
ДИАГНОСТИКА НАРУШЕНИЙ БИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА ЖЕНЩИН С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Г.Ф. Тотчиев, А.Э. Ахмедова, С.Р. Д. Коннон,
С.М. Семятов, З.М. Сохова

Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

В исследование включены 67 пациенток с начавшимся самопроизвольным выкидышем (СВ) и неразвивающейся беременностью (НБ). Пациенткам проводилось бактериологическое, бактериоскопическое исследование, рН-метрия влагалища, а также взяты анализы мочи, содержащие десквамированные эпителиальные клетки влагалища, которые исследовали методом флуоресцентной гибридизации *in situ*. Дисбиотический процесс (ДБ) влагалища пациенток с невынашиванием беременности подтвержден рН-метрией влагалища, микроскопией, ПЦР в реальном времени у 59,7%, 62,7%, 52,7% женщин соответственно. ДБ влагалища, ассоциированный с гарднереллезной био пленкой, выявлен методом ПЦР в реальном времени и FISH в 14,9%. Энтеробактерии в моче имели высокую частоту встречаемости у пациенток с дисбиозом влагалища (54,8%) и воспалительными заболеваниями органов брюшной полости и/или малого таза (46,2%).

Ключевые слова: дисбиоз влагалища, невынашивание беременности, рН-метрия влагалища, ПЦР в реальном времени, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), гарднереллезные био пленки, энтеробактерии

Ежегодно на свет появляются около 15 миллионов недоношенных детей, которые становятся главной причиной перинатальной смертности по всему миру [1]. Учитывая широкомасштабность проблемы невынашивания беременности, особую актуальность приобретают исследования, направленные на выявление этиопатогенетических аспектов данного состояния [2]. За последние несколько лет опубликовано много научных статей, подтверждающих связь досрочного прерывания беременности с нарушением микробной экосистемы нижнего полового тракта [3—5]. Однако проблема остается нерешенной. Так, по данным нескольких исследований, лечение дисбиоза влагалища с помощью антимикробных средств во время беременности не снижает уровень преждевременных родов [6—8]. Неэффективное лечение связано прежде всего с отсутствием расширенного представления о микрофлоре влагалища женщин [2; 6—8], что, в свою очередь, является следствием несовершенной диагностики микробной составляющей влагалища. Сегодня в практической гинекологии широко используются культуральные и молекулярные методы исследования микрофлоры влагалища [2; 9; 10].

Золотым стандартом диагностики дисбиотических процессов влагалища является количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР/ПЦР в реальном времени), имеющая высокую чувствительность и специфичность [11]. Помимо влагалищных мазков, для диагностики дисбиоза влагалища с высокой точностью также используют первую порцию мочи [12], что делает возможным проведение количественной ПЦР неинвазивно. Это достигается благодаря смыву большого

количества эпителиоцитов влагалища во время мочеиспускания. Еще одно достоинство данного метода — быстрая готовность результатов (около 3 часов).

Тем не менее, данный метод остается дорогостоящим и малодоступным для большей части населения.

Сравнительно недавно для изучения микробной составляющей влагалища был предложен метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

FISH — это молекулярный метод, используемый для идентификации и определения количества микроорганизмов в различных материалах. Данная технология совмещает простоту микроскопического наблюдения и специфичность гибридизации ДНК/рРНК, что позволяет определять необходимые виды бактерий и изучать их морфологию. Для идентификации основных бактерий, вызывающих дисбиоз влагалища, с помощью метода FISH требуется всего около 3 часов [13; 14].

Любой биологический материал может быть изучен на наличие отдельных бактерий и целых бактериальных биопленок методом FISH, включая вагинальные мазки и десквамированные эпителиальные клетки в моче [14]. Использование мочи, а не влагалищного мазка в качестве материала для исследования идеально в обследовании беременных женщин и женщин послеродового или послеабортного периода по многим причинам. Прежде всего это снижает риск инфекции. Во вторых, женщины перед посещением гинеколога как правило проводят туалет половых органов, смывая тем самым естественную флору влагалища и приводя тем самым к гиподиагностике. Также моча может быть собрана самостоятельно пациенткой в любое время дня, независимо от доктора и главное перед туалетом влагалища [12; 14].

