

ОБГРУНТУВАННЯ ТА АПРОБАЦІЯ ОРИГІНАЛЬНОГО СПОСОБУ ВЗЯТТЯ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ З МЕТОЮ АДАПТАЦІЇ ДІАГНОСТИКУМА ФЕМОФЛОР – 16 ДЛЯ КІЛЬКІСНОЇ ДЕТЕКЦІЇ АНАЕРОБНОЇ ТА МІКРОАЕРОФІЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ СЕЧОСТАТЕВОЇ СИСТЕМИ ЧОЛОВІКІВ

П.В. Федорич

Українська військово-медична академія, м. Київ

Ключові слова: анаеробна та мікроаерофільна мікрофлора, чоловіки, діагностикум Фемофлор–16, метод полімеразної ланцюгової реакції.

Вступ

Багатолітні спостереження, численні результати клінічних і лабораторних досліджень переконливо доводять реальність інфікування уретри чоловіків – статевих партнерів жінок, хворих на бактеріальний вагіноз (БВ), умовнопатогенною піхвою транзиторною мікрофлорою (ТМ), що складається переважно з анаеробних та мікроаерофільних бактерій [8].

БВ – інфекційний незапальний синдром, пов’язаний з дизбіозом біотопа піхви, для якого притаманні підвищені концентрації анаеробних (облігатних та факультативних) мікроорганізмів та значне зниження (відсутність) молочнокислих бактерій [12]. Серед мікробних агентів, які відіграють роль у розвитку даної патології, виділяють *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealiticum*, *Ureaplasma parvum*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium nuclearum*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Dianister*, *Lachnobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Leptotrichia*, *Sneathia*, *Veilonella*, *Candida spp*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus spp* та інш. [13,14].

ТМ сечостатевих органів – це умовнопатогенна мікрофлора, постійна присутність якої не є притаманною для відповідної частини організму здорової людини. ТМ може викликати запальні процеси в сечостатевих органах і передаватися статевим шляхом лише за певних умов. Саме тому всі стани і захворювання, пов’язані з наявністю ТМ, за літературними даними, рекомендується розглядати як інфекційний процес [7].

Чоловіча уретра, на відмінність від здорової жіночої піхви, має більш лужне середовище, що є сприятливим чинником для існування і розмноження там піхвової ТМ [2]. Проте не всі чоловіки схильні до зараження ТМ. Серед інфікованих на ТМ чоловіків можна чітко виділити три основні групи: особи, що перенесли у минулому хламідійну або гонококову інфекції; хворі на хронічний простатит; особи, що зловживають місцевими антисептиками

для профілактики венеричних хвороб (мірамістин, хлоргексидин) [11]. Носійство ТМ є найчастішим варіантом її перебування в сечостатевій системі чоловіків і відзначається у 50–70% чоловіків – статевих партнерів жінок, хворих на БВ. При цьому відбувається колонізація уретри *Gardnerella vaginalis* й іншими збудниками, асоційованими з БВ. Чоловіки за цих умов можуть абсолютно нічого не відчувати суб’єктивно і тоді носійство ТМ можна виявити лише при лабораторному обстеженні за умови використання спеціальних високоточних діагностичних методів [10]. Отже, такі чоловіки є, зазвичай, лише переносниками ТМ. Але за умови безладного статевого життя вони виступають в якості основного резервуару і розповсюджувачів відповідної мікрофлори серед жінок. Окрім цього, у чоловіків збудники, що асоціюються з БВ жінок, можуть викликати баланіти, баланопостити, хронічні простатити, а також бути передумовою аденоми простати [2]. Таким чином, неабиякого значення при лікуванні пацієнтів, хворих на БВ, набуває необхідність одночасного повноцінного лікування (санації) їх статевих партнерів [4]. Це можливо лише при всебічному та повноцінному їх обстеженні.

Враховуючи важливість і актуальність розв’язання проблеми об’єктивної лабораторної діагностики урогенітальних інфекційних захворювань, викликаних умовнопатогенною, переважно анаеробною мікрофлорою, виникла нагальна потреба в розробці й впровадженні в практичну охорону здоров’я нових діагностичних підходів, що дозволяють вчасно (до розвитку ускладнень) діагностувати такі захворювання. Також вкрай важливим є визначення обсягу раціонального медикаментозного втручання (в залежності від індивідуальної комбінації складових інфекційного процесу, викликаного анаеробною мікрофлорою), та здійснення об’єктивного контролю ефективності лікування відповідних пацієнтів [9].

В останні роки молекулярно-біологічними методами було виявлено цілу низку “нових” умовно-патогенних для сечостатевій системи як жінок, так і чоловіків, мікроор-

ганізмів, таких як *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Bacteroides*, *Atopobium* та ін., культивування яких являє проблему [3]. До недавнього часу виявлення цих мікроорганізмів та їх кількісна детекція були terra incognita для переважної більшості лікарів відповідного фаху.

