

Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: изменения и коррекция 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

Хаютин Л.В., заместитель директора, ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г. Екатеринбург

Vaginal biocenosis in the context of quantitative PCR: changes and correction during pregnancy

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

Резюме

Проведено исследование изменений биоценоза влагалища у 119 женщин в течение беременности методом количественной ПЦР. Установили, что наличие нормоценоза в I триместре является хорошим прогностическим признаком, указывающим на высокую вероятность сохранения этого состояния на протяжении всей беременности. Состояние абсолютного и относительного нормоценоза во время беременности представляет собой устойчивую систему, на которую экзогенные факторы, в том числе и лекарственная терапия, не оказывают существенного влияния. Наибольшие положительные сдвиги в состоянии биоценоза наблюдали в группах женщин, имевших в I триместре беременности умеренный и выраженный дисбаланс. Полученные данные демонстрируют недостаточную эффективность препаратов для коррекции биоценоза влагалища в I триместре беременности. Положительную динамику в рамках проведенного исследования отмечали у 39,5% пациенток. **Ключевые слова:** биоценоз влагалища, беременность, ПЦР в реальном времени

Resume

We estimated changes during pregnancy in vaginal biocenosis of 119 women. Normocenosis was considered as good predictive character for maintenance of this condition during pregnancy. Exogenous factors including medication do not affect absolute and comparative normocenosis because these conditions were stable during pregnancy. The most significant positive dynamics during pregnancy was observed in women with moderate and expressed dysbiosis found in first trimester. Correction of biocenosis in first trimester was considered as insufficient, because positive changes in biocenosis were shown in 39.5% patients.

Key words: vaginal biocenosis, pregnancy, PCR

Введение

В настоящее время существуют две диаметрально противоположные точки зрения на биоценоз беременных женщин и изменение количественного и качественного состава биоты на протяжении беременности. Ряд авторов утверждают, что микрофлора влагалища у беременных очень неустойчива к различным эндогенным и экзо-

генным воздействиям и в период беременности претерпевает существенные изменения [1]. Другие авторы, напротив, говорят о том, что биоценоз влагалища – сложная, многокомпонентная система, обладающая такими свойствами, как устойчивость и восстановление. Формирование экосистемы «макроорганизм – микроорганизм» происходит через процесс сукцессии, т.е. последовательной смены одних микроорганизмов в биоценозе другими видами с образованием устойчивого и стабильного микробного сообщества [2].

Тем не менее, большинство авторов однозначно утверждают, что различные дисбиотические нарушения биоты влагалища в период беременности негативно влияют не только на состояние матери, но и на здоровье

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

новорожденного.

Для прогнозирования течения и исхода беременности, принятия врачом решения о назначении различных антибактериальных, антимикотических и восстанавливающих препаратов необходима адекватная лабораторная диагностика, которая позволит оценить состояние биоценоза урогенитального тракта, определить степень его нарушений и выявить этиологию дисбиотического процесса.

ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволит врачу-клиницисту выявлять этиологическую причину дисбиотического процесса во влагалище, оценивать эффективность выбранной терапии и восстановление нормальной микрофлоры.

Целью настоящего исследования являлось выявление особенностей динамики биоценоза влагалища в течение беременности с помощью количественной ПЦР, оценка возможности коррекции нарушений вагинальной микрофлоры у беременных женщин в первом триместре.

Материалы и методы

В исследование были включены 119 беременных женщин в возрасте от 20 до 43 лет (средний возраст 29,82 года), состоявшие на диспансерном учете по беременности в МФЦ «Гармония» в период с апреля 2008 по декабрь 2009 года. Биоценоз влагалища методом количественной ПЦР исследовали однократно в каждом триместре беременности. Всего было изучено 357 вагинальных образцов.

Материал для исследования собирали с заднебоковой стенки влагалища в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл физиологического раствора, хранение и транспортировку материала проводили согласно действующим МУ [3]. 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 (г·мл)) общей бактериальной массы, лактобацилл и различных групп условно-патогенных микроорганизмов. Также оценивали долю нормофлоры, факультативно-анаэробных микроорганизмов и анаэробных микроорганизмов в процентах среди всех выявленных бактерий. Классификация видов биоценоза осуществлялась в соответствии с предложенной ранее схемой [4].

