

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЦЕНОЗОВ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА У ЖЕНЩИН С ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ МАСШТАБЕ ВРЕМЕНИ

УДК 618.146—074:577.486

Поступила 11.10.2010 г.



Л.Д. Андосова, к.м.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики ФПКВ¹;
К.Н. Конторщикова, д.б.н., профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики ФПКВ¹;
О.В. Михалева, врач-дерматовенеролог²;
С.Ю. Куделькина, врач клинической лабораторной диагностики²;
О.Л. Блатова, врач-дерматовенеролог²;
И.А. Кузнецова, к.м.н., врач акушер-гинеколог³

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

²Медицинский центр «Тонус», Н. Новгород;

³Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко, Н. Новгород

Цель исследования — изучить характеристики биоценозов урогенитального тракта у женщин с фоновыми, воспалительными и предраковыми процессами на шейке матки с применением теста «Фемофлор».

Материалы и методы. Обследовано 102 женщины в возрасте от 18 до 50 лет с заболеваниями шейки матки воспалительного и пролиферативного генеза.

Результаты. Использование полимеразной цепной реакции в реальном масштабе времени для оценки биоценоза урогенитального тракта у женщин позволило установить, что 70% пациенток с фоновыми и предраковыми процессами на шейке матки имели те или иные нарушения биоценоза влагалища, а именно угнетение молочнокислых бактерий на фоне повышения содержания представителей условно-патогенной флоры. Состояние дисбаланса биоты на шейке матки, безусловно, является одной из ведущих причин урогенитальных инфекционно-воспалительных заболеваний. Набор реагентов «Фемофлор» позволяет определить, какие группы условно-патогенных микроорганизмов преимущественно вызывают дисбаланс. Лабораторный тест «Фемофлор» предлагает принципиально новый подход к оценке физиологического равновесия и дисбаланса биоты, что дает возможность выбрать адекватную терапию и контролировать ее проведение.

Ключевые слова: биоценоз, патология шейки матки, урогенитальный тракт.

English

The research of biocenoses of urinogenital tract in women with cervical pathology using polymerase chain reaction in real time

L.D. Andosova, PhD, Tutor, the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

K.N. Kontorstchikova, D.Bio.Sc., Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

O.V. Mikhaleva, Dermatovenerologist²;

S.Y. Kudelkina, Physician of Clinical Laboratory Diagnostics²;

O.L. Blatova, Dermatovenerologist²;

I.A. Kuznetsova, PhD, Obstetrician-Gynecologist³

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod;

²Medical Centre "Tonus", Nizhny Novgorod;

³Nizhny Novgorod Regional Clinical Hospital named after N.A. Semashko, Nizhny Novgorod

The aim of the investigation is to study the characteristics of biocenoses of urinogenital tract in women with background, inflammatory and pre-malignant processes in cervix uteri using "Femoflor" test

Для контактов: Андосова Лариса Дмитриевна, тел. раб. 8(831)438-33-94, тел. моб. +7 951-916-85-31; e-mail: larisa-andosova@yandex.ru

Materials and Methods. There were examined 102 women aged 18–50 years with diseases of cervix uteri of inflammatory and proliferative genesis.

Results. The use of polymerase chain reaction in real time to assess the biocenosis of urogenital tract in women enabled to state that 70% of patients with background and premalignant processes in cervix uteri had some disorders of vaginal biocenosis, namely: lactic acid bacteria suppression against the background of high concentration of opportunistic pathogenic flora. Biota imbalance on cervix uteri is certainly to be one of the leading causes of urogenital infectious and inflammatory diseases. “Femoflor” helps to determine which groups of opportunistic pathogenic microorganisms mostly cause the imbalance. Laboratory test “Femoflor” suggests radical new approach to the assessment of physiological equation and biota imbalance that enables to choose an adequate therapy and control it.

Key words: biocenosis, cervical pathology, urogenital tract.

