

УДК 618.215:612.014.3:618.34-007.251

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМ РАЗРЫВОМ ОКОЛОПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕСТА «ФЕМОФЛОР»**М.А.Власова¹, О.В.Островская¹, С.В.Супрун¹, Е.А.Кондрашова²,
Н.М.Ивахнишина¹, Е.Б.Наговицына¹, В.В.Хорук²**

¹Хабаровский филиал Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания
Сибирского отделения РАМН – НИИ охраны материнства и детства,
680022, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49

²Перинатальный центр министерства здравоохранения Хабаровского края,
680028, г. Хабаровск, ул. Истомина, 85

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – определение качественного и количественного состава микроорганизмов, составляющих микробиоценоз генитального тракта, у беременных женщин с преждевременным разрывом околоплодных оболочек. Проведено исследование цервикальных мазков 28 беременных женщин, поступивших в Перинатальный центр на сроке гестации 26-34 недели с преждевременным разрывом околоплодных оболочек. Группу контроля составили 11 беременных женщин с физиологически развивающейся беременностью на сроке гестации 20-25 недель. Исследование генитальных мазков проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Использовали реактивы, входящие в набор «Фемофлор 16», и детектирующий амплификатор ДТ-96 производства фирмы «НПО ДНК-Технология» (Россия). Снижение доли *Lactobacillus spp.*, бактериальный дисбаланс у беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек установлен в 64,3% случаев. В то же время у беременных с физиологически протекающей беременностью снижение лактобактерий определено только в 9,1% ($p < 0,002$), в большинстве же случаев обнаружен нормоцитоз. В структуре дисбиоза у женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек основную роль играют анаэробные микроорганизмы (50,0%) с участием *Gardnerella vaginalis* (17,8%), грибов рода *Candida spp.* (10,7%), *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* – 17,8%, *Atopobium vaginae* (7,1%). Аэробный дисбиоз определен только у 2 женщин (7,1%) с участием *Streptococcus spp.* и грибов рода *Candida spp.*, смешанный – в 2 (7,1%) случаях. Выявленный факт высокой частоты дисбиоза у женщин основной группы подтверждает точку зрения о значительной роли бактериального вагиноза в генезе преждевременно наступающих родов, о необходимости выявлять дисбиоз в период прегравидарной подготовки с последующим восстановлением нормальной микрофлоры и селективной деконтаминацией аэробов и грибов.

Ключевые слова: беременные женщины с преждевременным разрывом плодных оболочек, биоценоз генитального тракта, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

SUMMARY**EVALUATION OF GENITAL TRACT MICROBIOCENOSIS IN PREGNANT WOMEN WITH PRETERM RUPTURE OF MEMBRANES USING «FEMOFLOR» TEST****M.A.Vlasova¹, O.V.Ostrovskaya¹, S.V.Suprun¹,
E.A.Kondrashova², N.M.Ivakhnishina¹,
E.B.Nagovitsyna¹, V.V.Khoruk²**

¹Khabarovsk Branch of the Far Eastern Scientific
Center of Physiology and Pathology of Respiration of
Siberian Branch RAMS – Research Institute of Maternity
and Childhood Protection, 49 Voronezhskaya Str.,
Khabarovsk, 680022, Russian Federation

²Perinatal Center of Khabarovsk Krai Ministry
of Public Health, 85 Istomina Str., Khabarovsk,
680028, Russian Federation

The aim of the study was to determine qualitative and quantitative composition of genital tract microbiosis in pregnant women with preterm rupture of membranes. Cervical smears of 28 pregnant women admitted to the Perinatal Center at 26-34 weeks of gestation for preterm rupture of membranes were studied. A control group consisted of 11 women with normally progressing pregnancy at 20-25 weeks of gestation. Genital smears were studied using a real-time polymerase chain reaction. «Femoflor-16» reagents and detecting amplifier DT-96 (RNA-Technology, Russia) were employed. Decrease in the level of *Lactobacillus spp.* and bacterial dysbalance in pregnant women with preterm rupture of membranes was identified in 64.3% of cases. At the same time, the decrease in lactobacillus level in normally progressing pregnancies was only found in 9.1% of cases ($p < 0.002$), the majority of cases presenting with normocytosis. The structure of dysbiosis in pregnant women with preterm rupture of membranes was represented by anaerobes (50.0%) with involvement of *Gardnerella vaginalis* (17.8%), fungi of *Candida spp.* (10.7%), *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* – 17.8%, and *Atopobium vaginae* (7.1%). Aerobic dysbiosis was only identified in two women (7.1%) with involvement of *Streptococcus spp.* and fungi of *Candida spp.*, mixed dysbiosis was found in 2 (7.1%) cases. High dysbiosis rate identified in women of the basic group confirms the significance of bacterial vaginosis in the genesis of preterm delivery, indicates the