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

Структура биоценоза влагалища у беременных в I, II и III триместрах беременности представлена в Таблице 1.

К концу беременности наблюдали увеличение количества биоценозов, в которых доля лактобактерий в составе биоценоза была более 90% (абсолютный и относительный нормоценоз). Причем при снижении количества относительных нормоценозов увеличилось число абсолютных нормоценозов. В структуре относительных нормоценозов во всех триместрах доминировали варианты, обусловленные присутствием *Ureaplasma* spp. (75,6%, 66,4% и 87% в I, II и III триместрах соответственно). Доля относительных нормоценозов с *Candida* spp. в надпороговых значениях снижалась почти в 2 раза к III триместру (62,2%, 64% и 34,8% в I, II и III триместрах соответственно).

Провели анализ изменений доли нормофлоры в составе биоценоза влагалища в течение беременности. Установлено, что степень изменения этого показателя на протяжении беременности может существенно различаться. Так у женщин с вариантами биоценоза, в которых доля лактобактерий превышала 90% (абсолютный и относительный нормоценоз), ее изменения были незначительными (в пределах 10%). Таким образом, эти варианты представляют собой достаточно устойчивую систему, на которую внешние воздействия, в том числе лекарственная терапия не оказывают выраженного влияния. Наибольшие колебания доли нормофлоры в течение бе-

Таблица 1. Структура биоценоза влагалища в течение беременности (N=119)

| | I триместр N (%) | II триместр N (%) | III триместр N (%) |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Нормоценоз | 56 (47,05%) | 67 (56,30%) | 70 (58,82%) |
| Относительный нормоценоз | 41 (34,45%) | 30 (25,21%) | 32 (26,89%) |
| Умеренный дисбаланс | 10 (8,40%) | 14 (11,76%) | 11 (9,24%) |
| Выраженный дисбаланс | 12 (10,10%) | 8 (6,73%) | 6 (5,05%) |

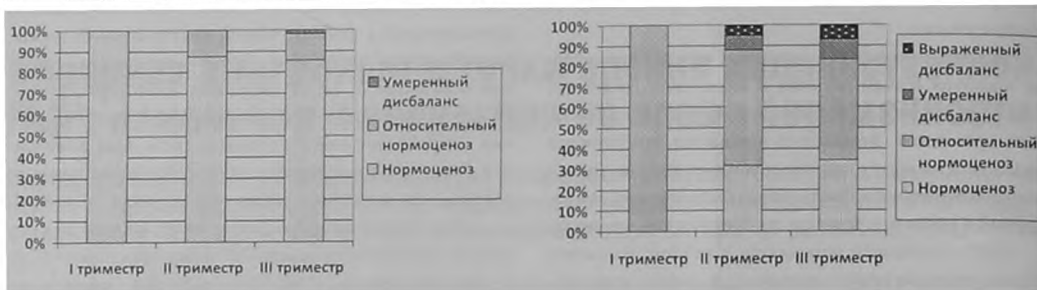


Рисунок 1. Изменения биоценоза влагалища во II и III триместрах беременности у женщин с нормоценозом в I триместре (n=56)

Рисунок 2. Изменения биоценоза влагалища во II и III триместрах беременности у женщин с относительным нормоценозом в I триместре (N=41)

