

Характеристика биоценоза влагалища ВИЧ-инфицированных беременных

Ворошилина Е.С., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития, г.Екатеринбург; **Тумбинская Л.В.**, к.б.н., заместитель генерального директора по развитию, ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; **Ежова С.А.**, врач акушер-гинеколог, Свердловский областной центр по профилактике и лечению ВИЧ-инфекции, г.Екатеринбург; **Хяютин Л.В.**, заместитель директора, ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г. Екатеринбург; **Плотко Е.Э.**, к.м.н., главный врач, ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г. Екатеринбург

Characteristics of vaginal biocenosis of HIV-positive pregnant women

Voroshilina E.S., Tumbinskaya L.V., Ezhova S.A., Hayutin L.V., Plotko E.E.

Резюме

Исследовали биоценоз влагалища у 106 ВИЧ-инфицированных беременных женщин в I триместре беременности методом количественной ПЦР (Фемофлор, НПФ ДНК-Технология, Москва). В качестве группы сравнения были подобраны 106 ВИЧ-серонегативных беременных по принципу случай – контроль. Установили, что наличие ВИЧ-инфекции является фактором, значительно ухудшающим состояние биоценоза влагалища у беременных. У половины обследованных женщин выявлен дисбиоз вагинальной микрофлоры, абсолютный нормоценоз диагностирован только у каждой пятой ВИЧ-инфицированной беременной. Было показано, что на фоне приема ВААРТ отмечено снижение доли дисбиозов и увеличение доли нормоценозов в структуре биоценоза влагалища у ВИЧ-инфицированных беременных и уменьшение количества генитальных микоплазм в составе вагинального биоценоза.

Ключевые слова: биоценоз влагалища, ВИЧ-инфекция, беременность, ПЦР в реальном времени.

Summary

Vaginal biocenosis of 106 HIV-positive pregnant women in I trimester was evaluated by means of quantitative real-time PCR (Femoflor, NPF DNA-Technology, Moscow). For comparison 106 HIV-negative pregnant women were chosen (case-control study). Dysbiosis of vaginal microflora was found in half of HIV-positive women, while absolute normocenosis was detected in only every fifth pregnant woman. It was shown that admission of HAART leads to decrease of dysbiosis proportion and rise of normocenosis proportion in structure of vaginal biocenosis and decrease of quantity of genital mycoplasmas in vaginal biota.

Key words: vaginal biocenosis, HIV-infection, pregnancy, real-time PCR

Введение

Воспалительные заболевания влагалища, такие как бактериальный вагиноз, кандидозный вульвовагинит часто встречаются у ВИЧ-инфицированных женщин и отличаются хроническим рецидивирующим течением. У беременных женщин бактериальный вагиноз и урогенитальный кандидоз являются факторами риска развития ряда патологических состояний: прерывания беременности, многоводия, преждевременного излития околоплодных вод [1], преждевременных родов [7]. Бактериальный

вагиноз также является фактором риска развития послеродовых гнойно-воспалительных осложнений. По данным разных авторов, частота послеродового эндометрита увеличивается в 2,2–5,8 раза у родильниц с бактериальным вагинозом [3]. Состояние биоценоза влагалища влияет не только на женщину, но и на состояние плода и новорожденного. Так, отмечена высокая частота гнойно-воспалительных заболеваний новорожденных в раннем неонатальном периоде в случае беременности у женщин с дисбиотическими нарушениями во влагалище [1].

Благодаря ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), становится возможным провести комплексную (количественную и качественную) оценку сложных взаимоотношений микроорганизмов урогенитального тракта ВИЧ-позитивных беременных женщин.

Целью настоящего исследования являлось описание структуры биоценоза влагалища, полученное с помощью

Ответственный за ведение переписки -
Ворошилина Екатерина Сергеевна
620026, Екатеринбург, ул. Тевритина 16,
медицинский центр «Гармония»
Тел. (343) 251-08-75,
e-mail: voroshilina@gmail.com

метода ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), у ВИЧ-инфицированных беременных женщин.

Материалы и методы

В исследование были включены 106 беременных женщин в возрасте от 18 до 39 лет (средний возраст 26,2 года), состоявшие на учете в Областном центре по профилактике и лечению ВИЧ-инфекции (г. Екатеринбург). 29 (27,4%) женщин планировали прерывать беременность, а 77 (72,6%) пациенток — вынашивать. 80 (75,5%) беременных были обследованы в первом триместре, 21 (19,8%) — во втором триместре и 5 (4,7%) — в третьем триместре. В качестве группы сравнения были отобраны 106 ВИЧ-серонегативных беременных женщин по принципу случай-контроль, совпадающие с ВИЧ-инфицированными пациентками по следующим параметрам: возраст, срок беременности на момент обследования, характер жалоб и клинических проявлений, состояние микрофлоры влагалища по данным микроскопического исследования.