Особое место в практической медицине заслуженно занимает рН-метрия влагалища в диагностике дисбиоза. Помимо возможности проведения исследования в домашних условиях самостоятельно пациенткой данный метод — самый дешевый и быстрый, а также способен заменить практикующему врачу критерии Амселя и микроскопию мазка с оценкой по шкале Ньюджента для установления наличия дисбиоза влагалища [15]. Однако для установления этиологии дисбиоза влагалища данный метод не годится.

Цель исследования: оценить состояние микрофлоры влагалища пациенток с невынашиваем беременностями, используя рН-метрию, микроскопию мазка, количественную ПЦР влагалищного мазка и FISH мочевого осадка.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на базе гинекологического отделения ГКБ № 12 с января 2015 г. по сентябрь 2015 г. Для проведения исследования выбраны женщины, которые находились на стационарном лечении с диагнозом «Неразвивающаяся беременность» или «Начавшийся самопроизвольный выкидыш». У всех пациенток взято письменное согласие на проведение клинического исследования.

Перспективно обследованы 67 пациенток с СВ и НБ в 1 триместре беременности до проведения прерывания беременности при необходимости. У пациенток взяты влагалищные мазки для проведения бактериоскопического анализа и ПЦР в реальном времени методом Фемофлор 17, анализ мочи методом FISH на пред-

мет *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* и *Enterobacteriaceae*. Самостоятельно пациентками проведена рН-метрия влагалища с использованием лакмусовых бумажек.

Критерии исключения: пациентки со специфическим вагинитом, положительными результатами RW, HBS, HCV, ВИЧ; пациентки, которым проводили антибиотикотерапию во время беременности и после выкидыша.

Для проведения анализа мочи методом FISH пациентки не проводили туалет мочеполовых путей за сутки до сдачи анализа и до проведения прерывания беременности по показаниям. Кроме того, требовалась первая порция мочи, которая содержит наибольшее количество десквамированных эпителиальных клеток влагалища.

Собранную мочу подвергали центрифугированию при 7000 оборотах в минуту в течение 6 минут. После слива надосадочной жидкости к полученному мочевому осадку добавляли 2 мл фиксатора Карнуа, состоящего из 6 частей абсолютного этанола, 6 частей ледяной уксусной кислоты и 1 части чистого хлороформа. Фиксированный материал содержали при комнатной температуре в пробирках. После этого материал отправляли в лабораторию, где проводили дальнейшую обработку. На предметном стекле очерчивали квадраты парафиновым карандашом размером 5×5 мм для выделения места гибридизации. Фиксированный материал вортексировали и вносили по 5 мкл в квадрат с помощью пипетки. Стекла маркировали соответственно номеру истории болезни пациенток и помещали в термостат при 52 °С на 30 минут для высыхания.

Далее готовили раствор для гибридизации. В эппендорф на 2 мл добавляли 360 мкл 5 М NaCl, 40 мкл 1 М Tris-HCl (pH 7,4), 10 мкл SDS 10% (содиум додецил сульфат натрия), 20 мкл Formamid (Merck), 1200 мкл дистиллированной воды. Раствор помещали в термостат на 15 мин при 46 °С.

0,5 мкл мочевого осадка добавляли к 50 мкл раствора для гибридизации и данную смесь инкубировали в течение 1 часа при 46 °С.

В это время начинали приготовление водного буферного раствора, состоящего из 2150 мкл 5 М NaCl, 46,4 мл H₂O, 1000 мкл 1 М Tris-HCl (pH 7,4), 30 мкл SDS 10% и 500 мкл EDTA 0,5 М.

После инкубации пробы промывали дистиллированной водой и далее инкубировали в водной бане при температуре 48 °С в течение 5 мин, после чего повторно промывали дистиллированной водой и сушили в термостате при 50 °С в течение 5 мин в темноте.

После сушки исследуемый материал помещали на предметное стекло и покрывали 50 мкл раствора DAPI. Далее инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего материал промывался дистиллированной водой и высушивался в течение 5 мин в темноте в термостате при 50 °С.

Для подсчета бактерий использовались зонды, окрашенные флуоресцентными красками Cy3 (оранжевая краска), Cy5 (красная краска) и DAPI (синяя краска). Использовались зонды GardV, Ato, и Ebac, которые присоединялись к образцам, отмечая *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Enterobacteriaceae* соответственно.

Подсчет эпителиальных клеток в области гибридизации 5×5 мм суммировался и пересчитывался в количество эпителиоцитов на 1 мл мочевого осадка. Общая концентрация адгезивных бактерий рассчитывалась путем сложения среднего значения бактерий на 1 эпителиоцит и количества эпителиоцитов на 1 мл мочевого осадка.

