

Комплексная оценка вагинальной микробиоты методом ПЦР в режиме реального времени

Билимова С.И. – врач-бактериолог лаборатории иммунологии и микробиологии ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

Чистякова Г.Н. – д.м.н., руководитель отделения иммунологии и микробиологии ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

Ремизова И.И. – к.б.н., и.о. с.н.с. отделения экологической репродуктологии ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

Complex assessment of vaginal microbiota by a method PCR in real-time

Billimova S.I., Chistjakova G.N., Remisova I.I.

Резюме

С целью оценки качественного и количественного состава вагинальной микрофлоры с помощью метода ПЦР в режиме реального времени с использованием диагностической тест-системы «Фемофлор 16» было обследовано 40 практически здоровых женщин в период предгравидарной подготовки. В результате комплексной оценки была определена характеристика вагинальной нормобиоты и выявлены варианты дисбаланса биоты. Диагностика этиологической структуры и степени выраженности дисбаланса вагинальной микробиоты на ранних стадиях способствовала оптимизации коррекционной терапии выявленного вида дисбаланса у конкретной пациентки.

Ключевые слова: вагинальная микробиота, метод ПЦР в режиме реального времени.

Summary

40 practically able-bodied women in the predgravid stage were surveyed with purpose to estimate qualitative and quantitative composition of vaginal microflora by the PCR method in real time with using of test-system "Femoflor-16". The performance of vaginal biota and the variants of dysbalance of biota were detected as the results of the complex assessment. Diagnostics of etiological frame and degree of manifestation of dysbalance of vaginal microbiota at early stages contributed in optimization of correctional therapy of the detected view of dysbalance for the concrete patiente.

Key words: vaginal microbiota, method PCR in real-time.

Введение

По данным многочисленных эпидемиологических исследований среди инфекционно-воспалительных заболеваний женских половых органов все большее значение приобретают инфекционные процессы, этиологическим агентом которых выступают условно-патогенные бактерии и грибы рода *Candida*, являющиеся составной частью нормальной микрофлоры. Дисбаланс условно-патогенной и нормальной микрофлоры проявляется как инфекционный полимикробный невоспалительный вагинальный синдром – бактериальный вагиноз [1,2]. Именно нарушение количественных соотношений в микробиоценозе влагалища является важнейшим фактором клинических проявлений бактериального вагиноза. Степень нарушения микрофлоры может касаться как видового состава, так и количественного уровня каждого вида.

К настоящему времени определен спектр бактерий, с которыми ассоциируют бактериальный вагиноз: *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp., *Clostridium* spp., *Megasphaera* и др. Наиболее тяжелые, рецидивирующие формы бактериального вагиноза ассоциированы с *Atopobium vaginae* и *Leptotrichia* spp. [2].

Доказано, что это патологическое состояние обеспечивает дискомфорт и снижает качество жизни, увеличивает риск развития инфекций передающихся половым путем, способствует неудачам при экстракорпоральном оплодотворении, связано с угрозой выкидыша и преждевременных родов, несвоевременным излитием околоплодных вод, интраамниальной инфекцией и воспалительными процессами в матке в послеродовом периоде [3,4].

Обнаружение отдельных видов условно-патогенных микроорганизмов в составе вагинальной микрофлоры не позволяет дать объективную оценку состояния микробиоценоза и решить вопрос о необходимости проведения этиотропной терапии. Только количественные исследования, определяющие соотношение отдельных видов микроорганизмов, в полной мере характеризуют вагинальный микробиоценоз.

Ответственный за ведение переписки -
Газиева Ирина Александровна,
620028, г. Екатеринбург, ул. Ретина 1
e-mail: uchsec@niiomtm.ru

Культуральная диагностика до настоящего времени является «золотым стандартом» лабораторной диагностики любого патологического процесса, поскольку позволяет выполнить количественную оценку, идентифицировать микроорганизм до вида и определить чувствительность выделенного штамма к антимикробным препаратам. Однако этот метод не лишен недостатка. Группа условно-патогенных микроорганизмов, кроме факультативно-анаэробных бактерий, включает также анаэробные микроорганизмы, для культивирования которых требуется наличие анаэробно-оборудования и реагентов, необходим длительный срок культивирования. Ряд этиологически значимых микроорганизмов трудно культивируются, что не позволяет верифицировать диагноз по результатам культурального исследования.

В последние годы широкое распространение получил культивационно-независимый метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» (real time), который позволяет в короткие сроки идентифицировать микроорганизмы до вида, в том числе и трудно культивируемые, и определить их количественное содержание.