В структуре патологии женских половых органов заболевания шейки матки занимают лидирующее положение [1]. Как правило, они сопровождаются урогенитальной и (или) вирусной инфекцией [2]. Инфицированность вирусами папилломы человека (ВПЧ) считается причиной развития предраковых и раковых процессов на шейке матки в 97% случаев [3]. Большой интерес представляет взаимосвязь микробиоценоза урогенитального тракта и состояния слизистой оболочки шейки матки. О наличии нарушений в микробиоценозе влагалища, дефиците содержания доминирующих представителей нормоценоза у больных с различной патологией шейки матки, в том числе с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (ЦИН), свидетельствует ряд отечественных работ [4, 5]. Наряду с этим имеются предположения, что цервикальные неоплазии ассоциированы с цервикальным воспалением, которое и может быть кофактором в развитии этих поражений у женщин, инфицированных онкогенными типами ВПЧ [6, 7].

Нормализация вагинального микробиоценоза является важным этапом лечения любой патологии нижнего отдела генитального тракта. Широкое использование в комплексном лечении заболеваний шейки матки химиотерапевтических и антибактериальных средств может оказывать отрицательное воздействие на нормальную флору генитального тракта, вызывать или усиливать дисбиотические нарушения и снижать эффективность лечения. Это важно учитывать при выборе средств санации перед деструкцией и эксцизией атипичного эпителия, а также при подборе препаратов для профилактики осложнений после инвазивных вмешательств [8, 9]. В настоящее время лабораторная диагностика предлагает эффективный способ оценки биоценоза урогенитального тракта у женщин — метод полимеразной цепной реакции в формате реального времени (ПЦР-РВ) с учетом биоты изучаемого эпитопа в целом [10]. ПЦР-РВ позволяет представить микрофлору половых путей в виде единой экологической системы. Этот тест получил название «Фемофлор» [11, 12].

Цель исследования — изучить характеристики биоценозов урогенитального тракта путем комплексной оценки баланса нормальной и условно-патогенной микробиоты у женщин с воспалительными, фоновыми и предраковыми процессами на шейке матки с применением набора реагентов «Фемофлор».

Материалы и методы. Обследовано 102 женщины в возрасте от 18 до 50 лет, обратившиеся в клиники Н. Новгорода по поводу заболеваний шейки матки вос-

палительного и пролиферативного генеза. В результате прицельной биопсии у 20 из них установлен диагноз цервикального интраэпителиального поражения низкой и высокой степени тяжести. Всем пациенткам проведено лабораторное обследование с помощью методов жидкостной цитологии, Пап-теста (окраска мазков по методу Папаниколау) и с помощью метода ПЦР-РВ. Последний метод включал в себя ВПЧ-скрининг на вирусы высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР), генотипирование ВПЧ ВКР и определение вирусной нагрузки.

При анализе сопутствующей экстрагенитальной патологии у наблюдаемых констатирован высокий инфекционный индекс. Наиболее часто встречались хронические воспалительные заболевания органов дыхания и мочевыводящих путей, а также вирусные респираторные инфекции. Заболевания желудочно-кишечного тракта в 46,2% случаев были представлены дисбактериозом кишечника. В структуре гинекологических заболеваний отмечен высокий уровень воспалительных заболеваний нижнего отдела генитального тракта и органов малого таза, что может быть свидетельством как сниженной резистентности макроорганизма в целом, так и нарушением местных защитных факторов вагинального микробиоценоза.

Критерии включения в группу исследования — отсутствие заболеваний, вызванных облигатными патогенами (сифилис, гонорея, ВИЧ); критерии исключения: беременность или лактация, системное применение гормональных контрацептивных средств, а также антибактериальных препаратов в последние 2 мес, использование местных лекарственных препаратов в течение 3 нед, предшествующих обследованию. 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. ДНК выделяли с использованием комплекта реагентов «ПРОБА-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Исследование биоценоза влагалища выполняли методом ПЦР-РВ с использованием реагентов «Фемофлор» 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), лактоба-

цилл и различных групп условно-патогенных микроорганизмов (факультативно- и облигатно-анаэробных микроорганизмов, микоплазм и дрожжеподобных грибов). Также оценивали долю нормофлоры, факультативно-анаэробных микроорганизмов и анаэробных микроорганизмов в процентах от всех выявленных бактерий.