Материал просматривался под иммульсией с помощью флуоресцентного микроскопа Nikon e600 и фотографировался на камеру Nikon.

Результаты исследования и обсуждение. Всего обследовано 67 пациенток: 40 (59,7%) повторнوبرеменных, из которых 27 (40,3%) — со спорадическим выкидышем и 13 (19,4%) — с привычным невынашиванием, и 27 (40,3%) первобеременных женщин.

Средний возраст пациенток составил 30 лет. Из них средний возраст первобеременных составил 27 лет, а повторнوبرеменных — 31 год.

26 (38,8%) пациенток не отметили имеющихся или перенесенных гинекологических и соматических заболеваний. При опросе остальных 41 (61,2%) пациенток выявлена следующая картина: у 15 пациенток (22,4%) — воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) в анамнезе; 13 (19,4%) женщин перенесли оперативные вмешательства в органах брюшной полости, из них 9 (13,4%) выполнены лапаротомическим, 2 (3%) лапароскопическим методом, а 2 (3%) пациентки имели как лапаротомическую, так и лапароскопическую операции в анамнезе; 8 (12%) пациенток отметили раздельное диагностическое выскабливание (РДВ) в анамнезе (рис. 1).

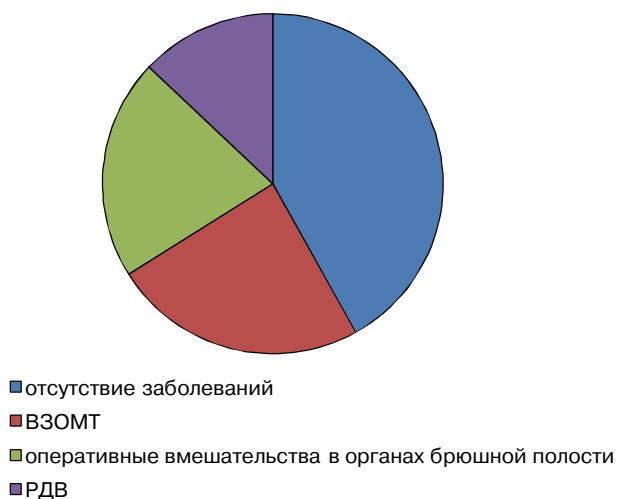


Рис. 1. Гинекологический и соматический анамнез пациенток с невынашиванием беременности

Среди пациенток с привычным невынашиванием беременности (13 человек — 19,4%) в анамнезе только 4 (6%) отметили предгравидарную подготовку, включающую прием гормональных средств. Еще 15 (22,4%) женщин принимали прогестагеновые гормональные средства во время текущей беременности.

При поступлении в стационар больше всего предъявлено жалоб на кровяные выделения из половых путей умеренного характера, сопровождающиеся схваткообразными болями внизу живота умеренного характера (50 пациенток — 74,6%), 1 женщина с острым пиелонефритом предъявила жалобы на повышение температуры тела до 38,8 °С (1,4%) и кровяные выделения из половых путей умеренного характера. 12 (18%) пациенток имели жалобы при поступлении на бели и схваткообразные боли внизу живота умеренного характера, и 4 (6%) женщины с НБ не имели активных жалоб (табл. 1).

Таблица 1

Жалобы при поступлении пациенток с невынашиванием беременности

Кровяные выделения из половых путей и схваткообразные боли внизу живота	74,6%
Бели и схваткообразные боли внизу живота	18%
Повышение температуры тела до 38,8°С, кровяные выделения из половых путей и схваткообразные боли внизу живота	1,4%
Отсутствие активных жалоб	6%

Среди 67 обследованных пациенток 38 (56,7%) имели НБ. Из остальных 29 (43,2%) пациенток с диагнозом при поступлении «Начавшийся СВ» 11 (16,4%) пациенткам сохранить беременность не удалось.

рН-метрия влагалища проводилась пациентками самостоятельно с помощью лакмусовой бумажки. У всех пациенток с жалобами при поступлении на бели (12 пациенток — 18%) рН-метрия влагалища показала щелочную среду (рН > 4,5). У 51 пациентки (76%) при поступлении были жалобы на умеренные кровяные выделения из половых путей, для которых характерна щелочная рН, в связи с чем данная группа пациенток рН-метрию влагалища проводила после завершения гематостатической терапии с целью получения точных результатов. Щелочная среда влагалища, по данным рН-метрии, выявлена у 28 пациенток данной группы (рН > 4,5). Таким образом, наличие дисбиоза влагалища, по результатам рН-метрии влагалища, подтверждена у 40 (59,7%) обследованных женщин, у 28 из которых (41,2%) дисбиоз носил бессимптомный характер.

