

Ворошилина Е.С.^{1,3}, Тумбинская Л.В.², Донников А.Е.², Плотко Е.Э.^{1,3}

Современные возможности диагностики бактериального вагиноза: исследование количественного и качественного состава сложных микробных сообществ

1 - ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г.Екатеринбург; 2 - ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; 3 - ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г.Екатеринбург

Voroshilina E.S., Tumbinskaya L.V., Donnikov A.E., Plotko E.E.

Modern opportunities for diagnostics of bacterial vaginosis: analysis of quantitative and qualitative composition of complex microbial communities

Резюме

Исследовали качественный и количественный состав микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ у 94 пациенток репродуктивного возраста (18-45 лет) с диагностированным бактериальным вагинозом (БВ). В качестве группы сравнения рассматривали 230 клинически здоровых женщин репродуктивного возраста. Установлено, что выявление дисбиотического варианта мазка, характерного для БВ, коррелирует с анаэробным дисбиозом по данным ПЦР-РВ. У пациенток с БВ микробиоценоз влагалища характеризуется повышением общей бактериальной массы, абсолютным и относительным снижением содержания лактофлоры, доминированием значительного числа представителей облигатно-анаэробной микрофлоры, а также высокой частотой встречаемости *A. vaginae* и генитальных микоплазм в диагностически значимых количествах. Углубленное исследование микробиоценоза влагалища рекомендуется пациенткам с БВ при неудачных попытках терапии по стандартным схемам лечения с применением метронидазола.

Ключевые слова: бактериальный вагиноз, ПЦР В реальном времени, *Atopobium vaginae*

Summary

Quantitative and qualitative composition of vaginal microbiocenosis was estimated by real-time PCR in women with bacterial vaginosis (BV). Control group: 230 healthy women of reproductive age. Was found that dysbiotic type of microscopy correlated with anaerobic dysbiosis determined by real-time PCR. Vaginal microbiocenosis of women with BV was characterized by elevated quantity of total bacterial mass, decreased quantity of *Lactobacillus* spp., dominating of obligate anaerobes and high frequency of occurrence of *Atopobium vaginae* and genital *Mycoplasma* spp. in diagnostically significant quantity. The advanced investigation of vaginal microbiocenosis is highly recommended for patients with BV when therapy with metronidazol was ineffective.

Key words: bacterial vaginosis, real-time PCR, *Atopobium vaginae*

Введение

Бактериальный вагиноз – выраженное дисбиотическое нарушение микрофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста. Бактериальный вагиноз характеризуется снижением количества нормальной микрофлоры влагалища (*Lactobacillus* spp.) и ростом анаэробной флоры. Этот синдром часто характеризуется ясной клинической картиной и существующими вот уже на протяжении 28 лет клинико-диагностическими критериями для оценки [1]. Не меньшую историю насчитывают и безуспешные попытки борьбы с рецидивирующими случаями бактериального вагиноза.

Новую волну интереса к бактериальному вагинозу вызвали исследования, указывающие на связь между выраженными дисбиотическими нарушениями микрофлоры и предрасположенностью к колонизации урогенитального тракта безусловно-патогенными микроорганизмами, вирусами папилломы человека и ВИЧ [2,3].

Современные знания о дисбиотических нарушениях и их потенциальном вреде для здоровья диктуют необходимость углубленного изучения видового состава микроорганизмов, принимающих участие в формировании микробиоценоза влагалища при дисбиозах, по определению антибиотикоустойчивости этих микроорганизмов и по созданию антибактериальных препаратов направлен-

ного действия [4]. В этой связи все более актуальными становятся высокочувствительные и специфичные методы исследования, например, молекулярно-биологические и, в частности, полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ позволяет в короткие сроки проводить точную количественную и качественную оценку ДНК микроорганизмов, являющейся частью сложной смеси нуклеиновых кислот и может это делать с высокой чувствительностью и специфичностью.

Бактериальный вагиноз – полимикробный синдром, требующий от лабораторной диагностики сложного, многофакторного и количественного анализа для описания микробного сообщества.

Целью работы было описание количественного и качественного состава микробиоценоза влагалища у пациенток с установленным бактериальным вагинозом и оценка диагностической чувствительности и специфичности метода ПЦР-РВ (набор реагентов Фемофлор) для определения таких состояний.

