

Микробиологическая характеристика *Lactobacillus plantarum* P17630, содержащейся в пробиотическом препарате Гинолакт для интравагинального применения

G. Dho, F. Marchese, E.A. Debbia

DISCAT – Sezione di Microbiologia «C.A. Romanzi»,
Facolta di Medicina e Chirurgia,
Universita di Geneva

Итальянский журнал медицинской, зубоврачебной и клинической микробиологии. – 2003. – Т. 7, № 2. – С. 102–108.

Проведена оценка концентрации *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) P17630 – микроорганизма, используемого в качестве пробиотика при вспомогательном лечении различных инфекционных заболеваний половых путей. Свечи Гинолакт предоставлены компанией «Шарпер». Концентрация бактериального загрязнения составляла приблизительно 4×10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Этот штамм был единственной молочнокислой бактерией, выявленной в содержимом влагалища, способной расти в присутствии ванкомицина (12 мг/л) или в среде, содержащей рибозу. Кроме гликопептида ванкомицина и тейкоплатина, микроорганизм оказался резистентным к норфлоксацину, фосфомидину, метронизадолу, клиндамицину, флуконазолу и вориконазолу, а также чувствительным к другим препаратам. *L. plantarum* P17630 может расти на тампонажной основе при pH 4 и 6,5, температуре 30, 37 и 43 °C. Кроме того, штамм способен создавать биопленку. На основе анализа этих фактов сделано заключение, что *L. plantarum* P17630, входящий в состав свечей Гинолакт, обладает всеми свойствами, необходимыми пробиотика для вагинального применения.

Организм человека, как и всех живых существ, населен микроорганизмами, которые в течение жизни подвержены количественным и качественным изменениям [10, 17]. Эти микроорганизмы представляют собой нормальную микробную популяцию (НМП), включающую различные виды, постоянно локализующиеся в определенных зонах, очень легко восстанавливающие оригинальный состав. При изменении количества и качества микроорганизмов, обусловленном внешними воздействиями, в НМП в течение некоторого времени могут присутствовать транзитные микроорганизмы, которые при наличии благоприятных условий способны поселиться на постоянный период. Роль НМП основополагающая для защитных функций человека. Особенно она проявляется в борьбе с патогенными микроорганизмами, в борьбе за питательные вещества, рецепторы на клетках вырабатывают бактериоцины, жирные кислоты, перекись водорода и другие токсичные метаболиты для многих микроорганизмов, пролиферирует и персистирует, но не является инвазионной или патогенной, может противостоять микроцидам или вагинальным спермицидам, стимулирует иммунную систему в составе макрофагов и выработке иммуноглобулинов [10, 17].

Размножение инородных микроорганизмов в организме человека может обуславливать возникновение инфекционных процессов вследствие способности штамма-оппортуниста или патогенного штамма присоединиться к эпителию и проникать в глубже расположенные ткани, а также изменения слизистой оболочки, при основном заболевании или применении лекарственных средств, способных изменять

микробиоценоз некоторых участков организма. Изменение экосистемы способствует проникновению грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов экзогенного и эндогенного происхождения.

Наиболее целесообразные меры предупреждения или устранения первых признаков таких инфекций предполагают проведение микробиологических исследований зон накопления в целях восстановления природной экосистемы. В этом смысле все больший интерес вызывают пробиотики – препараты для местного применения или введения внутрь, содержащие одну или большее количество бактериальных культур, в дальнейшем заполняющие зону, в которую проникли инородные источники инфекции. Рекомендуемые культуры в основном характеризуются способностью быстро размножаться, чтобы заменить патогенные микроорганизмы и восстановить первичную среду [1, 9, 16].

Благодаря этим характеристикам молочнокислые бактерии достаточно давно считают важнейшими биотерапевтическими агентами как в профилактике, так и лечении различных заболеваний. Особенно широко используют эти бактерии для восстановления биологического баланса пищеварительного канала и наружных половых путей. Область влагалища заселена естественным образом различными видами молочнокислых бактерий, которые способствуют поддержанию кислого уровня pH и освобождению перекиси водорода и других метаболитов, препятствующих размножению патогенных видов микроорганизмов [2, 8, 11, 13–15, 18].