При ознакомлении с анамнезом 7 (10,4%) пациенток имели перенесенные ВЗОМТ, 3 (4,5%) — РДВ слизистой матки и 4 (6%) — оперативные вмешательства в органах брюшной полости. Таким образом, только 14 (20,6%) пациенток с дисбиотическим процессом, подтвержденным рН-метрией, имели воспалительные заболевания в анамнезе.

Результаты бактериоскопии показали бактериальный вагиноз у 10 пациенток (14,9%), что подтвердилось наличием «ключевых» клеток и отсутствием лейкоцитов. Кандидозный кольпит выявлен только у 1 первобеременной пациентки (1,5%). Помимо кандидозного кольпита ДБ во влагалище с воспалительным процессом протекал еще у 32 (47,8%) пациенток.

В общей сложности ДБ во влагалище с воспалительным процессом или без него, по данным бактериоскопии, выявлен у 6 (9%) женщин с ВЗОМТ в анамнезе, 4 (6%) женщин с перенесенной лапаротомической операцией и 4 женщин с ла-

пароскопией в анамнезе, 3 (4%) женщин с РДВ слизистой матки в анамнезе. Таким образом, из 42 (62,7%) пациенток с дисбиотическим процессом во влагалище, по данным бактериоскопии, только 13 (19,4%) пациенток имели воспаление в органах малого таза и брюшной полости в анамнезе.

По результатам FISH, ДБ во влагалище, вызванный гарднереллезной биопленкой, выявлен всего у 10 (14,9%) пациенток. У всех 10 пациенток в гарднереллезной биопленке обнаружены *Atopobium vaginae*. Однако у 3 (4%) пациенток обнаружены дисперсные формы *Atopobium vaginae* вне гарднереллезной биопленки. Кроме того, 2 (3%) пациентки имели повышенное количество как *Gardnerella vaginalis* (8—10 в эпителиоците), так и *Atopobium vaginae* (10—12 в эпителиоците), однако их количество не превышало 20 в эпителиоците влагалища, что, возможно, указывает на начало формирования гарднереллезной биопленки (рис. 2).

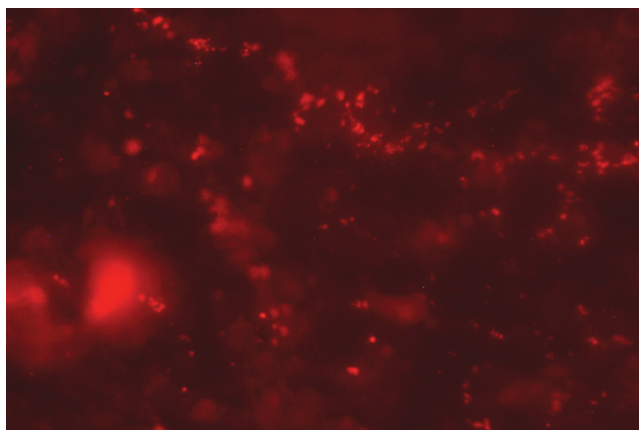


Рис. 2. Гарднереллез-ассоциированная биопленка у пациентки с начавшимся СВ

Среди пациенток с дисбиотическим процессом, вызванным гарднереллезной биопленкой, 3 (4%) пациентки имели в анамнезе оперативные вмешательства в органах брюшной полости (2 лапаротомические и 1 лапароскопические), остальные 7 (10,4%) пациенток не имели заболеваний в анамнезе.

Отмечена высокая частота встречаемости *Enterobacteriaceae* с гарднереллезной биопленкой. Так из 10 пациенток с гарднереллезной биопленкой 8 (11,9%) имели *Enterobacteriaceae*. В общей сложности *Enterobacteriaceae*, по результатам FISH, выявлены у 31 (46,2%) женщины. Однако следует иметь в виду, что *Enterobacteriaceae* обнаружены в самом мочевом осадке, а не во влагалищном эпителиоците, что указывает на имеющиеся заболевания мочевых органов. Несмотря на такие результаты, только 2 (3%) пациентки отметили хронический цистит и пиелонефрит в стадии ремиссии и 1 (1,5%) пациентка поступала в отделение с острым циститом. Что касается общего анализа мочи, то лейкоцитурия выявлена лишь у 17 (25,4%) пациенток с обнаруженными *Enterobacteriaceae* по FISH (рис. 3).