Оценку нормобиоты (основной представитель — лактобактерии) проводили как в абсолютных показателях (гэ/мл), так и в относительных, т.е. в сравнении с ОБМ. Существуют следующие варианты биоценоза: нормоценоз, умеренно сниженный уровень лактобацилл, значительно сниженный уровень. В соответствии с данными клинической апробации теста «Фемофлор» была предложена следующая классификация видов биоценоза: дисбаланс I, умеренный — вариант биоценоза, при котором доля лактобактерий составляет 10–90% относительно ОБМ и увеличена доля аэробов или анаэробов. Дисбаланс II, выраженный — вариант биоценоза, при котором доля аэробов и анаэробов достигает 90% относительно ОБМ, а доля лактобактерий снижается до уровня менее 10% относительно ОБМ [13].

Все женщины, включенные в исследование, были разделены на 4 группы: 1-я группа — 28 женщин с фоновыми, гиперпластическими процессами без воспалительного компонента — псевдозерозии (эктопии) (клиническая классификация И.Я. Яковлевой с соавт.); 2-я группа — та же, но с воспалительным компонентом — 34 женщины; 3-я группа — 20 пациенток с воспалительным характером изменений — цервициты (острый, хронический); 4-я группа — 20 женщин с предраковыми состояниями (дисплазии — слабая, умеренная, тяжелая).

Результаты и обсуждение. Проведенное клиническое исследование показало, что большинство женщин — 84 человека (82,3%) обратились с жалобами на выделения из половых путей или чувство жжения и дискомфорта в области наружных половых органов; 44 (52%) предъявляли жалобы на «незначительные» или «умеренные» выделения, что расценивалось ими как вариант физиологической нормы. «Выраженные» выделения из влагалища, мотивировавшие обращение пациенток в лечебное учреждение, наблюдались только у 20 женщин (19,6%). С целью профилактического осмотра обратились 18 человек. В 1-й и 4-й группах — эктопии без воспаления и диспластические изменения шейки матки — количество женщин, предъявлявших жалобы со стороны мочеполовой системы, было значительно меньше, чем в группах с воспалительным компонентом.

Комплексная оценка урогенитальной биоты в представленных группах позволила выделить три основных типа биоценоза влагалища: 1-й тип, нормоценоз — 40 женщин (39,2%); 2-й тип, умеренный дисбиоз — 21 женщина (20,6%); 3-й тип, выраженный дисбиоз — 50 пациенток, что составляет 49%. В группе женщин с умеренным дисбиозом у 9 отмечалось нормальное содержание лактобактерий, что позволяет отнести их одновременно в две группы: относительный нормоценоз и умеренный дисбиоз. Наиболее многочисленная группа — женщины с выраженным дисбиозом влагалища. Выраженный дисбаланс был выявлен в основном у пациенток с заболеваниями шейки матки воспалительного характера — 36

человек (35,3%) и у женщин с патологией в виде цервикальных неоплазий — 10 (9,8%). Нормоценоз и отсутствие дисбаланса достоверно чаще определялись в группе женщин с эктопиями шейки матки без элементов воспаления — 18 человек (64,3%) в группе.

Исследование ОБМ показало отсутствие различий между всеми обследованными клиническими группами. У 73 женщин (71,6%) отмечено значение 10^6 – 10^8 гэ/мл, что является нормальными значениями ОБМ. Избыточное количество микроорганизмов в исследуемом биотопе выявлено у 28 человек (27,4%). Самые высокие значения показали пациентки 2-й клинической группы — эктопии шейки матки с «воспалением» — у 12 женщин (35,3% в группе). Уменьшения ОБМ в образцах не отмечено.