Материалы и методы

Для описания микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ у пациенток были обследованы 94 пациентки в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст 27,6 лет) с диагностированным бактериальным вагинозом (БВ) вне беременности. Диагноз был поставлен на основании комплекса клинико-лабораторных данных, включающих в себя клинический осмотр, пробу с КОН, определение pH вагинального отделяемого и микроскопическое исследование. У всех пациенток при микроскопии выявляли обильную полиморфную грамм- и грамм+ микрофлору, «ключевые» клетки при отсутствии воспалительной реакции. Субъективные и объективные признаки патологии влагалища присутствовали у 84 (89,3%) обследованных женщин, однако бели с запахом, характерные для бактериального вагиноза, отмечали только у каждой пятой обследованной женщины. Проба с КОН была положительной у 65 (62,3%) пациенток, pH вагинального отделяемого была более 5 у всех обследованных. В качестве группы сравнения были отобраны 230 клинически здоровых женщин вне беременности в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст 26,3 года). Микроскопическая картина вагинального отделяемого у женщин этой группы соответствовала критериям нормоценоза, а клинические признаки инфекционно-воспалительной патологии влагалища отсутствовали.

Критериями исключения являлись наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, гепатитов В и С, генитальных инфекций, вызванных облигатными патогенами (*C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*, *M.genitalium*, *T.vaginalis*), получение местной или системной антибиотикотерапии в течение 4-х предшествующих обследованию недель.

Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим нормативным документам. ДНК выделяли с исполь-

зованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Исследование микробиоценоза влагалища проводили методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием реагентов Фемофлор (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Классификацию вариантов микробиоценоза осуществляли в соответствии с ранее предложенным алгоритмом [5]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics версии 17.0. В качестве меры центральной тенденции количественных признаков была выбрана медиана, а в качестве интервальной оценки — верхний и нижний квартили, т.к. исследуемые выборки не подчиняются закону нормального распределения.

Результаты и обсуждение

Анализ частоты встречаемости сопутствующей гинекологической и урологической патологии показал, что у пациенток с вагинозом статистически значимо чаще, чем в группе сравнения отмечали невынашивание беременности ($p=7,3*10^{-4}$, OR 5,46 (1,99 – 14,9)) и воспалительные заболевания шейки матки ($p=6,8*10^{-4}$, OR 22,9 (1,23 – 426)).

При оценке микробиоценоза влагалища методом ПЦР-РВ у обследованных групп женщин выявлены значительные различия.

У всех пациенток с БВ при исследовании биоценоза влагалища методом ПЦР-РВ выявили изменения в составе вагинальной микрофлоры — умеренный или выраженный дисбиоз. В группе сравнения доминировали варианты с нормальным количеством лактобацилл – их выявили у 213 (92,6%) из 230 обследованных женщин, дисбиотические нарушения по данным ПЦР-РВ присутствовали только в 7,4% случаев. Таким образом, по результатам ПЦР-РВ в структуре биоценозов у женщин с БВ преобладали варианты со сниженным количеством нормофлоры, в то время как у женщин в группе сравнения преобладали варианты биоценоза с сохранной нормофлорой.

При анализе структуры умеренных и выраженных дисбиозов у обследованных групп женщин установили, что дисбиотические нарушения у пациенток с БВ в 100% случаев были обусловлены доминированием облигатно-анаэробной микрофлоры. У женщин группы сравнения при умеренном дисбиозе в 18,2% случаев доминировали факультативные анаэробы. По мере усиления дисбиотических нарушений эти тенденции стали более выраженными: в трети случаев заметную роль в формировании дисбиоза играли факультативные анаэробы, причем в 16,6% случаев выявляли аэробный дисбиоз, а в 16,6% — смешанный аэробно-анаэробный дисбиоз. Таким образом, анаэробный дисбиоз статистически значимо чаще обнаруживали у пациенток с вагинозом по сравнению с группой сравнения ($p=0,035$).