Экзогенные возбудители инфекции способны заменить резидентную популяцию микроорганизмов в определенной среде, изменить эту область, препятствуя накоплению и распространению природных микроорганизмов. Поэтому, применяя пробиотики с терапевтической целью, необходимо всегда учитывать некоторые фундаментальные характеристики:

- 1) количество микроорганизмов, которые могут эффективно бороться с патогенными инфекциями;
- 2) способность создавать биопленку, что необходимо для укрепления колонизации;
- 3) выживание при различных pH и температуре, отличающейся от физиологической или не оптимальной для микроорганизмов;
- 4) способность противостоять антибиотикам, наиболее часто используемым в терапии инфекций половых путей.

Этими свойствами должны обладать пробиотики, чтобы обеспечить клинически достоверный результат.

Целью исследования явилось изучение указанных характеристик в свечах Гинолакт для вагинального применения, содержащих *L. plantarum* P17630 – один из наиболее важных микроорганизмов, используемых в качестве пробиотического препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микроорганизмы и условия роста

Свечи Гинолакт, содержащие *L. plantarum* P17630, предоставлены компанией «Шарпер» (Милан) и хранились в соответствии с условиями, указанными производителем. Свечи использовали в стерильной среде. После удаления упаковки содержимое растворяли в 10 мл MRS (MercK), содержащей ванкомицин 12 мг/л (MRS V12). Затем бактерии выделяли и культивировали в модифицированной среде MRS V12 и Rogosa (MercK), содержащей пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, рибозу 25 г/л, одноосновный фосфат калия 6 г/л, цитрат аммония 2 г/л, Твин 80 1 г/л, натрия ацетат 15 г/л, магния сульфат 0,575 г/л, железа сульфат 0,034 г/л, марганца сульфат 0,12 г/л, при необходимости добавляли для затвердевания 15 г/л агар-агара [11]. Такая среда оказалась высокоселективной для *L. plantarum* P17630. Концентрация микроорганизмов была вдвое выше по сравнению с таковой в растворе культуры на двух селективных средах. Рост *L. plantarum* P17630 при различной pH проанализирован на основе MRS, измененной до указанных значений кислотности (табл. 1) с добавлением соли (R.N. Costilow, 1981).

Оценка чувствительности к антибиотикам

Пробы на чувствительность к антибиотикам проведены с применением метода диффузии диска (NCCLS, 2002). В качестве тестируемых антибиотиков использовали пенициллин, амоксициллин, цефалотин, цефамандол, имипенем, ванкомицин/тейкопланин, эритромицин, клиндамицин, рифампицин, котримоксазол, гентамицин, доксициллин, фосфомицин, норфлоксацин, нитрофурантоин, цефалотин, метронидазол, флуконазол и вориконазол.

Количественная оценка образования биопленки

Образование биопленки количественно проанализировано с использованием среды, содержащей конго красный, по методике Фримана [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка жизнеспособности и исходной концентрации бактерий в свече Гинолакт

Материал трех различных свечей, растворенных должным образом, помещали в две селективные среды Rogosa R и MRS V12, на основе контроля MRS без ванкомицина определяли концентрацию *L. plantarum* P17630, которая составляла 4×10^8 КОЕ/мл (табл. 2), что в 4 раза превышало минимальную концентрацию, заявленную в технической карточке. Кроме того, не установлено существенных различий при использовании разных сред, которые могут влиять на жизнеспособность микроорганизма.

Концентрация *L. plantarum* P17630 соответствовала таковой для применения в целях, предусмотренных при использовании в свече, соответствуя общей концентрации молочнокислых бактерий в половых путях $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ КОЕ/мл.

Микроорганизмы, выделенные из свечей, должны заселиться со значительным количеством патогенных микроорганизмов в среде, измененной инфекционным процессом. Кроме того, необходимо иметь в виду, что эти биотерапевтические агенты должны бороться не только за адгезию к эпителию, в большой степени занятому возбудителями, но и быть способными восстановить pH, а также физиологическую среду, которая препятствовала бы размножению патогенных микроорганизмов. В такой ситуации повышение концентрации дает больше возможности пробиотиком быстро достичь цели.