need for detection of dysbiosis during preconception preparation with subsequent recovery of normal microflora and selective decontamination of aerobes and fungi.

Key words: pregnant women with preterm rupture of membranes, genital tract biocenosis, real-time polymerase chain reaction.

Микрофлора урогенитального тракта женщин представляет собой совокупность микроорганизмов, обуславливающих колонизационную резистентность, постоянство pH слизистой оболочки влагалища, участвующих в поддержании местного иммунитета и, как следствие, обеспечивающих общую сопротивляемость организма инфекциям. Нормальная микрофлора влагалища здоровой женщины репродуктивного возраста содержит грамположительные и грамотрицательные аэробные, факультативно-аэробные и облигатно-анаэробные микроорганизмы, при этом 95-98% всех микроорганизмов представлено лактобактериями. К нормальной микрофлоре относятся также генитальные микоплазмы в титре менее 10^4 КОЕ/мл, грибы рода *Candida* в титре менее 10^3 КОЕ/мл [1].

Следствием качественного и количественного изменения состава микрофлоры урогенитального тракта является бактериальный вагиноз. К ассоциированным с бактериальным вагинозом микроорганизмам относятся *Gardnerella*, *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Leptotrichia*, *Atopobium vaginae* и др. [1, 3]. Следствием вагиноза могут быть инфекционно-воспалительные заболевания, протекающие со стертым, торпидным, малосимптомным течением, что неизбежно приводит к поздней обращаемости, нередко уже на стадии развития осложнений со стороны органов репродуктивной системы [2, 4]. Заболевания, вызванные условно-патогенной микрофлорой у матери, могут быть причиной спонтанных аборт, преждевременного излития околоплодных вод, внутриутробного и постнатального инфицирования плода, послеродовых воспалительных заболеваний влагалища, преждевременных родов, а также внутриутробного и постнатального инфицирования плода [2, 4].

Наиболее распространенными методами диагностики инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитального тракта являются микроскопическое исследование состояния вагинального эпителия и лейкоцитарной реакции, оценка состава и количества микроорганизмов по микроскопии мазка и бактериологическое исследование, качественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Условно-патогенные микроорганизмы могут присутствовать как при патологических состояниях (в значительных количествах), так и в норме (в ограниченном количестве). Поэтому для оценки состояния биоценоза необходимы и качественная, и количественная характеристики. Это стало возможно после разработки методики ПЦР в реальном времени.

Цель исследования – определение качественного и количественного состава микроорганизмов, составляющих микробиоценоз генитального тракта у бере-

менных женщин с преждевременным разрывом околоплодных оболочек методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы исследования

Проведено исследование цервикальных мазков 28 беременных женщин в возрасте 24-36 лет, поступивших в Перинатальный центр на сроке гестации 26-34 недели с преждевременным разрывом околоплодных оболочек. Группу контроля составили 11 беременных женщин в возрасте 24-36 лет с физиологически развивающейся беременностью на сроке гестации 20-25 недель.

Исследование осуществляли методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Использовали набор реагентов для исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени (Фемофлор-16) и детектирующий амплификатор ДТ-96 производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия). Получение, хранение, транспортировку клинических образцов, диагностику дисбиотических нарушений проводили согласно медицинской технологии, разработанной сотрудниками ИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова МЗ РФ и НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта СЗО РАМН [5]. Для получения адекватных результатов использовали только образцы с достаточным количеством клеток цервикального канала, попавших в пробирку с анализируемой пробой и достаточной общей бактериальной массой. Учитывались пробы, в которых количество ДНК клеток человека было больше 10^4 геном-эквивалентов (ГЭ) в образце, а величина общей бактериальной массы составляла от 10^6 до 10^9 ГЭ/образец.

