



УДК 618.215:574:616-093/-098

М.А. Власова¹, О.В. Островская¹, С.В. Супрун¹, Е.А. Кондрашова², Н.М. Ивахнишина¹, Е.Б. Наговицына¹

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТА «ФЕМОФЛОР-16» ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БИОЦЕНОЗА ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМИ РОДАМИ

¹Хабаровский филиал ФГБУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»
СО РАМН – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства,
680022, ул. Воронежская, 49, корп. 1, тел. 8-(42-12)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru;
²КГБУЗ «Перинатальный центр» министерства здравоохранения Хабаровского края,
680028, ул. Истомина, 85, тел. 8-(4212)-45-40-03, e-mail: perinatalcenter@rambler.ru, г. Хабаровск

Резюме

Целью работы было определение микробиоценоза генитального тракта у беременных женщин с преждевременным излитием околоплодных вод. Проведено исследование мазков заднебоковой стенки влагалища 29 беременных женщин, поступивших в Перинатальный центр с преждевременным излитием околоплодных вод и 38 беременных женщин с физиологически развивающейся беременностью. Исследование 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». Бактериальный дисбаланс у беременных с преждевременным излитием околоплодных вод установлен в 72,4 % случаев. У беременных с физиологически протекающей беременностью – только в 10,5 % ($p < 0,002$). В структуре анаэробного дисбиоза у женщин с преждевременным излитием околоплодных вод основную роль играют *Gardnerella vaginalis* – *Ureaplasma* spp., грибы рода *Candida*, *Mobiluncus* species, *Atopobium vaginae*. Аэробный дисбиоз – определен только в 10,3 % случаев с участием *Streptococcus* spp., смешанный – 6,9 % случаев. Выявленные факты подтверждают точку зрения о значительной роли бактериального вагиноза в генезе преждевременно наступающих родов, диктуют необходимость выявлять дисбиоз в период прегравидарной подготовки с последующим восстановлением нормальной микрофлоры и селективной деконтаминацией аэробов и грибов.

Ключевые слова: беременные женщины с преждевременным излитием околоплодных вод, биоценоз генитального тракта, ПЦР в реальном времени.

М.А. Vlasova¹, O.V. Ostrovskaya¹, S.V. Suprun¹, E.A. Kondrashova², N.M. Ivakhnishin¹, E.B. Nagovitsyna¹

EVALUATION OF GENITAL TRACT MICROBIOCENOSIS IN PREGNANT WOMEN WITH PRETERM RUPTURE OF MEMBRANES USING FEMOFLOLOR TEST

¹Research Institute of Mother and Child Health Care;
²Perinatal Center of Khabarovsk Kray Ministry of Public Health, Khabarovsk

Summary

Determine of genital tract microbiosis in pregnant women with preterm rupture of membranes. Posterolateral wall of the vagina smears of 29 pregnant women admitted to the Perinatal Center for preterm rupture of membranes were studied. A control group consisted of 38 women with normally progressing pregnancy. Genital smears were studied using a real-time polymerase chain reaction. Femoflor-16 reagents and detecting amplifier DT-96 (manufacturer: NPO RNA – Technology, Russia) were employed. Bacterial dysbalance in pregnant women with preterm rupture of membranes was identified in 72,4 % of cases. In normally progressing pregnancies was only found in 10,51 % ($p < 0,002$). The structure of dysbiosis in pregnant women with preterm rupture of membranes was represented by anaerobes: *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* species, *Ureaplasma*, *Atopobium vaginae* and fungi of *Candida* spp. Aerobic dysbiosis was only identified in (10,3 %) with involvement of *Streptococcus* spp. Mixed dysbiosis was found in 6,9 % 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.