Проверка выживаемости и роста *L. plantarum* P17630 при различной pH и различной температуре

Согласно данным, приведенным в табл. 1, отмечена возможность роста *L. plantarum* P17630 на тампонавой среде при изменении pH от 4,0 до 6,5 с интервалом 0,5 между каждой культурой, при сравнении с культурой, используемой в качестве исходной. Образцы разделены на три части и инкубированы при температуре 30, 37 и 43 °C. Для проверки взята культура штамма MRS (pH 6,0), которую культивировали в течение ночи при температуре 37 °C. Во всех растворах установлен рост микроорганизмов, сопоставимый с таким в контроле, за исключением образцов, культивированных при pH 4 как при 30, так и 43 °C, а также при температуре 43 °C и pH 4,5, в которых интенсивность роста в связи с мутностью составляла 33% по сравнению с таковой в контроле.

Эти данные свидетельствуют о том, что даже в неоптимальных условиях для размножения этого микроорганизма, как например, в среде при инфекционном процессе, которая характеризуется в основном отличным от физиологического уровнем pH, *L. plantarum* P17630 способна размножаться без объединения с химическими модификаторами уровня pH. Благодаря значительной концентрации она легко восстанавливает биоценоз половых путей и за короткий срок нормализует физиологическую среду.

Чувствительность к различным антибиотикам, применяемым при различных вагинальных и мочевых инфекциях

В пробах на чувствительность к антибиотикам установлено, что три различных изолированных штамма *L. plantarum* P17630 резистентны к ванкомицину/тейкопланину, а также клиндамицину, гентамицину, фосфомицину, норфлоксацину, метронидазолу, флуконазолу и вориконазолу (табл. 3). Прежде всего, следует обратить внимание, что многие из этих препаратов используются в терапии как вагинальных, так и бактериальных и грибковых инфекций, вызванных влагалищной трихомонадой [5]. Полученные результаты свидетельствуют, что при проведении антибактериальной терапии *L. plantarum* P17630, благодаря резистентности к препаратам, может размножаться и оказывать пробиотический эффект.

Таблица 1

Оценка роста *L. plantarum* P17630 на тампонавой основе при различной pH и инкубации при различной температуре

Температура, °C	pH						Контроль 6,0
	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	
30	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
43	+	+	+++	+++	+++	+++	+++

Примечание: +++ – рост более 5×10^8 КОЕ/мл в течение 16–18 ч при указанной температуре; + – рост 33% по сравнению с таковым в контроле.

Таблица 2

Оценка концентрации *L. plantarum* P17630 в трех различных свечах

Образец	Концентрация, $\times 10^8$ КОЕ/мл в среде		
	Rogosa R	MRSV12	MRSV
1	6,4	5,7	5,5
2	4,1	3,9	4,2
3	1,8	2,2	2,4

Оценка способности восстановления био пленки

При культивировании *L. plantarum* P17630 на соответствующей среде отмечена способность синтезировать био пленку в отличие от не вырабатывающего ее штамма, взятого в качестве контроля. Продукция гликокаликса является одним из основных свойств для всех микроорганизмов, которые на этапе планктонной формы жизни присоединяются к клеточным субстратам, а особенно к тесно соприкасающимся поверхностям [3, 6].

Эта структура общепризнана в качестве одного из основных факторов вирулентности при многих инфекциях, но особенно часто она локализуется в природных полостях организма. Выработка гликокаликса позволяет микроорганизмам погрузиться в полисахаридный матрикс, что обеспечивает их защиту от действия антибиотиков, фагоцитоза, анти тел и других неблагоприятных воздействий [3, 6].

Замедление роста клеток, имеющих широкое основание прикрепления, снижение давления кислорода, нехарактерный эффект адсорбции полисахаридного матрикса, уменьшение рН и осмотической концентрации раствора – это факторы, способствующие выработке фенотипной резистентности с большинством классов препаратов, в основном аминокликозидов, β-лактамов, фторхинолона, гликопротеидов [3, 6].

