНК из пробиотических препаратов проводили с использованием набора «РибоСорб» (Интерлабсервис, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Для видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. helveticus* были сконструированы искусственные матрицы, воспроизводящие последовательность амплифицируемых фрагментов. Так как размеры амплифицируемых участков составляли 345 п.о., то синтезировать целиком фрагменты такой величины не представлялось возможным. Поэтому реконструкцию таких фрагментов проводили из четырех более коротких фрагментов. Принцип метода состоял в отжиге и комплементарной достройке четырех, расположенных в шахматном порядке на разных нитях ДНК, перекрывающихся одноцепочечных контигов длиной около 90 п.о. (Рисунок 2 -). Контиги синтезировали в Евrogen (Москва).



Рисунок 2 - Схема расположения контигов в составе реконструируемых искусственных матриц

Достройку цепей производили последовательно при помощи фермента Taq-полимеразы в ПЦР буфере. На первом этапе синтеза матрицы объединяли центральные контиги. Синтез цепей проводили по протоколу обратного плавления, то есть температуру раствора сначала повышали до полной денатурации ДНК и потом постепенно снижали. В процессе снижения температуры контиги праймируются друг на друга, а полимераза производит их комплементарное удлинение до получения двухцепочечного фрагмента ДНК (Рисунок 3 -).

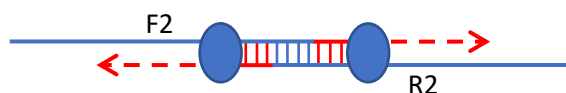


Рисунок 3 - Процесс реконструкции центральной части синтетической матрицы

После проведения двух циклов обратного плавления, полученный материал анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле, чтобы подтвердить наличие продукта необходимого размера. Далее продукт от первого этапа синтеза разводили в 10 – 100 тыс. раз. С разведенным

продуктом ставили реакцию ПЦР, где в качестве праймеров использовались концевые контиги F1 и R1.

Последовательность полученных матриц подтверждали секвенированием по методу Сенжера. С этой целью на этих матрицах проводили амплификацию с соответствующими праймерами. Полученные ампликоны секвенировали в Евrogen (Москва).

2.7. Клинический материал

Отбирали вагинальные мазки от женщин в возрасте от 18 до 66 лет, не принимавших антибиотики и не имевших полового контакта в течение суток до взятия материала. Сбор данных о женщинах, сдавших материал на анализ, производили с использованием бланка информированного согласия и анкетирования. Общий объем выборки составил 602 образцов. При этом, 119 образцов получено от Духаниной Н.С. из Московского центра планирования семьи и репродукции в рамках выполнения совместной научной работы, 153 образца от Моревой Ж.Г. из Ивановской государственной медицинской академии в рамках выполнения совместной научной работы, 259 из МЦ «Открытие» в г. Чебоксары и 74 из ЖК№2 г.Королёва в рамках сотрудничества с ООО «Нанодиагностика».

2.8. Оценка состояния вагинальной микробиоты

Оценку состояния вагинальной микробиоты проводили по алгоритму, реализованному в наборах «Фемофлор» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Данный алгоритм предполагает нормирование количественной оценки лактобактерий по отношению к общему содержанию бактерий. Содержание лактобактерий в наборах «Фемофлор» проводится по результатам амплификации гена *16S rPHK*, тогда как в разработанной в настоящем проекте тест-системе – по результатам амплификации гена *rplK*. В клетках лактобактерий ген *rplK* представлен одной копией, тогда как количество генов *16S rPHK* у вагинальных лактобактерий может варьировать от 4 до 6. Поэтому, на основании результатов видовой дифференциации, тотальное содержание лактобактерий рассчитанное с использованием гена *rplK* умножали на количество копий гена *16S rPHK*. Полученный показатель использовали для сравнения с показателем панбактериальной ДНК. На основании процентного содержания лактобактерий относительно общей бактериальной массы, все образцы делили на три группы: нормоценоз (лактобактерий более 80%), умеренный дисбиоз (от 20% до 80% лактобактерий), выраженный дисбиоз (лактобактерий менее 20%).

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи пакета программ MS Excel и R-studio, используя следующие методы:

Метод Шапиро-Уилка - используется для проверки гипотезы H^0 : «случайная величина X распределена нормально» и является одним из наиболее эффективных критериев проверки нормальности (Логачев Ю., 2011). Результатом проверки является значение p , если оно меньше или равно 0,05, значит распределение данных отличается от нормального и для анализа выборки могут быть использованы только непараметрические методы.

Метод главных компонент (англ. *principal component analysis*, PCA) - один из основных способов уменьшить размерность данных, потеряв наименьшее количество информации [5]. Вычисление главных компонент может быть сведено к вычислению сингулярного разложения матрицы данных или к вычислению собственных векторов и собственных значений ковариационной матрицы исходных данных. В данном исследовании использовался для изменения размерности категориальных данных о распространенности конкретных видов лактобацилл и визуализации кластеризации образцов по доминирующему виду вагинальных лактобактерий.

Точный тест Фишера - обычно используется, чтобы исследовать значимость взаимосвязи между двумя переменными в факторной таблице сопряженности признаков [13]. В данной работе применялся для оценки взаимосвязи категориальных данных.

Регрессионный анализ - статистический метод исследования влияния одной или нескольких независимых переменных на зависимую переменную [12]. Использовался для оценки взаимосвязи данных малой размерности о распространенности видов лактобактерий, полученных после применения метода главных компонент, и возраста пациентов.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Анализ геномов, подбор перспективных мишеней

Наличие в базах данных полногеномных последовательностей для целого ряда вагинальных лактобактерий позволило предложить новый подход для разработки метода детекции и идентификации вагинальных лактобактерий. Суть этого подхода состояла в том, чтобы на основе сравнительного анализа полногеномных последовательностей найти генетические области, которые могли бы служить генетическими мишенями для целевой амплификации и идентификации тех видов лактобактерий, которые по данным метагеномных исследований наиболее характерны для вагинального микробиоценоза.

Для поиска новых генетических мишеней мы использовали разработанный в лаборатории молекулярной диагностики ИМГ РАН метод, основанный на поиске консенсусных участков в заданном наборе полногеномных последовательностей (см. Материалы и методы). Обнаружение консенсусных участков в геномной ДНК заданной группы последовательностей позволяло надеяться на конструирование на их основе группо- и видоспецифичных праймеров и зондов. Как минимум, необходимо было сравнить полногеномные последовательности четырех основных видов вагинальных лактобактерий: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*. Однако, к началу нашего исследования, из интересующих нас видов в Genbank присутствовали полногеномные последовательности только для *L. gasseri* и *L. crispatus*, а *L. jensenii* и *L. iners* были представлены только частичными сборками (scaffolds). Поэтому помимо полногеномных последовательностей для *L. gasseri* и *L. crispatus* в исследование были включены самые крупные фрагменты из сборок *L. iners* и *L. jensenii*, составлявшие 752 тыс. и 1605 тыс. оснований, соответственно. Кроме того, в исследование была добавлена полногеномная последовательность *L. johnsonii* - вид, который генетически очень близок *L. gasseri*.

В результате попарного сравнения последовательности *L. iners*, взятую как референс-последовательность, с каждой из последовательностей из вышеобозначенного списка, в общей сложности было выявлено около 3000 идентичных парных мотивов протяженностью 20 и более нуклеотидов. Общие гомологичные мотивы для всех 5-ти исследованных последовательностей локализовались в 139 генах. Как и ожидалось, наибольшую долю консенсусных областей дали гены рибосомальных РНК (5S, 16S и 23S) и спейсерная область между генами 16S и 23S *pPHK* – 24 мотива, а также различные *mPHK* – 9 мотивов. За вычетом генов *pPHK* и *mPHK* оставались 25 различных генетических областей, имеющих в своем составе 31 мотив, полностью гомологичных в геномах исследованных 5 видов лактобацилл. Последующий анализ методом BLAST полных последовательностей нескольких генов, содержавших консенсусные мотивы, позволил оценить

степень консервативности отобранных консенсусных мотивов уже на всей базе нуклеотидных последовательностей. Методом BLAST всего было проанализировано 15 генов: *atpA*, *clpP*, *efG*, *gapd*, *groEL*, *gyrB*, *pheS*, *recA*, *rplB*, *rplC*, *rplK*, *rpoA*, *rpoB*, *secA*. В конечном итоге, учитывая взаимное расположение и архитектуру консервативных и переменных мотивов, их пригодность для конструирования праймеров и зондов для детекции и идентификации интересующих нас видов лактобактерий, мы остановили наше внимание на гене *rplK*, отвечающем за синтез рибосомального белка L11.

3.2. Разработка тест-системы на основе гена *rplK*

3.2.1. Праймеры

При поиске последовательностей, гомологичных гену *rplK* *L. iners*, с использованием алгоритма BLAST в базе «Whole Genome Shotgun contigs» в итоговый список попали 659 последовательностей различных видов бактерий, включая 180 последовательностей 54 видов лактобактерий. В результате анализа выровненных последовательностей гена *rplK* был определен целевой участок обеспечивающий возможность групповой детекции всех видов вагинальных лактобактерий.

Найденная мишень имела протяженность около 400 пар оснований и включала 3 консервативных только для лактобактерий участка, что открывало возможность для разработки 3-х систем амплификации с длинами ампликонов 133, 207 и 345 пар оснований. При тестировании кандидатных систем на образцах ДНК, выделенных из клинических урогенитальных мазков, все три системы праймеров продемонстрировали близкие показатели порогового цикла и формировали один пик плавления (Рисунок 4 -). Потенциал для видовой дифференциации вагинальных лактобактерий у системы с длинным ампликоном был намного шире, чем у системы с коротким ампликоном, поэтому для дальнейшей работы была выбрана система с праймерами LacI2 и LacANr, амплифицирующими ампликон размером 345 пар оснований.

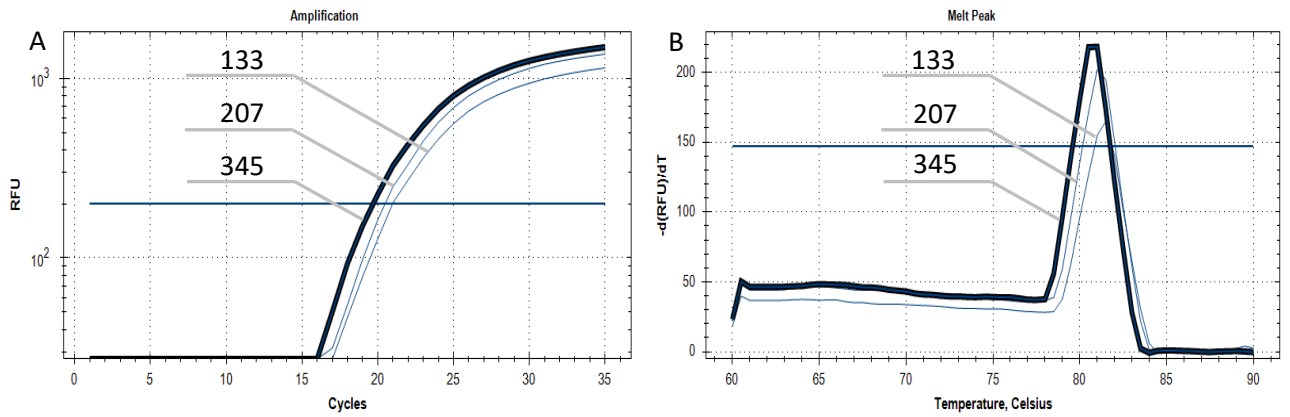


Рисунок 4 - Сравнение кандидатных систем праймеров с разными размерами ампликонов при амплификации ДНК, выделенной из урогенитального мазка. А - кривые амплификации, В - пики плавления

Специфичность праймеров LacI2+LacANr была проверена *in silico* с помощью программы «Primer Blast» (Таблица 2 -). Установлено, что праймеры имеют высокую степень гомологии к ДНК лактобактерий ацидофильного комплекса, в том числе *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jenseni*. Относительно этих видов последовательность обратного праймера имеет абсолютную гомологию, за исключением *L. jenseni*, где встречается 1 нуклеотидная замена на 5' конце. Прямой праймер имеет по 1 нуклеотидной замене для каждого из видов, при этом у *L. crispatus*, *L. acidophilus* и *L. helveticus* нуклеотидная замена располагается на 5' конце, а у *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jenseni* в центре.

Таблица 2 - Проверка специфичности праймеров LacI2 и LacANr в программе «Primer Blast»

Организм	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')	Количество гомологов в GenBank
<i>L. crispatus</i>	...А.....	3
<i>L. acidophilus</i>	...А.....	7
<i>L. gasseri</i>А.....	4
<i>L. johnsonii</i>А.....	8
<i>L. helveticus</i>	...А.....	14
<i>L. iners</i>А.....	1
<i>L. jenseni</i>А.....	..Т.....	2
<i>L. amylovorus</i>	...А.....	5
<i>L. gallinarum</i>	...А.....	1
<i>L. kefiranofaciens</i>	...А.....	2
<i>L. acetotolerans</i>А.....С.....	1
<i>L. delbrueckii</i>	...А.....А.....А.....	8
<i>L. apis</i>А.....Г	..Т.....	1

<i>L. kimbladii</i>A.....G	..T..C.....A.	1
<i>L. kullabergensis</i>A.....G	..T..C.....A.	1
<i>L. ruminis</i>GT..A.....	..T..A.....	1
<i>L. salivarius</i>GT..A.....	..T..A.....	5
<i>L. buchneri</i>G.GT..A.....	..C.....	2
<i>L. kefir</i>A.GT..A.....	..C.....	1
<i>L. reuteri</i>A.G...A.....	..T..A...A.....	6
<i>L. fermentum</i>C.G...A.....	..T..G...A.....	5
<i>L. ingluviei</i>C.G...A.....G	..T..G..G.....	1
<i>L. sanfranciscensis</i>	...A..A.GT..A.....	..T.....A....	1
<i>L. mucosae</i>C.GT..C.....G	..T.....G.....	1
<i>L. brevis</i>C.GG..A.....	..T..C.....A..A.	4
<i>L. plantarum</i>	...A..C.G...A.....G	..T..G.....C..A.	27

В то же время, виды лактобактерий, не характерные для вагинальной микробиоты, имели в сайтах посадки праймеров 2 и более нуклеотидных замен.

Влияние нуклеотидных замен на праймирование было исследовано экспериментально в условиях реальной реакции амплификации ДНК *L. gasseri* и *L. acidophilus*, которые содержали в сайте посадки прямого праймера по одной нуклеотидной замене на 5'-конце и в середине праймера, соответственно. Концентрация ДНК этих двух видов предварительно была выровнена по показателям амплификации с использованием панбактериальной системы праймеров на *16SpPHK*. Наличие одной нуклеотидной замены в середине или на 5'-конце праймера мало влияло на эффективность амплификации – различия по C_t не превышали 1-го цикла, что находилось в пределах погрешности пипетирования (Рисунок 5 -).

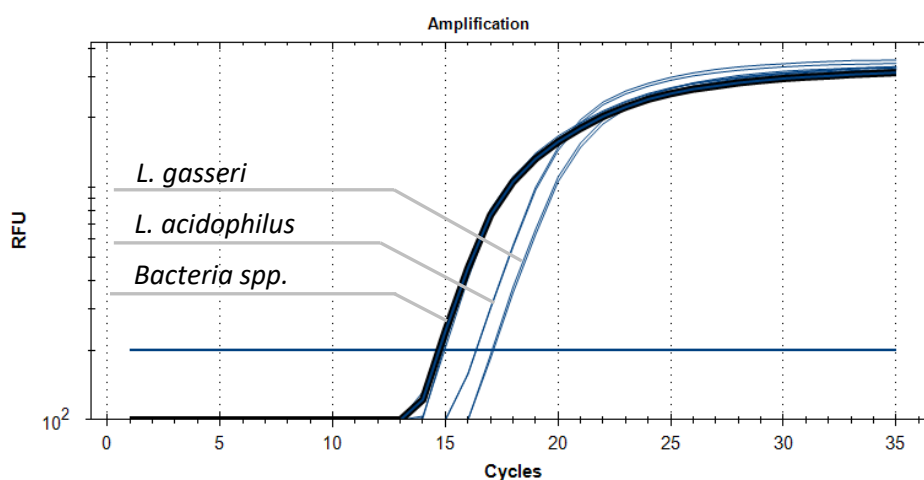


Рисунок 5 - Сравнение влияния расположения нуклеотидных замен в последовательности праймера, на примере *L. gasseri* и *L. acidophilus*

Для проверки влияния на амплификацию большего количества нуклеотидных замен в сайте посадки праймера был проведен эксперимент с ДНК *L. gasseri*, *L. delbrueckii*, *L. kefir* и *L. reuteri* (Рисунок 6 -). Количество и расположение нуклеотидных замен в прямом и обратном праймерах для каждого из этих видов указано в Таблица 2 -. Концентрацию ДНК всех четырех видов предварительно выравняли по показателям амплификации с панбактериальной системой праймеров.

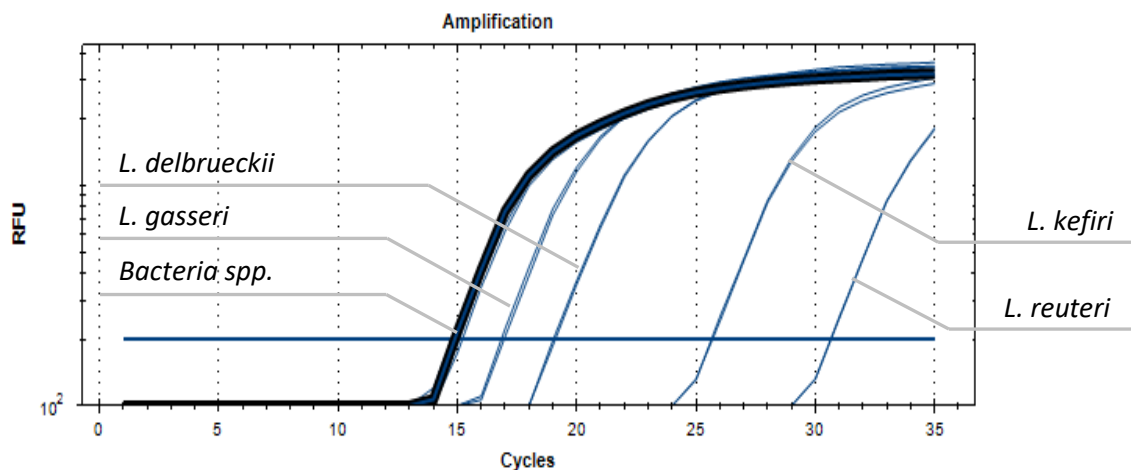


Рисунок 6 - Влияние количества нуклеотидных замен на эффективность амплификации

С ДНК *L. delbrueckii* разница в C_t между панбактериальной и лактобактериальной системами составила более 4-х циклов, что превышает расчетную разницу в два раза. Соответствующая разница в C_t для *L. kefir* составила 11 циклов ПЦР, а в случае *L. reuteri* – 16. Очевидно, что наличие более 2-х нуклеотидных замен в центре или ближе к 5'-концу праймера сводят эффективность амплификации мишени к предельно низкому уровню, не имеющему диагностической значимости. Приняв во внимание изначальную концентрацию ДНК микроорганизмов, которая составляла около 10⁷ ГЭ/мкл, можно предположить, что при анализе реального клинического образца в присутствии более гомологичной матрицы виды *L. delbrueckii*, *L. kefir* и *L. reuteri* амплифицироваться не будут.