Критериями исключения для группы сравнения являлись: наличие облигатно патогенных возбудителей инфекций, передающихся половым путем (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalium*), сифилиса, системная или местная антимикробная или антимикотическая терапия в течение 4 недель до обследования.

Материал для исследования методом количественной ПЦР забирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим нормативным документам [6]. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология»). Исследование биоценоза влагалища проводили методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием реагентов Фемофлор (ООО «НПО ДНК-Технология») в детектирующем амплификаторе ДТ-96 согласно инструкции производителя (ООО «НПО ДНК-Технология»). Классификацию вариантов биоценоза 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

На момент обследования у 86 (81,2%) женщин была установлена 3-я стадия ВИЧ-инфекции, у 20 (18,8%) — 4-я стадия, в том числе у 19 (17,9%) — стадия 4а, и у одной (0,9%) — стадия 4в. 21 (19,8%) женщина получала высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), в том числе 11 (10,4%) женщин с 3-й стадией ВИЧ-инфекции, 9 (8,5%) со стадией 4а; 1 (0,9%) со стадией 4в.



Рис. 1. Структура биоценоза влагалища у ВИЧ-инфицированных беременных женщин (n=106)

Жалобы на момент обследования предъявляла 21 (19,8%) женщина, в том числе 10 (9,4%) беременных отметили обильные бели, 9 (8,5%) женщин — зуд и бели, 2 (1,9%) — бели с запахом. Большинство беременных (80,2%) жалоб не предъявляли. Объективные признаки патологии влагалища (патологические бели и/или гиперемия слизистой) выявили у 31 (29,2%) женщин, 75 (70,8%) пациенток были расценены врачом как клинически здоровые. Таким образом, 65 (61,3%) из 106 ВИЧ-инфицированных беременных не имели на момент обследования как субъективных, так и объективных признаков патологии влагалища.

Результаты исследования биоценоза влагалища у ВИЧ-инфицированных беременных методом ПЦР-РВ представлены на рисунке 1.

Абсолютный нормоценоз по результатам ПЦР-РВ выявили только у 22 (20,8%) беременных. Относительный нормоценоз диагностировали у 31 (29,2%) женщины. Таким образом варианты биоценоза с сохранной нормофлорой присутствовали у половины пациенток. У 50% беременных по результатам ПЦР-РВ выявили дисбиотические нарушения микрофлоры влагалища, в том числе умеренный дисбиоз у 18 (17%) женщин, выраженный дисбиоз — у 35 (33%) женщин.

При сравнении структуры биоценоза влагалища по результатам ПЦР-РВ у ВИЧ-инфицированных беременных с группой сравнения — ВИЧ-серонегативными беременными, подобранных по принципу случай-контроль были получены следующие данные (рис. 2).

Частота выявления вариантов биоценоза с сохранной нормофлорой была достоверно ниже у ВИЧ-позитивных беременных ($p=0,01$; OR 2,03, 1,17–3,53), причем абсолютный нормоценоз выявляли почти в 2 раза реже, чем в группе сравнения ($p=0,04$; OR 2,03 (1,08–3,82)). При этом удельный вес относительного нормоценоза в обследованных группах различался незначительно (31,1% и 34,9% у ВИЧ+ и ВИЧ– пациенток соответственно).

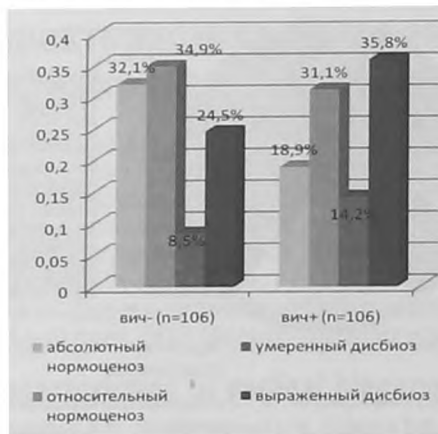


Рис. 2. Структура биоценоза влагалища по данным ПЦР-РВ у беременных женщин в зависимости от ВИЧ-статуса

Частота выявления дисбиозов была статистически значимо выше у беременных с ВИЧ-инфекцией ($p=0,018$; OR 2,03, 1,17–3,53). Таким образом, наличие ВИЧ-инфекции у беременных женщин было связано с более высокой частотой дисбиоза влагалища по данным ПЦР-РВ.