Данные о количественном составе вагинального биоценоза у пациенток с БВ и в группе сравнения представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Количественный состав (Lg ГЭ/мл) микробиоценоза влагалища у женщин с бактериальным вагинозом и в группе сравнения

Показатель	Количество микроорганизмов Медиана(25–75 процентиль), ГЭ	
	Бактериальный вагиноз	Группа сравнения
Общая бактериальная масса*	8,4 (8,0–8,6)	7,6 (6,9 – 8,1)
Нормофлора		
Lactobacillus spp.*	6,6 (5,1–7,2)	7,5 (6,7 – 8,0)
Факультативно-анаэробные (аэробные) микроорганизмы		
Enterobacteriaceae spp.	3,2 (2,7–3,6)	3,0 (2,6 – 3,4)
Streptococcus spp.	2,8 (0–3,8)	2,8 (0 – 3,4)
Staphylococcus spp.*	3,6 (2,9–4,0)	3,0 (2,5 – 3,8)
Облигатно-анаэробные микроорганизмы		
Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas spp.*	7,8 (7,3–8,2)	3,7 (2,5 – 4,3)
Eubacterium spp.*	6,7 (6,2–7,0)	4,0 (3,0 – 4,7)
Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium*	7,0 (4,2–7,6)	2,0 (1,5 – 2,8)
Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.*	7,2 (6,5–7,6)	2,5 (0,8 – 3,4)
Lachnobacterium spp./Clostridium spp.*	5,5 (3,9–7,5)	2,8 (2,2 – 3,5)
Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.*	4,6 (3,8–6,0)	3,3 (2,7 – 4,0)
Peptostreptococcus spp.*	6,2 (5,6–6,8)	2,9 (2,1 – 3,8)
Atopobium vaginae*	7,3 (6,4–7,7)	2,0 (0 – 2,9)
Микоплазмы		
Mycoplasma hominis	0,1 (0–5,8)	0 (0 – 0)
Ureaplasma (urealyticum + parvum)*	4,2 (2,0–5,0)	1,4(0 – 4,0)
Дрожжеподобные грибы		
Candida spp.	3,2 (2,8–3,5)	3,1 (2,8 – 3,5)

*-Обозначены статистически значимые различия между группами.

Таблица 2. Частота выявления облигатно анаэробных микроорганизмов в диагностически значимых количествах у пациенток с дисбиотическими нарушениями и у клинически здоровых женщин репродуктивного возраста

	Клинически здоровые		Бактериальный вагиноз	
	Умеренный дисбиоз (n=11)	Выраженный дисбиоз (n=6)	Умеренный дисбиоз (n=31)	Выраженный дисбиоз (n=63)
Gardnerella vaginalis	6 (54,5%)	4 (66,7%)	29 (96,6%)	63 (100,0%)
Eubacterium spp.	8 (72,7%)	5 (83,3%)	24 (80%)	47 (74,6%)
Sneathia spp.	2 (18,2%)	2 (33,3%)	15 (50%)	45 (71,4%)
Megasphaera spp./Veillonella spp.	4 (36,3%)	3 (50%)	21 (33,3%)	56 (88,9%)
Clostridium spp.	2 (18,2%)	2 (33,3%)	3 (10%)	29 (46,0%)
Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.	0	0	3 (10%)	9 (14,2%)
Peptostreptococcus spp.	1 (9,1%)	1 (16,7%)	14 (46,3%)	34 (53,9%)
Atopobium vaginae	3 (27,3%)	1 (16,7%)	16 (53,3%)	55 (87,3%)
Количество одновременно присутствующих видов	3 (2-4)	4 (1-6)	5 (3-8)	6 (5-9)

У пациенток с БВ общая бактериальная масса (ОБМ) статистически значимо выше ($p=3,9 \cdot 10^{-4}$), а количество нормофлоры ниже, чем у клинически здоровых женщин ($p=0,014$). При этом у части женщин отмечено достаточно высокое содержание Lactobacillus spp. — более 10^6 ГЭ/мл. Такое количество лактофлоры принято расценивать как нормальное, если не принимать во внимание соотношение между нормальной и условно-патогенной микрофлорой, которое у данной группы пациенток характери-

зуется доминированием облигатных анаэробов. Количество всех групп облигатно анаэробных микроорганизмов было статистически значимо выше (на 3-4 порядка) у пациенток с БВ по сравнению с группой сравнения. Количество Ureaplasma spp. также было статистически значимо выше у пациенток с БВ, чем у клинически здоровых женщин ($p=0,031$), в то время как количество Candida spp. не различалось между группами.