Оценка нормобиоты урогенитального тракта женщин с помощью теста «Фемофлор», когда основными представителями являются лактобактерии, выявила следующие состояния: умеренно сниженный уровень лактобацилл (относительный показатель, разница логарифмов/порядков между ОБМ и лактобациллами, — от 0,5 до 1) — у 10 женщин (9,8%); значительно сниженный уровень лактобацилл (относительный показатель более чем 1) — у 52 человек (51%); 3-я группа представлена женщинами, у которых абсолютный показатель уровня лактобацилл практически не отличается от абсолютного показателя ОБМ, т.е. составляет 10^6 – 10^8 Ig — 40 человек (39,2%).

Проведенные исследования показали, что у 62 женщин, т.е. больше половины обследуемых (60,8%), отмечается угнетение нормальной биоты, что делает возможным заселение влагалища патогенными микроорганизмами или чрезмерное размножение условно-патогенных микроорганизмов. В 1-й группе (эктопии без «воспаления») нормоценоз выявили у 18 женщин (64,3% в группе), сниженный уровень лактобацилл — у 10 человек (35,7%) в группе. Мы не нашли статистически значимых различий в состоянии биоценоза влагалища у женщин с заболеваниями шейки матки воспалительного и пролиферативного генеза — 2, 3 и 4-я группы (соответственно у 6, 4, 6 обследуемых пациенток). Это позволяет предположить, что нормобиота урогенитального тракта в этих группах отмечает снижение численности лактобактерий.

С помощью теста «Фемофлор» проведена оценка аэробной и анаэробной условно-патогенной микробиоты. Во всех клинических группах анаэробный дисбиоз представлен самыми большими цифрами — 45 женщин (44,1%), смешанный (аэробно-анаэробный дисбиоз) занимает второе место — 30 (29,4%), аэробный дисбиоз — самая малочисленная группа — 2 человека из обследованных. Этиологическую структуру аэробного дисбиоза составляют энтеробактерии, стрептококки и стафилококки, которые реже всего выявляются в отделяемом влагалища. Чаще всего причиной дисбиоза, по нашим данным, служат анаэробы. Необходимо отметить, что в 1-й группе (патология шейки матки без «воспаления») у большей части пациенток не выявлен дисбаланс биоты, в остальных группах выявленная тенденция с преобладанием анаэробов сохранялась. С помощью нового ла-

бораторного теста «Фемофлор» труднокультивируемые облигатно-анаэробные бактерии легко определяются, а также выявляется группа микроорганизмов, диагностика которых до сих пор не была представлена, например специфический маркер рецидивирующего течения бактериального вагиноза *Atorobium vaginae*, который был найден у 35 женщин (в 34,4% исследований).

Анализ этиологической структуры выявленного дисбаланса продемонстрировал превалирование бактериально-грибковых форм: уреоплазмоз+кандидоз, микоплазмоз+кандидоз — найдены у 37 женщин (36,3%), грибов рода *Candida* — у 32 (31,4%). Значительно реже регистрируются бактериальные формы: уреоплазмоз — у 19 пациенток (18,6%), микоплазмоз+уреоплазмоз — у 4 человек (3,9%). Таким образом, в структуре нарушений биоценозов урогенитального тракта основную роль играют анаэробные микроорганизмы, в том числе с участием грибов рода *Candida* и уреоплазм. Микоплазмы оказались редкой находкой у женщин с патологией шейки матки. Уреоплазмы обнаруживали во всех группах испытуемых. Доля женщин, у которых количество уреоплазм было более 10^4 , была значительной — 28%. Частота контаминации влагалища дрожжеподобными грибами рода *Candida* у больных цервикальными неоплазиями превышала соответствующие показатели в других группах, что, вероятно, является отражением местного иммунодефицита, сопровождающего папилломавирусную инфекцию шейки матки. Грибы рода *Candida* присутствовали у большинства обследованных женщин всех групп в количестве более 10^3 , у 12% женщин 2, 3 и 4-й групп грибы выявляли и в более значительных количествах — 10^4 – 10^5 г/мл.

Полученные данные требуют коррекции существующих представлений о допустимых количествах грибов рода *Candida* в составе биоценоза влагалища. Представленные данные свидетельствуют о том, что в группах женщин с заболеваниями шейки матки воспалительно-пролиферативного генеза происходит значительное вытеснение лактобактерий с заменой их преимущественно анаэробными микроорганизмами. Значительную роль в формировании и поддержании дисбаланса биоты играют анаэробные микробные ассоциации.