Проверку специфичности праймеров LacI2 и LacANr в реакциях амплификации проводили с ДНК из 14 штаммов лактобактерий и других бактерий, филогенетически близких к вагинальным лактобактериям (см. материалы и методы), и препаратах ДНК, выделенной из человеческой крови и используемой в качестве отрицательного контроля. Концентрацию бактериальной ДНК в пробах приводили к одному уровню и контролировали методом ПЦР с панбактериальными праймерами. Как и ожидалось, амплификационный продукт нарабатывался с ДНК из *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, но отсутствовали в реакциях с ДНК из *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. linens* или *L. mesenteroides* (Рисунок 7 -). С ДНК из *L. kefir* и *L. reuteri* также наблюдали образование

продукта амплификации, но с большим опозданием по Cq от проб с ДНК *L. gasseri* или *L. acidophilus*.

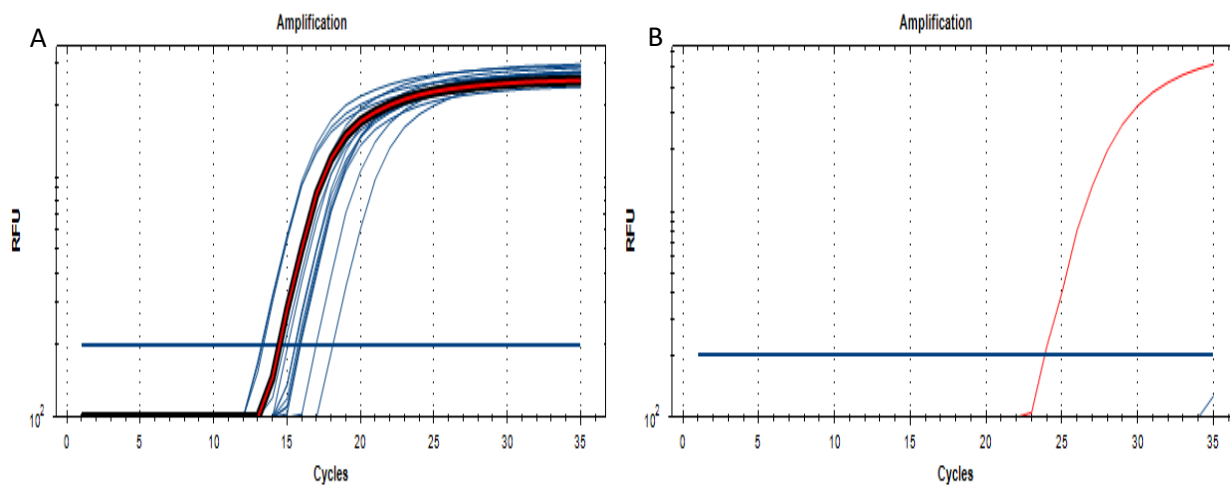


Рисунок 7 - Проверка специфичности праймеров LacI2 и LacANr на близкородственных видах. А – ПЦР с панбактериальными праймерами, В – ПЦР с праймерами LacI2 и LacANr. Красным цветом выделен положительный контроль ПЦР. В качестве матриц использовали ДНК *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. lactis subsp. cremoris*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Brevibacterium linens*, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacterium longum*

Таким образом, праймеры LacI2 и LacANr способны эффективно амплифицировать матрицы, имеющие не более двух нуклеотидных замен на один сайт посадки праймера.

По результатам анализа специфичности праймеров *in silico* и результатам ПЦР с ДНК из различных видов лактобактерий из 3-х кандидатных пар праймеров была выбрана пара LacI2 и LacANr, которая демонстрировала наибольшую специфичность и чувствительность при амплификации вагинальных лактобактерий.

3.2.2. Группоспецифичный зонд

Как упоминалось ранее, выбранная нами мишень для амплификации содержит высоко консервативный участок в центральной области, который использовался как сайт посадки праймера для систем с длиной ампликона 133 и 207. Этот участок может быть использован и для разработки группового Taqman зонда для детекции всех интересующих нас видов вагинальных лактобактерий. Оценка специфичности *in silico* в программе «Primer Blast» одного из вариантов такого зонда (Pb LacAAr2) приведена в Таблица 3 -.

Таблица 3 - Проверка специфичности зонда Pb LacAAr2 в программе «Primer Blast»

Организм	Зонд Pb LacAAr2 (5'–3')	Количество гомологичных последовательностей в GenBank
<i>L. crispatus</i>	3
<i>L. iners</i>	1
<i>L. jensenii</i>	2
<i>L. gasseri</i>	5
<i>L. johnsonii</i>	8
<i>L. acidophilus</i>	6
<i>L. helveticus</i>	16
<i>L. kefiranofaciens</i>	2
<i>L. gallinarum</i>	1
<i>L. amylovorus</i>	...С.Т.....	2
<i>L. reuteri</i>G.....	13
<i>L. delbrueckii</i>	...С.Т.....А..	8
<i>L. kefiri</i>С.....	1
<i>L. sanfranciscensis</i>	1
<i>L. apis</i>А.....	1
<i>L. paracollinoides</i>С.....А.....	3
<i>L. mucosae</i>G.....G.....	1
<i>L. paraplantarum</i>С.....С.....	1
<i>L. pentosus</i>С.....С.....	2
<i>L. plantarum</i>С.....С.....	30
<i>L. buchneri</i>С..С.....	2

Как видно из таблицы, зонд имеет 100% гомологии с ДНК всех основных видов вагинальных лактобактерий: *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Помимо ДНК видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii*, зонд Pb LacAAr2 будет связываться с ДНК видов *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. gallinarum* и, возможно, с меньшей эффективностью с *L. delbrueckii* и *L. amylovorus*, которые, по некоторым данным, также могут встречаться в вагинальной микробиоте. Остальные виды, имеющие гомологичные сайты посадки зонда, либо не содержат в геноме участки гомологичные праймерам, либо не были обнаружены в микробиоте репродуктивного тракта женщин. Специфичность работы зонда была подтверждена в ПЦР с ДНК, которые давали амплификационный продукт с праймерами LacI2 и LacANr: *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. kefiri*. При концентрации бактериальной ДНК около 10^{-4} копий сигнал от зонда наблюдали только в реакциях с ДНК из *L. gasseri* и *L. acidophilus*, т.е. матрицы, имевшие

по данным секвенирования 100% гомологии с зондом, давали разгорание, и, напротив, матрицы, имевшие полиморфные сайты в гомологичных зонду участках, взаимодействие с зондом не обнаруживали.

Таким образом, специфичность зонда Pb LacAAr2 в сочетании со специфичностью праймеров LacI2 и LacANr ограничена узким кругом видов лактобактерий, характерных исключительно для вагинальной микробиоты, что позволяет предложить на основе этих олигонуклеотидов тест-систему для определения общего содержания лактобактерий в вагинальном секрете. Тест-система, работающая с праймерами LacI2, LacANr и групповым зондом Pb LacAAr2 была названа «Лактокомплекс».

3.2.3. Аналитические характеристики тест-системы для группового определения лактобактерий

Для получения аналитических характеристик тест-системы «Лактокомплекс» проведена серия экспериментов с линейками десятикратных разведений ДНК *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. iners*, *L. crispatus* и *L. helveticus*. Установлено, что линейный диапазон работы системы в реакциях со всеми исследованными ДНК находится в пределах от 40 до $40 \cdot 10^9$ копий мишени. На Рисунок 8 - приведен пример графиков для реакций с ДНК *L. iners*.

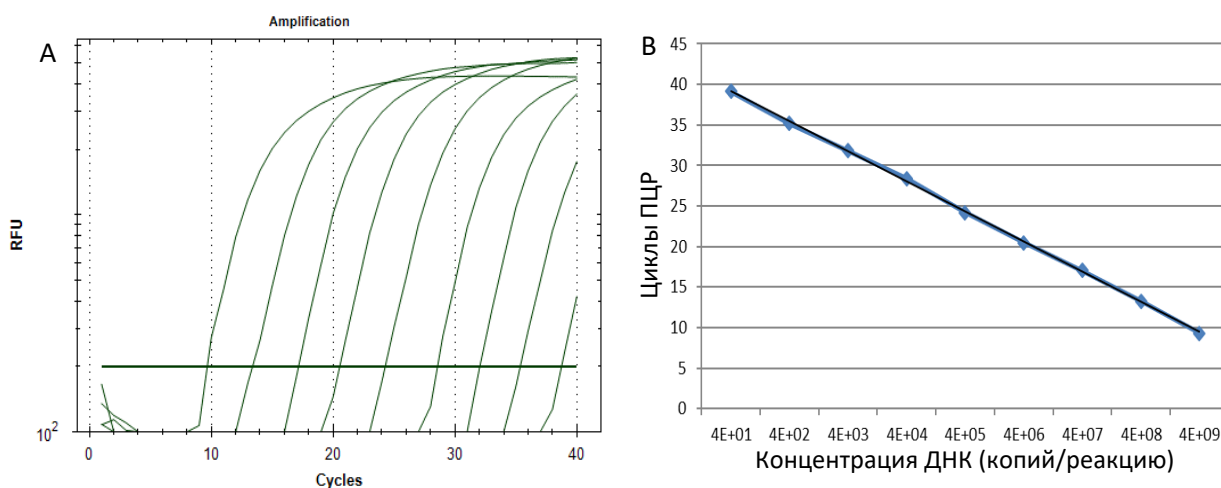


Рисунок 8 - Построение графика функции линейной регрессии на примере *L. iners*. А – кривые амплификации линейки десятикратных разведений, В – график функции линейной регрессии

С помощью графика функции логарифмической регрессии рассчитано уравнение работы тест-системы для количественной оценки содержания лактобактерий в клинических образцах. Во всем диапазоне измеряемых концентраций график имеет линейный характер (Рисунок 8 -В).

Аналитические характеристики тест-системы «Лактокомплекс» приведены в Таблица 4 -.

Таблица 4 - Аналитические характеристики тест-системы с групповым зондом Pb LacAAr2 на основе гена *rplK* лактобактерий

Показатель	Полученное значение
E (%)	93
M (Ct)	-3,7073
R	0,99
R ²	0,99
LOD (Копий/реакцию)	40

3.2.4. Видо-специфичные зонды

Последовательности участков геномов, амплифицируемых праймерами LacI2 и LacANr, помимо консервативного участка, гомологичного зонду Pb LacAAr2, имеются и полиморфные участки, которые обладали у разных видов лактобактерий межвидовой специфичностью. Это позволило разработать набор зондов, обладающих дифференцирующими свойствами. Для идентификации лактобактерий *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. acidophilus* было разработано 4 видоспецифичных зонда. Последовательности гена *rplK* у *L. gasseri* и *L. johnsonii* имели очень высокий уровень гомологии, что не позволяло подобрать зонд для детекции исключительно *L. gasseri*, но позволило сконструировать зонд для детекции обоих видов. Кроме того, был обнаружен участок, гомологичный для видов *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*, и пригодный для разработки Taqman-зонда на эту группу бактерий. В процессе разработки было исследовано несколько модификаций зондов. В настоящей работе приведены данные только для финальных модификаций.

Результаты проверки *in silico* специфичности финальных модификаций зондов приведены в Таблица 5 -.

Таблица 5 - Специфичность финальных модификаций зондов *in silico*

Организм	Зонд (5'-3')	Зонд (5'-3')
	PbLcr	PbLin
<i>L. crispatus</i>	нет совпадений

L. iners	нет совпадений
L. jensenii	.A.....G.....C...	...C.....A.A..T....C.
L. gasserii	.G...G.....	...C.....T..T....
L. gasserii	AA.A..G.....A.	...C...C.....T..T....
L. johnsonii	нет совпадений	...C.....C.....T..T....
L. acidophilusA.C.....	нет совпадений
L. acidophilusATC.....T.	нет совпадений
L. acidophilusC.T.....	нет совпадений
L. helveticusC.T.....	нет совпадений
L. acetotoleransC.T.....	нет совпадений
L. amylovorusC.T.....	нет совпадений
L. gallinarumC.T.....	нет совпадений
L. kefiranofaciensC.T.....	нет совпадений
L. pentosus	нет совпаденийT.....T....
	PbLje	PbLjoga
L. crispatusT.....C..T....	нет совпадений
L. iners	.T.....C.T..C.....T.C..A.....
L. jenseniiA.A.....A..C.....
L. gasserii	нет совпадений
L. johnsonii	нет совпадений
L. acidophilusT.....T....	.TA.A.....C.....C.
L. helveticusT.....T....	.TA.A.....C.....C.
L. amylovorusT.....T....	нет совпадений
L. apisT.....T....	нет совпадений
L. delbrueckiiTC.T.....T....	.T.....C.....C.
L. gallinarumT.....T....	нет совпадений
L. kimbladiiT.....T....	нет совпадений
L. kullabergensisT.....T....	нет совпадений
L. mucosae	нет совпаденийG.....
L. reuteri	нет совпаденийG.....A..C.....
	PbLhe	PbLaci
L. crispatusT.G.....	A.....T.G.....
L. iners	нет совпадений	нет совпадений
L. jenseniiGG.T.C.....A.	нет совпадений
L. gasserii	.C.....G.CA.C.....	A...C...G..A.C.....
L. johnsonii	нет совпадений	нет совпадений
L. acidophilusA.C.....
L. helveticus	A.....C.T.....
L. acetotolerans	A.....C.T.....
L. amylovorus	A.....C.T.....
L. apis	T.....G.C.....	G..T...G.....
L. gallinarum	A.....C.T.....
L. kefiranofaciens	A.....C.T.....

В экспериментах *in vitro* в первую очередь проверяли работу зондов на искусственных матрицах *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. helveticus*, и 2-х нативных ДНК *L. acidophilus* и *L. gasserii*. Зонды PbLin, PbLje и PbLjoga продемонстрировали хорошую чувствительность и

специфичность. Что касается зондов PbLaci, PbLcr и PbLhe, чьи сайты посадки перекрывались в геномах соответствующих видов лактобактерий, то они требовали повышения специфичности из-за перекрестного неспецифичного отжига. В результате для зондов PbLaci, PbLcr и PbLhe в общей сложности было протестировано 11 модификаций, отличавшихся сайтами посадки и температурой отжига, прежде чем мы добились высокого уровня специфичности и чувствительности. В финальном формате, все 6 зондов не давали перекрестного отжига, а реакции с зондами обладали достаточно высокой чувствительностью. В конечном итоге, была сформирована диагностическая панель, состоящая из 2-х наборов олигонуклеотидов, содержащих одну пару универсальных праймеров и зонды, меченные различными флуорофорами. Диагностическая панель, получившая название «Лактоспектр_rplK», позволяла проводить в 2-х реакциях с детекцией по 3-м каналам флуоресценции идентификацию 4-х индивидуальных видов лактобактерий (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. acidophilus*), одной пары видов лактобактерий (*L. gasseri* и *L. johnsonii*) и одного комплекса лактобактерий, состоящего из 6-ти видов (*L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*). Демонстрация работы тест-системы «Лактоспектр_rplK» приведена на Рисунок 9 -.

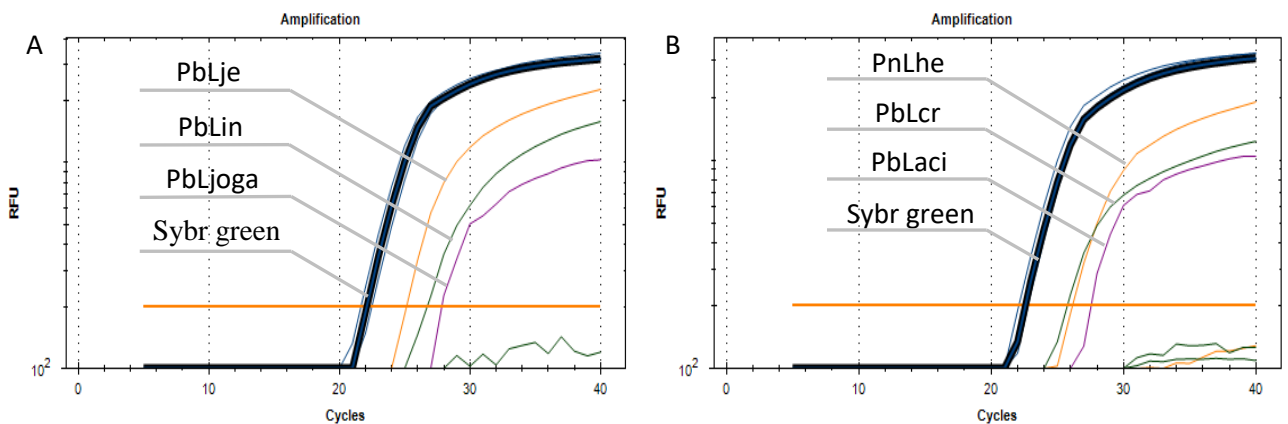


Рисунок 9 - Результаты амплификации специфических матриц с двумя наборами Taqman зондов. А – набор «В», В – набор «С»

3.2.5. Аналитические характеристики панели тест-систем для видовой идентификации вагинальных лактобактерий

Аналитические характеристики работы диагностической панели «Лактоспектр_rplK» с каждым из шести зондов, полученные в реакциях с десятикратными разведениями ДНК соответствующих видов лактобактерий, приведены в Таблица 6 -.

Таблица 6 - Аналитические характеристики работы тест-системы «Лактоспектр_rplK» на основе гена *rplK* с видоспецифичными зондами

Показатель	PbLin	PbLje	PbLjoga	PbLcr	PbLhe	PbLaci
E (%)	91	93,5	89	91,4	88	93
M (Ct)	-3,8605	-3,675	-4,0041	-3,8177	-4,0525	-3,7007
R	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
LOD (Копий/реакцию)	200	200	200	200	200	200

Графики линейной регрессии для реакций со всеми зондами имели однотипный характер. В качестве примера приведен график для реакции с зондом *L. iners* (Рисунок 10 -).

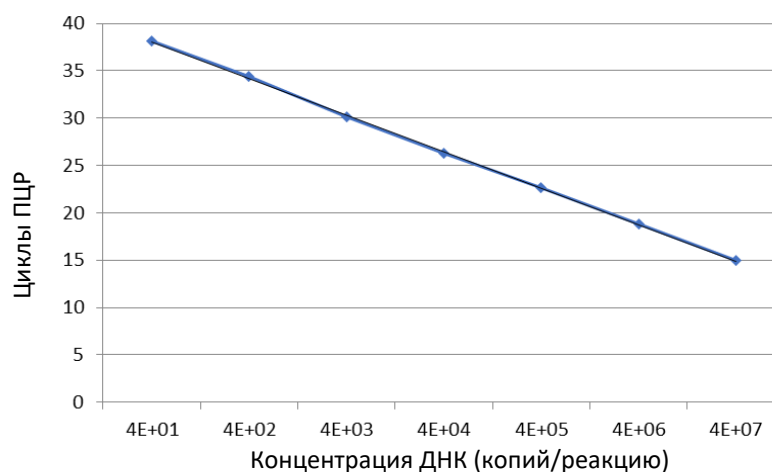


Рисунок 10 - График линейной регрессии работы системы на *rplK* с зондом PbLin

Таким образом, было разработано 6 Taqman зондов для индивидуальной, либо субгрупповой детекции практически всех видов вагинальных лактобактерий, встречающихся или потенциально способных присутствовать в вагинальной микробиоте. Это позволило сконструировать тест-систему для мультиплексного определения и типирования вагинальных лактобактерий. В состав тест-системы входит набор олигонуклеотидов, состоящий из одной пары праймеров и 6 зондов, меченных различными флуорофорами. Олигонуклеотиды были разделены на 2 комплекта, что позволило в 2-х реакциях ПЦР обеспечить детекцию и идентификацию практически всех видов вагинальных лактобактерий. Первая реакция с зондами PbLin, PbLje и PbLjoga, меченными флуорофорами HEX, ROX и Cy5, соответственно, позволяла детектировать и идентифицировать *L. iners*, *L. jenseni* и *L. gasseri* / *L. johnsonii*. Вторая реакция с зондами PbLaci, PbLcr и PbLhe, также мечеными флуорофорами Cy5, HEX и ROX, соответственно, позволяла

детектировать и идентифицировать *L. acidophilus*, *L. crispatus*, и *L. helveticus* с группой близкородственных бактерий. Для отслеживания возможного присутствия видов, не идентифицирующихся зондами, в обеих реакциях использовали неспецифичный краситель Sybr green. Тест-система, работающая по вышеописанному протоколу названа «Лактоспектр_rplK».