Бактериальный вагиноз – инфекционный невоспалительный синдром, связанный с дисбиозом влагалищного биотопа, сопровождающийся резким снижением содержания или отсутствием молочнокислых бактерий *Lactobacillus spp* и чрезмерно высокой концентрацией условно-патогенных микроорганизмов, появлением патологических выделений из влагалища. Бактериальный вагиноз увеличивает восприимчивость к инфекциям, передающимся половым путем, увеличивает риск возникновения инфекционных осложнений после аборт и гинекологических операций, воспалительных заболеваний органов малого таза, приводит к увеличению частоты плацентарной недостаточности, невынашивания беременности, синдрома задержки развития плода [1, 2, 3, 5]. Поэтому бактериальный вагиноз необходимо вовремя диагностировать и лечить.

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 качественные, и количественные характеристики, что стало возможно после разработки методики ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [5].

Цель работы – оценка состояния биоценоза генитального тракта у беременных женщин с преждевременными родами методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени.

Материалы и методы

Исследуемые группы составили 29 беременных женщин, поступивших в «Перинатальный центр» на сроке гестации 26-34 недели с преждевременным излитием околоплодных вод (1-я группа) и 38 женщин с физиологически протекающей беременностью на сроке гестации 20-25 недель (2-я группа).

Исследовали соскобы эпителия задне-бокового свода влагалища. Состояние биоценоза влагалища определяли методом ПЦР-РВ с использованием реагентов «Фемофлор-16» в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (НПО ДНК-Технология). Данный набор включает комплекс реагентов для выявления контроля взятия материала, количественного определения общей бактериальной массы (ОБМ), количественной оценки нормофлоры (*Lactobacillus spp.*), и 23 условно-патогенных микроорганизмов с выявлением соотношений между ними и ОБМ.

Для получения адекватных результатов использовали только образцы с достаточным количеством клеток цервикального канала, попавших в пробирку с анализируемой пробой и достаточной общей бактериальной массой. Учитывали пробы, в которых количество ДНК клеток человека было больше 10^4 геном – эквивалентов (ГЭ) в образце, а величина ОБМ составляла от 10^6 до 10^9 ГЭ в образце.

С помощью программного обеспечения рассчитывали количество ОБМ, лактобацилл и различных групп условно-патогенных микроорганизмов количественным методом и относительно ОБМ. Результаты оценивали в соответствии с критериями, предложенными [5]. Классификация видов биоценоза включала:

1) нормоценоз абсолютный – вариант биоценоза, при котором доля нормофлоры составляет 80 до 100 % относительно ОБМ, количество *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* – менее 10^4 гЭ/мл; а грибов рода *Candida* – менее 10^3 гЭ/мл;

2) нормоценоз условный – доля нормофлоры составляет 80-100 % относительно ОБМ, количество *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.* – более 10^4 гЭ/мл, а *Candida spp.* – более 10^3 гЭ/мл;

3) дисбаланс умеренный (аэробный, анаэробный или смешанный) – доля лактобактерий снижена до 20-80 % относительно ОБМ за счет увеличения количества анаэробов и/или аэробов;

4) дисбаланс выраженный (аэробный, анаэробный или смешанный) – доля лактобактерий снижается до 20 % и менее, доля условно патогенных микроорганизмов достигает 80-100 % относительно ОБМ.

Полученные результаты обработаны с помощью программы Statistika for Windows 6.0 (Statsoft Inc., США). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1

Группа	Определяемые показатели
Диагностика нормоценоза	Общая бактериальная масса <i>Lactobacillus spp.</i> Контроли
Факультативно-анаэробные микроорганизмы*	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i>
Облигатно-анаэробные микроорганизмы**	<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/</i> <i>Porphyromonas spp. Eubacterium spp.</i> <i>Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium spp. Megasphaera spp./ Veillonella spp./Dialister spp+</i> <i>Lachnobacterium spp./Clostridium spp.</i> <i>Mobiluncus spp./ Corynebacterium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i> <i>Atopobium vaginae</i>
Дрожжеподобные грибы	<i>Candida spp.</i>
Микоплазмы	<i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>
Патогенные микроорганизмы	<i>Mycoplasma genitalium</i>

Примечание. * – в случае увеличения доли факультативно-анаэробных микроорганизмов в биоценозе более 10 % данный дисбиоз оценивается как аэробный, ** – при увеличении доли облигатно-анаэробных микроорганизмов более 10 % – дисбиоз оценивается как анаэробный.