Найбільш об'єктивним з доступних методів діагностики ІПСШ в даний час є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [5]. Відсоток чутливості і специфічності цього методу дослідження для виявлення ДНК анаеробних мікроорганізмів складає близько 98%. За допомогою методу ПЛР можливо проводити прицільну ідентифікацію мікроорганізмів, причому, незалежно від їх кількості [6]. Однією з найбільш перспективних методик проведення ПЛР є її модифікація з детекцією результатів в режимі реального часу (ПЛР-РЧ). Вона дозволяє виявляти ДНК шуканого мікроорганізму в складній суміші нуклеїнових кислот, проводити мультиплексні кількісні дослідження і отримувати результат вже в день узяття матеріалу, а також дозволяє розв'язати проблему, швидкого і якісного виявлення будь-якої мікрофлори, як аеробної, так і анаеробної. Завдяки цьому метод ПЛР-РЧ став "золотим стандартом" при детекції більшості складових БВ (анаеробів, які важко культивуються) [1]. На основі методу ПЛР-РЧ розроблено сучасну діагностичну систему Фемофлор – 16 (виробник: ТОВ "НВО ДНК-технологія", Російська Федерація, РУ ФСР 2009/04663, Патент №2362808 від 13.02.2008). Її призначенням є кількісне визначення відповідної мікрофлори у жінок. Інформації щодо зареєстрованих в Україні способів ПЛР-РЧ кількісного визначення умовнопатогенної, переважно анаеробної, мікрофлори у чоловіків знайдено не було.

Виходячи зі сказаного вище, метою цього дослідження було обґрунтування та апробація оригінального способу взяття біологічного матеріалу з метою адаптації діагностичного Фемофлор-16 для кількісної детекції анаеробної та мікроаерофільної мікрофлори сечостатевої системи чоловіків.

Матеріали і методи дослідження

Нами було проведено клініко-лабораторне дослідження 30 чоловіків, яких було спеціально відібрано серед пацієнтів, що звернулись за спеціалізованою медичною допомогою з приводу хронічних запалень сечостатевої системи у 2011 році. Основним критерієм відбору в дослідну групу була наявність бактеріального вагінозу у статевих партнерів (дружин та/або постійних статевих партнерш з відповідним стажем не менше 6 місяців). Діагностика БВ у жінок проводилась за визначенням стандартних для цього захворювання критеріїв Амсея [20].

Пацієнти, що перебували під нашим спостереженням, були у віці від 24 до 46 років (середній вік $35 \pm 3,5$), серед 2010 – 2011 рр. Для збереження чистоти експерименту в дослідну групу залучались лише пацієнти, які не мали на час дослідження захворювань, наявність яких передбачала б обов'язковий прийом будь-яких ліків.

Дослідження біоценозу сечостатевої системи чоловіків проводили методом ПЛР-РЧ реагентами Фемофлор – 16, що включає: суміш для ПЛР-ампліфікації, специфічну для всіх бактерій (загальна бактеріальна маса), суміш, специфічну для лактобактерій (*Lactobacillus* spp.) і суміші, специфічні

для умовно-патогенних мікроорганізмів. Він призначений для проведення 12 тестів, включаючи дослідження позитивних і негативних контрольних зразків, дозволяє виявляти 25 показників, включаючи 23 групи мікроорганізмів (табл. 1), контроль узяття матеріалу й загальну бактеріальну масу. Дослідження проводили в ампліфікаторі ДТ-32 (ТОВ "НВО ДНК-технологія") згідно інструкції виробника.

Таблиця 1

Комплектація набору реагентів діагностичного Фемофлор-16

N	Показник, що виявляється
1	Загальна бактеріальна маса
2	Нормофлора – <i>Lactobacillus</i> spp.* /ВК
3	<i>Enterobacteriaceae</i>
4	<i>Streptococcus</i> spp.
5	<i>Staphylococcus</i> spp..
6	<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas</i> spp.
7	<i>Eubacterium</i> spp.
8	<i>Sneathia</i> spp./ <i>Leptotrihia</i> spp./ <i>Fusobacterium</i> spp.
9	<i>Megasphaera</i> spp./ <i>Veilonella</i> spp./ <i>Dialister</i> spp.
10	<i>Lachnobacterium</i> spp./ <i>Clostridium</i> spp.
11	<i>Mobiluncus</i> spp./ <i>Corynebacterium</i> spp.
12	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
13	<i>Atopobium vaginae</i>
14	<i>Mycoplasma (hominis +genitalium)</i>
15	<i>Ureaplasma (urealyticum + parvum)</i>
16	<i>Candida</i> spp./контроль узяття матеріалу