3.3. Разработка тест-системы на основе гена *tuf*

3.3.1. Анализ праймеров, описанных в литературе

В период разработки метода идентификации вагинальных лактобактерий на основе гена *rplK* появилась публикация, в которой в качестве мишени для идентификации вагинальных лактобактерий использовали ген *tuf*, кодирующий фактор элонгации Tu [20]. Авторы предложили детекцию и типирование 4-х основных видов вагинальных лактобактерий: *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jenseni* и *L. gasseri*. Все 4 вида можно было идентифицировать в одной реакции при помощи пары универсальных праймеров и видоспецифичных Taqman зондов. Появление этой работы поставило перед нами задачи, оценить возможности описанной тест-системы, с одной стороны, и гена *tuf* в целом, с другой стороны, как возможной генетической мишени для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий.

Результаты проверки специфичности предложенных олигонуклеотидов [20] в программе «Primer-BLAST» свидетельствуют, что праймеры могут амплифицировать не менее 24 видов лактобактерий (Таблица 7 -**Error! Reference source not found.**).

Таблица 7 - Оценка праймеров из работы Balashov S.V. et. al. 2014
в программе «Primer-BLAST»

Организм	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')	Количество гомологов в GenBank
<i>L. agilis</i>Т.....А.....	2
<i>L. amylolyticus</i>	1
<i>L. amylovorus</i>	4
<i>L. aviarius</i>А.....	1
<i>L. brevis</i>	..С.....	12
<i>L. crispatus</i>	3
<i>L. delbrueckii</i>	16
<i>L. gallinarum</i>	3
<i>L. gasseri</i>	7
<i>L. gigeriorum</i>	1
<i>L. hamsteri</i>С.....	1
<i>L. helveticus</i>	67
<i>L. hominis</i>	1
<i>L. iners</i>Т.....	1

<i>L. intestinalis</i>	1
<i>L. jensenii</i>	2
<i>L. kalixensis</i>	1
<i>L. koreensis</i>	..C.....	1
<i>L. paracollinoides</i>	..C.....T.....A.....	3
<i>L. pasteurii</i>	1
<i>L. paucivorans</i>	..C.....T.....	1
<i>L. psittaci</i>	1
<i>L. salivarius</i>C.....A.....	13
<i>L. spicheri</i>C.....A.....	1

Работа данной системы праймеров была дополнительно проверена в реальной реакции ПЦР с использованием Sybr Green I. Оказалось, что, несмотря на хорошие результаты реакции амплификации со специфичной ДНК *L. gasseri*, в отсутствие специфичной матрицы (отрицательный контроль ПЦР) с высокой интенсивностью образуются димеры праймеров. На это указывают кривая амплификации с ранним Cq и пик плавления продукта реакции - Tm отличается от Tm специфического продукта (Рисунок 11 -**Error! Reference source not found.**). Образование димеров является отрицательной характеристикой праймеров, так как снижает эффективность специфической реакции и ухудшает аналитические показатели диагностической системы.

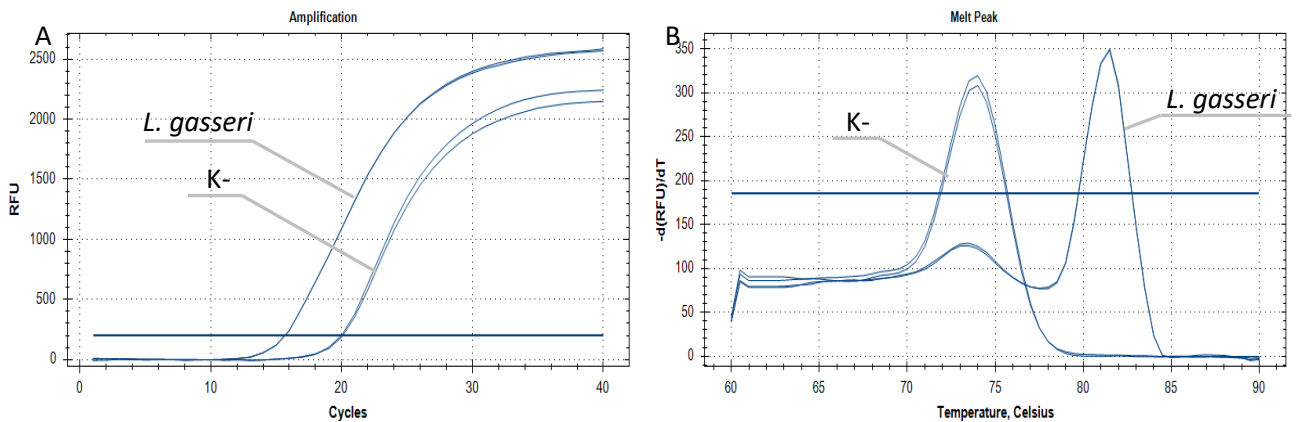


Рисунок 11 - Проверка системы праймеров из работы Balashov S.V. et. al. 2014

«K-» - отрицательный контроль ПЦР, т.е. реакция в отсутствие специфической матрицы.

Полученные результаты приводят к заключению, что использование праймеров, описанных в работе Balashov S.V. et. al. 2014, для анализа клинических проб, обладающих сложным микробным составом и неопределенным представительством разнообразных видов лактобактерий, может приводить к ошибкам и некорректному определению количественных показателей. Тем не менее, было решено провести собственный анализ особенностей межвидовой и внутривидовой вариабельности гена *tuf* и изучение возможностей для разработки

собственной системы праймеров и зондов для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий.

3.3.2. Разработка оригинальных праймеров для амплификации участка гена *tuf*

Ген *tuf* достаточно хорошо изучен, поэтому в базе Genbank присутствовало большое количество последовательностей этого гена для широкого круга видов лактобактерий. На основании сравнительного анализа выровненных последовательностей гена *tuf*, был выбран целевой участок размером 181 п.о. с возможностью амплификации и дифференциации Taqman зондами всех интересующих нас видов лактобацилл. Для амплификации данного участка разработаны праймеры (Таблица 8 -).

Таблица 8 - Анализ специфичности праймеров *tuf* в программе «Primer Blast»

Организм	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')	Количество гомологов в GenBank
<i>L. crispatus</i>	..C.....	.A.....	1
<i>L. iners</i>	T.C.....	.A.....	1
<i>L. jensenii</i>	..C.....	.A.....	1
<i>L. gasseri</i>	..C.....	.A.....	3
<i>L. johnsonii</i>	..C.....	.A.....	4
<i>L. vaginalis</i>	T.C.....	.A.....	1
<i>L. helveticus</i>	..C.....	.A.....	4
<i>L. acidophilus</i>	..C.....	.A.....	3
<i>L. delbrueckii</i>	..C.....	.A..G.....	7
<i>L. amylovorus</i>	..C.....	.A.....	2
<i>L. gallinarum</i>	..C.....	.A..G...T.....	2
<i>L. reuteri</i>	..C.....	.A...A.G.....	6
<i>L. buchneri</i>	..CG.....	.A...A.GA.....	1
<i>L. acetotolerans</i>	A.C.....	.A...T..A.T.....	1
<i>L. kefiranofaciens</i>	A.C.....	.A...T..G.T.....	2
<i>L. fermentum</i>	..C.....	.A..T.AA.GG...G...	4

Как видно из Таблица 8 -**Error! Reference source not found.**, помимо основных видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri*, предложенные праймеры имеют потенциал амплифицировать ДНК по крайней мере еще 5 видов (*L. johnsonii*, *L. vaginalis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*), которые также могут встречаться в вагинальной микробиоте (см. Обзор литературы).

Специфичность работы праймеров *in vitro* проверяли на искусственных матрицах *L. iners*, *L. jenseni*, *L. crispatus*, *L. vaginalis* и нативной ДНК *L. gasseri*, а также на образцах ДНК, выделенных из клинических урогенитальных мазков. По результатам проверки для всех матриц и лактоположительных клинических проб получены сигмоидальные кривые амплификации и один четкий пик плавления, с температурой 80 - 82°C в зависимости от вида, что показано на примере амплификации 5 искусственных матриц *L. iners*, *L. jenseni*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis* и геномной ДНК *L. gasseri* на Рисунок 12 -.

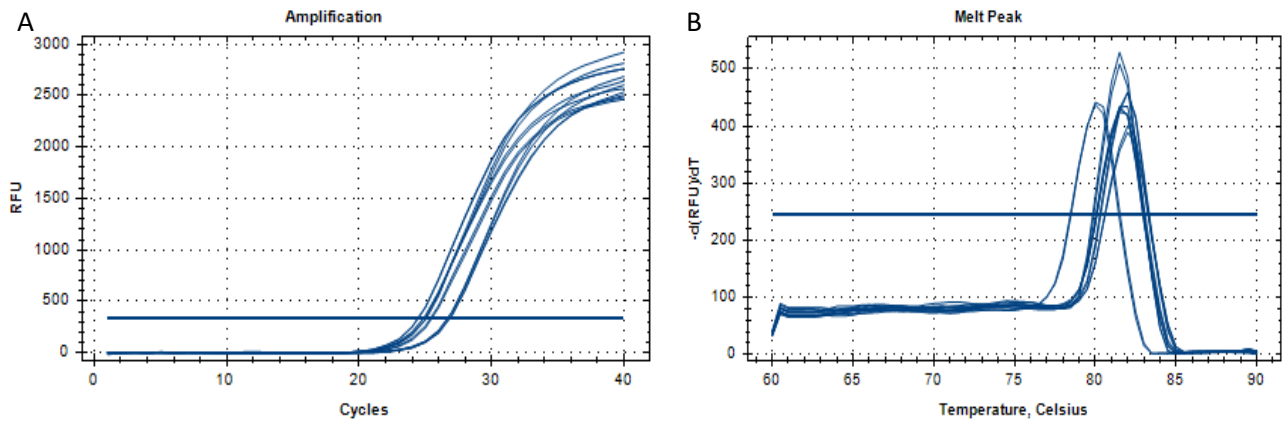


Рисунок 12 - Проверка работы праймеров при амплификации искусственных матриц *L. iners*, *L. jenseni*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis* и геномной ДНК *L. gasseri*.

А – кривые амплификации, В – кривые плавления

Однако, на лактоотрицательном материале и даже в отрицательном контроле ПЦР кривые флуоресценции всегда достигали порогового значения около 29 цикла. Оказалось, что в отсутствие специфической матрицы образуется продукт с пиком плавления около 74°C (Рисунок 13 -). Методом электрофореза в 3% агарозном геле выяснили, что размер данного продукта около 50 п.о., что позволяет предположить, что данный продукт является димером праймеров.

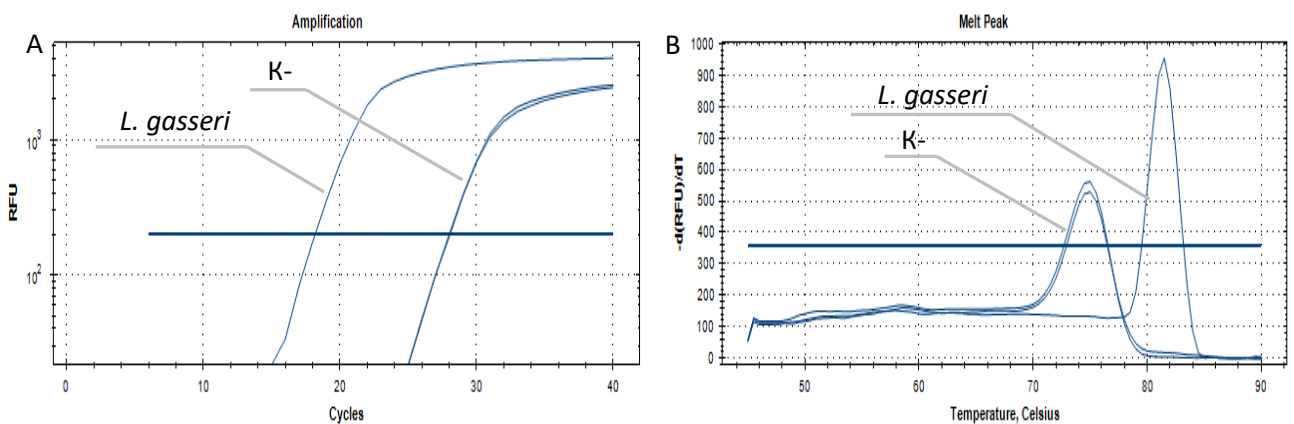


Рисунок 13 - Проверка работы праймеров в отсутствие специфической матрицы

При количественном обсчете эксперимента с десятикратными разведениями ДНК *L. gasseri*, установлено, что димеризация становится доминирующим процессом за пределами

чувствительности системы. Лимит детекции при визуализации результатов амплификации с использованием красителя Sybr green I составил 400 копий мишени в реакции, что соответствует 28 циклам ПЦР. В данных условиях, процесс димеризации не будет конкурировать со специфической амплификацией и не должен отражаться на результатах идентификации вагинальных лактобактерий.

3.3.3. Видоспецифичные зонды на основе гена *tuf*

Высокий межвидовой полиморфизм амплифицируемого фрагмента гена *tuf* исключал возможность подобрать для этой системы группоспецифичный зонд и в то же время открывал потенциал для типирования детектируемых видов лактобактерий. На основании проведенного анализа было разработано 5 зондов для специфичной детекции *L. iners*, *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. johnsonii* и *L. jensenii*, и 1 зонд для группового определения *L. crispatus*, *L. helveticus* и *L. amylovorus*. Результаты проверки специфичности зондов в программе «Primer Blast» представлены в Таблица 9 -.

Таблица 9 - Специфичность зондов на основе гена *tuf* по результатам анализа в программе «Primer Blast»

Организм	Зонд (5'-3')	Зонд (5'-3')
	Pb LinCIr	Pb LjenCE
<i>L. crispatus</i> A GT	CA . G CTT
<i>L. iners</i>	нет совпадений
<i>L. jensenii</i>	. C . AA GT
<i>L. gasseri</i> A GT	CA . G G . A AC
<i>L. johnsonii</i> A GT	нет совпадений
<i>L. vaginalis</i> A GT	C CTT AC
<i>L. helveticus</i>	. C . AA GT	CA . G CTT
<i>L. acidophilus</i>	. C . AA GT A . A CTT
<i>L. delbrueckii</i> A GT	нет совпадений
<i>L. amylovorus</i>	. C . AA GT	CA . G CTT
	Pb LvagCDCR	Pb LcriCD
<i>L. crispatus</i>	. . GTA . . . A . G GT -
<i>L. iners</i> TA . A . . . GAA . . A	нет совпадений
<i>L. jensenii</i>	нет совпадений	нет совпадений
<i>L. gasseri</i>	. A A . G . . . GAA . . A	нет совпадений
<i>L. johnsonii</i>	нет совпадений	нет совпадений
<i>L. vaginalis</i> ACT . . . G . C - A
<i>L. helveticus</i>	. . GTA . . . A . G GT -
<i>L. acidophilus</i>	нет совпадений T . . A -
<i>L. delbrueckii</i>	нет совпадений A - . T . G . CT

<i>L. amylovorus</i>	..GTA...A.G.....GT..-.....
	Pb LgasCDCE	Pb LjonCDCE
<i>L. crispatus</i>	TA.....CTT..G...GT..	нет совпадений
<i>L. iners</i>T..A.....T..AG.....A.....
<i>L. jensenii</i>	нет совпадений	нет совпадений
<i>L. gasseri</i>G.....A.....
<i>L. johnsonii</i>	нет совпадений
<i>L. vaginalis</i>G.C...CTT..G.....G.CG..CTT.....
<i>L. helveticus</i>	TA.....CTT..G...GT..	нет совпадений
<i>L. acidophilus</i>	нет совпадений	нет совпадений
<i>L. delbrueckii</i>	нет совпадений	нет совпадений
<i>L. amylovorus</i>	TA.....CTT..G...GT..	нет совпадений

Работу зондов *in vitro* проверяли на положительном и отрицательном клиническом материалах и искусственных матрицах. После ряда модификаций с использованием LNA-аналогов нуклеотидов, мы добились того, чтобы все зонды демонстрировали достаточно интенсивный сигнал на специфичной ДНК и не отжигались на неспецифичных видах лактобацилл. Зонды метили различными флуорофорами, что позволило укомплектовать 2 набора олигонуклеотидов, обеспечивавших индивидуальную идентификацию 5-ти видов лактобактерий и комплексную идентификацию еще 3-х видов в 2-х реакциях с детекцией по 3-м каналам флуоресценции. Демонстрация работы зондов приведена на Рисунок 14 -. Сконструированная тест-система получила обозначение «Лактоспектр_tuf».

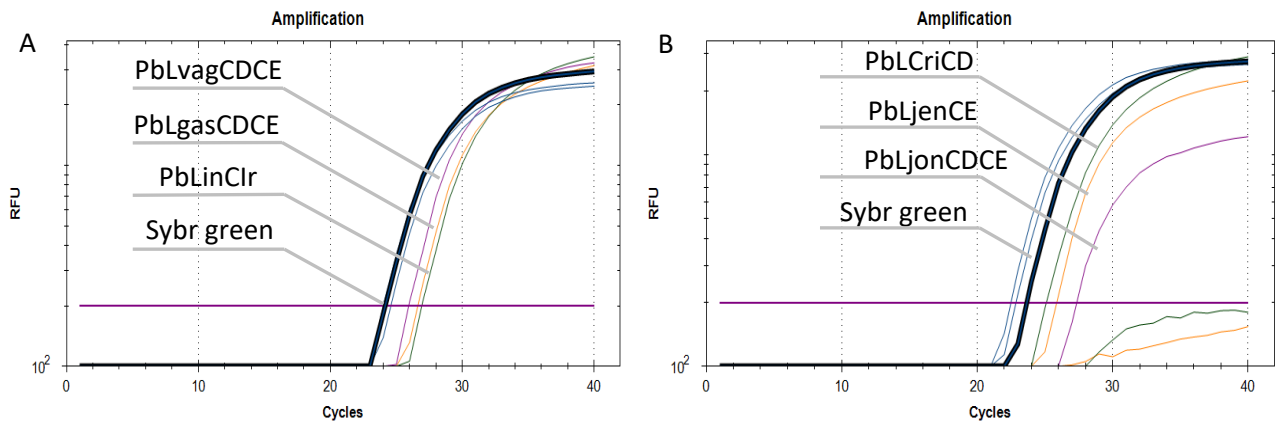


Рисунок 14 - Проверка работы зондов на основе гена *tuf* на специфичных матрицах

Полученные при помощи линеек десятикратных разведений аналитические характеристики, описывают разработанную систему «Лактоспектр_tuf» как эффективный инструмент для типирования 5-ти видов вагинальных лактобактерий индивидуально и 3-х видов комплексно (Таблица 10 -).

