

Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: состояние во время беременности

Ворошилина Е.С., к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Росздрава, г.Екатеринбург
Тумбинская Л.В., к.б.н., заместитель генерального директора по развитию, ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва
Донников А.Е., к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов исследования, ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова, г.Москва
Плотко Е.Э., к.м.н., главный врач, ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г. Екатеринбург
Хаятин Л.В., заместитель директора, ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г. Екатеринбург

Vaginal biocenosis in the context of quantitative PCR: situation during pregnancy

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

Резюме

Было исследовано 557 образцов вагинального содержимого, полученных от беременных женщин в разные сроки беременности, методом количественной ПЦР (Фемофлор, НПФ ДНК-Технология, Москва). Представлена структура биоценоза влагалища в течение беременности. Установили, что у каждой 5-й беременности вне зависимости от срока гестации была снижена доля лактобактерий в составе биоценоза за счет увеличения преимущественно количества анаэробных бактерий. Показана динамика количества таких участников биоценоза, как *Ureaplasma* spp. и *Candida* spp., в течение беременности.

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

Resume

557 vaginal samples were obtained from pregnant women and examined in quantitative real-time PCR (Femoflor, NPF DNA-Technology, Moscow). Structure of vaginal biocenosis during pregnancy was shown. We found out that share of lacobacillus was decreased in biocenosis of every fifth pregnant woman because of increased quantity of anaerobes. The dynamics of quantity of *Ureaplasma* spp. and *Candida* spp. was shown.

Key words: vaginal biocenosis, pregnancy, PCR

Введение

Биоценоз влагалища представляет собой сложную систему, в которую входят сотни видов микроорганизмов. До недавнего времени существовали значительные ограничения в изучении сложных микробиологических сообществ, связанные с методикой анализа, трудностью культивирования части микроорганизмов и некоторой относительностью количественной оценки.

С появлением реагентов серии Фемофлор у врача клинической лабораторной диагностики и акушера-гинеколога возник дополнительный инструмент для комплексного исследования биоценоза влагалища, позволяющий с высокой точностью и специфичностью дать количественную и качественную оценку основных участ-

ников исследуемого биотопа. Новый метод исследования позволяет провести абсолютный и относительный количественный анализ, выявить степень выраженности дисбиотических процессов и вести динамические наблюдения.

Дисбиотические нарушения, такие как бактериальный вагиноз и урогенитальный кандидоз у беременных женщин являются факторами риска ряда патологических состояний: угрозы прерывания беременности, многоводия, преждевременного излития околоплодных вод [1], преждевременных родов [2]. 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 [4].

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

С внедрением в широкую медицинскую практику молекулярно-биологических методов и, в частности, ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), задачи комплексной (количественной и качественной) оценки сложных микробиологических сообществ перестали быть уделом научных лабораторий и могут быть решены при помощи рутинной лабораторной практики.

Целью настоящего исследования являлось описание структуры биоценоза влагалища, полученное с помощью количественной ПЦР у беременных женщин в I, II и III триместрах.

Материалы и методы

Было исследовано 557 образцов вагинального содержимого, полученных от беременных женщин в разные сроки беременности. 303 образца были получены от беременных в I триместре, 144 — во втором триместре и 110 — в третьем триместре. В исследование были включены беременные женщины в возрасте от 18 до 43 лет (средний возраст 28,54 года), состоявшие на диспансерном учете по беременности в МФЦ «Гармония» в период с апреля 2008 по декабрь 2009 года. Из анализа исключили пробы от женщин, у которых выявляли облигатно патогенные возбудители урогенитальных заболеваний (*Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Mycoplasma genitalium*), ВИЧ или которые получали в течение 4 недель до обследования системную или местную антимикробную или антимикотическую терапию. Представленные данные не являются репрезентативными для всего населения, т.к. большинство беременных, включенных в исследование, проходило предгравидарное обследование и подготовку.

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 [5]. 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»). Количество эпителиальных клеток во взятом материале оценивали по результатам анализа геномной ДНК человека в каждом образце. При помощи специализированного программного обеспечения рассчитывали количество (в геном-эквивалентах/мл (гэ/мл)) общей бактериальной массы (ОБМ), лактобацилл и различных групп условно-патогенных микроорганизмов (факультативно- и облигатно-анаэробных МО, микоплазм и дрожжеподобных грибов). Также оценивали долю нормофлоры, факультативно-анаэробных микроорганизмов и анаэробных микроорганизмов в процентах среди всех выявленных бактерий. В соответствии с данными клинической апробации теста Фемофлор была предложена следующая

классификация видов биоценоза:

1. Нормоценоз (абсолютный нормоценоз) — вариант биоценоза, при котором доля нормофлоры в его составе была более 90% относительно ОБМ, количество *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Candida spp.* менее 104 гэ/мл.