Анализ результатов лабораторного обследования на урогенитальные инфекции продемонстрировал, что инфекционные агенты преимущественно представлены вирусами (папилломавирусная, герпетическая инфекции) — у 58 человек (56,9%), бактериальные патогены и простейшие (хламидии, трихомонады и др.) идентифицированы у 34 женщин (33,3%). Сочетание вирусов и бактерий обнаружено почти в 15% случаев, у 12 человек патогены не определены. Необходимо отметить низкое число выявления возбудителей у женщин с фоновыми заболеваниями шейки матки без воспалительного компонента — 16 инфекционных агентов, тогда как в других группах эти цифры значительно выше — 43, 28, 30 соответственно. В этих группах на первом месте по количеству стоят вирусные инфекции, включая ВПЧ; бактериальные, вирусно-бактериальные отмечены у незначительного числа пациенток.

Заключение. Использование ПЦР в реальном масштабе времени для оценки биоценоза урогенитального тракта у женщин позволило установить, что 70% пациенток с фоновыми и предраковыми процессами на шейке матки имели те или иные нарушения биоценоза влагалища, а именно угнетение молочнокислых бактерий на фоне повышения содержания представителей условно-патогенной флоры. Состояние дисбаланса биоты на шейке матки, безусловно, является одной из ведущих причин урогенитальных инфекционно-воспалительных заболеваний. Набор реагентов «Фемофлор» позволяет определить, какие группы условно-патогенных микроорганизмов преимущественно вызывают дисбаланс. Лабораторный тест «Фемофлор» предлагает принципиально новый подход по оценке физиологического равновесия и дисбаланса биоты, что дает возможность выбрать адекватную терапию и контролировать ее проведение.

References

1. Kokhanevich E.V. *Patologiya sheyki i tela matki* [Pathology of uterine cervix and body]. Nezhin: Gidromaks; 2009.
2. Sidorova I.S., Levakov S.A. *Fonovye i predrakovye protsessy sheyki matki* [Background and precancer processes of cervix uteri]. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2006; 92 p.
3. Prilepskaya V.N. *Patologiya sheyki matki i genital'nye infektsii* [Pathology of cervix uteri and genital infections]. Moscow: MEDpress-inform; 2008; 384 p.
4. Rogovskaya S.I. *Papillomavirusnaya infektsiya u zhenshchin i patologiya sheyki matki* [Papillomavirus infection in females and pathology of cervix uteri]. Moscow: GEOTAR-Media; 2008; 188 p.
5. Prilepskaya V.N. *Akusherstvo i ginekologiya* 2007; 5: 73–76.
6. Kiselev V.I. *Virusy papillomy cheloveka v razvitiy raka sheyki matki* Human papilloma virus in the development of cervical cancer]. Moscow: Dimitreyd Grafik Grupp; 2004; 182 s.
7. Sidorova I.S., Borovkova E.I. *Mikroflora polovoykh putey u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta* [Microflora of genital tracts in females of reproductive age]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2007; 80 p.
8. Burton J.P., Cadieux P., Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 97–101.
9. Voroshilina E.S., Tumbinskaya L.V., Donnikov A.E. et al. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal* 2010; 03(68): 103–107.
10. Shipitsina E.V., Martikaynen Z.M., Vorob'eva N.E. et al. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney* 2009; 3: 44–50.
11. Voroshilina E.S., Tumbinskaya L.V., Donnikov A.E. et al. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal* 2010; 03(68): 108–112.
12. Sidorova I.S., Borovkova E.I. *Mikroflora polovoykh putey u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta* [Microflora of genital tracts in females of reproductive age]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2007; 62 p.
13. Lipova E.V., Boldyreva M.N., Trofimov D.Yu., Vitvitskaya Yu.G. *Femoflor* [Femoflor]. Moscow; 2010; 30 p.