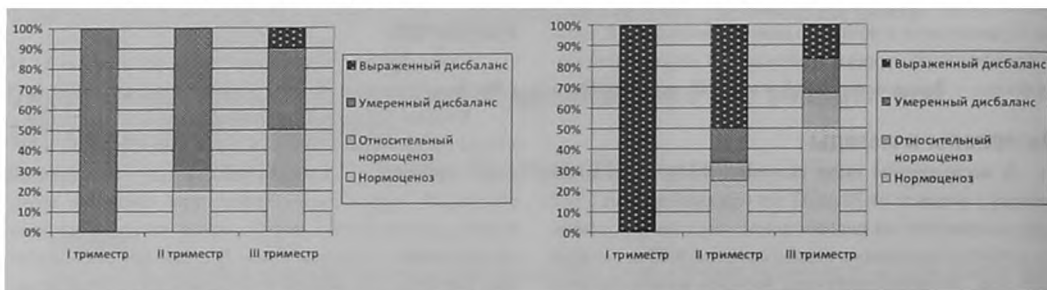


Рисунок 3. Изменения биоценоза влагалища во II и III триместрах беременности у женщин с умеренным дисбалансом в I триместре (n=10)

Рисунок 4. Изменения биоценоза влагалища во II и III триместрах у женщин с выраженным дисбалансом в I триместре (n=12)

ремени (более 90%) наблюдали у женщин с выраженным дисбалансом вагинальной микрофлоры.

Промежуточное положение заняла группа женщин с умеренными и выраженными дисбалансами, у которых изменения доли нормофлоры в течение беременности были умеренными (от 10 до 90%). При этом увеличение доли лактофлоры у этих женщин не всегда приводило к восстановлению абсолютного нормоценоза.

Изучили динамику состояния биоценоза влагалища на протяжении беременности в зависимости от его исходного состояния.

На Рисунке 1 представлены данные по изменению биоценоза влагалища у беременных женщин с диагностированным нормоценозом в I триместре.

Нормоценоз в I триместре выявили у 56 женщин. Обследование их во II и III триместре показало, что у 48 (85,71%) из них нормоценоз сохранился до конца беременности. У 4 женщин (7,14%) во II триместре нормоценоз сменился относительным нормоценозом (увеличилось количество *Ureaplasma spp.* при сохраненной лактофлоре), причем такой вариант биоценоза сохранялся у них до конца беременности. У 3 женщин во II триместре выявляли относительный нормоценоз, обусловленный увеличением количества *Candida spp.*, у 2 из них это состояние сохранялось до конца беременности. У 1 женщины с нормоценозом в I триместре биоценоз изменился в III триместре — у нее выявили умеренный анаэробный дисбаланс. Таким образом, наличие нормоценоза в I триместре является хорошим прогностическим признаком,

указывающим на высокую вероятность сохранения этого состояния на протяжении всей беременности.

У 41 женщины в I триместре состояние влагалищной микрофлоры оценивали как относительный нормоценоз. Данные по изменению биоценоза влагалища у беременных этой группы представлены на Рисунке 2.

У 10 из 25 женщин с относительным нормоценозом, обусловленным присутствием *Ureaplasma spp.*, к III триместру беременности удалось добиться снижения количества этого микроорганизма ниже 10^4 . Уменьшение количества *Candida spp.* было достигнуто у каждой третьей пациентки с относительным нормоценозом, обусловленным наличием дрожжеподобных грибов. При наличии смешанной инфекции только в 1 из 6 случаев был восстановлен абсолютный нормоценоз к концу беременности. Таким образом, положительной динамики добились в 14 из 41 случаев (39,13%). При этом у 7 (17,1%) женщин динамика состояния биоценоза была отрицательной — на фоне проведенной терапии отмечали снижение доли лактобактерий в составе вагинальной микрофлоры и формирование умеренного или выраженного дисбиоза.

На Рисунке 3 представлены данные по изменению биоценоза влагалища у беременных женщин с выявленным умеренным дисбалансом в I триместре (n=10). Положительную динамику к концу беременности наблюдали в половине случаев: у 2 женщин восстановился нормоценоз, у 3 — относительный нормоценоз. У 4 беременных состояние биоценоза не изменилось, а у 1 пациентки к III триместру состояние вагинальной микрофлоры ухудши-

Таблица 1. Структура биоценоза влагалища в течение беременности (N=119)

| Вид биоценоза | До лечения N (%) | После лечения N (%) |
|--------------------------|------------------|---------------------|
| Нормоценоз | 0 | 10 (26,31%) |
| Относительный нормоценоз | 22 (57,89%) | 14 (36,84%) |
| Умеренный дисбаланс | 3 (7,9%) | 6 (15,77%) |
| Выраженный дисбаланс | 13 (34,21%) | 8 (21,05%) |

дось - у нас выявили выраженный аэробный дисбаланс.