2. Относительный нормоценоз — вариант биоценоза, при котором доля нормофлоры в его составе была более 90% относительно ОБМ, количество *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Candida spp.* более 104 гэ/мл.

3. Умеренный (аэробный или анаэробный) дисбаланс — вариант биоценоза, при котором доля лактобактерий определяется в пределах 10–90% относительно ОБМ и увеличена доля аэробов или анаэробов.

4. Выраженный (аэробный, анаэробный или смешанный) дисбаланс — вариант биоценоза, при котором доля аэробов или анаэробов достигает 90% относительно ОБМ, а доля лактобактерий снижается менее 10% относительно ОБМ.

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

Все беременные, включенные в исследование, были разделены на 3 группы по триместрам: I триместр с 1 по 14 неделю, II триместр с 15 по 28 неделю, III триместр с 29 по 36 неделю. Структура биоценоза влагалища у беременных женщин в зависимости от срока беременности представлена в Таблице 1.

Нормоценоз выявили у 46,86% беременных женщин в I триместре, у 45,83% — во II триместре, у 55,45% — в III триместре беременности. Относительный нормоценоз обнаружили у 32,34% беременных женщин в I триместре, у 34,72% — во II триместре, у 26,36% — в III триместре беременности. Варианты биоценоза, при которых доля нормофлоры в составе биоценоза была более 90%, несколько чаще выявляли у женщин во II и III триместрах (80,65% и 81,81%, соответственно), чем в I триместре (79,20%).

Анализ количественной структуры биоценоза у беременных с нормоценозом выявил, что ОБМ была значительно ниже во II и III триместрах за счет уменьшения абсолютного содержания всех групп аэробных, факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий. Достоверно ниже в III триместре по сравнению с I триместром было абсолютное содержание ряда анаэробов: *Eubacterium spp.*, *Megasphaera spp.*, *Peptostreptococcus spp.* Абсолютное количество лактобактерий при этом оставалось на одном уровне (медиана $Ig = 7,6$). Таким образом, доля лактофлоры в составе биоценоза у беременных с нормоценозом увеличивалась к концу беременности.

Структура относительных нормоценозов менялась в

Таблица 1. Структура биоценоза влагалища в течение беременности

	I триместр N=303	II триместр N=144	III триместр N=110
Нормоценоз	142 (46,86%)	66 (45,83%)	61 (55,45%)
Относительный нормоценоз	98 (32,34%)	50 (34,72%)	29 (26,36%)
Умеренный дисбиоз	22 (7,26%)	16 (11,11%)	11 (10,00%)
Выраженный дисбиоз	41 (13,54%)	12 (8,34%)	9 (8,19%)

Таблица 2. Структура относительных нормоценозов в течение беременности

Тип биоценоза	I триместр N=98	II триместр N=50	III триместр N=29	p
Относительный нормоценоз с <i>Ureaplasma</i> spp. в количестве > 10 ⁴ г/мл	38 (38,77%)	19 (38%)	17 (58,62%)	0,030 ^{I-III} 0,017 ^{II-III}
Относительный нормоценоз с <i>Candida</i> spp. в количестве > 10 ⁴ г/мл	35 (35,71%)	21 (42%)	6 (20,69%)	0,041 ^{I-III} 0,016 ^{II-III}
Относительный нормоценоз с <i>Ureaplasma</i> spp. и <i>Candida</i> spp. в количестве > 10 ⁴ г/мл	25 (25,52%)	10 (20%)	6 (20,69%)	--

Таблица 3. Структура выраженных дисбиозов вагинальной микрофлоры у женщин в течение беременности

Тип биоценоза	I триместр N = 41	II триместр N = 12	III триместр N = 9
Выраженный анаэробный дисбиоз	31 (75,61%)	10 (83,33%)	4 (44,44%)
Выраженный аэробный дисбиоз	2 (4,87%)	2 (16,66%)	3 (33,33%)
Выраженный дисбиоз смешанного типа	8 (19,52%)	0 (0%)	2 (22,22%)

разные сроки беременности (Таблица 2). В I триместре относительный нормоценоз в 64,29% случаев был обусловлен присутствием *Ureaplasma* spp. в количестве более 10⁴ г/мл, в 61,23% — *Candida* spp.. Причем, в 25,52% случаев выявляли оба микроорганизма. Во II триместре относительный нормоценоз в 80% случаев был обусловлен присутствием *Ureaplasma* spp., в 62% — *Candida* spp., смешанную инфекцию выявили в 20% случаев. Таким образом, во II триместре доля относительных нормоценозов, обусловленных смешанной инфекцией, была ниже, но увеличилась доля кандидозов. *Mycoplasma* spp. отсутствовала у большинства беременных женщин вне зависимости от срока беременности.