Автором було розроблено та запропоновано оригінальний спосіб взяття біологічного матеріалу з метою адаптації діагностичному Фемофлор – 16 для кількісної детекції анаеробної та мікроаерофільної мікрофлори сечостатевої системи чоловіків. Він виконувався наступним чином: чоловікам, що не мочилися не менше 2 годин, виконувався масаж передміхурової залози. При цьому секрет, що виділявся, мав вільно витікати з уретри. Після чого одноразовим уретральним зондом робили зішкребок з уретри з глибини 1,5 – 2 см. У матеріалі, узятому саме так, одночасно присутні секрет передміхурової залози – матеріал, найбільш інформативний відносно вмісту анаеробних мікроорганізмів, і уретральні виділення – найбільш перспективний матеріал відносно детекції гарднерелл, мікоплазм і дріжджеподібних грибків роду кандиди, а також велика кількість епітеліальних клітин.

Крім того, пацієнти перед узяттям біологічного матеріалу для названого дослідження повинні не менше 2 тижнів не приймати антибіотики, не менш 2 діб не приймати алкоголь, а також утримуватися від статевих зносин.

Взятий за описаним методом біологічний матеріал розміщувався в пробірках "Еппендорф", що містили 1мл стерильного фізіологічного розчину, і зберігався у замороженому вигляді до проведення відповідного дослідження.

Результати дослідження та їх обговорення

На підставі обліку одержаних результатів лабораторних досліджень мікробіоценозу сечостатевої системи у

чоловіків було одержано наступні результати (табл. 2): майже у 95% обстежених виявлені системні (в межах урогенітального тракту) дизбіотичні порушення. Змішаний дизбіоз склав 73,4%, анаеробний дизбіоз 23,3%, нормоценоз – 3,3% (1 пацієнт із 30 досліджених). Отже, порушення мікробіоценозу сечостатевої системи, спричиненого анаеробними мікроорганізмами (МО) самими чи у поєднанні з аеробними МО у чоловіків дослідженої групи було зареєстровано у 96,7% осіб.

Таблиця 2

Структура мікробіоценозу сечостатевої системи у чоловіків, досліджуваних за допомогою тест-системи Фемофлор – 16

Тип дизбіоза	Абсолютний показник	Відносний показник (%)
Нормоценоз	1	3,3
Змішаний дизбіоз	22	73,4
Анаеробний дизбіоз	7	23,3
Аеробний дизбіоз	0	0
Загалом	30	100

За виявленням окремих груп МО серед факультативних анаеробів превалює група *Streptococcus* spp. – у 55,5% чоловіків; на другому місці за частотою виявлення – *Staphylococcus* spp. – у 44,4%; група *Enterobacterium* spp перевищує один відсотковий бар'єр від забору біологічної маси в 22,2% випадків. Найбільш стійкою із представлених асоціацій факультативних анаеробів є *Streptococcus* spp. і *Staphylococcus* spp, що складає 33%.

За кількістю облигатних анаеробів, які беруть участь в полімікробній асоціації сечостатевої системи, група чоловіків розділилась наступним чином: 5 облигатних анаеробів виявлено у 2 пацієнтів, 4 – у 4 пацієнтів, 3 – у 4 пацієнтів, 2 – у 15 пацієнтів, 0 – у 1 пацієнта. Найбільшу кількість серед облигатних анаеробів налічують представники *Eubacterium* spp, що склало 72%. У 50% обстежених 1% бар'єр від ЗБМ перевищили мікроорганізми групи *Gard/Pre/Prop. Mobi/Coque* – виявлено у 61% пацієнтів. У 22% обстежених виявлено облигатних анаеробів із груп *Mega/Veil/Dial* і *Peptostrept*. Мікроорганізми груп *Atorobium_vaginae* та *Lachno/Clost* не знайдено у жодного обстеженого чоловіка.

За даними результатів дослідження ПЛР-РЧ найбільш стійкі асоціації серед облигатних анаеробів – *Gard/Pre/Prop+Eubacterium* spp., що склала 45% і *Eubacterium* spp. + *Mobi/Coque*, яка налічує 39%. Група *Peptostrept* часто співіснує разом з *Mega/Veil/Dial* (17%) і *Peptostrept* + *Mobi/Coque* (17%).

Спираючись на сказане вище, можна зробити такі **висновки**.

Діагностикум Фемофлор-16 має високі діагностичну чутливість і специфічність. Отримані результати показали актуальність визначення анаеробної компоненти біоти сечостатевої системи чоловіків за умови застосування оригінального способу забору біологічного матеріалу, що дозволяє адаптувати Фемофлор-16 для проведення досліджень у даної групи пацієнтів.