Цель исследования: оценка с помощью метода ПЦР в режиме «реального времени» качественного и количественного состава вагинальной микрофлоры для дифференцирования состояния физиологического равновесия и дисбаланса условно-патогенной микробиоты влагалища у практически здоровых женщин репродуктивного возраста, обращающихся в женскую консультацию с целью предгравидарной подготовки.

Материалы и методы

Обследованы 40 женщин, обратившихся в женскую консультацию ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий» г.Екатеринбурга с целью предгравидарной подготовки. Возраст женщин в среднем составил 29,4±0,5 года. У всех 40 обследуемых пациенток отсутствовали заболевания, вызванные облигатными патогенами: гонорея, сифилис, трихомониаз, хламидиоз, ВИЧ, гепатит В и С. Женщины не имели выраженных клинических симптомов урогенитальных инфекций, относились к группе практически здоровых. Обследование женщин проводили в период овуляции при условии отсутствия незащищённых половых контактов в течение предшествующих 3-5 дней.

Материалом для исследования методом ПЦР в режиме РВ служил соскок эпителиальных клеток в области заднебокового свода влагалища.

Клинический материал забирали одноразовым стерильным урогенитальным зондом. Полученный образец помещали в пробирку типа «Эпэндорф», содержащую транспортную среду. Для обработки клинического материала использовали коммерческий набор реагентов под названием «Фемофлор 16» фирмы ДНК-Технология (Россия). Амплификацию с детекцией в режиме «реального времени» осуществляли на приборе IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System фирмы BIO-RAD(США).

Из одной биопробы методом ПЦР в режиме РВ выполнялась количественная оценка общей бактериальной массы, урогенитальной нормофлоры (лакто-

бациллы), комплекса аэробных (Enterobacterium spp., Streptococcus spp.,Staphylococcus spp.) и анаэробных микроорганизмов (Gardnerella, Prevotella bivia, Porphyromonas spp., Eubacterium spp., Sneathia spp., Leptotrihia spp., Fusobacterium spp., Megaspheara spp.,Veilonella spp., Dialister spp., Lachnobacterium spp., Clostridium spp., Mobiluncus spp., Corynebacterium spp.,Peptostreptococcus spp.,Atopobium

vaginae), урогенитальных микоплазм (Mycoplasma hominis+genitalium, Ureaplasma urealyticum+parvum) и грибов рода Candida, участвующих в развитии дисбиотических процессов в урогенитальном биоценозе.

Методика диагностики дисбаланса урогенитальной микробиоты у женщин состояла в следующем:

1.Сравнение количества лактобацилл с общим количеством бактерий, позволяющее оценить выраженность нарушений уровня нормофлоры;

2.Сравнение количества представителей условно-патогенной биоты с количеством лактобацилл, позволяющее определить этиологическую значимость тех или иных микроорганизмов в развитии дисбиоза и степень его выраженности;

3.Количественное определение геномной ДНК эпителиальных клеток человека, попадающих в биопробу при правильном взятии материала, обеспечивающее контроль качества преаналитического этапа и исключающее ложноотрицательные результаты исследования.

Результаты и обсуждение

Из 40 обследованных пациенток нормобиоценоз влагалищной микрофлоры был выявлен у 19 (47%) женщин. Примеры состава микрофлоры влагалища, соответствовавшие нормоценозу, представлены данными авторов-разработчиков тест-системы «Фемофлор 16» и результатами собственных исследований в таблице 1.

Согласно данным таблицы 1, количество лактобацилл равно общей бактериальной массе, количество остальных условно-патогенных микроорганизмов отличалось от количества лактобацилл в десятки раз. Существенное преобладание лактобацилл над остальными условно-патогенными микроорганизмами определялось как нормобиоценоз.

Полученные в результате собственных исследований данные о микрофлоре влагалища здоровой женщины репродуктивного возраста согласовывались с данными научной литературы об одновременном присутствии большого количества грамположительных и грамотрицательных анаэробов (облигатных и факультативных), микроаэрофилов, грибов р.Candida и уреаплазм [1,3]. Несмотря на то, что понятие норма и дисбаланс микробиологии окончательно не определены, соотношение количества лактобацилл с количеством других представителей биоты позволило определить нормативные границы.