Таблица 10 - Аналитические характеристики работы тест системы на основе гена *tuf* с видоспецифичными зондами

Показатель	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. vaginalis</i>	<i>L. crispatus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. amylovorus</i>	<i>L. jenseni</i>	<i>L. johnsoni</i>
E (%)	96	97	94	95	95	93
M (Ct)	-3,527	-3,4836	-3,6194	-3,557	-3,5829	-3,7054
R	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,9992	0,99
LOD (Копий/реакцию)	400	400	400	400	400	400

Тем не менее, при проверке тест-системы «Лактоспектр_тuf» на коллекции ДНК из 14-ти видов лактобактерий, зонд на *L. iners* показывал фоновый сигнал в реакциях с ДНК из *L. curvatus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum* и *L. kefir* (данные не приведены). Преодолеть эту ситуацию путем изменения структуры зонда или праймеров не удалось. Так же не удалось подобрать зонд для индивидуальной детекции *L. crispatus*. В дополнение, высокая степень полиморфизма данной мишени не позволила подобрать родоспецифичный зонд для оценки тотального количества лактобактерий в образце.

Таким образом, хотя разработанная система детекции и идентификации лактобактерий «Лактоспектр_тuf» на основе амплификации гена *tuf* продемонстрировала вполне удовлетворительные результаты в отношении идентификации и количественной детекции *L. gasseri*, *L. vaginalis*, *L. jenseni*, и *L. johnsonii*, она не соответствовала в полной мере поставленным задачам, так как не обеспечивала индивидуальную идентификацию *L. crispatus* и специфическую детекцию *L. iners*. Стоит напомнить, что, по данным литературы, *L. crispatus* и *L. iners* являются ключевыми видами вагинальной микробиоты.

3.4. Количественная оценка содержания бактерий в образцах, содержащих ДНК двух видов лактобактерий одновременно

Известно, что в пределах индивидуальной микробиоты может присутствовать несколько видов лактобактерий одновременно. Возможности количественной оценки содержания каждого вида в мультиплексной реакции с видоспецифичными зондами были исследованы в цикле экспериментов со «смешанными» образцами, содержащими ДНК 2-х видов лактобактерий. «Смешанные» образцы готовили, смешивая в разных соотношениях предварительно

откалиброванные препараты ДНК *L. iners* и *L. gasseri* (Таблица 11 -). Концентрацию ДНК обоих видов определяли с помощью тест-системы «Лактоспектр_gplK» по показателю Ct с зондами Pb Lin и Pb Ljoga, тотальную ДНК определяли с помощью тест-системы «Лактокомплекс» с зондом Pb LacAAr2. Результаты представлены в Таблица 11 -.

Таблица 11 - Условия и результаты экспериментов со «смешанными» образцами

Пропорция	Концентрация (ГЭ/реакцию)		Ct		
	<i>L. iners</i>	<i>L. gasseri</i>	Pb Lin	Pb Ljoga	Pb LacAAr2
0:1	0	750 000	0,0	21,9	21,0
0,04:1	30000	750 000	0,0	22,2	20,8
0,2:1	150000	750 000	26,7	22,1	20,4
1:1	750 000	750 000	22,3	22,4	19,7
1:0,2	750 000	150000	22,3	26,9	20,7
1:0,04	750 000	30000	22,4	0,0	21,0
1:0	750 000	0	22,7	0,0	21,5

Оказалось, что при амплификации двух видов одной парой праймеров количественная оценка каждого вида возможна только в том случае, если их концентрации в образце равны или различаются незначительно. В случае смещения пропорции в сторону одного из видов более чем в 5 раз, количественно оценить можно только доминирующий вид. Если разница в концентрации компонентов составляла около порядка и больше, то менее концентрированный компонент не детектировался. Полученные результаты позволяют сделать несколько принципиальных выводов в отношении анализа проб, содержащих ДНК одновременно двух или более видов лактобактерий. Присутствие ДНК дополнительных видов лактобактерий не влияет на детекцию и количественное определение доминирующего вида. Наличие в образце ДНК двух видов лактобактерий приблизительно в равной концентрации не отражается не только на детекции этих видов, но и на их количественной оценке. Различие в концентрации ДНК двух видов более чем в 5 раз делает некорректной количественную оценку, а при больших различиях в концентрациях и невозможной детекцию и и идентификацию минорных компонентов. Выявленные закономерности необходимо учитывать при интерпретации результатов исследования клинических образцов.

3.5. Разработка системы нормирования

Исследование такого клинического материала, как урогенитальные мазки, плохо поддается стандартизации, что создает трудности при количественных оценках и поднимает вопрос о

нормировании количественных показателей. От правильно выбранного фактора нормирования зависит интерпретация полученных данных, а соответственно и результаты исследований. При выборе нормирующего показателя широкое распространение имеют два подхода: нормирование по количеству ДНК человеческих клеток или по общему содержанию ДНК микроорганизмов.

Сначала мы оценили особенности нормирования по содержанию человеческой ДНК. С этой целью 144 клинических женских урогенитальных мазка тестировали с помощью группоспецифичной системы на лактобактерии и тест-системы на человеческий ген *GapH*. Все образцы имели разное, но достаточно высокое содержание ДНК лактобактерий в абсолютных показателях, что позволяло проводить дальнейший анализ состава вагинальной микробиоты. В то же время, около 15% проб содержали малое количество человеческой ДНК, а около 15% проб, напротив, имели высокое содержание человеческой ДНК (Рисунок 15 -). Нормирование по человеческой ДНК поместило бы эти две группы образцов в диаметрально противоположные кластеры, что никак не соответствовало статусу лактобактериального компонента. Очевидно, что эта проблема вызвана не особенностью вагинальной микробиоты, а различиями в захвате вагинального эпителия при заборе пробы. Следовательно, в случае изучения компонентов микробиот, показатель соотношения человеческих клеток и микроорганизмов нельзя признать адекватным критерием для количественной оценки содержания микроорганизмов.

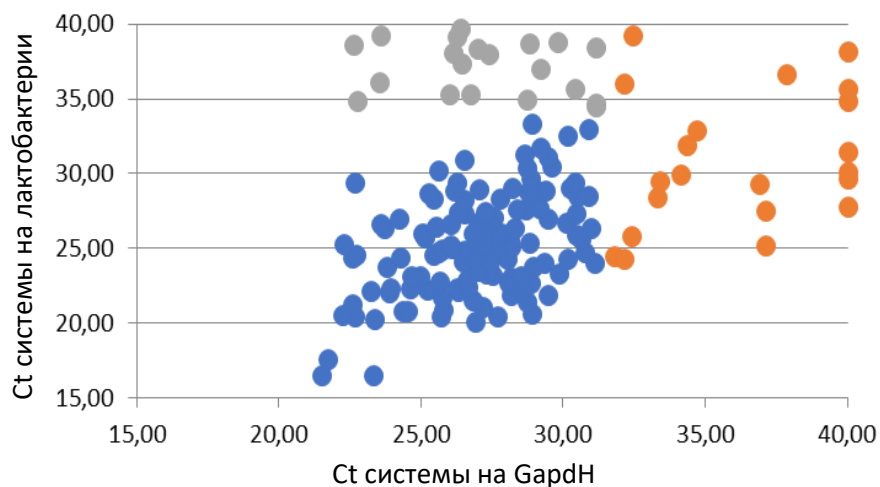


Рисунок 15 - Сравнение содержания лактобактериальной и человеческой ДНК в 144 образцах. Синим выделены образцы с высоким содержанием ДНК человека и лактобактерий; серым - образцы, в которых на фоне высокого содержания человеческой ДНК лактобактерии практически отсутствуют; оранжевым - образцы с различным уровнем лактобактерий, но с предельно низкой концентрацией ДНК человека

Другой подход - обсчитывать все компоненты микробиоты как процент от общего содержания бактериальной ДНК в образце позволяет преодолеть указанный недостаток. При таком подходе на первый план выходит не показатель общего содержания бактериальных

компонентов в пробе в абсолютных значениях, а содержание разных компонентов относительно общего бактериального пула, что, на наш взгляд меньше зависит от качества забора пробы, а, с другой стороны, более информативно с точки зрения характеристики различных индивидуальных микробов.

Общепринятой мишенью для определения «панбактериальной» ДНК методом ПЦР является ген *16S rPHK*. Предложено большое количество пар праймеров для проведения такого анализа [69, 72, 136, 156]. Мы отобрали 6 описанных в литературе пар праймеров и провели биоинформатический сравнительный анализ последовательностей гена *16S rPHK* для более чем 35 тысяч различных видов микроорганизмов для оценки сайтов связывания кандидатных праймеров, на предмет потенциальной возможности амплификации всех видов бактерий, которые по данным метагеномных исследований встречаются в вагинальной микробиоте. Кроме того, специфичность и эффективность всех пар праймеров сравнивали в реакциях амплификации с ДНК, выделенной из клинических урогенитальных мазков и чистой ДНК человека. Для визуализации амплификации в реальном времени ПЦР ставили с добавлением SYBR Green, что позволяло контролировать эффективность реакции и образование неспецифических продуктов. По результатам экспериментов выбрана система, состоящая из праймеров E782Fm и E1061Rm. Помимо того, что данная система обладала наилучшей чувствительностью, сайты посадки праймеров настолько консервативны, что практически не меняются в пределах одного типа бактерий (Таблица 12 -), при этом на человеческой ДНК продуктов амплификации не образуется.

Таблица 12 - Результаты проверки панбактериальных праймеров в сервисе Primer-BLAST, относительно видов, по данным метагеномных исследований, встречающихся в вагинальной микробиоте

Тип	Род	E782F (5'-3')	1061Rm (5'-3')
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>T.....	CA.....
	<i>Acinetobacter</i>T.....	CA.....
	<i>Cedecea</i>T.....	CA.A.....
	<i>Buttiauxella</i>T.....	CA.A.....
	<i>Eshherichia</i>T.....	CA.....
	<i>Morganella</i>T.....	CA.A.....
	<i>Haemophilus</i>T.....	CA.A.....
	<i>Aeromonas</i>T.....	CA.....
	<i>Stenotrophomonas</i>T.....	C.....
	<i>Ralstonia</i>T.....	CA.....
	<i>Janthinobacterium</i>T.....	CA.....
	<i>Comamonas</i>T.....	CA.....
Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>T.....	CA.....
	<i>Aerococcus</i>T.....	CA.....
	<i>Streptococcus</i>T.....	CA.....

	EnterococcusТ.....	СА.....
	LactobacillusТ.....	СА.....
	DialisterТ.....	СА.....
	ClostridiumТ.....	СА.....
	PeptostreptococcusТ.....	СА.....
	AnaerococcusТ.....	СА.....
	ParvimonasТ.....	СА.....
	Ureaplasma	.Т.....Т.....А.....	СА.....
Fusobacteria	LeptotrichiaТ.....	СА.А.....Т....
	SneathiaТ.....	СА.А.....Т....
	FusobacteriumТ.....	СА.....
Bacteroidetes	PrevotellaТ.....	СА..G.....
Actinobacteria	GardnerellaТ.....	СА.....
	BifidobacteriumТ.....	СА.....
	AtopobiumТ.....	СА.....

Для оценки аналитических характеристик тест системы использовали десятикратные разведения ДНК *L. gasseri*, с пересчетом на количество копий рибосомального оперона в геноме бактерии. По данным проведенных экспериментов построены графики функций линейной и логарифмической регрессии. Получены аналитические характеристики (Таблица 13 -). С помощью графика функции логарифмической регрессии рассчитано уравнение для количественной оценки содержания бактерий в образце.

Таблица 13 - Аналитические характеристики панбактериальной системы

Показатель	Полученное значение
E (%)	96
M (Ct)	-3,5283
R	0,99
R ²	0,99
LOD (Копий/реакцию)	300

Учитывая широту охвата бактериальных видов для амплификации, разработанная система представляет ценность не только для изучения вагинальной микробиоты, но и для других микробиологических исследований.

При оценке нормирования концентрации лактобактерий на общее содержание бактериальной ДНК в клинических пробах, в большинстве образцов выявлена прямая зависимость этих показателей (Рисунок 16 -).

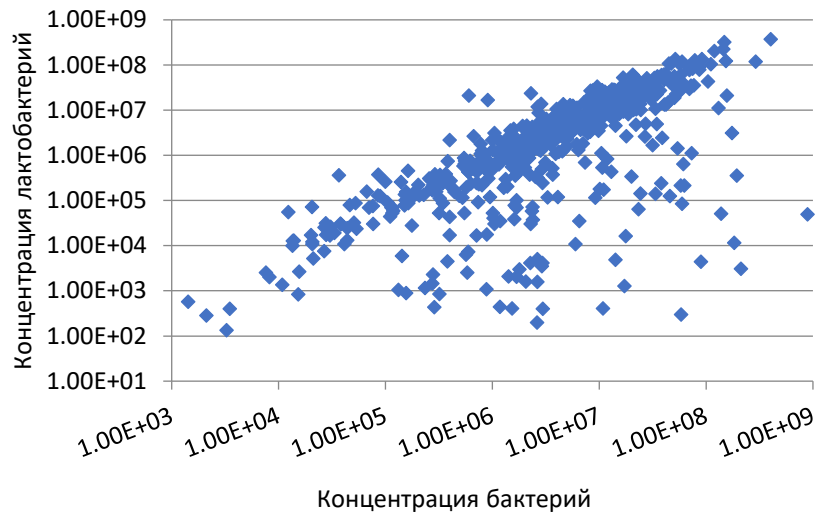


Рисунок 16 - Концентрация лактобацилл относительно общего содержания бактериальной ДНК

Таким образом, нормирование на общее содержание микробной ДНК является более адекватным подходом, потому что позволяет оценить процентное содержание отдельного вида бактерий в составе микробного сообщества. Полученное значение для лактобактерий можно предложить как лактобактериальный индекс и рекомендовать его для оценки влагалищного биоценоза.

3.6. Оценка состояния вагинальной микрофлоры по лактобактериальному индексу

Оценка состояния вагинальной микрофлоры по соотношению общего количества лактобактерий (без типирования) к общему количеству бактериальной массы (лактобактериальный индекс) в практическом плане в России впервые была реализована ООО «ДНК-Технология» в тест-системе «Фемофлор». Особенности систем «Лактокомплекс» и «Фемофлор» состоят в том, что общее содержание бактерий в обеих системах определяют по результатам амплификации гена *16S rPHK*, а количественную оценку для лактобактерий в системе «Фемофлор» получают на основе анализа также многокопийного гена *16S rPHK*, тогда как в системе «Лактокомплекс» - на основе анализа однокопийного гена *rplK*. Мы провели сравнение результатов определения лактобактериального индекса, полученных системами «Лактокомплекс» и «Фемофлор». Исследование было проведено на выборке из 86 клинических урогенитальных мазков. В первую очередь мы сравнили показатели определения бактериальной массы (Рисунок 17 -). Оказалось, что количественные оценки, полученные с помощью разных систем, хорошо коррелируют в диапазоне концентраций выше 10^6 копий мишени в микролитре

образца. Коэффициент детерминации (R^2) составил 0,8, что подтверждает высокую степень взаимосвязи полученных значений. При концентрации мишени менее 10^6 копий/мкл показатели системы «Фемофлор» оказались более высокими по сравнению с системой «Лактокомплекс».

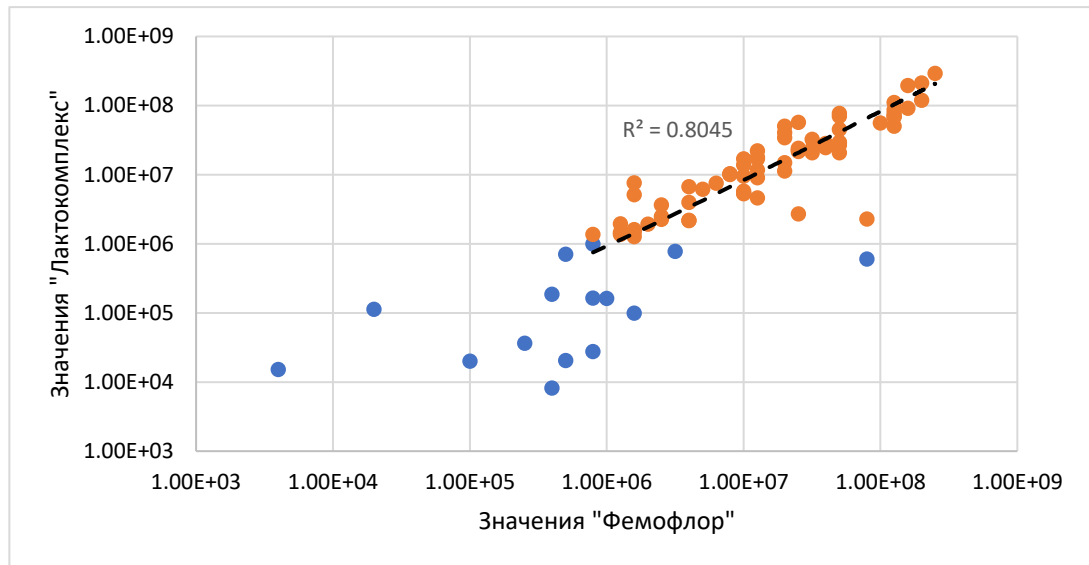


Рисунок 17 - Сравнение количественной оценки содержания бактерий при помощи систем «Лактокомплекс» и «Фемофлор». Синим выделены образцы с концентрацией мишени менее 10^6 копий/мкл, оранжевым – более 10^6 копий/мкл

Необходимо учитывать, что количество копий гена *16S pPHK* в геноме лактобактерий различается у разных видов, в то время как количество копий гена *rplK* у всех видов одинаково и равно 1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/>). Это означает, что реальное содержание лактобактерий относительно других видов может быть завышено, или, наоборот, занижено. Поэтому в математический аппарат нашей тест системы была включена поправка на количество копий гена *16S pPHK*. Так как система на основе гена *rplK* при детекции лактобактерий амплифицирует преимущественно доминирующий вид, результаты количественной оценки умножали на количество копий гена *16S pPHK* того вида, который определялся в результате анализа. Этот алгоритм потребовал определенных допущений в отношении *L. iners*. Полногеномная последовательность *L. iners* до сих пор не установлена, поэтому число копий рибосомального оперона не известно. Поэтому коэффициент умножения для *L. iners* подбирали эмпирически, опираясь на данные, полученные системой «Фемофлор». Анализ полученных данных позволил предположить, что *L. iners* имеет в геноме 2 копии рибосомального оперона. Результаты количественной оценки содержания лактобактерий в образце с учетом и без учета копийности генов при оценке количества лактобактерий представлены на Рисунок 18 -. После введения поправки на количество копий гена *16S pPHK*

коэффициент детерминации значений количества лактобактерий значительно вырос - с 0,17 до 0,75.