В III триместре в 79,31% случаев при относительном нормоценозе выявляли *Ureaplasma* spp. в количестве более 10⁴ г/мл, в 41,38% — *Candida* spp., смешанная инфекция присутствовала в 20,69% случаев. Таким образом, в III триместре доля относительных нормоценозов, обусловленных *Candida* spp., была достоверно ниже, а доля относительных нормоценозов, связанных с уреоплазменной инфекцией, достоверно выше.

При анализе количественной структуры биоценоза у женщин с относительным нормоценозом выявили снижение во II и III триместрах как ОБМ, так и абсолютно количества лактофлоры по сравнению с I триместром. Кроме того, в III триместре имело место статистически достоверное снижение количества следующих групп анаэробных микроорганизмов: *Eubacterium* spp. (p=4*10⁻⁴), *Megasphaera* spp. (p=4*10⁻⁴), *Lachnobacterium* spp. (p=0,002), *Mobiluncus* spp. (p=0,001), *Atopobium* vaginae (p=5*10⁻⁴).

Единственным микроорганизмом, количество которого при относительном нормоценозе возрастало во II и III триместрах, была *Ureaplasma* spp. (медиана возросла с Ig=4,3 до Ig=4,5). Количество *Candida* spp. незначительно повышалось во II триместре беременности (медиана возросла с Ig=3,8 до Ig=4,1), но достоверно снижалось в III триместре (p=0,005). Полученные данные вполне согласовались с выявленными различиями в структуре относительных нормоценозов в зависимости от срока беременности.

Выраженный дисбиоз вагинальной микрофлоры

ры обнаружены у 13,73% беременных в I триместре, у 7,80% — во II триместре и у 7,89% — в III триместре.

В I триместре в структуре выраженных дисбиозов доминировал анаэробный дисбаланс — в 31 из 42 случаев (75,61%), аэробный дисбаланс выявляли в 15 раз реже — у 2 женщины (в 4,87% случаев) (Таблица 3). У 8 из 42 женщин с выраженным дисбалансом (19,52%) выявили смешанный аэробно-анаэробный дисбаланс. Таким образом, в формировании большинства выраженных дисбиозов в I триместре принимали участие анаэробные микроорганизмы. Во II триместре не выявили ни одного случая смешанного дисбаланса, в 83,33% случаев возникновение дисбиоза было обусловлено анаэробными микроорганизмами. Структура выраженных дисбалансов у беременных в III триместре отличается от таковой в I и II триместрах беременности. Это связано с возрастанием роли аэробной и факультативно-анаэробной флоры, которая участвовала в формировании 5 из 9 выявленных случаев дисбиоза (55,5%). На долю чистых анаэробных дисбалансов пришлось 4 из 9 случаев.

Анализ количественного состава биоценоза влагалища у женщин с выраженным дисбалансом показал, что в I триместре ОБМ была выше, при других вариантах биоценоза, однако во II и III триместрах ее количество снизилось. Количество лактофлоры было меньше ОБМ в 10 раз и снижалось во II и III триместрах.

При выраженном дисбалансе среди анаэробов в I триместре в наибольших количествах выявляли *Gardnerella vaginalis* в ассоциации с *Eubacterium* spp. и *Atopobium vaginae* (медианы $Ig=6,8$, $Ig=6,4$, и $Ig=6,4$ соответственно). Следует отметить, что *Atopobium vaginae* участвовал в формировании 17 из 41 случаев выраженно-го дисбиоза (41,46%).

В меньших количествах выявляли *Lachnobacterium* spp. и *Peptostreptococcus* spp., *Mobiluncus* spp. (медианы $Ig=4,6$, $Ig=4,7$ и $Ig=4,0$). Другие анаэробные микроорганизмы также выявляли у всех женщин, но в меньших количествах. Во II триместре в максимальных количествах обнаруживали *Gardnerella vaginalis* и *Eubacterium* spp. (медианы $Ig=7,1$ и $Ig=6,3$), количество же *Atopobium vaginae* было ниже (медиана $Ig=3,3$). Абсолютные количества других анаэробов также стали меньше, в количестве более 104 обнаруживали только *Peptostreptococcus* spp.. В III триместре продолжало снижаться количество всех анаэробных микроорганизмов за исключением *Gardnerella vaginalis* (медиана $Ig=6,2$).