Следует отметить, что лактобациллы не являются единственной «протективной» составляющей микрофлоры урогенитального тракта. Описана роль бифидобактерий как одного из наиболее вероятных дополнительных микробных компонентов вагинального нормобиоценоза. Однако, лактобациллы являются доминирующими бактериями, обеспечивающими колонизационную резистентность и гомеостаз

Таблица 1. Структура вагинальной микрофлоры при нормобиоценозе

Микрофлора (ФЕМОФЛОР 16)	Группа	Количество геномной ДНК бактериальных клеток	
		Log*	Log**
Общая бактериальная масса	Диагностика нормобиоценоза	8	8
Lactobacillus spp.	Факультативные аэробные микроорганизмы	8	8
Enterobacterium spp.		2	2
Streptococcus spp.		2	2
Staphylococcus spp.		3	3
Gardnerella /Prevotella bivia /Porphyromonas spp.	Анаэробные микроорганизмы	4,8	4
Eubacterium spp.		4	4
Sneathia spp. /Leptotrihia spp. /Fusobacterium spp.		1	1
Megasphaera spp. /Veilonella spp. /Dialister spp.		0	1
Lachnobacterium spp. /Clostridium spp.		1	1
Mobiluncus spp. /Corynebacterium spp.		0	2
Peptostreptococcus spp.		3	3
Atopobium vaginae		0	0
Mycoplasma (hominis+genitalium)		0	0
Ureaplasma (urealyticum+parvum)		4,6	4
Грибы p.Candida	Грибы	2,8	3

Примечание: *количественные показатели, представленные авторами-разработчиками тест-системы «Фемофлор 16»; ** количественные показатели, полученные в результате собственных исследований.

Таблица 2. Структура вагинальной микрофлоры при дисбалансе

Микрофлора (ФЕМОФЛОР 16)	Количество геномной ДНК бактериальных клеток Log			
	виды дисбаланса микрофлоры			
	I	II	III	IV
Общая бактериальная масса	7	6	8	7
Lactobacillus spp.	6,7	5	6	5
Enterobacterium spp.	5	3	3	4
Streptococcus spp.	5	5	4	5
Staphylococcus spp.	5	6	5	6
Gardnerella /Prevotella bivia /Porphyromonas spp.	6	3	8	7
Eubacterium spp.	5	3	7	5
Sneathiaspp. /Leptotrihia spp. /Fusobacterium spp.	1	2	8	2
Megasphaera spp. /Veilonella spp. /Dialister spp.	3	0	7	4
Lachnobacterium spp. /Clostridium spp.	3	0	7	4
Mobiluncus spp. /Corynebacterium spp.	4	3	8	4
Peptostreptococcus spp.	3	3	7	4
Atopobium vaginae	2	0	8	3
Mycoplasma (hominis+genitalium)	0	0	5	0
Ureaplasma (urealyticum+parvum)	0	0	2	5
Грибы p.Candida	5	3	4	3

Примечание: I – умеренный дисбаланс, II – аэробный дисбаланс, III – анаэробный дисбаланс, IV – аэробно-анаэробный дисбаланс.

влагалищной среды [4,5].

Наряду с лактобациллами, с помощью молекулярно-генетического метода были определены и другие типичные представители нормальной микрофлоры влагалища: Peptostreptococcus spp., Propionobacterium spp., Porphyromonas spp., Prevotella spp., Corynebacterium spp., Eubacterium spp. Проведенные нами исследования подтвердили данные о том, что для нормобиоценоза влагалища сексуально активных женщин характерно присутствие энтеробактерий, коагулазонегативных стафилококков, негемолитических стрептококков, грибов p.Candida и уреоплазм в

количестве, не превышающем 104 ГЭК/мл при использовании ПЦР в режиме РВ. Atopobium vaginae, Mycoplasma hominis и Mycoplasma genitalium не были идентифицированы у женщин с вагинальным нормобиоценозом.

Огромное количество разнообразных микроорганизмов, образующих микрофлору влагалища женщины, определяет гомеостаз данного локуса, играет положительную роль в обменных процессах на слизистой оболочке влагалища и защищает от внешних патогенов. В то же время, микрофлора может проявлять и патогенные по отношению к макроорганизму функции, если качественный и количе-

ственный состав микрофлоры нарушен и токсинообразование, характерное для большинства представителей нормофлоры влагалища (например, *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., сем. *Enterobacteriaceae*), становится клинически значимым и может угрожать здоровью женщины. Более того, оно может нарушать главную физиологическую функцию женских половых органов – репродуктивную.

Из 40 (100%) обследованных пациенток, дисбаланс микрофлоры влагалища был выявлен у 21 (53%) женщины. Выявленный дисбаланс был этиологически неоднороден и представлен несколькими формами: умеренный дисбаланс, аэробный дисбаланс, анаэробный дисбаланс и смешанный аэробно-анаэробный дисбаланс.

Примеры качественного и количественного состава микрофлоры влагалища, соответствовавшие различным формам её дисбаланса, представлены в таблице 2.