Результаты и обсуждение

Сопоставление показателей биоценоза генитального тракта в группе женщин с преждевременным излитием околоплодных вод и у женщин с физиологически протекающей беременностью показало, что доля нормоценоза у женщин 1-й группы (27,6 %) в 3,2 раза ниже, чем во 2-й (89,5 %, $p < 0,0000$) (табл. 2). В 1-й группе абсолютный нормоценоз определен только у одной женщины (3,5 %), в то время как в контрольной группе – у 16 (42,1 %). У 7 пациенток 1-й группы и у 18 женщин 2-й группы с условным нормоценозом определены *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* в титре более 10^4 гЭ/мл и *Candida spp.* в титре более 10^3 гЭ/мл.

Дисбиоз в 1-й группе установлен в 72,4 % случаев, что в 6,9 раза чаще, чем во 2-й группе – 10,5 % ($p < 0,0000$). В целом умеренный и выраженный анаэробный дисбиоз у женщин 1-й группы установлен в 16

случаях (55,2 %), в то время как во 2-й группе – только в 4 случаях (10,5 %, $p < 0,0001$).

Таблица 2

Распознавание дисбиоза влагалища по виду и степени выраженности в группе женщин с преждевременным излитием околоплодных вод (абс./%)

Состояние биоценоза влагалища	Преждевременное излитие околоплодных вод (n=29), группа 1	Физиологически протекающая беременность (n=38), группа 2	Достоверность различия, р
Нормоценоз	8/27,6	34/89,5	0,0000
абсолютный	1/3,5	16/42,1	0,0004
условный	7/24,1	18/47,3	0,0289
Дисбиоз	21/72,4	4/10,5	0,0000
умеренный	12/41,4	2/5,3	0,0005
- анаэробный	7/24,1	2/5,3	0,0131
- аэробный	3/10,3	0	0,0252
- смешанный	2/6,9	0	0,0512
выраженный	9/31,0	2/5,3	0,0029
- анаэробный	9/31,0	2/5,3	0,0029

Умеренный анаэробный дисбиоз определили в 1-й группе в 12 случаях, в 7,8 раз чаще, чем у женщин 2-ой группы ($p < 0,0005$). При этом в этиологической структуре дисбаланса установлено сочетание *Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas spp.* с другими анаэробными возбудителями в 7 случаях и в 5 – причиной дисбиоза были *Ureaplasma* и *Candida spp.* Во 2-й группе умеренный дисбиоз фиксирован только в 2 случаях: 1 – *Gardnerella* в сочетании с другими анаэробными бактериями и 2 – микоплазмы.

Только в 1-й группе выявлены аэробный умеренный дисбиоз (3 случая *Streptococcus spp.* в высоких титрах) и смешанный умеренный дисбиоз (у одной пациентки – *Streptococcus spp.*+ *Gardnerella vaginalis* и у второй – *Streptococcus spp.*+ *Candida spp.*) Анаэробный дисбаланс в группе наблюдения выявлен в отношении суммы аэробного и смешанного дисбаланса как 3:1.

Выраженную степень анаэробного дисбиоза определили у 9 (31 %) женщин с преждевременным излитием околоплодных вод, что в 5,8 раза выше, чем во 2-й группе – у 2 пациенток (5,3 %, $p < 0,05$). Этиологическую его структуру составили возбудители, ассоциированные с бактериальным вагинозом: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginalis* и *Ureaplasma* в различных сочетаниях. Наиболее часто выявляли *Gardnerella vaginalis* (6) и *Ureaplasma (urealyticum+parvum)* (5) (табл. 3) Во 2-й группе выраженный анаэробный дисбаланс определили в 2 случаях: в 1-м – сочетание *Eubacterium spp.* + *Atopobium vaginae*, в другом – *Ureaplasma (urealyticum + parvum)* + *Candida spp.*