После амплификации автоматически устанавливали общее количество бактериальной массы, *Lactobacillus spp.* и каждого из условно-патогенных микроорганизмов. По их соотношению, рассчитываемому с помощью программного обеспечения, определялось состояние микробиоценоза влагалища.

Количественная оценка влагалищной микрофлоры проводилась как в абсолютных, так и в относительных показателях. Абсолютный показатель – количество ДНК искомого микроорганизма в образце, выраженное в ГЭ, представленное в виде десятичного логарифма – lg. Относительный количественный показатель микроорганизма рассчитывали как отношение количества искомого микроорганизма к количеству общей бактериальной массы. Он был представлен в двух форматах: разница десятичных lg количества соответствующей группы микроорганизмов и общей бактериальной массы, и в процентах по отношению к общей бактериальной массе.

Состояние биоценоза оценивали по критериям, разработанным Г.Т.Сухих и соавт. [5]. Классификация видов биоценоза включала:

- нормоценоз абсолютный – вариант биоценоза, при котором доля нормофлоры составляет 80–100% относительно общей бактериальной массы, количество *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* – менее 10^4 гЭ/мл, а

грибов рода *Candida spp.* – менее 10³ гз/мл;

- условный нормоценоз – доля нормофлоры составляет 80-100% относительно общей бактериальной массы, количество *Ureaplasma spp.* и/или *Mycoplasma spp.* – более 10⁴ гз/мл, а *Candida spp.* – более 10³ гз/мл;

- умеренный (аэробный или анаэробный) дисбаланс – доля лактобактерий снижена до 20–80% относительно общей бактериальной массы за счет увеличения доли аэробов или анаэробов;

- выраженный (аэробный, анаэробный или смешанный) дисбаланс (приходится 30-50%) – вариант биоценоза, при котором доля аэробов или анаэробов достигает 80-100% относительно общей бактериальной массы, а доля лактобактерий снижается до 20% и менее.

Обработку результатов исследования проводили с помощью программы Statistica 6.0. Достоверными считали различия при p<0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Сопоставление показателей биоценоза в сравниваемых группах показало, что доля нормоценоза у женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек в 2,5 раза ниже, чем в контрольной группе (p=0,0019). Дисбиоз был установлен в 18 случаях из 28 (64,3%), в то время, как в группе контроля – у 1 женщины из 11 (9,1%; p=0,0019). Умеренный анаэробный, выраженный аэробный и смешанный дисбиоз обнаруживали только у женщин основной группы (табл.). Анаэробные бактерии определяли чаще, чем аэробные, что совпадает с ранее полученными результатами [1].

Таблица

Распознавание дисбиоза влагалища по виду и степени выраженности в обследуемых группах, абс (%)

Группы беременных женщин	Нормоценоз	Дисбиоз			
		Умеренный анаэробный	Выраженный		Смешанный
			Анаэробный	Аэробный	
С преждевременным разрывом околоплодных оболочек (n=28)	10 (35,7)	7 (25,0)	7 (25,0)	2 (7,1)	2 (7,1)
С физиологически протекающей беременностью (n=11)	10 (90,9)	0	7 (25,0)	0	0
Достоверность различия (p)	0,0019	0,0376	0,1362	0,1869	0,1869

Нормоценоз в группе беременных женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек выявили в 10 случаях. Из них только у 1 пациентки определили абсолютный нормоцитоз, у остальных – условный нормоцитоз с наличием *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* в 8 из 9 случаев, и грибов рода *Candida spp.* в 1 случае в титрах более 10⁴ и 10³, соответственно.

Умеренный анаэробный дисбиоз диагностирован у 7 (25%) беременных женщин с преждевременным разрывом околоплодных оболочек. Доля *Lactobacillus spp.* в цервикальных мазках пациенток этой группы определена в пределах 24-70% относительно общей бактериальной массы. В высоких титрах выявили *Eubacterium spp.* – у 2 беременных женщин.

В 5 случаях обнаружены сочетания анаэробных бактерий и микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом:

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.*+ грибы рода *Candida*;
- *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* + *Sneathia spp./Leptotrihia spp./Fusobacterium spp.*;
- *Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.* + *Ure-*

aplasma (urealyticum+parvum);

- *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.*+ *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* + грибы рода *Candida*;

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.* + *Atopobium vaginae* + грибы рода *Candida*.