Количество факультативных аэробов не различа-

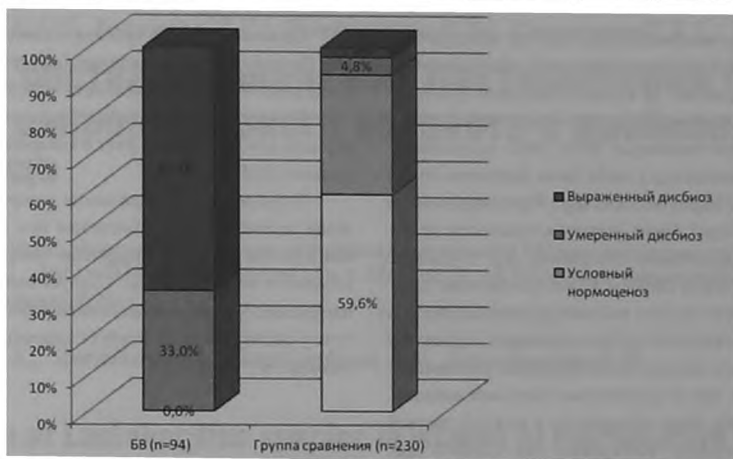


Рис.1. Структура микробиоценоза влагалища у клинически здоровых женщин и пациенток с бактериальным вагинозом

лось у обследованных групп пациенток за исключением группы *Staphylococcus* spp., количество которых было выше у женщин с БВ ($p=0,006$).

Было интересно оценить, какое значение играют отдельные группы микроорганизмов в формировании дисбиоза влагалища. Принимали во внимание те микроорганизмы, доля которых в биоценозе была более 1% от суммы всех выделенных бактерий (Таблица 2).

Число основных участников микробиоценоза при дисбиозе влагалища было выше у пациенток с БВ — у них выявляли до 9 групп микроорганизмов одновременно (медиана = 5, 25-75 перцентиль = 4,0–6,0), чем у женщин в группе сравнения. У клинически здоровых женщин в формировании дисбиоза одновременно принимали участие меньшее количество групп микроорганизмов (медиана=3, 25-75 перцентиль = 2,0–4,0), различия статистически значимы ($p=9,3*10^{-6}$).

У пациенток с БВ при анаэробном дисбиозе *Gardnerella vaginalis* присутствовала в составе микробиоценоза влагалища в 100% случаев. Среди других облигатных анаэробов, которые участвуют в формировании дисбиоза, у пациенток с БВ чаще других выявляли *Megasphaera* spp. — присутствовала у 77 (82,7%) из 94 женщин, *Eubacterium* spp. — у 71 (76,3%), *Sneathia* spp. — у 60 (64,5%) пациенток. *Clostridium* spp. и *Peptostreptococcus* spp. обнаруживали у 32 (34,4%) и 48 (51,6%) женщин соответственно. Реже всего обнаруживали *Mobiluncus* spp., который присутствовал только у 12 (12,9%) из 94 женщин с дисбиозом влагалища. Интересно, что частота выявления *G.vaginalis*, *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mobiluncus* spp. не различалась в зависимости от степени выраженности дисбиотических нарушений, в то время как при выраженном дисбиозе статистически значимо чаще, чем при умеренном, выявляли *Megasphaera* spp. ($p=0,038$), *Clostridium* spp. ($p=4,8*10^4$), *A.vaginae* ($p=5,9*10^4$).

У пациенток в группе сравнения на первом месте среди участников дисбиотических процессов оказались *Eubacterium* spp. — выявлены у 13 (76,4%) из 16 женщин с дисбиозом по результатам исследования ПЦР-РВ.

G.vaginalis выявляли несколько реже — у 10 (62,5%) из 16 пациенток. Другие облигатные анаэробы присутствовали еще реже: *Sneathia* spp., *A.vaginae* и *Clostridium* spp. у 4 (25%), *Peptostreptococcus* spp. у 2 (12,5%) пациенток. *Mobiluncus* spp. отсутствовал у всех женщин в группе сравнения.

Особый интерес для клиницистов представляет *Atopobium vaginae* — микроорганизм, устойчивый к метронидазолу, что создает сложности при лечении БВ по стандартным схемам. У женщин с БВ *A.vaginae* выявили у 57(90,4%) из 63 женщин выраженным дисбиозом и у 16 (53,3%) из 30 женщин с умеренным дисбиозом. В группе сравнения *A.vaginae* выявили у одной (16,6%) из 6 женщин с выраженным дисбиозом и у 3 (27,2%) из 11 женщин с умеренным дисбиозом. Таким образом, в формировании дисбиоза у пациенток клинико-лабораторными признаками БВ *A.vaginae* принимает участие статистически значимо чаще, чем у клинически здоровых женщин ($p=5,1*10^3$).