У женщин с выраженным дисбалансом количество *Ureaplasma* spp. было выше во II и III триместрах беременности (медиана увеличилась с $Ig=2,3$ до $Ig=4,4$), количество *Candida* spp. оставалось на одном уровне в течение всей беременности. В III триместре увеличилось по сравнению с I триместром абсолютное количество *Streptococcus* spp. ($Ig=2,9$ и $Ig=3,7$ в I и III триместрах соответственно) и *Staphylococcus* spp. ($Ig=3,2$ и $Ig=3,0$ в I и III триместрах соответственно), в то время как количество *Enterobacteriaceae* spp. понизилось ($Ig=3,1$ и $Ig=2,9$ в I и III триместрах соответственно).

Таким образом, при выраженном дисбалансе ми-

крофлоры во всех триместрах доминировала *Gardnerella vaginalis*. В I триместре значимый вклад вносил *Atopobium vaginae*. К концу беременности на фоне уменьшения количества всех анаэробов возрастало значение аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, особенно стрептококков.

Реже всего у беременных в I триместре выявляли умеренный дисбаланс — в 7,26% случаев (Таблица 1). Во II триместре доля таких женщин была выше — 11,11% женщин; в III триместре умеренный дисбаланс выявили у 10% беременных.

При анализе количественной структуры биоценоза влагалища при умеренном дисбалансе отмечали увеличение ОБМ во II и III триместрах по сравнению с I триместром. Одновременно увеличивалось и количество лактофлоры. Среди анаэробов наибольшее значение имели *Gardnerella vaginalis* и *Eubacterium* spp., причем во II и III триместрах количество *Eubacterium* spp. увеличивалось и к концу беременности в 10 раз превышало количество *Gardnerella vaginalis* (медианы $Ig=6$ и $Ig=5,1$ соответственно). В III триместре увеличивалось также количество *Peptostreptococcus* spp. и *Sneathia* spp..

Количества аэробов и факультативных анаэробов в разные сроки беременности были различными. Если количество *Staphylococcus* spp. было ниже в конце беременности ($Ig=3,3$ и $Ig=3,0$ в I и III триместрах соответственно), то количества *Streptococcus* spp. ($Ig=2,8$ и $Ig=3,1$ в I и III триместрах соответственно) и представителей семейства *Enterobacteriaceae* ($Ig=3,1$ и $Ig=3,3$ в I и III триместрах соответственно), наоборот, увеличивались. Кроме того, у беременных с умеренным дисбалансом во II и III триместрах на фоне снижения количества анаэробов и увеличения количества аэробов увеличивалось количество *Ureaplasma* spp..

Количество *Candida* spp. возросло к III триместру у женщин с умеренным дисбалансом, причем такой тенденции не отмечали при других вариантах дисбиозов. Таким образом, в разные сроки беременности наблюдали разную структуру умеренных дисбалансов, что было связано с разнонаправленными изменениями количественных показателей микроорганизмов-участников вагинального биоценоза.

Выводы

1. Установлено, что у большинства обследованных женщин в течение беременности выявляли варианты биоценоза влагалища, при которых доля нормофлоры в составе биоценоза была более 90%, (у 79,20%; 80,65% и 81,81% женщин, в I, II и III триместрах соответственно). Причем, доля абсолютных нормоценозов была выше во II и III триместрах.

2. При нормоценозе во II и III триместрах ОБМ была незначительно ниже за счет уменьшения абсолютного содержания всех групп аэробных, факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий. Абсолютное количество лактофлоры являлось стабильным показателем, который не менялся на протяжении беременности. Соответственно, доля нормофлоры в составе биоцено-

ноза увеличивалась к концу беременности при неизменном ее абсолютном количестве.

3. У каждой 5-й беременной (19,19–20,80%) вне зависимости от срока беременности отмечали выраженное или умеренное снижение доли лактофлоры в составе биоценоза за счет увеличения количества анаэробных бактерий.

4. *Mycoplasma spp.* отсутствовала у большинства беременных женщин вне зависимости от срока беременности и степени выраженности дисбиотических состояний. *Ureaplasma spp.* выявляли у беременных во всех триместрах, кроме того, имело место некоторое увеличение

количества этого микроорганизма во II и III триместрах.

5. Количество *Candida spp.* у большинства женщин сохранялось без изменений в течение всей беременности. Исключение составили беременные с умеренным дисбалансом, для которых было характерно увеличение количества дрожжеподобных грибов в составе биоценоза влагалища к концу беременности.

6. Наибольшую вариабельность по количественному и качественному составу микрофлоры влагалища в течение беременности отмечали при промежуточных состояниях биоценоза, а именно при относительном нормоценозе и умеренном дисбалансе. ■

Литература:

1. 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.
2. 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
3. Топчий Н.В. Ликвидация дисбиоза – возможность профилактики заболеваний в общей врачебной практике? *Русский медицинский журнал.* 2007; 15(16): 1185-1192.
4. 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.
5. 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.)