Выраженная степень дисбиоза установлена у 9 (32,1%) беременных женщин основной группы, в том числе анаэробный дисбиоз у 7 (25,0%), аэробный – у 2 (7,1%) женщин. Количество *Lactobacillus spp.* при выраженном дисбиозе колебалось от 0 до 18% относительно общей бактериальной массы

Этиологическую структуру выраженного анаэробного дисбаланса составили следующие сочетания возбудителей анаэробных инфекций и микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом:

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.*;
- *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.* + *Atopobium vaginae* + *Ureaplasma (urealyticum+parvum)*;
- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.* + *Ureaplasma (urealyticum+parvum)*;

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp. + Eubacterium spp. + Sneathia spp./Leptotrihia spp./Fusobacterium spp. + Ureaplasma (urealyticum+parvum)*;

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp. + Eubacterium spp. + Mobiluncus spp./Corynebacterium spp. + Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp.*;

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp. + Eubacterium spp.*;

- *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp. + Sneathia spp./Leptotrihia spp./Fusobacterium spp.*

При выраженном аэробном дисбалансе, который был обнаружен у 2 пациенток из 28, у обеих женщин выявлен *Streptococcus spp.* в высоких титрах. У одной из пациенток наряду со стрептококком мы определили грибы рода *Candida* в диагностическом титре. В обоих случаях *Lactobacillus spp.* не были выявлены.

Умеренный аэробно-анаэробный (смешанный) дисбиоз определен также у 2 пациенток. Этиологическую структуру смешанного дисбиоза составили в одном случае *Streptococcus spp./Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.*, в другом – *Megasphaera spp./Veillonella spp./Dialister spp./Ureaplasma (urealyticum+parvum)*.

У женщин с физиологически развивающейся беременностью нормоценоз обнаружен в 10 случаях из 11 (90,9%). Из них абсолютный нормоценоз – у 4 женщин, условный нормоценоз – у 6 пациенток. Среди женщин с условным нормоценозом в 4 случаях обнаружена *Ureaplasma (urealyticum+parvum)*, у 1 пациентки – грибы рода *Candida spp.*, и у 1 беременной – оба возбудителя в диагностических титрах.

Выраженный анаэробный дисбиоз был выявлен у 1 из 11 беременных женщин с физиологически развивающейся беременностью. Этиологическая структура была представлена следующими возбудителями: *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porp Streptococcus spp., Gardnerella hyromonas spp., Eubacterium spp., Atopobium vaginae, Ureaplasma (urealyticum+parvum)*.

Таким образом, в результате проведенного исследования продемонстрирована эффективность применения нового современного метода ПЦР в реальном времени для диагностики бактериального вагиноза, разработанного сотрудниками фирмы «ДНК-технология». Метод позволяет в одном образце в течение короткого времени определять количество лактобактерий и бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом, анаэробную и аэробную флору, в том числе труднокультивируемую, оценить их соотношение и состояние биоценоза генитального тракта женщин.

Впервые с помощью теста «Фемофлор» описан микробный пейзаж генитального тракта беременных женщин с преждевременным разрывом околоплодных оболочек в сопоставлении с микробиоценозом генитального тракта женщин с физиологически протекающей беременностью. Снижение доли *Lactobacillus spp.*, бактериальный дисбаланс у беременных с преждевременным разрывом плодных оболочек установлены в

64,3% случаев. В то же время у женщин с физиологически протекающей беременностью снижение лактобактерий определено только в 9,1% ($p=0,002$), в большинстве же случаев установлен нормоцитоз. В структуре дисбиоза у женщин с преждевременным разрывом плодных оболочек основную роль играют анаэробные микроорганизмы (14 случаев из 28, или 50%) в сочетании с *Gardnerella vaginalis* (17,8%), грибами рода *Candida spp.* (10,7%), *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* – 17,8%, *Atopobium vaginae* (7,1%). Аэробный дисбиоз зарегистрирован только у 2 женщин (7,1%), при этом выявлены *Streptococcus spp.* и грибы рода *Candida spp.*, смешанный – в 2 (7,1%) случаях. Установленные факты подтверждают точку зрения о значительной роли бактериального вагиноза в генезе преждевременно наступающих родов, диктуют необходимость диагностировать дисбиоз в период прегравидарной подготовки с последующим восстановлением нормальной микрофлоры и селективной деконтаминацией аэробов и грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гомберг М. А. Бактериальный вагиноз и новые инфекции, с ним ассоциированные // Рос. вестн. акуш.-гин. 2010. №2. С.32–34.