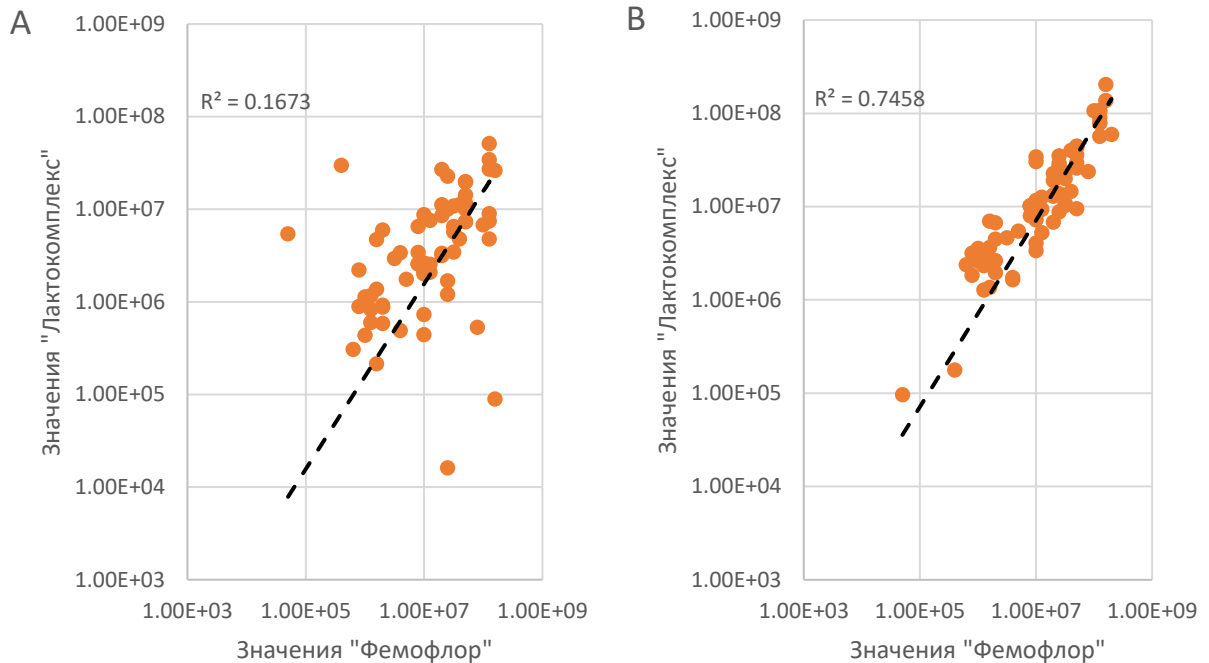


Рисунок 18 - Сравнение количественной оценки содержания лактобактерий при помощи систем «Лактокомплекс» и «Фемофлор». А – без учета и Б - с учетом копийности рибосомального оперона

Разработка алгоритма расчета лактобактериального индекса и его верификация в сравнении с коммерческим аналогом «Фемофлор» дало нам основание провести классификацию клинических проб по критериям ООО «ДНК-Технология» (Таблица 14 -).

Таблица 14 - Критерии классификации вагинального биоценоза в системе «Фемофлор»

Процентное содержание лактобактерий в образце относительно общей бактериальной нагрузки.	Категория
>80%	Нормоценоз
20-80%	Умеренный дисбиоз
<20%	Выраженный дисбиоз

Сравнение результатов интерпретации данных, полученных системами «Лактокомплекс» и «Фемофлор» по 86 образцам в соответствии с вышеуказанными критериями, приведены в Таблица 15 -.

Таблица 15 - Сравнение результатов интерпретации результатов оценки вагинального биоценоза в системах «Лактокомплекс» и «Фемофлор»

Категория		Количество образцов
«Лактокомплекс»	«Фемофлор»	
Нормоценоз	Нормоценоз	37
Нормоценоз	Умеренный дисбиоз	5
Умеренный дисбиоз	Нормоценоз	22
Умеренный дисбиоз	Умеренный дисбиоз	3
Выраженный дисбиоз	Выраженный дисбиоз	2

Как видно из таблицы, некоторое количество образцов по-разному классифицируются в разных системах в случае определения состояний как «Нормоценоз» или «Умеренный дисбиоз». Стоит отметить, что клиническое значение такого состояния как «Умеренный дисбиоз» остается неопределенным, более того, оно может быть следствием стандартной погрешности метода ПЦР. Категория «Выраженный дисбиоз» диагностируется обеими системами с равной эффективностью.

Разработанная система нормирования позволяет классифицировать вагинальные образцы на основании соотношения видов бактерий в пределах индивидуальной микробиоты. Результаты, полученные с помощью системы «Лактокомплекс», хорошо коррелируют с результатами коммерческого аналога «Фемофлор», который давно и широко используется в нашей стране для клинической оценки состояния вагинального биоценоза, что дало основание для использования разработанного алгоритма определения лактобактериального индекса для классификации микробиот в дальнейших исследованиях вагинальных проб в рамках настоящего проекта.

3.7. Изучение видового разнообразия лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин

Тест-системы «Лактокомплекс» и «Лактоспектр_гр1К» были использованы для изучения видового состава доминирующих лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин. Вместе эти 2 тест-системы позволяли детектировать 9 видов лактобактерий. Всего было исследовано 602 вагинальных мазка, взятых у женщин в возрасте от 14 до 66 лет, обратившихся в медицинские учреждения городов Москва, Королёв, Иваново и Чебоксары по разным причинам. Выборка включала в себя как женщин без видимых нарушений и жалоб, так и женщин с различными патологическими процессами в урогенитальной области.

Лактобактерии в достаточном количестве обнаружены в 96% проб, в остальных 3% образцов они либо полностью отсутствовали, либо выявлялись в предельно низкой концентрации. При этом, во всех пробах без лактобактерий общее содержание бактерий было в пределах нормы, то есть отсутствие лактобактерий не было связано с качеством взятия и преаналитической обработки образца.

По полученным данным в 77% образцов доминировал только один вид лактобактерий, в 21% присутствовали два вида и только в 1,6% проб встречались три доминирующих вида лактобактерий (Таблица 16 -). Наиболее часто встречались виды *L. iners* и *L. crispatus*, 50 % и 44,5 % проб, соответственно. *L. jensenii* встречался в 15% проб, при этом в 70% проб с наличием этого вида, он занимал минорную позицию в сочетании с *L. iners*. Реже остальных обнаруживался *L. gasseri*, он встречался только в 6% проб, однако, если он присутствовал, то в большинстве случаев он являлся доминирующим компонентом. На протяжении всего исследования найдена только 1 проба с доминированием *L. acidophilus*. Проб, в которых доминировали виды, типизирующиеся зондом PbLhe, в данном исследовании не обнаружено.

Таблица 16 - Распространенность видов лактобактерий в исследованной выборке

Виды <i>Lactobacillus</i>	Кол-во образцов	%
<i>L. iners</i>	203	33,7
<i>L. jensenii</i>	21	3,5
<i>L. gasseri</i>	29	4,8
<i>L. crispatus</i>	208	34,6
<i>L. iners</i> + <i>L. crispatus</i>	37	6,1
<i>L. iners</i> + <i>L. jensenii</i>	51	8,5
<i>L. iners</i> + <i>L. gasseri</i>	2	0,3
<i>L. crispatus</i> + <i>L. jensenii</i>	10	1,7
<i>L. crispatus</i> + <i>L. gasseri</i>	3	0,5
<i>L. iners</i> + <i>L. crispatus</i> + <i>L. jensenii</i>	8	1,3
<i>L. iners</i> + <i>L. crispatus</i> + <i>L. gasseri</i>	1	0,2
<i>L. crispatus</i> + <i>L. jensenii</i> + <i>L. gasseri</i>	1	0,2
<i>L. acidophilus</i>	1	0,2
<i>L. helveticus</i>	-	-
Не обнаружены	19	3,2
Всего	602	

Для сравнения, 202 пробы параллельно исследовали тест-системой «Лактоспектр_tuf», результаты представлены в Таблица 17 -. Результаты по идентификации доминирующего вида

совпали полностью, однако в отношении минорных компонентов обнаружены несовпадения. Как было сказано ранее, при одновременной амплификации нескольких видов в разных концентрациях одной парой праймеров, достоверная оценка возможна только если разница в концентрации не превышает 5 раз (см. главу 4.2.4.). Во всех случаях несовпадения результатов идентификации минорных лактобактерий, разница в концентрации между минорным и доминирующим видом превышала допустимый предел. Поэтому, обнаруженные расхождения результатов укладываются в наше понимание работы тест-систем и не являются критичными, так как целью являются не минорные, а доминирующие виды лактобактерий.

Таблица 17 - Сравнение результатов видовой идентификации системами «Лактоспектр_rplK» и «Лактоспектр_tuf» на выборке из 202 образцов

Название вида	Кол-во положительных образцов		Комментарий
	<i>rplK</i>	<i>tuf</i>	
<i>L. iners</i>	79	83	Во всех случаях несовпадений <i>L. iners</i> присутствовал в предельно низкой концентрации в сравнении с доминирующим видом.
<i>L. jensenii</i>	38	31	9 несовпадений. Во всех случаях несовпадений <i>L. jensenii</i> присутствовал в предельно низкой концентрации в сравнении с доминирующим видом.
<i>L. gasseri</i>	31	31	
<i>L. crispatus</i>	91	89	Во всех случаях несовпадений <i>L. crispatus</i> присутствовал в предельно низкой концентрации в сравнении с доминирующим видом.
<i>L. vaginalis</i>	не определяет	1	Обнаружен как минорный компонент на фоне <i>L. gasseri</i> .
<i>L. acidophilus</i>	1	не определяет	
<i>L. helveticus</i>	0	не определяет	Не обнаружен.
<i>L. johnsoni</i>	Не определяет	0	Не обнаружен.

Помимо 4 основных видов *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri*, в исследованных образцах обнаружены *L. acidophilus* и *L. vaginalis*. *L. acidophilus* занимал доминирующую позицию на фоне отсутствия каких либо других видов лактобактерий, в то время как *L. vaginalis* являлся минорным компонентом. Каких-либо других видов лактобактерий в данном исследовании не обнаружено.

По результатам проведенных исследований можно констатировать, что наиболее распространенными видами вагинальных лактобактерий являются *L. iners* и *L. crispatus*, виды *L. gasseri* и *L. jensenii* менее распространены, а все остальные виды вагинальных лактобактерий либо являются минорными компонентами, либо не встречаются в изученной популяции.

3.8. Корреляционный анализ доминирования различных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин

Для поиска возможной корреляции распространения доминантных видов лактобактерий с критериями из бланка информированного согласия пациентов и результатами количественной оценки, проведена обработка полученных данных методами статистического анализа с использованием пакета программ R.

В первую очередь определяли тип распределения данных методом Шапиро-Уилка, для выбора адекватных методов анализа. В качестве критерия для оценки использовали общее содержание бактерий, полученное панбактериальной системой. По результатам проверки, распределение отличалось от нормального ($p\text{-value} = 2.15E-08$), значит для анализа могут быть использованы только непараметрические методы.

Далее из выборки были исключены крайние значения с пониженной достоверностью, или так называемые «выбросы». В нашей выборке встречались выбросы двух типов: образцы с предельно низкой (меньше 10^4 ГЭ/реакцию) и слишком высокой (более 10^8 ГЭ/реакцию) концентрациями бактериальной ДНК. Такие образцы могут иметь негативное влияние на результаты статистической обработки, учитывая, что они составляли 5% от первичной выборки, было принято решение ими пренебречь. Размер финальной выборки составил 568 проб (Рисунок 19 -).

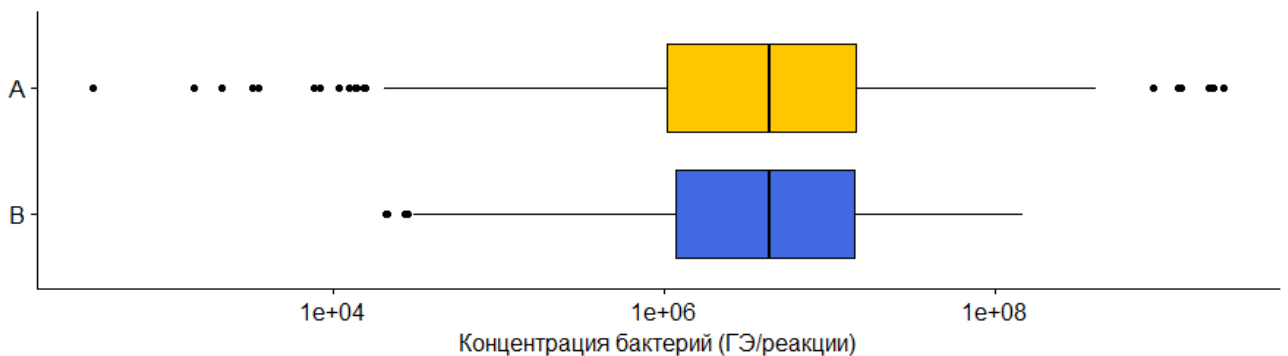


Рисунок 19 - Визуализация первичной и финальной выборок с использованием коробчатого графика, выбросы отмечены точками. А – выборка до исключения выбросов, В – выборка после исключения выбросов

Финальную выборку анализировали с использованием метода главных компонент на наличие кластеризации по доминирующим видам лактобактерий. (Рисунок 20 -).

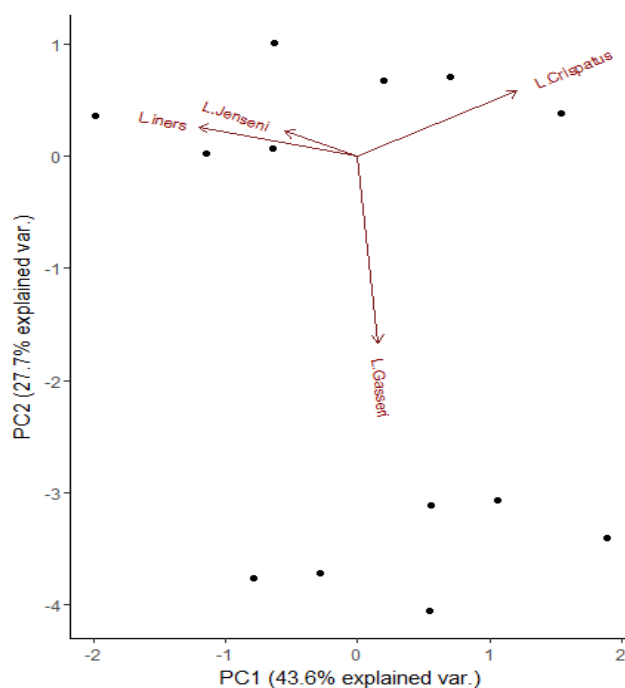


Рисунок 20 - Кластеризация образцов по встречаемости видов лактобактерий. По осям расположены рассчитанные значения для двух главных компонент (Comp.1 и Comp.2)

Как показано на Рисунок 20 -, все 568 образцов делятся на 3 кластера. При этом четко выделяются 3 кластера: с доминированием *L. crispatus*, *L. gasseri*, и пробы с доминированием *L. iners* или *L. jensenii*, объединенные в один кластер.

Дальнейшая статистическая обработка была направлена на выяснение возможных причин такой кластеризации.

В полном объеме ($n = 568$) выборку анализировали на ассоциации видового разнообразия лактобактерий с возрастом и городом проживания пациента.

Поиск ассоциации между городом проживания пациента и доминирующим видом вагинальных лактобактерий проводили с использованием точного теста Фишера. Оказалось, что распространение видов не зависит от города проживания пациентки, p -value варьировали от 0,06 до 0,4.

Возможную корреляцию распространенности видов лактобактерий среди пациенток разного возраста проводили с использованием комбинации метода главных компонент с регрессионным анализом относительно возраста пациенток. Установлено, что среди пациенток в возрасте от 14 до 66 лет статистически значимой корреляции распространенности конкретного вида с возрастом нет (p -value = 0,6).

Для проведения анализа на ассоциацию видов лактобактерий с состоянием вагинальной микробиоты, необходимо было отобрать пробы, в которых содержание бактерий превышало 10^6 копий/реакцию. Выборка, удовлетворяющая этому критерию, содержала 447 проб, что составляло 74% от общей выборки. Для всех отобранных проб рассчитано процентное содержание лактобактерий относительно общей бактериальной массы с учетом копийности рибосомального оперона. На основании полученных данных пробы были классифицированы по 3-м категориям: нормоценоз, умеренный дисбиоз, выраженный дисбиоз (см. главу 4.2.2). Далее возможную взаимосвязь между встречаемостью видов лактобактерий и различным состоянием вагинального биоценоза анализировали с использованием метода Фишера в пакете программ R.

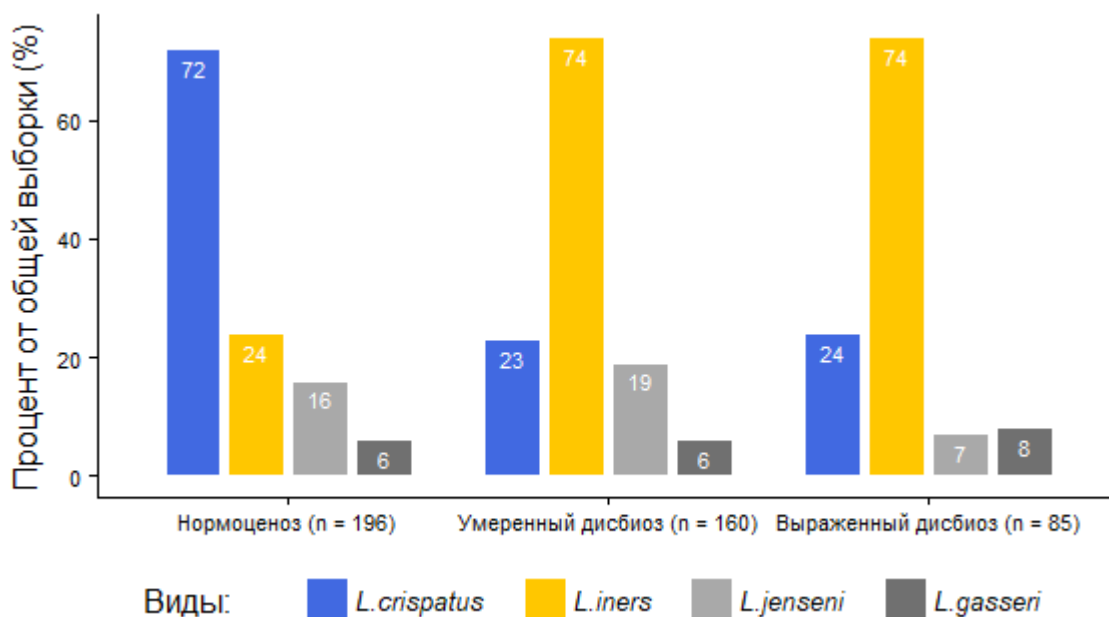


Рисунок 21 - Процент встречаемости видов лактобактерий в образцах с различным состоянием биоценоза

В результате анализа выявлены определенные закономерности (Рисунок 21 -). С образцами, отнесенными к категории нормоценоз, в качестве доминирующего вида ассоциирован *L. crispatus* (p -value $< 2e-16$), тогда как доминирование *L. iners* ассоциировано с умеренным и выраженным дисбиозом (p -value $< 2,2e-16$). С невысокой статистической достоверностью можно отметить, что доминирование *L. jensenii* реже встречается в состоянии выраженного дисбиоза (p -value = 0,03). *L. gasseri* можно обнаружить во всех трёх категориях с равной вероятностью (p -value = 0,8). Таким образом, клиническое состояние вагинальной микробиоты, описываемое в терминах нормоценоз – дисбиоз, имеет выраженную корреляцию не просто с количеством лактобактерий, а с доминированием определенных видов: *L. crispatus* при нормоценозе и *L. iners* при дисбиозе.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обнаружение и идентификация вагинальных лактобактерий методом ПЦР в реальном времени не является тривиальной задачей, учитывая широкое разнообразие молочнокислых бактерий, их сложную классификацию, меняющиеся таксономические критерии и генетический полиморфизм близких видов. Описанные на сегодня системы комплексного определения лактобактерий методом ПЦР основаны прежде всего на амплификации гена *16S pPHK*, который является консервативным для всего бактериального сообщества. Высокая консервативность гена *16S pPHK* часто не позволяет подобрать не только видоспецифичные, но и группо- или родоспецифичные зонды. Кроме того, различное число копий гена *16S pPHK* у разных видов бактерий, включая лактобактерии, делает некорректными результаты определения количественного содержания бактерий в образцах, имеющих сложный видовой состав. Поэтому, использование альтернативных генетических мишеней для диагностической амплификации ДНК вагинальных лактобактерий может открыть новые возможности для решения указанной проблемы. Следует подчеркнуть, что подбор генетических мишеней для детекции бактерий методом ПЦР в основном определяется двумя факторами: наличием в базах данных представительных наборов необходимых сиквенсов и принадлежностью отобранных маркеров к генам «домашнего хозяйства». С появлением полногеномного секвенирования, созданием и расширением соответствующих геномных баз данных появились принципиально новые возможности для поиска новых амплификационных маркеров, основанные на исчерпывающем сравнительном анализе геномов бактерий.