Антибиотики эффективны только в отношении планктонной фракции патогенных микроорганизмов в связи с последующим «выкорчевыванием» бактериальных клеток био пленки, которые поддерживают активность инфекции. Но если все эти условия направлены на замедление выработки гликокаликса патогенных возбудителей, у пробиотических микроорганизмов это свойство может быть одним из важнейших, обуславливающих их клиническую эффективность. Благодаря этим свойствам НМП включает молочнокислые бактерии, создает среду, в которой может развиваться без утраты защитных функций организма, исключается возможность адгезии других микроорганизмов и выполняет предна

значенную роль. Био пленка также является контрольным фактором, который защищает НМП от чрезмерного размножения, сохраняя ее на физиологическом уровне [3, 6].

Селекция *L. plantarum* P17630 для нормальных вагинальных образцов

Несмотря на то, что *L. plantarum* P17630 относится к микроорганизмам кишечника, не будучи видом молочнокислых бактерий, его часто обнаруживают в половых путях [11, 18].

Эти особенности биотерапевтического агента, определенные в лабораторных условиях в некоторых предварительных анализах, подтверждены некоторыми текущими исследованиями, и представляют большой интерес для его более широкого использования. Необходимо помнить, что при использовании во время терапии пробиотического средства в качестве биотерапевтического средства, в любой момент возможен контроль присутствия самого микроорганизма и его концентрации в патологическом очаге.

Осуществлено обследование женщин, у которых отсутствовала активная инфекция или проведена антибактериальная терапия для обнаружения *L. plantarum*.

С этой целью использовали вагинальные тампоны пациентов, у которых периодически контролировали наличие в половых путях микробной популяции.

Образцы представлены микробиологической лабораторией клиники Института микробиологии Университета в г. Генуя.

Тампоны, культивированные на шоколадном и кровяном агаре, представляли НМП. Затем их помещали в раствор MRS для обеспечения и обогащения популяции, через 24 ч – посеяны на пластины MRS агар. Затем в MRS агар добавляли ванкомицин в объеме 12 мг/л, Rogosa агар (содержащий рибозу вместо глюкозы), кровяной и шоколадный агар.

В 15 проанализированных образцах рост микроорганизмов на селективной среде для *L. plantarum* P17630 не обнаружен. Эти данные подтверждают положение о незначительной доле этого пробиотика среди многих видов молочнокислых бактерий [11, 18, собственные данные].

Необходимо было установить, способен ли *L. plantarum* P17630 выжить при добавлении НМП, как при лечении пробиотиком. Часть состава, содержащего НМП, оставляли для роста на 24 ч и разделяли на два контейнера: в один из них добавляли 100 мл раствора, в котором предварительно растворяли свечу, затем оба контейнера оставляли для роста микроорганизмов на 24 ч; после этого раствор каждой пробирки разливали на указанные среды. Через 24 ч инкубации проводили сравнительный анализ полученных результатов. С морфологической точки зрения распознать *L. plantarum* P17630 среди других видов микроорганизмов легко. К тому же другие виды бактерий не влияли на жизнеспособность *L. plantarum* P17630. Биохимические характеристики и резистентность к антибиотикам позволяют легко распознать его среди других микроорганизмов при изучении его концентрации в половых путях с терапевтической целью.

ВЫВОДЫ

На основании анализа полученных результатов установлено, что *L. plantarum* P17630, входящий в состав вагинальных свечей Гинолакт, обладает необходимыми характеристиками пробиотика, а также способностью эффективно размножаться в различных физических и патологических условиях.

L. plantarum P17630 имеет все предпосылки для достижения клинических результатов при использовании в различных ситуациях.

Благодарности

Авторы выражают благодарность проф. Лоренцо Морелли за ценные указания при выделении и идентификации *L. plantarum* PI 7630.

Таблица 3

Оценка концентрации *L. plantarum* P17630 в трех различных свечах

Штамм <i>L. plantarum</i> P17630			
Антибиотик	1	2	3
Пенициллин	S	S	S
Амоксициллин	S	S	S
Цефалотин	S	S	S
Цефамандол	S	S	S
Цефалотин	S	S	S
Имипенем	S	S	S
Тейкопланин	R	R	R
Эритромицин	S	S	S
Клиндамицин	R	R	R
Рифампицин	S	S	S
Котримоксазол	S	S	S
Гентамицин	R	R	R
Доксициллин	S	S	S
Фосфомицин	R	R	R
Норфлоксацин	R	R	R
Нитрофурантоин	S	S	S
Метронидазол	R	R	R
Флуконазол	R	R	R
Вориказол	R	R	R