Индикаторы бактериального вагиноза у женщин с преждевременными родами определены в следующих количествах: *Gardnerella vaginalis* – в 34,5 % случаев, *Ureaplasma spp.* и грибы рода *Candida* в диагностических титрах – в 27,6 % и 10,3 % случаев, *Mobiluncus species* – в 13,8 % случаев, *Atopobium vaginae* – 6,9 %. Во 2-й группе: *Gardnerella v.* – 2,6 %, *Ureaplasma spp.* – 2,6 %, *Atopobium v.* – 2,6 %. Ряд анаэробов трудно культивируются и при микроскопии неотличимы по морфологическим свойствам. ПЦР – РВ дает возможность

их выявлять. Это особенно важно при определении *Atopobium v.* – специфического маркера хронического бактериального вагиноза [4]. В 5 случаях (17,2 %) определены факультативно-анаэробные микроорганизмы *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* и *Enterobacteriaceae*, вызывающие гнойно-воспалительные процессы в послеродовом периоде у матери и ребенка.

Таблица 3

Этиологическая структура выраженного анаэробного дисбаланса при преждевременном излитии околоплодных вод

Выявленные облигатно-анаэробные микроорганизмы	Группы женщин	
	1-я (n=29)	2-я (n=38)
<i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i> + <i>Atopobium vaginae</i> + <i>Ureaplasma (urealyticum+parvum)</i>	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> + <i>Ureaplasma (urealyticum+parvum)</i>	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> + <i>Sneathia spp.</i> / <i>Leptotrichia spp.</i> / <i>Fusobacterium spp.</i> + <i>Ureaplasma (urealyticum+parvum)</i>	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> + <i>Eubacterium spp.</i> + <i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i> + <i>Mobiluncus spp.</i> / <i>Corynebacterium spp.</i>	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> + <i>Eubacterium spp.</i> + <i>Peptostreptococcus spp.</i>	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> + <i>Sneathia spp.</i> / <i>Leptotrichia spp.</i> / <i>Fusobacterium spp.</i>	1	0
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i>	1	0
<i>Eubacterium spp.</i> + <i>Ureaplasma (urealyticum+parvum)</i>	1	0
<i>Mobiluncus spp.</i> / <i>Corynebacterium spp.</i> + <i>Ureaplasma (urealyticum+ parvum)</i>	1	0
<i>Eubacterium spp.</i> + <i>Atopobium vaginae</i>	0	1
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> + <i>Lachnobacterium spp.</i> / <i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i>	0	1
<i>Mycoplasma hominis</i> + <i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>	0	1
<i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i> + <i>Candida spp.</i>	0	1

Выводы

Использование ПЦР в реальном времени позволило установить, что у 72,4 % женщин с преждевременным излитием околоплодных вод выявляется бактериальный вагиноз влагалища (анаэробный дисбиоз – 55,2 %, аэробный – 10,3 %, смешанный – 6,9 %). В группе женщин с физиологически развивающейся беременностью установлен только анаэробный дисбиоз (10,5 %).

Полученные нами данные свидетельствуют о высоких диагностических возможностях метода ПЦР в реальном времени для оценки микробиоценоза генитального тракта у женщин, о связи бактериального вагиноза с преждевременным прерыванием беременности, о необходимости выявления бактериального вагиноза в период прегравидарной подготовки и на ранних сроках беременности с последующим восстановлением нормальной микрофлоры и селективной деконтаминацией микроорганизмов, ассоциированных с вагинозом.