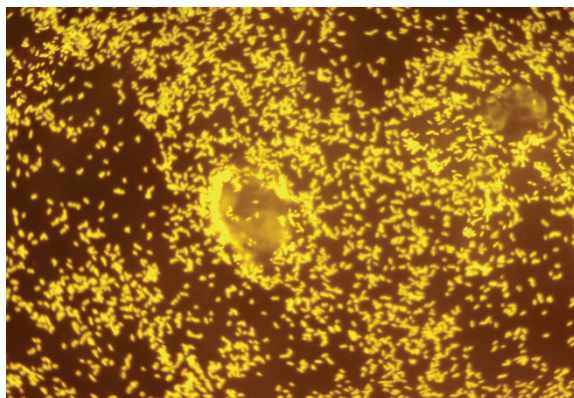


Рис. 3. Энтеробактерии в мочевом осадке у пациентки с невынашиванием беременности

Выявлена связь высоких значений *Enterobacteriaceae* с перенесенными воспалительными процессами в органах малого таза и брюшной полости у повторнобеременных пациенток с СВ — 9 (13,4%) ВЗОМТ, 4 (6%) с оперативными вмешательствами в органах брюшной полости и 4 (6%) с РДВ слизистой матки. Итого, у 17 пациенток из 31 обнаружены энтеробактерии (54,8%).

По результатам ПЦР в реальном времени 12 (17,9%) пациенток имели умеренный дисбиоз влагалища с превышением уровня нормы факультативных анаэробов — энтеробактерий, 10 (14,9%) пациенток — выраженный дисбиоз влагалища с преобладанием облигатных анаэробов (*Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.*), 6 (9%) пациенток — умеренный дисбиоз с превышением уровня нормы факультативных анаэробов — энтеробактерий и присутствием дрожжеподобных грибов, 6 (9%) пациенток — умеренный дисбиоз с преобладанием облигатных анаэробов (*Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas spp.*) и присутствием *Mycoplasma hominis*, и 6 (4,5%) пациенток — умеренный дисбиоз с превышением нормальных значений факультативных анаэробов — стрептококков и энтеробактерий. *Atopobium vaginae* обнаружен во всех образцах с гарднереллезными биопленками и 3 образцах с нормальными значениями гарднерелл.

Таким образом, согласно данным, полученным из ПЦР в реальном времени методом Фемофлор 17, ДБ подтвержден у 37 (55,2%) пациенток, из них 33 (49,3%) пациентки со спорадическим выкидышем и 4 (6%) пациентки с привычным невынашиванием.

Стоит отметить, что все пациентки с невынашиванием беременности имели оперативные вмешательства в органах брюшной полости (1 лапаротомическую и 3 лапароскопические). Из пациенток с СВ 10 (14,9%) пациенток имели ВЗОМТ в анамнезе, 3 (4,5%) пациентки — оперативные вмешательства в органах брюшной полости в анамнезе и 1 (1,5%) пациентка — раздельное диагностическое выскабливание слизистой матки в анамнезе.

Выводы

1. Невынашивание беременности в 1 триместре более характерно для повторнобеременных пациенток со спорадическим выкидышем (40,3%) в анамнезе с вос-

палительными заболеваниями органов малого таза и/или органов брюшной полости (22,4% и 19,4% соответственно) и дисбиотическими процессами влагалища во время текущей беременности (55,2%, 62,7%).

2. Отмечена высокая частота встречаемости пациенток с энтеробактериями в моче и перенесенными воспалительными процессами (54,8%), а также дисбиотическими процессами влагалища (46,2%).

3. рН-метрия влагалища является дешевым, быстрым и удобным методом, позволяющим женщинам самостоятельно, без помощи врача, выявлять дисбиотические процессы во влагалище, что особенно важно для беременных. Однако для диагностики дисбиоза влагалища этот метод идеален лишь при отсутствии кровяных выделений из половых путей.

4. Дисбиотические процессы влагалища, по результатам бактериоскопии и ПЦР в реальном времени, выявлены у большей части пациенток с невынашиванием беременности (62,7% и 55,2% соответственно).