ЛИТЕРАТУРА

1. Alvarez-Olmos M.I., Oberhelman R.A. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on traditional therapy // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – V. 32. – P. 1567–1576.
2. Barbes C., Boris S. Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens // *AIDS Patient Care and STDs.* – 1999. – V. 13. – P. 747–751.
3. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science.* – 1999. – V. 284. – P. 1318–1322.
4. Costilow R.N. Biophysical factors in growth. *Manual of methods for general bacteriology* // Gerhardt et al. / Eds. – 1981. – P. 66–78.
5. Debbia E.A., Campora U. Massaro S. et al. In vitro activity of metronidazole alone and in combination with clotrimazole against clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* // *J. Chemother.* – 1996. – V. 8. – P. 96–101.
6. Dunne W.M.Jr. Bacterial adhesion: seen any good bio-films lately? // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002. – V. 15. – P. 155–166.
7. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. New method for detecting «slime» production by coagulase negative staphylococci // *J. Clin. Pathol.* – 1989. – V. 42, № 8. – P. 872–874.
8. Hilton E., Rindos P., Isenberg H.D. Lactobacillus GG vaginal suppositories and vaginitis // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – V. 33. – P. 1433.
9. Klaenhammer T.P. Probiotics and prebiotics // *Food Microbiology and Frontiers* / Ed. M.R Doyle et al. – 2nd ed. – 2001. – P. 797–811.
10. Molina-Romanzi A.M. I nostri rapporti con i microrganismi // *Microbiologia Clinica Utet*, 2002. – P. 14–51.
11. Morelli L. Lattobacilli ad uso probiotico: dalla ricerca di base alle applicazioni. 30° // *Congr. Naz. Microbiologia.* – Catania, 2002. – Abstr. 27.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing // *Twelfth informational supplement NCCLS*, Wayne, PA. – 2002. – M100-S12. – V. 22, № 1.
13. Redondo-Lopez V., Cook Ft.L., Sobel J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora // *Rev. Infect. Dis.* – 1990. – V. 12. – P. 856–872.
14. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – V. 73, suppl. – P. 437S–443S.
15. Reid G. The scientific basis for Probiotic strains of *Lactobacillus* // *Appl. Environm. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 3763–3766.
16. Sullivan A., Nord C.E. Probiotics in human infections // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2002. – V. 50. – P. 625–627.
17. Tramont E.G., Hoover D.L. Innate (general or non-specific) host defense mechanism // *Principles and Practice of Infectious Diseases* / Eds. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin. – Fifth ed. – 2000. – P. 31–38.
18. Vasquez F., Jakobsson A.T., Ahnru S. et al. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – V. 40. – P. 2746–2749.

НОВОСТИ МЕДИЦИНЫ

ДВА СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ МИОМЫ СРАВНЯТ В ОКСФОРДЕ

Исследование, которое будет проведено специалистами Оксфорда, поможет женщинам найти равновесие между рождением детей и работой. Ученые запланировали клиническое испытание двух методик лечения миомы матки - доброкачественной опухоли.

При отсутствии лечения миома может увеличиваться и вызывать трудности с зачатием ребенка. Радикальным методом избавления от этого заболевания является удаление матки, но женщины редко идут на столь серьезный шаг без

достаточных на то медицинских оснований.

Руководителем исследовательской группы назначен доктор Мак-Ферсон. Он утверждает, что в современном мире дамы все чаще оттягивают рождение детей к такому возрасту, в котором начинаются фиброзные изменения тканей.

Если женщина с миомой хочет иметь ребенка в будущем, то ей необходимо лечение. Одной из важнейших задач современной гинекологии является сохранение репродуктивной функции у женщин с фиброзом.

Испытания покажут, какая из двух методик лечения миомы более комфортна. Речь идет о хирургическом удалении опухоли (миомэктомии) и блокировке поступления крови к образованию - эмболизации.

Примерно 80 процентов всех женщин в возрасте от 45 до 50 лет имеют фиброзные изменения и при этом не замечают каких-либо признаков этого состояния. Развитие миомы провоцируется возрастными нарушениями гормонального баланса. Запланированная работа стартует весной.

<http://dr20.ru>