Литература

1. Кира Е.Ф. Современные подходы к выбору препарата локального действия в терапии бактериального вагиноза // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 7. – С. 59-66.
2. Кудрявцева Л.В., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Минаев В.И., Зайцева С.В., Липова Е.В., Баткаев Э.А. Бактериальный вагиноз: пособие для врачей. – М.: Н.п.ф. «Литех», 2003. – 56 с.
3. Кулаков В.И. Практическая гинекология: клинические лекции / под ред. акад. РАМН В.И.Кулакова, проф. В.Н. Прилепской. – 4-е изд., доп. – М.: МЕД-пресс. информ, 2008. – 752 с.
4. Плахова К.И., Гомберг М.А., Атрошкина М.Е., Ильина Е.Н., Говорун В.М. Роль *Atopobium vaginae* при рецидивировании бактериального вагиноза // Вестник дерматологии и венерологии. – 2007. – № 5. – С. 10-13.
5. Сухих Г.Т., Айламазян Э.К., Прилепская В.Н., Трофимов Д.Ю., Савичева А.М., Донников А.Е., Шипицына Е.В. Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин (тест Фемофлор) (медицинская технология) // М., 2011. – 36 с.

Literature

1. Kira E.F. Modern approach on the selection of topical action drugs on the treatment of bacterial vaginosis // Obstetrics and gynecology. – 2012. – № 7. – P. 59-66.
2. Kudryavtseva L.V., Iina E.N., Govorun V.M., Minaev V.I., Zaitseva S.V., Lipova E.V., Batkaev E.A. Bacterial vaginosis: A Handbook for physicians. – M.: N.p.f. «Liteh», 2003. – 56 p.
3. Kulakov V.I. Practical Gynecology: clinical lectures / ed. By Acad. Of RAMS Kulakov, prof. V.N. Prilepской. – 4th ed, dop. – M.: MED-press. inform, 2008. – 752 p.
4. Plakhova K.I., Gomberg M.A., M.E. Atroshkin, Ilyin E.N., Govorun V.M. Role of *Atopobium vaginae* with recurrence of bacterial vaginosis // Journal of Dermatology and venerologii. – 2007. – № 5. – P. 10-13.
5. Sukhikh G.T., Ailamazyan E.K., Prilepskaya V.N., Trofimov D.Yu. Savicheva A.M., Donnikov A.E., Shipitsyna E.V. Application of polymerase chain reaction in real time to assess microbiocenosis of urogenital tract in women (Femoflor test) (medical technology). – M., 2011. – 36 с.

Координаты для связи с авторами: *Власова Марина Александровна* – канд. мед. наук, старший научный сотрудник группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии; *Островская Ольга Васильевна* – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии; *Супрун Стефания Викторовна* – д-р мед. наук, главный научный сотрудник Хабаровского филиала ФГБУ « ДНЦ ФПД» СО РАМН – НИИ ОМиД; *Ивахнишина Наталья Михайловна* – канд. биолог. наук, старший научный сотрудник группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии; *Наговицына Елена Борисовна* – канд. мед. наук, старший научный сотрудник группы молекулярно-генетической диагностики лаборатории комплексных методов исследования бронхолегочной и перинатальной патологии; *Кондрашова Евгения Альбертовна* – врач акушер-гинеколог.



УДК 618.36-002:616.98

Н.М. Ивахнишина¹, О.В. Островская¹, О.В. Кожарская²

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПЕРИНАТАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ИНФЕКЦИЙ В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ НЕДОНОШЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

¹Хабаровский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»

СО РАМН – Научно-исследовательский институт охраны материнства и детства, 680022, ул. Воронежская, 49, корп. 1, тел. 8-(4212)-98-05-91, e-mail: iomid@yandex.ru;

²КГБУЗ «Перинатальный центр» министерства здравоохранения Хабаровского края, 680028, ул. Истомина, 85, тел. 8-(4212)-45-40-03, г. Хабаровск

Резюме

Целью работы было определение частоты и спектра возбудителей перинатально – значимых инфекций в плаценте при невынашивании беременности методом ПЦР. Показано, что плаценты при недоношенной беременности были инфицированы в 65,1 % случаев, что в 3,1 раза выше этого показателя при доношенной беременности (37,5 %, $p < 0,05$). При невынашивании в плацентах наиболее часто выявляли *S.pneumoniae* (34 %), *U.urealyticum* (32,5 %)