В лаборатории молекулярной диагностики ИМГ РАН был разработан оригинальный программный комплекс, позволяющий выполнять поиск гомологичных последовательностей в заданном наборе геномных последовательностей [3]. В результате такого анализа формируется список нуклеотидных мотивов, гомологичных для исследованной группы микроорганизмов, которые потенциально могут быть использованы для подбора амплификационных мишеней.

В настоящей работе описанный подход был использован для анализа геномов типичных представителей вагинальных лактобактерий, что позволило предложить ген *rplK* в качестве новой амплификационной мишени для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий. Метод количественной ПЦР активно используется для определения лактобактерий в вагинальных образцах, но только два генетических локуса использовались в качестве амплификационных мишеней: гены *16S pPHK* и *tuf* [20, 24, 36, 51, 79, 100, 137, 140, 155, 158]. При анализе невагинальных лактобактерий использовались и другие гены: межгенный спейсерный участок *16S-23S pPHK* [135], гены *pheS*, *rpoA* [105], *hsp60 / groEL* [116, 130], *fusA*,

gpmA, *gyrA*, *gyrB*, *lepA*, *pyrG* и *recA* [116, 123, 144], *dnaJ* [68], *rpoB*, *rplB* [130] и гены пептидогликана гидролаз [71]. Мы первыми предложили ген *rplK*, который кодирует рибосомный белок L11, для детекции и видовой идентификации лактобактерий методом ПЦР. Преимущества этой мишени заключаются в том, что она присутствует у всех видов бактерий, включая лактобактерии, и она всегда представлена в единственной копии, обеспечивая правильную количественную оценку. Кроме того, генетический полиморфизм первичной структуры гена *rplK* гораздо более выражен по сравнению с генами рибосомных РНК, что помогает избежать проблемы неспецифической амплификации, присущей системам амплификации на основе генов рибосомных РНК.

На основе гена *rplK* разработаны тест-системы для количественной оценки общего содержания лактобактерий «Лактокомплекс» и для видовой дифференциации основных видов вагинальных лактобактерий «Лактоспектр_*rplK*». Обе системы не имеют аналогов в мире.

Тест-система «Лактокомплекс» предназначена для определения интегрального показателя количества всех видов вагинальных лактобактерий в образце. Стоит упомянуть, что все предложенные до сих пор для достижения этой цели тест-системы основаны на амплификации рибосомального оперона, число которого для каждого вида разное, что может приводить к неверным заключениям о содержании лактобактерий. Например, число копий гена *16S pPHK* в геноме *L. gasseri* – 6, *L. crispatus* – 4, *L. iners* – предположительно не более 2-х. Следовательно, если исследовать 3 образца с одинаковым количеством микроорганизмов, но в первом образце будет присутствовать *L. gasseri*, во втором - *L. crispatus*, а в третьем - *L. iners*, количественная оценка с использованием мишени *16S pPHK* будет не корректной. Напротив, при тестировании этих образцов системой «Лактокомплекс» определение концентрации лактобактерий будет проведено правильно.

Для сравнительного анализа сложных микробных сообществ в серии образцов необходим фактор нормирования. Самым адекватным подходом на данный момент является нормирование на общее содержание бактерий, определяемое по результатам амплификации рибосомального оперона. Несмотря на несовершенство этого подхода, связанное с межвидовой разнокопийностью мишени, альтернативы данной мишени нет в виду ее универсальности и консервативности в пределах всего домена *Bacteria*. Поэтому, при разработке математического аппарата тест-системы «Лактокомплекс» для расчета процентного содержания лактобактерий по отношению к общей бактериальной массе, мы учитывали количество копий гена *16S pPHK* у доминирующего вида лактобактерий. Результаты проценой оценки лактобактерий данной тест-системой хорошо коррелировали с результатами коммерческих аналогов, что давало возможность использовать наши системы для классификации проб по общепринятым критериям.

Тест-система «Лактоспектр_rplK» позволяет в 2-х реакциях с детекцией по 3-м каналам флуоресценции проводить детекцию в общей сложности 11 видов лактобактерий: идентификацию 4-х индивидуальных видов - *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jenseni* и *L. acidophilus*, одной пары видов *L. gasseri* и *L. johnsonii* без дифференциации и группы лактобактерий из 5-ти видов также без дифференциации - *L. helveticus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. acetotolerans* и *L. kefiranofaciens*. Прямых аналогов данной тест-системе в мире нет. Частично диагностическую панель «Лактоспектр_rplK» можно сопоставить с мультиплексной тест-системой на основе амплификации гена *tuf*, которая обеспечивает детекцию и дифференциацию 4-х основных видов вагинальных лактобактерий, предложенной в работе Balashov S.V. et al., 2014. Ключевые отличия цитированной системы заключаются в использовании другой мишени амплификации и отсутствии возможности определения интегрального показателя общего содержания лактобактерий в образце. Помимо этого, система «Лактоспектр_rplK» способна определять не только самые распространенные 4 вида вагинальных лактобактерий, но и группу «нерегулярных» видов, которые по данным метагеномных исследований так же могут встречаться в вагинальной микробиоте [69, 118, 136]. Последняя особенность позволила нам провести исследование возможности присутствия «нерегулярных» видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин и показать, что их наличие в качестве доминирующих компонентов крайне редко, если вообще возможно.

Несмотря на очевидные достоинства системы «Лактоспектр_rplK», использовать ген *tuf* в качестве мишени для детекции вагинальных лактобактерий также заслуживало внимания. В отличие от гена *rplK*, последовательности которого можно было извлечь только из проектов по полногеномному секвенированию лактобактерий, что существенно сужало аналитическую базу, ген *tuf* относится к «популярным» объектам исследования и его последовательности широко представлены в Genbank. В частности, в базе данных имелась последовательность гена *tuf* для *L. vaginalis* - вид, который в целом ряде работ приводится в качестве возможного компонента вагинального биоценоза [69, 72, 118, 136]. Отсутствие аналогичной последовательности для гена *rplK* не позволило разработать на его основе тест-систему для определения *L. vaginalis*.

Проведенный анализ распределения консервативных и переменных участков гена *tuf* лактобактерий позволил разработать тест-систему «Лактоспектр_tuf», которая имела как общие, так и отличные характеристики с системой «Лактоспектр_rplK». Тест-система «Лактоспектр_tuf» обеспечивала в 2-х реакциях с детекцией по 3-м каналам флуоресценции детекцию 5 индивидуальных видов лактобактерий (*L. iners*, *L. jenseni*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* и *L. vaginalis*) и группы лактобактерий из 3-х видов без дифференциации (*L. crispatus*, *L. helveticus* и *L. amylovorus*). При этом, зонд на *L. iners* демонстрировал перекрестный отжиг на нескольких близкородственных видах лактобактерий, и отсутствовала возможность индивидуальной

идентификации *L. crispatus*. Стоит напомнить, что виды *L. iners* и *L. crispatus* являются ключевыми для вагинальной микробиоты. Высокая вариабельность мишени *tuf* также не позволила подобрать такой участок, который мог бы послужить зондом для оценки интегрального показателя общего количества лактобактерий. Однако, несмотря на вышеуказанные «слабости» системы «Лактоспектр_*tuf*» она являла собой хорошее дополнение к тест-системе «Лактоспектр_*gplK*». Во-первых, с ее помощью можно было верифицировать данные о распространении различных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин, полученные с помощью тест-системы «Лактоспектр_*gplK*». Во-вторых, провести исследования распространения в вагинальных микробиотах *L. vaginalis*, который по данным литературы так же может встречаться в вагинальной микробиоте [69, 72, 118, 136]. Наконец, с помощью системы «Лактоспектр_*tuf*» можно дифференцировать *L. gasseri* и *L. johnsonii*, что не позволяла сделать система «Лактоспектр_*gplK*», т.к. эти виды детектируются в ней парно.

Исследование распространения различных видов лактобактерий в вагинальных микробиотах российских женщин с использованием тест-системы «Лактоспектр_*gplK*» было проведено на 602 урогенитальных мазках, полученных от женщин из Москвы, Иваново, Королёва и Чебоксар. В выборке присутствовали как здоровые, так и имеющие патологические процессы различной этиологии женщины. Возрастной диапазон составил от 14 до 66 лет.

В 96% проб обнаружены лактобактерии в достаточном количестве, в остальных 3%, на фоне нормального содержания бактерий, лактобактерии либо отсутствовали, либо содержались в предельно низкой концентрации, что соответствует данным зарубежных авторов [118, 136, 157]. Наиболее распространенными видами лактобактерий оказались *L. iners* (49%) и *L. crispatus* (43%), менее распространены *L. jensenii* (15%) и *L. gasseri* (6%), остальные виды либо встречаются крайне редко, либо являются минорными компонентами. Это полностью совпадает с общепринятыми представлениями о распространении видов вагинальных лактобактерий [69]. При этом, в 77% случаев доминировал только один вид лактобактерий, в 21 % два вида, а в 1,6 % было обнаружено три вида лактобактерий. Интересно, что в 18% из 19,5 % проб с двумя и во всех пробах с тремя видами лактобактерий в качестве одного из компонентов фигурировала *L. iners*. Не менее интересным является факт, что *L. jensenii* практически всегда была ассоциирована с *L. iners* в качестве минорного компонента, а *L. gasseri* практически никогда не образовывала пар.

В 202 пробах, дополнительно протестированных тест-системой «Лактоспектр_*tuf*» различий в идентификации доминирующих видов лактобактерий не обнаружено. В 31 образце из 202, доминировал вид *L. gasseri* и ни в одном из образцов не найден *L. johnsonii*. Эти данные дают нам основание предполагать, что в исследованной популяции вид *L. johnsonii* либо не встречается, либо является минорным компонентом. *L. vaginalis* был найден только в 1 из 202

образцов, в котором занимал позицию минорного компонента. На основании полученных данных можно предположить, что этот вид встречается крайне редко, либо является минорным компонентом и не определяется на фоне доминирующего вида.

Однако, для оценки возможностей обсуждаемых тест-систем с обоими были проведены эксперименты со смешанными образцами по результатам которых выяснилось, что наш формат ПЦР-реакции дает возможности анализировать минорные компоненты, если они уступают в концентрации доминирующему виду не более чем в 10 раз (см. главу 0).

В наших исследованиях доля вагинальных проб, не содержащих лактобактерии, составляла 3%, тогда как по данным некоторых метагеномных исследований 20-30% [118]. Такая разница в результатах, на наш взгляд, вызвана разницей в чувствительности методов, так как метод ПЦР в 1000 раз более чувствителен, чем метагеномное секвенирование. В любом случае, необходимы дополнительные исследования по изучению подобного рода микробиот.

При анализе распространенности видов вагинальных лактобактерий на выборке из 602 проб с помощью методов статистического анализа обнаружена кластеризация образцов на 3 группы. Образцы, содержащие *L. iners* и/или *L. jensenii* объединены в одну группу, остальные две группы содержали *L. gasseri* и *L. crispatus* индивидуально. Обнаружено, что распространение видов лактобактерий не связано с возрастом и местом проживания женщин, участвовавших в исследовании. Однако, существует статистически достоверная корреляция между доминированием видов *L. iners* и *L. crispatus* и процентным содержанием лактобактерий относительно общей бактериальной нагрузки в образце (см главу 0.). Стоит напомнить, что в настоящее время в клинической практике процентное содержание лактобактерий относительно общего содержания бактерий используется для диагностики вагинальных дисбиозов. Наши результаты коррелируют с представлением, что *L. crispatus* ассоциирован с состоянием «нормоценоз», а *L. iners* – с состояниями «умеренный дисбиоз» и «выраженный дисбиоз». Существует мнение, что *L. iners* больше похож на патоген, чем на симбионта, из-за своих физиологических особенностей [87, 101, 117], что косвенно подтверждается нашими данными о том, что этот вид практически всегда присутствует в микробиотах, где доминируют несколько видов лактобактерий. Вид *L. jensenii*, по нашим наблюдениям, чаще встречается в состоянии «умеренного дисбиоза». Поэтому, скорее всего, он играет не ключевую роль, а является транзиторным и доминирует только в отсутствие других резидентных видов, таких как *L. crispatus* или *L. gasseri*. Ассоциировать *L. gasseri* с каким-либо критерием не удалось. Тем не менее, факт того, что он практически никогда не образует пар с другими лактобактериями, свидетельствует о способности этого вида обеспечить устойчивость биоценоза, что может играть определенную роль в механизмах защиты экосистемы репродуктивного тракта женщин от инфекции патогенами.

Полученные в данной работе данные крайне интересны с точки зрения клинической диагностики проблем уrogenитального тракта женщин. В частности, присутствие в значительном количестве одного из видов лактобактерий отражает определенные клинические состояния вагинальной экосистемы, и, следовательно, может служить маркером этих состояний. Продолжение исследований в этом направлении позволит улучшить диагностику расстройств женской репродуктивной системы и открывает новые возможности для разработки пробиотиков на основе резидентных штаммов *L. crispatus*, и возможно *L. gasseri*.

ВЫВОДЫ

1. Предложена новая амплификационная мишень для детекции и идентификации вагинальных лактобактерий – ген *rplK*, кодирующий рибосомальный белок L11.
2. Впервые разработана тест-система, обеспечивающая корректное определение общего содержания вагинальных лактобактерий в пробе. Корректность работы системы обеспечивается тем, что в основе определения лежит амплификация гена *rplK*, который у всех потенциальных мишеней имеет одинаковое число копий.
3. На основе амплификации гена *rplK* разработана уникальная панель тест-систем, обеспечивающих как определение общего содержания, так и видовую идентификацию широкого круга лактобактерий, потенциально встречающихся в вагинальных микробиотах.
4. Биоразнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах женщин европейской части России ограничивается небольшим числом видов, среди которых доминируют *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и *L. jensenii*. Другие виды лактобактерий встречаются крайне редко и обычно являются минорными компонентами микробиоты.
5. Вагинальные микробиоты российских женщин могут быть классифицированы на 3 кластера с доминированием *L. crispatus*, *L. iners*, или *L. gasseri*. Доминирование *L. crispatus* ассоциировано с нормальной микрофлорой, доминирование *L. iners* с вагинальным дисбиозом, выражающимся сниженным содержанием лактобактерий.
6. Распространение *L. jensenii* коррелирует с доминированием *L. iners*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанный алгоритм определения лактобактериального состава вагинального биотопа рекомендуется для дифференциации нормальных и дисбиотических состояний микробиоценоза влагалища.

2. Панель тест-систем «Лактоспектр-гp1К» рекомендуется для изучения популяционной variability видового состава микробиоты влагалища.

3. Тест-системы «Лактокомплекс» и «Лактоспектр-гp1К» рекомендуются для изучения динамики изменения лактобактериальных компонентов вагинальной микробиоты при различных физиологических состояниях и инфекционных заболеваниях женской репродуктивной сферы.

4. Разработка и применение локальных пробиотических препаратов, основанных на принципах персонализированной медицины, должна проводиться с учетом доминирования вида *L. crispatus* в вагинальных биотопах российских женщин и способности этого вида к поддержанию здоровой вагинальной микробиоты.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

1. Выявленные закономерности позволяют предполагать, что у *L. crispatus* существуют механизмы поддержания вагинального здоровья, отсутствующие у *L. iners*. Так же остается неизвестным влияние доминирования *L. gasseri* и *L. jensenii* на состояние вагинальной микробиоты. В дальнейшем необходимо более подробное изучение данных вопросов и поиск дополнительных маркеров устойчивости вагинального микробного сообщества как со стороны микроорганизмов, так и со стороны организма человека.