Частота выявления факультативных анаэробов — участников формирования дисбиотических нарушений различалась в зависимости от группы обследованных женщин. У пациенток с БВ эти микроорганизмы были редкой находкой. *Enterobacteriaceae* spp. выявили только у одной (1,08%), *Staphylococcus* spp. у двух (2,13%), *Streptococcus* spp. у 4 (4,3%) из 94 женщин с дисбиозом. У клинически здоровых женщин факультативные анаэробы принимали участие в формировании дисбиоза статистически значимо чаще, чем у женщин с БВ. Так *Streptococcus* spp. были обнаружены у 12 (70,5%, $p=2*10^{-3}$), *Enterobacteriaceae* spp. у 9 (52,9%, $p=4,9*10^{-8}$), *Staphylococcus* spp. у 2 (11,7%) из 17 женщин группы сравнения, состояние микробиоценоза влагалища которых соответствовало критериям дисбиоза по результатам ПЦР-РВ. Таким образом, роль факультативных анаэробов значительна в формировании дисбиозов у клинически здоровых женщин. У пациенток с вагинозом дисбиотические нарушения обусловлены преимущественно облигатно анаэробными микроорганизмами.

Мы также проанализировали частоту обнаружения условно-патогенных микроорганизмов у обследованных групп женщин в целом. В группе сравнения условно-патогенные микроорганизмы встречались менее, чем в 5% случаев, причем некоторые роды либо отсутствовали вообще (*Mobiluncus* spp.), либо были выявлены менее чем в 1% случаев (*Staphylococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mycoplasma* spp.). Чаще всего у клинически здоровых женщин обнаруживали *Ureaplasma* spp. и *Candida* spp. (частота выявления 26,9% и 10,4% соответственно).

У женщин с БВ частота выявления факультативных анаэробов не отличалась от группы сравнения, однако все группы облигатных анаэробов встречались статистически значимо чаще, чем у клинически здоровых женщин. *Mycoplasma hominis* была обнаружена у каждой третьей женщины при вагинозе. Интересно, что *Candida* spp. встречалась с той же частотой, что и в группе сравнения. По всей видимости, щелочная pH, при которой существуют облигатные анаэробы, неблагоприятна для дрожжеподобных грибов.

Выводы

У пациенток с БВ микробиоценоз вагинальной микрофлоры характеризуется повышением общей бактериальной массы, абсолютным и относительным снижением содержания лактофлоры (в большинстве случаев менее 20% от суммы всех выделенных микроорганизмов), доминированием значительного числа представителей облигатно-анаэробной микрофлоры, а также высокой частотой встречаемости *A.vaginae* и генитальных микоплазм в диагностически значимых количествах.

Диагностическая чувствительность набора реагентов Фемофлор для выявления бактериального вагиноза составляет 95%, специфичность – 89,6%.

Выявление дисбиотического варианта мазка, характерного для БВ, коррелирует с анаэробным дисбиозом по данным ПЦР-РВ.

Углубленное исследование микробиоценоза влагалища рекомендуется пациенткам при неудачных попытках терапии БВ по стандартным схемам лечения с применением метронидазола. Следует иметь в виду, что обнаружение *A.vaginae* в диагностически значимом количестве у пациенток с БВ требует коррекции лекарственной терапии. ■

Ворошилина Е.С., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА Минздрава России, заведующая лабораторией ООО МФЦ «Гармония», г.Екатеринбург; Тумбинская Л.В., к.б.н, заместитель директора по науке ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; Донников А.Е., к.м.н., заместитель генерального директора по клинической работе ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; Плотко Е.Э., к.м.н., главный врач ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г.Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Ворошилина Екатерина Сергеевна, 620026, Екатеринбург, ул. Тверитина 16, медицинский центр «Гармония», Тел. (343) 251-08-75, e-mail: voroshilina@gmail.com

Литература:

1. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983;74:14–22.
2. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis.* 2010;202:1907–1915.
3. Allsworth JE, Lewis VA, Peipert JF. Viral sexually transmitted infections and bacterial vaginosis: 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Survey data. *Sex Transm Dis.* 2008;35:791–796.
4. Jean-Pierre Menard. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies. *Int J Womens Health.* 2011; 3: 295–305.
5. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотко Е.Э., Жаютин Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? // *Акушерство и гинекология*, 2011, № 1. С. 57–65.