2. Микробиоценоз влагалища и пути его коррекции у женщин с самопроизвольным прерыванием беременности в поздние сроки гестации в анамнезе / Е.Э.Гродницкая [и др.] // Рос. вестн. акуш.-гин. 2011. №1. С.22–25.

3. Дмитриев Г.А., Глазко И.И. Бактериальный вагиноз. М.: Бином, 2008. 192 с.

4. Калинкина О.Б. Эффективность восстановления биоценоза влагалища женщин с синдромом поликистозных яичников при лечении псевдоэрозии шейки матки // Профилактика рака шейки матки: взгляд в будущее: мат. междунар. науч.-практ. конф. М., 2008. С.62–63.

5. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. М.: МИА, 2012. 472 с.

6. Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин (тест Фемофлор®): медицинская технология / Г.Т.Сухих [и др.]. М., 2011. 36 с.

7. Савичева А.М., Шипицына Е.В. Бактериальный вагиноз и беременность // Гинекология. 2012. Т.14, № 3. С.38–43.

8. Хамаганова И. В. Бактериальный вагиноз // Лечащий врач. 2007. №10. С.24–26.

9. Применение теста Фемофлор для оценки микробиоценоза влагалища / Е.В.Шипицына [и др.] // Журн. акуш. и жен. бол. 2009. №3. С.44–50.

REFERENCES

1. Gomberg M. A. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa* 2010; 2:32–34.

2. Grodnitskaia E.É., Shamanova M.B., Palei O.S., Kurtser M.A. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa* 2011; 1:22–25.

3. Dmitriev G.A., Glazko I.I. *Bakterial'nyy vaginoz* [Bacterial vaginosis]. Moscow: Binom; 2008.
4. Kalinkina O.B. *Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Profilaktika raka sheyki matki: vzglyad v budushchee»* (International scientific-practical conference «The prevention of cervical carcinoma: prospection»). Moscow; 2008:62–63.
5. Kira E.F. *Bakterial'nyy vaginoz* [Bacterial vaginosis]. Moscow: MIA; 2012.
6. Sukhikh G.T., Aylamazyan E.K., Savicheva A.M., Prilepskaya V.N., Trofimov D.Yu., Donnikov A.E., Shipitsyna E.V. *Primenenie metoda polimeraznoy tsepnoy reaktsii v real'nom vremeni dlya otsenki mikrobiotsenoza urogenital'nogo trakta u zhenshchin (Test Femoflor®): meditsinskaya tekhnologiya* [Use of the method of polymerase chain reaction in real time to assess of microbio-cenosis of the urogenital tract in women (test Femoflor®): medical technology]. Moscow; 2011.
7. Savicheva A.M., Shipitsyna E.V. *Ginekologiya* 2012; 14(3):38–43.
8. Khamaganova I. V. *Lechashchiy vrach* 2007; 10:24–26.
9. Shipitsyna E.V., Martikaynen Z.M., Vorob'eva N.E., Ermoshkina M.S., Stepanova, O.S., Donnikov A.E., Skorkina Yu.A., Tumbinskaya L.V., Savicheva A.M. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney* 2009; 3:44–50.

Поступила 02.10.2014

Контактная информация

Ольга Васильевна Островская,

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник

лаборатории комплексных методов исследований бронхолегочной и перинатальной патологии,

НИИ охраны материнства и детства,

680022, г. Хабаровск, ул. Воронежская, 49.

E-mail: iomid@yandex.ru

Correspondence should be addressed to

Ol'ga V. Ostrovskaya,

MD, PhD, Leading staff scientist of Laboratory of Complex
Methods of Research of Bronchopulmonary and Perinatal Pathology,

Research Institute of Maternity and Childhood Protection,

49 Voronezhskaya Str., Khabarovsk, 680022, Russian Federation.

E-mail: iomid@yandex.ru