2. Противоречия между данными о роли различных видов бактерий в развитии вагинальных дисбиозов до сих пор не разрешены. Также остается непонятной роль видов лактобактерий, являющихся минорными компонентами вагинальной микробиоты. Нерешенным остается и вопрос, являются ли критические изменения в составе вагинального биоценоза результатом внешней интервенции нерезидентных для данного биоценоза видов, или это есть результат физиологического дисбаланса резидентной микрофлоры. Продолжение исследований в этом направлении позволит не только улучшить диагностику дисбиотических состояний женской репродуктивной сферы, но и разработать рациональные подходы к их коррекции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВОЗ (WHO)	всемирная организация здравоохранения
ВПГ	вирус простого герпеса
ВПЧ	вирус папилломы человека
ГЭ	геном эквивалент
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИППП	инфекции передающиеся половым путем
КОЕ	колониеобразующая единица
п.о.	комплементарно связанная пара нуклеотидов
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РТ-ПЦР	ПЦР в реальном времени
<i>16S рРНК</i>	ген, кодирующий рибосомальную рибонуклеиновую кислоту малой субъединицы рибосом прокариот.
<i>23S рРНК</i>	ген, кодирующий рибосомальную рибонуклеиновую кислоту большой субъединицы рибосом прокариот.
<i>atpA</i>	ген, кодирующий альфа субъединицу АТФ-синтазы
BLAST	семейство компьютерных программ, служащих для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот
<i>cpn60</i>	ген, кодирующий белок теплового шока CPN60
<i>clpP</i>	ген, кодирующий протеолитическую субъединицу АТФ-зависимой серин-протеазы
CRISPR	семейство последовательностей ДНК антивирусного защитного механизма бактерий и архей
Ct	цикл ПЦР, на котором флуоресценция реакции превысила пороговое значение
<i>dnaJ</i>	ген, кодирующий домен белка теплового шока HSP40
<i>efG</i>	ген, кодирующий фактор элонгации G (один из аллелей <i>fusA</i>)
FISH	метод флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i>
<i>fusA</i>	ген, кодирующий фактор элонгации G
<i>gapd</i>	ген, кодирующий глицеральдегид трифосфат дегидрогеназу
<i>gpmA</i>	ген, кодирующий фермент фосфоглицератмутаза
<i>groEL</i>	ген, кодирующий белок теплового шока GroEL
<i>gyrA</i>	ген, кодирующий субъединицу А ДНК-гиразы
<i>gyrB</i>	ген, кодирующий субъединицу В ДНК-гиразы

<i>hsp60</i>	ген, кодирующий белок теплового шока HSP60
<i>lepA</i>	ген, кодирующий фактор элонгации EF4
LNA-нуклеотиды	класс бициклических аналогов ДНК, в которых 2'- и 4'-положения соединены в фуранозном кольце
LOD	предел чувствительности
MALDI-ToF	метод матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации с последующим разделением ионов в вакууме
MetaHIT	Европейский консорциум метагеномики кишечного тракта
OTU	операционная таксономическая единица
<i>pheS</i>	ген, кодирующий субъединицу альфа фермента фенилаланин тРНК синтаза
<i>pyrG</i>	ген, кодирующий фермент цитидин трифосфат синтаза
qPCR	ПЦР в реальном времени
<i>recA</i>	ген, кодирующий фермент рекомбиназа A
<i>rplB</i>	ген, кодирующий рибосомальный белок L2
<i>rplK</i>	ген, кодирующий рибосомальный белок L11
<i>rpoA</i>	ген, кодирующий субъединицу альфа фермента РНК полимеразы
<i>rpoB</i>	ген, кодирующий субъединицу бета фермента РНК полимеразы
<i>secA</i>	ген, кодирующий альфа субъединицу препротейн транслоказы
<i>Slp</i>	ген, кодирующий липопротеин клеточной мембраны
T/DGGE	электрофорез в денатурирующем градиентном геле
Taq-полимераза	термостабильная полимеразы, выделенная из микроорганизма <i>thermophilus aquaticus</i>
T-RFLP	анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
<i>tuf</i>	ген, кодирующий фактор элонгации Tu

Список использованной литературы

1. Анкирская, А.С. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов / А.С. Анкирская, В.В. Муравьева // Медицинская технология. – 2011. – С. 3 – 10.
2. Ботина, С.Г. Реклассификация отечественных пробиотических культур бактерий рода *Lactobacillus* / С.Г. Ботина, К.М. Климина, Н.В. Коробан, В.В. Зинченко, В.Н. Даниленко // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 11. – С. 1306 – 1313.
3. Демкин, В.В. Специфичные мотивы в геномах семейства *Chlamydiaceae* / В.В. Демкин, Н.В. Кириллова // Молек. генет. микробиол. вирусол. – 2012. – № 3. – С. 26 – 27.
4. Исаева, А.С. Видовая идентификация влагалищных лактобацилл, выделенных у женщин репродуктивного возраста / А.С. Исаева, А.В. Летаров, Е.Н. Ильина, А.Д. Боровская, В.В. Муравьева, А.С. Анкирская // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 3. – С. 60 – 64.
5. Копылов А. Метод главных компонент // www.wikipedia.org. MediaWiki. 2017. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4_%D0%B3%D0%BB%D0%B0%D0%B2%D0%BD%D1%8B%D1%85_%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D0%BE%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D1%82#%D0%94%D0%B8%D0%B0%D0%B3%D0%BE%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%BA%D0%B
6. Логачев Ю. Критерий Шапиро-Уилка // www.machinelearning.ru. 2011. http://www.machinelearning.ru/wiki/index.php?title=%D0%9A%D1%80%D0%B8%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B9_%D0%A8%D0%B0%D0%BF%D0%B8%D1%80%D0%BE-%D0%A3%D0%B8%D0%BB%D0%BA%D0%B0
7. Медведева, П.А. Структура видовой разнообразия лактобацилл из вагинального биотопа женщин, проживающих в г. Иркутске / П. А. Медведева, Ю. П. Джигоев, С. М. Попкова, И. Н. Данусевич, Л.С. Козлова, Н.М. Шабанова, Е.В. Бухарова, Г.В. Юринова, В.П. Саловарова // Известия ИГУ. – 2012. – Т. 5, – № 1. – С. 11 – 19.
8. Мелкумян, А.Р. Влагалищные лактобактерии современные подходы к видовой идентификации и изучению их роли в микробном сообществе / Мелкумян А.Р., Припутневич Т.В. // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 7. – С. 18 – 23.
9. Припутневич, Т.В. Использование современных лабораторных технологий в видовой идентификации лактобактерий при оценке состояния микробиоты влагалища у женщин репродуктивного возраста / Т.В. Припутневич, А.Р. Мелкумян, А.С. Анкирская, Д.Ю. Трофимов, В.В. Муравьева, М.Г. Завьялова // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 1. – С. 76 – 80.

10. Шабанова, Н.М. Анализ структуры и характеристика комбинационного разнообразия видовых ассоциаций лактобацилл вагинального биотопа / Н.М. Шабанова, Ю.П. Джиоев, С.М. Попкова, П.А. Медведева, И.Н. Данусевич, Г.В. Юринова, В.П. Саловарова // Известия ИГУ. – 2014. – Т. 7. – С. 69 – 79.
11. Шабанова, Н.М. Микроэкологическая и геновидовая характеристика лактобацилл вагинального биотопа у женщин с неспецифическими воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта / Н.М. Шабанова, С.М. Попкова, Ю.П. Джиоев, Е.Б. Ракова, И.Н. Данусевич, Е.В. Бухарова, У.М. Немченко // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – Т. 2, № 2. – С. 90.
12. Шамин, Р.В. Регрессионный анализ // [www.Wikipedia.org](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7). 2016. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%B5%D0%B3%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7.
13. Щуров, И. Точный тест Фишера // [www.Wikipedia.org](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D1%82%D0%B5%D1%81%D1%82_%D0%A4%D0%B8%D1%88%D0%B5%D1%80%D0%B0). 2014. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D0%BE%D1%87%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D1%82%D0%B5%D1%81%D1%82_%D0%A4%D0%B8%D1%88%D0%B5%D1%80%D0%B0.
14. Af Heurlin, M. Bakteriologische Untersuchungen des Genitalsekretes / M. Af Heurlin // Karger, Berlin. – 1914.
15. Antonio, M.A. The identification of vaginal Lactobacillus species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species / M.A. Antonio, S.E. Hawes, S.L. Hillier // J. Infect. Dis. – 1999. – Vol. 180. – P. 1950 – 1956.
16. Anukam, K. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial / K. Anukam, E. Osazuwa, I. Ahonkhai, M. Ngwu, G. Osemene, A.W. Bruce, et al. // Microbes. Infect. – 2006a. – Vol. 8. – P. 1450 – 1454.
17. Anukam, K.C. Clinical study comparing probiotic Lactobacillus GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis / Anukam K. C., Osazuwa E., Osemene G. I., Ehigiagbe F., Bruce A. W., Reid G. // Microbes. Infect. – 2006b. – Vol. 8. – P. 2772 – 2776.
18. Anukam, K.C. Lactobacillus vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city Nigeria / K.C. Anukam, E.O. Osazuwa, I. Ahonkhai, G. Reid // Sex Transm. Dis. – 2006c. – Vol. 33. – P. 59 – 62.
19. Baker, G.C. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers / G.C. Baker, J.J. Smith, D.A. Cowan // J. Microbiol. Meth. – 2003. – Vol. 55, № 3. – P. 541 – 555.

20. Balashov, S.V. Multiplex quantitative polymerase chain reaction assay for the identification and quantitation of major vaginal lactobacilli / S.V. Balashov, E. Mordechai, M.E. Adelson, J.D. Sobel, S.E. Gyax // *Diagn. Micr. Infec.* – 2014. – Vol. 78, № 4. – P. 321 – 327.
21. Blaiotta, G. Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation / G. Blaiotta, V. Fusco, D. Ercolini, M. Aponte, O. Pepe, F. Villani // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74, № 1. – P. 208 – 215.
22. Borgdorff, H. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women / H. Borgdorff, E. Tsvitsivadze, R. Verhelst, M. Marzorati, S. Jurriaans, G.F. Ndayisaba, et al. // *ISME J.* – 2014. – Vol. 8. – P. 1781 – 1793.
23. Brooijmans, R.J.W. The electron transport chains of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 / R.J. Brooijmans, W.M. de Vos, J. Hugenholtz // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 3580 – 3585.
24. Burton, J.P. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques / J.P. Burton, G. Reid // *J. Infect. Dis.* – 2002. – Vol. 186. – P. 1770 – 1780.
25. Bustin S.A., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative realtime PCR experiments / S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, et al. // *Clin. Chem.* – 2009. – Vol. 55. – P. 611 – 622.
26. Byun, R. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries / R. Byun, M.A. Nadkarni, K.L. Chhour, F.E. Martin, N.A. Jacques, N. Hunter // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, № 7. – P. 3128 – 3136.
27. Cardone, A. Utilisation of hydrogen peroxide in the treatment of recurrent bacterial vaginosis / A. Cardone, R. Zarcone, A. Borrelli, C.A. Di, A. Russo, E. Tartaglia // *Minerva Ginecol.* – 2003. – Vol. 55. – P. 483 – 492.
28. Carey, J. C. Is a change in the vaginal flora associated with an increased risk of preterm birth? / J.C. Carey, M.A. Klebanoff // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 192. – P. 1341 – 1346.
29. Carr, F.J. The lactic acid bacteria: a literature survey / F.J. Carr, D. Chill, N. Maida // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2002. – Vol. 28. – P. 281 – 370.
30. Chaban, B. Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle / B. Chaban, M.G. Links, T.P. Jayaprakash, E.C. Wagner, D.K. Bourque, Z. Lohn, et al. // *Microbiome.* – 2014. – Vol. 2. – P. 23.

31. Chaithongwongwatthana, S. Single hydrogen peroxide vaginal douching versus single-dose oral metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis: a randomized controlled trial / S. Chaithongwongwatthana, S. Limpongsanurak, C. Sitthi-Amorn // *J. Med. Assoc. Thai.* – 2003. – Vol. 86, № 2. – P. 379 – 384.
32. Chavagnat, F. Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli / F. Chavagnat, M. Haueter, J. Jimeno, M.G. Casey // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – Vol. 217, № 2. – P. 177 – 183.
33. Collins, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S RNA / M.D. Collins, U.M. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J.A.E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B.A. Phillips, A.M. Williams, S. Wallbanks // *Microbiology Letters.* – 1991. – Vol. 77. – P. 5 – 12.
34. Conti, C. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli / C. Conti, C. Malacrino, P. Mastromarino // *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. Vol. 60, № 6. P. 19 – 26.
35. Datcu, R. Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR / R. Datcu, D. Gesink, G. Mulvad, R. Montgomery-Andersen, E. Rink, A. Koch, et al. // *BMC Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 480.
36. De Backer, E. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners* / E. De Backer, R. Verhelst, H. Verstraelen, M.A. Alqumber, J.P. Burton, J.R. Tagg, M. Temmerman, M. Vaneechoutte // *BMC Microbiol.* – 2007. – Vol. 7. – P. 115.
37. Dellaglio, F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria / F. Dellaglio, G.E. Felis // *Probiotics and prebiotics: scientific aspects.* – 2005.
38. Döderlein, A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber / A. Döderlein. // Besold, Leipzig. – 1892.
39. Dominguez-Bello, M.G. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns / M.G. Dominguez-Bello, E.K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 11971 – 11975.
40. Donders, G.G. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy / G.G. Donders, C.K. Van, G. Bellen, R. Reybrouck, B.T. Van den, I. Riphagen, et al. // *BJOG.* – 2009. – Vol. 116. – P. 1315 – 1324.
41. Drell, T. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women / T. Drell, T. Lillsaar, L. Tummeleht, J. Simm, A. Aaspollu, E. Vain, et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – P. 54379.

42. Dumonceaux, T.J. Multiplex detection of bacteria associated with normal microbiota and with bacterial vaginosis in vaginal swabs by use of oligonucleotide-coupled fluorescent microspheres / T.J. Dumonceaux, J. Schellenberg, V. Goleski, J.E. Hill, W. Jaoko, J. Kimani, D. Money, T.B. Ball, F.A. Plummer, A. Severini // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47, № 12. 4067 – 4077.
43. El Aila, N.A. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora / N.A. El Aila, I. Tency, G. Claeys, H. Verstraelen, B. Saerens, G.L. Santiago, et al. // *BMC Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 9. – P. 167.
44. Eriksson, K.A double-blind treatment study of bacterial vaginosis with normal vaginal lactobacilli after an open treatment with vaginal clindamycin ovules / K. Eriksson, B. Carlsson, U. Forsum, P.G. Larsson // *Acta. Derm. Venereol.* – 2005. – Vol. 85. – P. 42 – 46.
45. Falsen, E. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. / E. Falsen, C. Pascual, B. Sjoden, M. Ohlen, M.D. Collins // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 49. – P. 217 – 221.
46. Felis, G.E. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria / G.E. Felis, F. Dellaglio // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 44 – 61.
47. Ferris, M.J. Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment / M.J. Ferris, J. Norori, M. Zozaya-Hinchliffe, D.H. Martin // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 1016 – 1018.
48. Forney, L.J. Comparison of self-collected and physician-collected vaginal swabs for microbiome analysis / L.J. Forney, P. Gajer, C.J. Williams, G.M. Schneider, S.S. Koenig, S.L. McCulle, et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 1741 – 1748.
49. Forsythe, P. Voices from within: gut microbes and CNS / P. Forsythe, W.A. Kunze // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2013. – Vol. 70. – P. 55 – 69.
50. Frank, D.N. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era / D.N. Frank, N.R. Pace // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 24. – P. 4 – 10.
51. Fredricks, D.N. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR / D.N. Fredricks, T.L. Fiedler, K.K. Thomas, C.M. Mitchell, J.M. Marrazzo // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – Vol. 47, № 3. – P. 721 – 726.
52. Gajer, P. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota / P. Gajer, R.M. Brotman, G. Bai, J. Sakamoto, U.M. Schutte, X. Zhong, et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2012. – Vol. 4. – P. 132.

53. Gautam, R. Correlates of the molecular vaginal microbiota composition of African women / R. Gautam, H. Borgdorff, V. Jespers, S.C. Francis, R. Verhelst, M. Mwaura // *BMC Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 15. – P. 86.
54. Gharthey, J.P. Lactobacillus crispatus dominant vaginal microbiome is associated with inhibitory activity of female genital tract secretions against Escherichia coli / J.P. Gharthey, B.C. Smith, Z. Chen, N. Buckley, Y. Lo, A.J. Ratner, et al. // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. 96659.
55. Gong, Z. Lactobacilli inactivate Chlamydia trachomatis through lactic acid but not H₂O₂ / Z. Gong, Y. Luna, P. Yu, H. Fan // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. 107758.
56. Goth, Y.J. Genomic features of Lactobacillus species / Y.J. Goth, T.R. Klaenhammer // *Front. Biosci.* – 2009. – Vol. 14. – P. 1362 – 1386.
57. Gustafsson, R.J. The Lactobacillus flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women / R.J. Gustafsson, S. Ahrne, B. Jeppsson, C. Benoni, C. Olsson, M. Stjernquist, et al. // *BMC Womens Health.* – 2011. – Vol. 11. – P. 17 – 11.
58. Hallen, A. Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli / A. Hallen, C. Jarstrand, C. Pahlson // *Sex Transm. Dis.* – 1992. – Vol. 19. – P. 146 – 148.
59. Hammes, W.P. Genus I. Lactobacillus / W.P. Hammes, C. Hertel // *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Berlin. – 2009. – Vol. 3.
60. Hammes, W.P. The genera Lactobacillus and Carnobacterium / W.P. Hammes, C. Hertel // *The prokaryotes.* – 2003. – Vol. 3. – P. 15.
61. Hammes, W.P. The genera of lactic acid bacteria / W.P. Hammes, R.F. Vogel // *Blackie Academic & Professional.* – 1995. – P. 628 – 631.
62. Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms / J. Handelsman // *Microbiol Mol. Biol. Rev.* – 2004. – Vol. 68, № 4. – P. 669 – 685.
63. Harmsen, H.J. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces / H.J. Harmsen, G.C. Raangs, T. He, J.E. Degener, G.W. Welling // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68, № 6. – P. 2982 – 2990
64. Heid, C.A. Real Time Quantitative PCR / C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams // *Genome Research.* – 1996. – Vol. 6. – P. 986 – 994.
65. Hemmerling, A. Phase 1 dose-ranging safety trial of Lactobacillus crispatus CTV-05 for the prevention of bacterial vaginosis / A. Hemmerling, W. Harrison, A. Schroeder, J. Park, A. Korn, S. Shiboski et al. // *Sex Transm. Dis.* – 2009. – Vol. 36. – P. 564 – 569.
66. Hemmerling, A. Phase 2a study assessing colonization efficiency, safety, and acceptability of Lactobacillus crispatus CTV-05 in women with bacterial vaginosis / A. Hemmerling, W. Harrison, A. Schroeder, J. Park, A. Korn, S. Shiboski et al. // *Sex Transm. Dis.* – 2010. – Vol. 37. – P. 745 – 750.

67. Henriques, A. In silico vs in vitro analysis of primer specificity for the detection of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and *Lactobacillus* spp / A. Henriques, T. Cereija, A. Machado, N. Cerca // *BMC Res.* – 2012. – Vol. 5. – P. 637.
68. Huang, C.H. The *dnaJ* gene as a molecular discriminator to differentiate among species and strain within the *Lactobacillus casei* group / C.H. Huang, M.T. Chang, L. Huang, W.S. Chu // *Mol. Cell. Probes.* – 2015. – Vol. 29, № 6. – P. 479 – 484.
69. Hummelen, R. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV / R. Hummelen, A.D. Fernandes, J.M. Macklaim, R.J. Dickson, J. Chagalucha, G.B. Gloor et al. // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5. – P. 12078.
70. Jakobsson, T. *Lactobacillus iners*: a marker of changes in the vaginal flora? / T. Jakobsson, U. Forsum // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 3145.
71. Jebava, I. Peptidoglycan hydrolases as species-specific markers to differentiate *Lactobacillus helveticus* from *Lactobacillus gallinarum* and other closely related homofermentative lactobacilli / I. Jebava, V. Chuat, S. Lortal, F. Valence // *Curr. Microbiol.* – 2014. – Vol. 68, № 4. – P. 551 – 557.
72. Jespers, V. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests / V. Jespers, J. Menten, H. Smet, S. Poradosu, S. Abdellati, R. Verhelst, L. Hardy, A. Buve, T. Crucitti // *BMC Microbiol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 83.
73. Jirovec, O. Neue Klassifikation der Vaginalbiocoenose auf sechs Grundbildern / O. Jirovec, R. Peter, J. Malek // *Gynaecologia.* – 1948. – Vol. 126. – P. 77.
74. Kandler, O. Genus *Lactobacillus* Beijerinck / O. Kandler, N. Weiss // *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Baltimore. – 1986. – Vol. 2.
75. Kilic, A.O. Comparative study of vaginal *Lactobacillus* phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence, morphology, host range, and DNA homology / A.O. Kilic, S.I. Pavlova, S. Alpay, S.S. Kilic, L. Tao // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 31 – 39.
76. Kiss, H. Vaginal *Lactobacillus* microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy / H. Kiss, B. Kogler, L. Petricevic, I. Sauerzapf, S. Klayraung, K. Domig, et al. // *BJOG.* – 2007. – Vol. 114. – P. 1402 – 1407.
77. Klein, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria / G. Klein, A. Pack, C. Bonaparte, G. Reuter // *Int. J. Food. Microbiol.* – 1998. – Vol. 41. – P. 103 – 125.
78. Kullen, M.J. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex / M.J. Kullen, R.B. Sanozky-Dawes, D.C. Crowell, T.R. Klaenhammer // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – Vol. 89, № 3. – P. 511 – 516.