Данные по изменению биоценоза влагалища у беременных с выявленным выраженным дисбалансом в I триместре представлены на Рисунке 4 (n=12). В целом положительную динамику во II триместре отмечали у 6 из 12 беременных, имевших в I триместре выраженный дисбаланс, в III триместре — у 10 беременных. В том числе восстановление доли лактофлоры до нормы произошло у 4 женщин во II триместре и у 8 — в III триместре. У 2 женщин состояние биоценоза к концу беременности осталось без изменений. У женщин с выраженным дисбалансом в I триместре в присутствии *Candida spp.* и *Ureaplasma spp.* > 10⁴ г/мл количество этих возбудителей к III триместру не изменилось, несмотря на проведенную терапию и достижение относительного нормоценоза. Вероятно, восстановление нормального баланса между лактобактериями и условно-патогенной флорой у беременных достигается легче, чем подавление *Candida spp.* и *Ureaplasma spp.*

Известно, что нарушения в составе вагинальной микрофлоры у беременных уже на ранних сроках повышают риск различных осложнений, в том числе невынашивания беременности. В то же время, выбор лекарственных препаратов, разрешенных к применению в первом триместре беременности весьма ограничен, а применение антибиотиков для санации урогенитальных инфекций противопоказано. Мы провели оценку эффективности коррекции биоценоза влагалища с помощью биопрепаратов (Экофемин) и препаратов аскорбиновой кислоты (Вагинорм-С) у 38 беременных в первом триместре. При наличии клинических и лабораторных признаков вагинального кандидоза предварительно назначался пимафуцин.

Частота выявления различных вариантов биоценоза у беременных до и после лечения приведена в Таблице 2.

В результате проведенной терапии у 26,31% беременных произошло восстановление биоценоза до нормы, при

этом состоянии нормоценоза у них сохранялось и в III триместре. Количество выраженных дисбалансов сократилось на одну треть. Анализ индивидуальных трендов показал, что у 15 из 38 женщин (39,5%) динамика изменения биоценоза на фоне проведенного лечения была положительной. У 20 (52,6%) женщин динамика отсутствовала, у 3 (7,9%) женщины регистрировали отрицательную динамику биоценоза. Таким образом, почти в 40% случаев коррекция биоценоза влагалища в I триместре была успешной.

Выводы

1. Наличие нормоценоза в I триместре является хорошим прогностическим признаком, указывающим на высокую вероятность сохранения этого состояния на протяжении всей беременности.

2. Состояние абсолютного и относительного нормоценоза во время беременности представляет собой устойчивую систему, на которую экзогенные факторы, в том числе и лекарственная терапия, не оказывают существенного влияния. Доля лактобактерий в составе данных видов биоценоза остается стабильной в течение всей беременности.

3. Динамика биоценоза влагалища при дисбиотических нарушениях была разнонаправленной. Наибольшие положительные сдвиги наблюдали в группах женщин, имевших в I триместре беременности умеренный и выраженный дисбаланс. Состояние относительного нормоценоза, обусловленного одновременным присутствием *Candida spp.* и *Ureaplasma spp.* в надпороговых количествах, оставалось стабильным на протяжении беременности.

4. Полученные данные демонстрируют недостаточную эффективность препаратов для коррекции биоценоза влагалища в I триместре беременности. Положительную динамику в рамках проведенного исследования отмечали у 39,5% пациенток. ■

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. Симонова Е.В., Пономарева О.А. Роль нормальной микрофлоры в поддержании здоровья человека. Сибирский медицинский журнал. 2008; 3: 20-25.
3. 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.) Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., Плутко Е.Э., Хаютина Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: состояние во время беременности. Уральский медицинский журнал. 2010; 3: стр. 103-107