Относительный нормоценоз у ВИЧ-инфицированных беременных в 25 (80,7%) случаях из 31 был обусловлен присутствием генитальных микоплазм в количестве более 10^4 ГЭ/мл, причем в 15 (48,4%) случаев это была микоплазменная моноинфекция, а в 11 (32,3%) — смешанная инфекция, обусловленная присутствием микоплазм и *Candida spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл. Из группы молликутов в формировании относительного нормоценоза в 24 из 25 случаев принимали участие представители *Ureaplasma spp.*, в 5 случаях – *Mycoplasma spp.*, при этом в 4 случае обнаружили оба рода микоплазм. Относительный нормоценоз, ассоциированный с *Candida spp.* в количестве более 10^4 ГЭ/мл выявили у 17 (51,6%) из 31 женщины, при этом в качестве моноинфекции *Candida spp.* присутствовала у 10 (19,3%) из 31 женщины с относительным нормоценозом.

Структура относительного нормоценоза у беременных не различалась в зависимости от их ВИЧ-статуса. В половине случаев относительный нормоценоз у беременных группы сравнения был связан с присутствием *Candida spp.*, в каждом третьем случае — со смешанной микоплазменно-грибковой инфекцией. Таким образом, следует предполагать, что высокая частота выявления *Candida spp.* в количестве более 10^4 гз/мл обусловлена репродуктивным статусом женщины, а не с наличием ВИЧ-инфекции.

В формировании умеренного дисбиоза у ВИЧ-инфицированных женщин в 38,9% случаев принимали участие аэробные микроорганизмы, прежде всего представители сем. *Enterobacteriaceae spp.*, при этом только в 11,1% случаев это был аэробный дисбиоз, а в 27,8% — смешанный аэробно-анаэробный дисбиоз. При выражен-

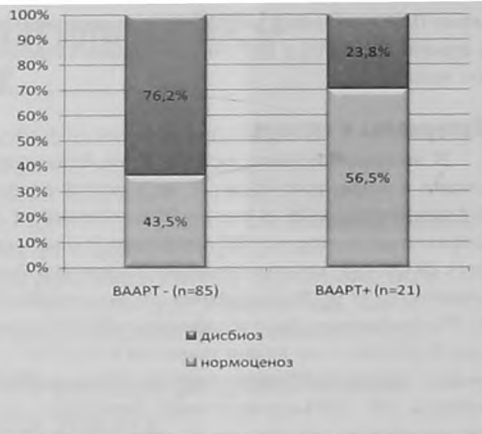


Рис. 3. Структура биоценоза влагалища по данным ПЦР-РВ у ВИЧ-инфицированных беременных в зависимости от получения ВААПТ

ных дисбиотических нарушениях и значительном снижении количества лактобактерий во влагалище частота выявления энтеробактерий снижается, но возрастает частота обнаружения облигатных анаэробов, в том числе *Gardnerella vaginalis*, *Megasphaera spp.*, *Eubacterium spp.* и *Atopobium vaginae*. При выраженном дисбиозе преобладали варианты биоценоза с доминированием анаэробных микроорганизмов: в 78,6% выявляли дисбиоз, ассоциированный с облигатными анаэробами, в 12,8% случаях диагностировали аэробно-анаэробный дисбиоз. Аналогичные изменения наблюдали у беременных в группе сравнения — при умеренном дисбиозе в каждом третьем случае выявляли аэробные микроорганизмы, а при выраженном дисбиозе в 92,3% преобладали облигатные анаэробы.

В таблице 1 представлены сведения о количественном составе биоценоза влагалища по данным ПЦР-РВ обследованных групп беременных.

Анализ количественного состава биоценоза влагалища показал, что у ВИЧ-инфицированных женщин количество лактобактерий статистически значимо ниже, чем у ВИЧ-серонегативных беременных ($p=0,004$). Эти данные вполне согласуются с наблюдением о снижении доли биоценозов с сохранной нормофлорой у ВИЧ-инфицированных женщин.