79. Kusters, J.G. A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis / J.G. Kusters, E.A. Reuland, S. Bouter, P. Koenig, J.W. Dorigo-Zetsma // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 34, № 9. – P. 1779 – 1785.
80. Lambert, J.A. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: recognition of the conversion process / J.A. Lambert, S. John, J.D. Sobel, R.A. Akins // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – P. 82599.
81. Larsson P.G. Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study / P.G. Larsson, B. Stray-Pedersen, K.R. Rytting, S. Larsen // *BMC Womens Health.* – 2008. – Vol. 8. – P. 3.
82. Lee, J.E. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort / J.E. Lee, S. Lee, H. Lee, Y.M. Song, K. Lee, M.J. Han, et al. // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – P. 63514.
83. Li, J. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome / J. Li, H. Jia, X. Cai, H. Zhong, Q. Feng, S. Sunagawa et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 834 – 841.
84. Loy, A. Phylogenetic microarrays for cultivation-independent identification and metabolic characterization of microorganisms in complex samples / A. Loy, M. Pester, D. Steger // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 688. – P. 187 – 206.
85. M. Massi, Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina / M. Massi, B. Vitali, F. Federici, D. Matteuzzi, P. Brigidi, // *J. Appl. Microbiol.* – 2004. – Vol. 96. – P. 777 – 786.
86. Macklaim, J.M. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1 / J.M. Macklaim, G.B. Gloor, K.C. Anukam, S. Cribby, G. Reid // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – Vol. 108. – P. 4688 – 4695.
87. Macklaim, J.M. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis / J.M. Macklaim, A.D. Fernandes, J.M. Di Bella, J.A. Hammond, G. Reid, G.B. Gloor // *Microbiome.* – 2013. – Vol. 1. – P. 12.
88. Marsh, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products / Marsh, T.L. // *Curr. Opin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 2, № 3. – P. 323 – 327
89. Martin, D.H. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees / D.H. Martin, M. Zozaya, R. Lillis, J. Miller, M.J. Ferris // *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* – 2012. – Vol. 123. – P. 242 – 256.

90. Martin, R. Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli / R. Martin, J.E. Suarez // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76. – P. 400 – 405.
91. Martin, R. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates / R. Martin, N. Soberon, M. Vaneechoutte, A.B. Florez, F. Vazquez, J.E. Suarez // *Int. Microbiol.* – 2008. – Vol. 11. – P. 261 – 266.
92. Martinez, R.C. Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected Brazilian women / R.C. Martinez, S.A. Franceschini, M.C. Patta, S.M. Quintana, A.C. Nunes, J.L. Moreira, et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – P. 4539 – 4542.
93. Martinez, R.C. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / R.C. Martinez, S.A. Franceschini, M.C. Patta, S.M. Quintana, B.C. Gomes, E.C. De Martinis, et al. // *Can. J. Microbiol.* – 2009. – Vol. 55. – P. 133 – 138.
94. Martinez-Pena, M.D. *Lactobacillus* species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study / M.D. Martinez-Pena, G. Castro-Escarpulli, M.G. Guilera-Arreola // *BMC Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 189.
95. Mastromarino, P. Antiviral activity of *Lactobacillus brevis* towards herpes simplex virus type 2: role of cell wall associated components / P. Mastromarino, F. Cacciotti, A. Masci, L. Mosca // *Anaerobe.* – 2011. – Vol. 17. – P. 334 – 336.
96. Mastromarino, P. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets / P. Mastromarino, P. Brigidi, S. Macchia, L. Maggi, F. Pirovano, V. Trinchieri, et al. // *J. Appl. Microbiol.* – 2002. – Vol. 93. – P. 884 – 893.
97. Mastromarino, P. Effectiveness of *Lactobacillus*-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis / P. Mastromarino, S. Macchia, L. Meggiorini, V. Trinchieri, L. Mosca, M. Perluigi, et al. // *Clin. Microbiol Infect.* – 2009. – Vol. 15. – P. 67 – 74.
98. Mastromarino, P. Effects of vaginal lactobacilli in *Chlamydia trachomatis* infection / P. Mastromarino, P.M. Di, G. Schiavoni, C. Nardis, M. Gentile, R. Sessa // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2014. – Vol. 304. – P. 654 – 661.
99. McPherson, J.D. A defining decade in DNA sequencing / J.D. McPherson // *Nat. Methods.* – 2014. – Vol. 11, № 10. – P. 1003 – 1005
100. Menard, J.P. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis / J.P. Menard, F. Fenollar, M. Henry, F. Bretelle, D. Raoult // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 47, № 1. – P. 33 – 43.
101. Mendes-Soares, H. Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. Reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment / H. Mendes-Soares, H. Suzuki, R.J. Hickey, L.J. Forney // *J. Bacteriol.* – 2014. – Vol. 196. – P. 1458 – 1470.

102. Mitchell, C. Interaction between lactobacilli, bacterial vaginosis-associated bacteria, and HIV Type 1 RNA and DNA genital shedding in U.S. and Kenyan women / C. Mitchell, J.E. Balkus, D. Fredricks, C. Liu, J. Kernan-Mullin, L.M. Frenkel, et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 2013. – Vol. 29. – P. 13 – 19.
103. Mullis, K. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R. Saiki; S. Scharf; F. Faloona; K. Mullis; G. Horn; H. Erlich; N. Arnheim // *Science.* – 1985. – Vol. 230. – P. 1350 – 1354.
104. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E.C. de Waal, A.G. Uitterlinden // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59, № 3. – P. 695 – 700.
105. Naser, S.M. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses / S.M. Naser, P. Dawyndt, B. Hoste, D. Gevers, K. Vandemeulebroecke, I. Cleenwerck, M. Vancanneyt, J. Swings // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007. – Vol. 57, № 12. – P. 2777 – 2789.
106. Nugent, R.P. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation / R.P. Nugent, M.A. Krohn, S.L. Hillier // *J. Clin. Microbiol.* – 1991. – Vol. 29. – P. 297 – 301.
107. O'Hanlon, D.E. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli / D.E. O'Hanlon, B.R. Lanier, T.R. Moench, R.A. Cone // *BMC Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 10. – P. 120.
108. O'Hanlon, D.E. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide / D.E. O'Hanlon, T.R. Moench, R.A. Cone // *BMC Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 11. – P. 200.
109. Orla-Jensen, S. The lactic acid bacteria / S. Orla-Jensen // Fred Host and Son. Copenhagen – 1919.
110. Parent, D. Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied Lactobacilli acidophili and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial / D. Parent, M. Bossens, D. Bayot, C. Kirkpatrick, F. Graf, F.E. Wilkinson, et al. // *Arzneimittelforschung.* – 1996. – Vol. 46. – P. 68 – 73.
111. Pascual, L.M. Lactobacillus rhamnosus L60, a potential probiotic isolated from the human vagina / L.M. Pascual, M.B. Daniele, F. Ruiz, W. Giordano, C. Pajaro, L. Barberis // *J. Gen. Appl. Microbiol.* – 2008b. – Vol. 54. – P. 141. – 148.
112. Pascual, L.M. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by Lactobacillus fermentum L23 / L.M. Pascual, M.B. Daniele, W. Giordano, M.C. Pajaro, I.L. Barberis // *Curr. Microbiol.* – 2008a. – Vol. 56. – P. 397 – 402.

113. Petricevic, L. Characterisation of the vaginal *Lactobacillus* microbiota associated with preterm delivery / L. Petricevic, K.J. Domig, F.J. Nierscher, M.J. Sandhofer, M. Fidesser, I. Krondorfer, et al. // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4. – P. 5136.
114. Petricevic, L. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis / L. Petricevic, A. Witt // *BJOG.* – 2008. – Vol. 115. – P. 1369 – 1374.
115. Porter, J.R. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria / J.R. Porter // *Bacteriol. Rev.* – 1976. – Vol. 40, № 2. – P. 260 – 269.
116. Ramachandran, P. Development of a tiered multilocus sequence typing scheme for members of the *Lactobacillus acidophilus* complex / P. Ramachandran, D.W. Lacher, E.A. Pfeiler, C.A. Elkins // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – Vol. 79, № 23. – P. 7220 – 7228.
117. Rampersaud, R. Inerolysin, a cholesterol-dependent cytolysin produced by *Lactobacillus iners* / R. Rampersaud, P.J. Planet, T.M. Randis, R. Kulkarni, J.L. Aguilar, R.I. Lehrer, et al. // *J. Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193. – P. 1034 – 1041.
118. Ravel, J. Vaginal microbiome of reproductive-age women / J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo, G.M. Schneider, S.S. Koenig, S.L. Mc Culle et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – Vol. 1. – P. 4680 – 4687.
119. Reid, G. Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract / G. Reid, R.L. Cook, A.W. Bruce // *J. Urol.* – 1987. – Vol. 138. – P. 330 – 335.
120. Reid, G. Oral probiotics can resolve urogenital infections / G. Reid, A.W. Bruce, N. Fraser, C. Heinemann, J. Owen, B. Henning // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2001. – Vol. 30. – P. 49 – 52.
121. Rekha, R. Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora / R. Rekha, A.R. Moshahid, P. Jaishree // *Electronic Journal of Biotechnology.* – 2006. – Vol. 9, № 5. – P. 505 – 512.
122. Rizzo, A. *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human beta-defensins 2 and 3 / A. Rizzo, A. Losacco, C.R. Carratelli // *Immunol. Lett.* – 2013. – Vol. 156. – P. 102 – 109.
123. Rodriguez, H. Efficacy of recA gene sequence analysis in the identification and discrimination of *Lactobacillus hilgardii* strains isolated from stuck wine fermentations / H. Rodriguez, B. de Las Rivas, R. Munoz // *Int. J. Food Microbiol.* – 2007. – Vol. 115, № 1. – P. 70 – 78.
124. Salvetti, E. The genus *Lactobacillus* : A taxonomic update / E. Salvetti, S. Tolinari, G. Felis // *Probiotics and Antimicrobial Proteins.* – 2012. – Vol. 1. – P. 7.

125. Santiago, G.L. Longitudinal qPCR study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina / G.L. Santiago, I. Tency, H. Verstraelen, R. Verhelst, M. Trog, M. Temmerman, et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. 45281.
126. Santiago, G.L. Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles / G.L. Santiago, P. Cools, H. Verstraelen, M. Trog, G. Missine, A.N. El, et al. // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – P. 28180.
127. Schleifer, K.H. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera / K.H. Schleifer, W. Ludwig // Syst. Appl. Microbiol. – 1995. – Vol. 18. – P. 461 – 467.
128. Schlundt, J. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria / J. Schlundt // Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. FAO / WHO. – 2012.
129. Schröder, R. Zur Pathogenese und Klinik des vaginalen Fluors / R. Schröder // Zbl Gynäkol. – 1921. – Vol. 38. – P. 1350 – 1361
130. Shevtsov, A.B. Identification of phenotypically and genotypically related *Lactobacillus* strains based on nucleotide sequence analysis of the *groEL*, *rpoB*, *rplB*, and 16S rRNA genes / A.B. Shevtsov, A.R. Kushugulova, I.K. Tynybaeva, S.S. Kozhakhmetov, A.B. Abzhalelov, K.T. Momynaliev, L.G. Stoianova // Mikrobiol. (Russian). – 2011. – Vol. 80, № 5. – P. 659 – 668.
131. Shi, Y. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods / Y. Shi, L. Chen, J. Tong, C. Xu // J. Obstet. Gynaecol. Res. – 2009. – Vol. 35. – P. 525 – 532.
132. Shipitsyna, E. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age – sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? / E. Shipitsyna, A. Roos, R. Datcu, A. Hallen, H. Fredlund, J.S. Jensen, et al. // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – P. 60670.
133. Siezen, R.J. The human gut microbiome: are we our enterotypes? / R.J. Siezen, M. Kleerebezem // Microb. Biotechnol. – 2011. – Vol. 4. – P. 550 – 553.
134. Smith, B.C. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization / B.C. Smith, T. McAndrew, Z. Chen, A. Harari, D.M. Barris, S. Viswanathan, et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. 40425.
135. Song, Y.L. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S - 23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA / Y.L. Song, N. Kato, C.X. Liu, Y. Matsumiya, H. Kato, K. Watanabe // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – Vol. 187, № 2. – P. 167 – 173.
136. Srinivasan, S. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. / S. Srinivasan, N. G.

Hoffman, M. T. Morgan, F. A. Matsen, T. L. Fiedler, R.W. Hall et al. // PLoS ONE – 2012. – Vol. 7. – P. 37818.

137. Srinivasan, S. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis / S. Srinivasan, C. Liu, C.M. Mitchell, T.L. Fiedler, K.K. Thomas, K.J. Agnew, J.M. Marrazzo, D.N. Fredricks // PloS One. – 2010. – Vol. 5, № 4. – P. 10197.

138. Stackebrandt, E. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards / E. Stackebrandt, J. Ebers // Microbiology Today. – 2006. – Vol. 33. – P. 152 – 155.

139. Strus, M. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities / M. Strus, M. Brzychczy-Wloch, T. Gosiewski, P. Kochan, P.B. Heczko // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 48. – P. 56 – 63.

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

141. The Human Microbiome project consortium, Structure, function and diversity of the healthy human microbiome / The Human Microbiome project consortium // Nature. – 2012. – Vol. 468. – P. 207 – 214.

142. Thomas, S. Döderlein's bacillus: *Lactobacillus acidophilus* / S. Thomas. // J. Infect. Dis. – 1928. – Vol. 43. – P. 218 – 227.

143. Thomas, T. Metagenomics a guide from sampling to data analysis / T. Thomas, J. Gilbert, F. Meyer // Microb. Inf. Exp. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 3.

144. Torriani, S. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* species by RAPD-PCR and AFLP / S. Torriani, F. Clementi, M. Vancanneyt, B. Hoste, F. Dellaglio, K. Kersters // Syst. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 24, № 4. – P. 554 – 560.

145. Van de Wijkert, J.H. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? / J.H. Van de Wijkert, H. Borgdorff, R. Verhelst, T. Crucitti, S. Francis, H. Verstraelen, et al. // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9. – P. 105998.

146. Vandamme, P. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics / P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, J. Swings // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1996. – Vol. 60. – P. 407 – 438.

147. Vasquez, A. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women / A. Vasquez, T. Jakobsson, S. Ahrne, U. Forsum, G. Molin // J. Clin. Microbiol. – 2002. Vol. 40. – P. 2746 – 2749.

148. Velraeds, M.M. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant / M.M. Velraeds, B. Van de Belt-Gritter, H.C. Van der Mei, G. Reid, H.J. Busscher // J. Med. Microbiol. – 1998. – Vol. 47. – P. 1081 – 1085.

149. Ventura, M. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification / M. Ventura, C. Canchaya, V. Meylan, T.R. Klaenhammer, R. Zink // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, № 11. – P. 6908 – 6922.
150. Verhelst, R. 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 / R. Verhelst, H. Verstraelen, G. Claeys, G. Verschraegen, S.L. Van, G.C. De, et al. // *BMC Microbiol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 61.
151. Walter, J. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584 / M.G. Gänzle, A. Höltzel, J. Walter, G. Jung, W.P. Hammes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, № 10. – P. 4325 – 4333.
152. WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food // London. Ontario. Canada. – 2002.
153. Witkin, S.S. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections / S.S. Witkin, H. Mendes-Soares, I.M. Linhares, A. Jayaram, W.J. Ledger, L.J. Forney // *MBio.* – 2013. – Vol. 4. – P. 460 – 413.
154. Woese, C.R. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms / C.R. Woese, G.E. Fox // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1977. – Vol. 74, № 11. – P. 5088 – 5090.
155. Zariffard, M.R. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis* / M.R. Zariffard, M. Saifuddin, B.E. Sha, G.T. Spear // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2002. – Vol. 34, № 4. – P. 277 281.
156. Zhou, X. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods / X. Zhou, S.J. Bent, M.G. Schneider, C.C. Davis, M.R. Islam, L.J. Forney // *Microbiology.* – 2004. – Vol. 150. – P. 2565 – 2573.
157. Zhou, X. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups / X. Zhou, M.A. Hansmann, C.C. Davis, H. Suzuki, C.J. Brown, U. Schutte et al. // *Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 58. – P. 169 181.
158. Zozaya-Hinchliffe, M. Quantitative PCR assessment of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis / M. Zozaya-Hinchliffe, R. Lillis, D.H. Martin, M.J. Ferris // *J. Clin. Microbiol.* 2010. – Vol. 48, № 5. – P. 1812 – 1819.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. Demkin, V.V., Characterization of vaginal Lactobacillus species by rplK -based multiplex qPCR in Russian women / V.V. Demkin, S.I. Koshechkin // Anaerobe. – 2017. – Vol. 47 – P. 1 – 7.
2. Demkin, V.V. A novel real-time PCR assay for highly specific detection and quantification of vaginal lactobacilli / V.V. Demkin, S.I. Koshechkin, A. Slesarev // Mol. Cell. Probes. – 2017. – Vol. 32. – P. 33 – 39.

Тезисы всероссийских и международных конференций:

3. Кошечкин, С.И. Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных мазках беременных женщин г. Москвы / С.И. Кошечкин, Н.В. Иванова, Н.С. Духанина, Г.Н. Заруцкая, Ф.А. Багдалова, Ф.Г. Медетханова, Е.В. Навбатникова, В.В. Демкин // В книге: Молекулярная диагностика - 2017 Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под ред. В.И. Покровского. – 2017. – Т. 1. – С.390 – 391.
4. Кошечкин, С.И. Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных мазках женщин г. Иваново / С.И. Кошечкин, Ж.Г. Морева, В.В. Демкин // Актуальные вопросы и перспективы развития медицины. Выпуск III. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (11 мая 2016 г). Омск. – 2016. – С. 65 – 67.
5. Кошечкин, С.И. Видовое разнообразие лактобактерий в вагинальных микробиотах женщин России / С.И. Кошечкин, В.В. Демкин // Материалы конгресса «X ЮБИЛЕЙНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС ПО РЕПРОДУКТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ» – М., 2016 – С. 413.
6. Кошечкин, С.И. Анализ видового состава лактобактерий в микробиотах влагалища у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени / С.И. Кошечкин, В.П. Карлина, Р.А. Кузьмичева, В.В. Демкин// Молекулярная диагностика. Сб. трудов колл.авт., под ред. В.И. Покровского. – Т. 1. – М.: ООО "Издательство МБА", 2014 – С. 181 – 182.
7. Демкин, В.В. Структура патогенной и условно-патогенной микрофлоры половой сферы по результатам обследования женщин Московского региона / В.В. Демкин, С.И. Кошечкин // Инфекционные болезни, Материалы V Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, г.Москва. – 2013. – Т. 11., приложение №1. – С. 120 – 121.