Більшість чоловіків – статевих партнерів жінок, хворих на бактеріальний вагіноз, згідно результатів спеціального лабораторного дослідження ПЛР-РЧ, мають дизбіози сечостатевої системи, викликані переважно анаеробною мікрофлорою. Результати кількісної детекції анаеробної та мікроаерофільної мікрофлори сечостатевої системи у чоловіків за допомогою діагностикуму Фемофлор – 16 свідчать на користь успішної адаптації цього методу для роботи з пацієнтами-чоловіками, хворими на інфекційні захворювання сечостатевої системи, що стало можливим за рахунок використання оригінального способу взяття у них біологічного матеріалу.

Рецензент: д.м.н., професор Пасечніков С.П.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Ворошилина Е.С. Структура дисбиотических нарушений у женщин репродуктивного возраста по результатам исследования методом количественной ПЦР в реальном времени / Е.С. Ворошилина, Л.В. Тумбинская, А.Е. Донников // Молекулярная диагностика – 2010. Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том III. – Москва. – 2010. – С. 197 – 200.
2. Дмитриев Г.А. Бактериальный вагиноз / Г.А. Дмитриев, И.И. Глазко // М.: Издательство БИНОМ. – 2008. – 192.
3. Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций / Г.А. Дмитриев // М.: Медицинская книга, 2003. – 336с.
4. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. / Е.Ф. Кира // СПб. – 2001. – 40с.
5. Мавров И.И. Унифікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом. / І.І. Мавров, О.П. Белозоров, Л.С. Тацька. – Х.: Факт. – 2000. – 120 с.
6. Мавров И.И. Половые болезни. / И.И. Мавров – М.: АСТ-ПРЕСС КНИГА, 2002. – 752с.: ил. – (Медицинская энциклопедия).
7. Переверзев А.С. Симптомы нижних мочевых путей / А.С. Переверзев, В.А. Козлюк. – Харьков: Факт, 2009. – 431с.: ил.
8. Плахова К.І. Діагностика й лікування бактеріального вагіноза / К.І. Плахова // Венеролог. – 2006. – № 9. – с. 46-49.
9. Плахова К.І. Бактеріальний вагіноз: протокол ведення хворих / К.І. Плахова // Венеролог. – 2007. – № 4. – с. 10-16.
10. Федорич П.В. Проблема бактеріального вагінозу і шляхи її вирішення / П.В. Федорич, О.Ю. Мацаєс // Therapia. Український медичний вісник. – №11 (52). – 2010. – С. 18 – 21.
11. Цвелев Ю.В. Анаэробная инфекция в акушерско-гинекологической практике / Ю.В. Цвелев, В.И. Кочеровец, Е.Ф. Кира, Е.Ф. Баскаков. – СПб: Питер Пресс, 1995. – 320с.: ил.
12. Pereira L., Culhane J., McCollum K., Agnew K. And Nyirjesy P. Variation in microbiologic profiles among pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* –2005. – Vol.193. – P. 746–751.

13. Plakhova K.I. Microchip technology in detection of vaginal flora in women with vaginal discharge / Plakhova K.I., Gombert M.A., Ilna E.N., Atroshkina M.E., Govorun V.M. // 17- th USTI World Congress, Book of abstracts. – Seattle. – 2007. – p-647.

14. Rink AD, Stass H, Delesen H et al. Pharmacokinetics and tissue penetration of moxifloxacin in intervention therapy for intra-abdominal abscess. Clin Drug Investig 2008;28(2):1–9.

ОБОСНОВАНИЕ И АПРОБАЦИЯ ОРИГИНАЛЬНОГО МЕТОДА ВЗЯТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С ЦЕЛЬЮ АДАПТАЦИИ ДИАГНОСТИКУМА ФЕМОФЛОР – 16 ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ АНАЭРОБНОЙ И МИКРОАЭРОФИЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ МОЧЕПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ МУЖЧИН

П.В. Федорич

Резюме. Работа посвящена адаптации использования диагностикума Фемофлор – 16 (метод полимеразной цепной реакции), рассчитанного на детекцию микробиоты влагалища, преимущественно анаэробной и микроаэрофильной, для работы с пациентами-мужчинами

Ключевые слова: анаэробная и микроаэрофильная микрофлора, мужчины, диагностикум Фемофлор–16, метод полимеразной цепной реакции.

GROUND AND APPROBATION OF ORIGINAL METHOD OF BIOLOGICAL MATERIAL TAKING FOR DIAGNOSTICUM FEMOFLO – 16 ADAPTATION FOR QUANTITATIVE DETECTION ANAEROBIC AND MICROAEROPHYLIC MICROFLORA OF MEN UROGENITAL SYSTEM

P.V. Fedorych

The article is devoted to adaptation of the use of diagnosticum of Femoflor – 16 (method of polymerase chain reaction), expected on detection microbiota of vagina, mainly anaerobic and microaerophylic, for work with men.

Keywords: anaerobic and microaerophylic microflora, men, diagnosticum of Femoflor–16, method of polymerase chain reaction.