Умеренный дисбаланс был диагностирован у 10-ти женщин и трактовался как умеренное снижение количества лактобацилл в соотношении с общей бактериальной массой, количество остальных условно-патогенных микроорганизмов было ниже или сопоставимо с количеством лактобацилл. При этом, из 10 у 5 (50%) пациенток на фоне снижения количества лактобактерий, был идентифицирован вагинальный аттопобиум (*Atopobium vaginae*), который не имеет специфических микроскопических признаков и не определяется культурально, поэтому основным методом диагностики вагинального аттопобиума является полимеразная цепная реакция. Вагинальный аттопобиум считается специфическим признаком бактериального вагиноза. Его обнаружение свидетельствует о наличии у женщины этого заболевания. Это особенно важно для диагностики бессимптомной формы бактериального вагиноза. Аэробный дисбаланс вагинальной микрофлоры был обнаружен у 3-х женщин. При этом виде дисбаланса вагинальной микрофлоры количество лактобацилл было меньше общей бактериальной массы, количество аэробных условно-патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus* spp.) превышало количество лактобацилл. Следует отметить, что выявленное методом ПЦР в режиме РВ преобладание стафилококков в структуре факультативных аэробов согласуется с данными культуральных бактериологических исследованиях вагинального отделяемого, проведенного нами параллельно. Стафилококки более конкурентноспособны в случае колонизации вагинального эпителия, т.к. имеют олигосахаридные поверхностные рецепторы, посредством которых осуществляется контакт с вагинальным эпителием, кроме того, микроорга-

низмы этого рода способны выделять ферментативный комплекс, подавляющий рост прочих бактерий. Важное патогенетическое значение отводится компонентам клеточной стенки этих бактерий, стимулирующим развитие воспалительной реакции в эпителие колонизации. В случаях аэробного дисбаланса вагинальный аттопобиум не был идентифицирован.

У 3-х пациенток был диагностирован анаэробный дисбаланс вагинальной микрофлоры, когда количество лактобацилл было существенно снижено по сравнению с общей бактериальной массой на фоне количественного преобладания анаэробных условно-патогенных микроорганизмов. В 100%, т.е. во всех 3-х пробах, выявлен в высоких титрах вагинальный аттопобиум в ассоциации с лептотрихом (*Leptotrichia* spp.) В последнее время была установлена связь между колонизацией лептотрихом и бактериальным вагинозом, что позволило некоторым исследователям считать его специфическим маркером бессимптомного бактериального вагиноза [4].

У 5 женщин был диагностирован аэробно-анаэробный дисбаланс микрофлоры влагалища, из них у 3-х (60%) выявлен вагинальный аттопобиум. В целом, из 40 обследованных пациенток у 19 женщин был определен нормобиоценоз вагинальной микрофлоры и у 21 пациентки был диагностирован дисбаланс микрофлоры влагалища. В зависимости от формы дисбаланса микрофлоры влагалища, частота выделения вагинального аттопобиума, маркера бактериального вагиноза, была различной: в 100% случаев *Atopobium vaginae* был идентифицирован при анаэробном дисбалансе, в 60% - при аэробно-анаэробном дисбалансе, в 50% - при умеренном дисбалансе и не был выявлен ни в одном случае при аэробном дисбалансе.

Таким образом, использование метода полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» и диагностической тест-системы «Фемофлор 16» позволило провести комплексную оценку микрофлоры влагалища, результаты которой дают возможность дифференцировать состояние физиологической нормы и состояние дисбаланса микрофлоры влагалища. Установление состояния вагинального нормобиоценоза у женщин в период предгравидарной подготовки предупреждало необоснованную лекарственную терапию. Диагностика этиологической структуры и степени выраженности дисбаланса вагинальной микрофлоры на ранних стадиях способствовала оптимизации коррекционной терапии выявленного вида дисбаланса у конкретной пациентки. ■

Литература:

1. Аполихина И.А., Муслимова С.З. Бактериальный вагиноз: что нового? Гинекология. 2008; 10 (6): 50-4.
2. Дмитриев Г.А., Глазко И.И. Бактериальный вагиноз. М: БИОНОМ; 2008.
3. Липова Е.В., Болдырева М.Н., Витвицкая Ю.Г. Новый высокочувствительный способ диагностики дисбаланса нормо- и условно-патогенной биоты у женщин на ранних стадиях. Consilium Medium. 2009; 11 (6): 53-7.
4. Мальцева Л.И. Что нужно знать о бактериальном вагинозе. Фарматека. 2009; 9: 22-4.
5. Сидорова И.С., Воробьев А.А., Боровкова Е.И. Микробиоценоз половых путей женщин репродуктивного возраста. Акушерство и гинекология. 2005; 2: 7 – 9.