Представители факультативных анаэробов играют разное значение в формировании биоценоза влагалища у ВИЧ-инфицированных и здоровых женщин. В то время как количество представителей семейства *Enterobacteriaceae spp.* статистически значимо выше в группе ВИЧ-инфицированных ($p=6,2 \cdot 10^{-8}$), *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* в более высоких количествах выявляли у здоровых женщин ($p=0,001$ и $0,002$ соответственно). При этом количества сем. *Enterobacteriaceae spp.*, *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* у ВИЧ-серонегативных беременных практически не различались (медианы $10^{3,1}$, 10^3 и 10^3 соответственно). У ВИЧ-инфицированных беременных ко-

Таблица 1. Количественный состав биоценоза влагалища у беременных женщин в зависимости от их ВИЧ-статуса (n=106), Lg ГЭ/мл

Показатель	ВИЧ-инфицированные (n=106)			ВИЧ-серонегативные (n=106)		
	медиана	25 - 75 процентиль	5 - 95 процентиль	медиана	25 - 75 процентиль	5 - 95 процентиль
Общая бактериальная масса	7,6	7,6-8,1	6,5-8,4	7,7	7,4-8,3	6,3-8,7
<i>Lactobacillus</i> spp.	7,2*	6,4-7,6	3,3-8,3	7,5	6,7-8,1	3,2-8,3
Сем. <i>Enterobacteriaceae</i>	4,9*	2,9-6,1	0,0-7,1	3,1	2,7-3,3	2,5-4,3
<i>Streptococcus</i> spp.	2,4*	0,0-3,3	0,0-5,4	3,0	2,1-3,6	0,0-6,3
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,7*	0,0-3,4	0,0-4,5	3,0	2,4-3,7	1,6-4,8
<i>Gardnerella vaginalis</i>	5,4*	3,9-7,1	2,9-8,2	4,4	3,3-5,9	0,0-7,8
<i>Eubacterium</i> spp.	5,3*	4,5-6,2	2,9-7,1	4,4	3,3-5,3	0,0-7,2
<i>Sneathia</i> spp	3,3	0,3-7,1	0,1-8,3	2,6	2,2-4,2	0,1-8,0
<i>Megasphaera</i> spp.	4,2*	1,8-6,8	0,0-7,6	3,1	1,6-4,0	0,0-7,6
<i>Lachnobacterium</i> spp./	3,6*	2,1-5,1	0,0-7,7	2,9	2,3-3,9	0,0-5,8
<i>Mobiluncus</i> spp.	3,7	2,9-4,5	0,0-5,8	3,3	2,7-4,2	1,7-5,3
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	4,2	2,9-6,0	0,0-6,7	3,5	2,4-4,5	0,0-6,9
<i>Atopobium vaginae</i>	3,4*	2,7-6,6	1,1-7,5	3,1	2,0-3,7	0,0-7,4
<i>Mycoplasma</i> spp.	2,4*	0,0-4,9	0,0-6,3	0,0	0,0-0,9	0,0-5,8
<i>Ureaplasma</i> spp.	4,0	2,3-4,8	0,0-5,4	2,9	0,0-4,7	0,0-5,7
<i>Candida</i> spp.	3,6	3,0-4,1	0,0-5,3	3,4	3,0-3,9	2,6-5,4

личество сем. *Enterobacteriaceae* spp. превышало количество *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp. в 1000 раз.

В группе облигатных анаэробов статистически значимые различия выявлены по содержанию *Gardnerella vaginalis* ($p=0,001$), *Eubacterium* spp. ($p=0,005$), *Megasphaera* spp. ($p=0,01$), *Peptostreptococcus* spp. и *Atopobium vaginae* ($p=0,0026$ и $p=0,03$ соответственно). У ВИЧ-инфицированных беременных статистически значимо чаще выявляли *Mycoplasma* spp. ($p=1,8 \cdot 10^{-4}$), количества *Ureaplasma* spp. и *Candida* spp. не различались между группами. Таким образом, состояние биоценоза влагалища ВИЧ-инфицированных беременных значительно отличалось по качественному и количественному составу от такового у ВИЧ-серонегативных беременных.

Для выявления факторов, оказывающих влияние на состояние вагинальной микрофлоры у ВИЧ-инфицированных женщин провели анализ структуры биоценоза влагалища по данным ПЦР-РВ в зависимости от срока беременности, стадии ВИЧ-инфекции, уровня вирусной нагрузки, количества CD4-клеток и приема ви-

сокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ).

Доля биоценозов с сохранной нормофлорой (абсолютный и относительный нормоценоз) у ВИЧ-инфицированных женщин увеличивалась на протяжении беременности и составила 43,9%, 54,8% и 71,4% в I, II и III триместрах соответственно. Аналогичная закономерность была установлена ранее в наблюдении за ВИЧ-серонегативными беременными женщинами (2).