5. Гарднереллезная биопленка, по данным FISH, выявлена в 14,9% случаев. Помимо *Gardnerella vaginalis*, составляющей гарднереллезной биопленки был *Atopobium vaginae*. Эти же результаты подтвердились при исследовании влагалищного мазка методом ПЦР в реальном времени.

6. Пациентки с невынашиванием беременности, имеющие гарднереллезные биопленки, возможно, страдают скрытыми формами заболеваний органов мочеполовой системы.

7. Неспецифический вагинит больше характерен для пациенток с невынашиванием беременности (32,8%), чем бактериальный вагиноз (14,9%).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- [1] Gravett M.G., Rubens C.E. Global Alliance to Prevent Prematurity, and Stillbirth Technical Team, "A framework for strategic investments in research to reduce the global burden of preterm birth". *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2012. Vol. 207. No. 5. P. 368—373.
- [2] Lamont R.F., Sobel J.D., Akins R.A. et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011. No. 118. P. 533—549.
- [3] Donders G., Bellen G., Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011. No. 118. P. 1163—1170.
- [4] Turovskiy Y., Noll K.S., Chikindas M.L. The etiology of bacterial vaginosis. *Journal of Applied Microbiology*. 2011. No. 110. P. 1105—1128.
- [5] Yzeiraj-Kalemaj L., Shpata V., Vyshka G. et al. Bacterial Vaginosis, Educational Level of Pregnant Women, and Preterm Birth: A Case-Control Study. *ISRN Infectious Diseases*. 2013. Vol. 2013. P. 1—4.
- [6] Romero R. Treatment of abnormal vaginal flora in early pregnancy with clindamycin for the prevention of spontaneous preterm birth: a systematic review and metaanalysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011. No. 205. P. 177—190.
- [7] Brocklehurst P., Gordon A., Heatley E. et al. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database System Review*. 2013. P. 1.
- [8] Gomez L.M., Sammel M.D., Appleby D.H. et al. Endogenous bacterial flora in pregnant women and the influence of maternal genetic variation. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2011. No. 118. P. 154—163.

- [9] Ravel J., Gajer P., Abdo Z. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011. No. 108. P. 4680—4687,
- [10] Aagaard K., Riehle K., Ma J. et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *Public Library of Science One*. 2012. Vol. 7.
- [11] Hardy L., Jaspers V., Dahchour N. et al. Unravelling the Bacterial Vaginosis-Associated Biofilm: A Multiplex Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae Fluorescence In Situ Hybridization Assay Using Peptide Nucleic Acid Probes. *Public Library of Science One*. 2015. No. 10.
- [12] Datcu R., Gesink D., Mulvad G. Bacterial Vaginosis Diagnosed by Analysis of First-Void-Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. No. 52. P. 218—225;
- [13] Lebeer S., Verhoeven T., Claes I. et al. FISH analysis of Lactobacillus biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. *Letters in Applied Microbiology*. 2011. No. 52. P. 220—226.
- [14] Swidsinski A., Verstraelen H., Loening-Baucke V. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *Public Library of Science One*. 2013. No. 8.
- [15] Krauss-Silva L., Almada-Horta A., Alves M.B. et al. Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low socioeconomic and multiethnic South American population. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2014. No. 14.

DIAGNOSIS OF BIOCENOSIS OF THE VAGINA OF WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGES

**G.Ph. Totchiyev, A.E. Akhmedova, S.R. D. Konnon,
S.M. Semyatov, Z.M. Sokhova**

Peoples' Friendship University of Russia
Miklukho-Maklay str., 6, Moscow, Russia, 117198

We investigated the vaginal microbiome of 67 patients with threatened pregnancy using bacterioscopic method and qPCR of vaginal swabs, vaginal pH measurement, and FISH to evaluate desquamated epithelial cells of vagina in urine sediments. Vaginal dysbiosis of women with miscarriage was detected by evaluation of vaginal pH, vaginal swabs bacterioscopy, qPCR in 59,7%, 62,7% and 52,7% of women respectively. Gardnerella vaginalis associated vaginal dysbiosis was determined by qPCR and FISH in 14,9% of women. Enterobacteriaceae in urine sediments were highly presented in women with vaginal dysbiosis (54,8%) and pelvic and/or abdominal cavity inflammatory diseases (46,2%).

Key words: vaginal dysbiosis, miscarriage, vaginal pH evaluation, qPCR, FISH, Gardnerella biofilms, Enterobacteriaceae