По результатам настоящего исследования не была выявлена связь между состоянием биоценоза влагалища и уровнем вирусной нагрузки или количеством CD4-клеток. Возможно, это связано с тем, что беременные с высокой вирусной нагрузкой и количеством CD4-клеток менее 200 в мл назначали ВААРТ, получение ВААРТ оказалось фактором, который оказывал значительное влияние на состояние биоценоза влагалища. У женщин, не получавших ВААРТ, в структуре биоценоза влагалища преобладали дисбиотические процессы. У беременных, получавших ВААРТ, статистически значимо чаще выявляли нормоценоз ($p=0,013$).

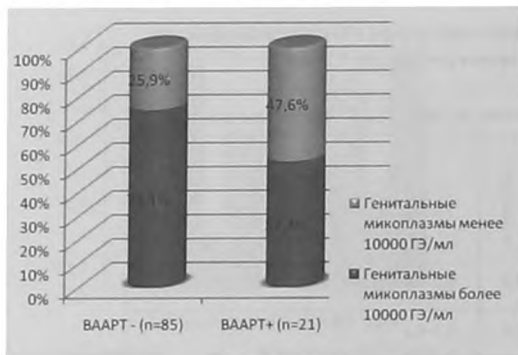


Рис. 4. Частота выявления генитальных микоплазм в диагностически значимых количествах по данным ПЦР-РВ у ВИЧ-инфицированных беременных в зависимости от приема ВААРТ

Кроме того на фоне получения ВААРТ отмечено значимое снижение количества генитальных микоплазм в составе вагинального биоценоза (рис. 3). У беременных,

получавших ВААРТ, генитальные микоплазмы в количестве более 10⁴ ГЭ\мл выявляли достоверно реже, чем у пациенток, не получавших ВААРТ (у 10 (47,6%) из 21 и 63 (74,1%) из 85 соответственно, p=0,033).

Выводы

1. Наличие ВИЧ-инфекции является фактором, значительно ухудшающим состояние биоценоза влагалища у беременных. У половины обследованных женщин выявлен дисбиоз вагинальной микрофлоры, абсолютный нормоценоз диагностирован только у каждой пятой ВИЧ-инфицированной беременной.

2. Состояние биоценоза влагалища у ВИЧ-инфицированных беременных не претерпевает значительных изменений при снижении количества CD4-клеток и увеличении вирусной нагрузки.

3. На фоне приема ВААРТ отмечено снижение доли дисбиозов и увеличение доли нормоценозов в структуре биоценоза влагалища у ВИЧ-инфицированных беременных и уменьшение количества генитальных микоплазм в составе вагинального биоценоза.■

Литература:

1. Берлев И.В., Кира Е.Ф., Белевитина А.А. Роль дисбиотических нарушений влагалища в развитии инфекционно-воспалительных осложнений новорожденных. Журнал акушерства и женских болезней, 2000; №4: 58-61.
2. Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плотко Е.Э., Хаятин Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: состояние во время беременности// Уральский медицинский журнал; №3(68) 2010, с 103-105.
3. Кира Е.Ф., Цвелев Ю.В., Симчера И.А. Микробиоценоз влагалища у женщин при физиологически протекающей беременности, бактериальном вагинозе и урогенитальном кандидозе. Акушерство и гинекология. Достижения и пути развития в XXI веке. Сборник научных трудов под редакцией профессора С. Н. Гайдукова, посвященный 75-летию кафедры акушерства и гинекологии СПб ГПМА, -СПб.; Издание ГПМА. 2002; 224 с.
4. Методические указания МУ 4.2.2039-05 "Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории" (утв. и введены в действие Главным государственным санитарным врачом РФ 23 декабря 2005 г.)
5. Топчий Н.В. Ликвидация дисбиоза – возможность профилактики заболеваний в общей врачебной практике? Русский медицинский журнал. 2007; 15(16): 1185-1192.
6. Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С., Донников А.Е., Плотко Е.Э., Байрамова Г.Р. Особенности биоценоза влагалища у женщин с нормальным и промежуточным типом мазка по результатам ПЦР-РВ, Акушерство и гинекология, 2011, №1, с 66-70.
7. Usui R, Ohkuchi A, Matsubara S, Suzuki M. Statistical model predicting a short duration to birth in women with preterm labor at 22-35 weeks' gestation: the importance of large vaginal Gram-positive rods. J Perinat Med. 2009; 37(3): 244-50