

СООТНОШЕНИЕ АЭРОБНОЙ И АНАЭРОБНОЙ МИКРОФЛОРЫ ВЛАГАЛИЩА В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОЛОВОГО РАЗВИТИЯ

Уварова Е.В.¹, Казакова А.В.², Артюх Ю.А.²

¹ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва;

²ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, e-mail: info@samsmu.ru

Проведено исследование по изучению закономерностей изменения соотношения видового состава влагалищного биотопа у здоровых девочек в периоде детства, препубертата и пубертата. Изучен микробиоценоз влагалища у 226 девочек с использованием метода комплексной количественной полимеразной цепной реакции. Выявлено, что у девочек нейтрального периода самое низкое содержание аэробов. Относительное содержание микробов во влагалище девочек разных возрастов показало, что с периодом взросления происходит достоверное увеличение содержания аэробов. В 6 раз увеличивается содержание аэробов у девочек препубертатного периода ($p < 0,001$), в 1,6 раза происходит увеличение количества между препубертатным и пубертатным периодом (0,008). Обратные изменения прослеживаются в группе анаэробов. В нейтральном периоде максимальное содержание анаэробов $92,24 \pm 2,19$. В возрасте 7 лет и до менархе количество анаэробов снижается в 1,6 раза ($p < 0,002$), и с наступлением первой менструации происходит снижение микроорганизмов еще в 1,8 раза ($p < 0,008$). Изучив относительное и абсолютное содержание сообществ микроорганизмов у девочек в различные периоды полового развития, необходимо подчеркнуть, что основные изменения микробиоты влагалища происходят в препубертатном периоде.

Ключевые слова: количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), микробиоценоз влагалища, периоды полового развития, аэробы, анаэробы, препубертатный период, пубертат, нейтральный период.

THE CORRELATION OF AEROBIC AND ANAEROBIC VAGINAL MICROFLORA AT DIFFERENT STAGES OF SEXUAL DEVELOPMENT

Uvarova E.V.¹, Kazakova A.V.², Artukh U.A.²

¹ Federal State Budget Institution «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology», Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow;

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Samara State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, e-mail: info@samsmu.ru

We have studied the consistent pattern of the compositional alteration of the vaginal biotope in healthy females at the periods of infancy, preadolescence and puberty. We have evaluated vaginal microbiocenosis in 226 girls through the complex quantitative polymerase chain reaction. The girls in the neutral period are found to have the lowest number of aerobic bacteria. The correlation of vaginal bacterial number in girls of different ages showed a firm increase of the presence of aerobic bacteria with aging. In preadolescent girls the number of aerobes multiplied by 6 times ($p < 0,001$), and at the following stage between preadolescence and puberty it further grew by 1,6 (0,008). The contrary alterations were observed in the group of anaerobe bacteria. Maximal anaerobic content in the neutral period was estimated as $92,24 \pm 2,19$. From the age of 7 till the menarche the anaerobic number reduced by 1,6 times ($p < 0,002$) and the first menstruation was directly followed by their further decrease by 1,8 ($p < 0,008$). Having studied relative and absolute microbiocenosis in girls in various periods of their sexual development we claim that the main changes in the vaginal mictoflora occur in the period of preadolescence.

Keywords: quantitative polymerase chain reaction (PCR), vaginal microbiocenosis, stages of sexual development, aerobes, anaerobes, preadolescence, puberty, neutral period

С современных позиций нормальную микрофлору рассматривают как совокупность микробиоценозов, занимающих свои экологические ниши на коже и слизистых оболочках человека. Микроорганизмы, составляющие нормальную микрофлору, состоят между собой в разнообразных взаимоотношениях (нейтрализма, конкуренции, мутуализма, комменсализма,

синергизма, паразитизма, синтрофии и др.). Изменение численности того или иного вида микроорганизмов в определенном биотопе или возникновение не свойственного данному месту обитания вида служит сигналом для адаптационных или необратимых изменений в соответствующем звене микроэкологической системы [1, 6].

Состав нормальной микрофлоры половых путей женщин достаточно изучен [1, 6, 8, 9]. Многообразие ее видового соотношения представлено строгими и факультативными анаэробами и в значительно меньшей степени — аэробными и микроаэрофильными микроорганизмами.

Характерными представителями микрофлоры половых путей здоровых женщин являются лактобактерии. Они обеспечивают защитный механизм конкуренции с патогенными микроорганизмами и поддерживают кислую среду во влагалище, создавая неблагоприятные условия для развития патогенной микрофлоры. Кроме лактобактерий, к нормальной микрофлоре влагалища относятся грамположительные палочки: эубактерии и несколько реже – бифидобактерии. Среди анаэробов в женских половых путях чаще всего встречаются три основных вида микроорганизмов: *Bacteroides* spp., *Peptococcus* и *Peptostreptococcus*, а также *Clostridium* spp. [12, 3]. Анаэробные бактерии наряду с аэробными бактериями являются частицей сложной микроэкологической системы, которая находится в определенном равновесии, содействуя нормальному функционированию половых органов в разные периоды жизни женщины (табл. 1).

Таблица 1

Видовой состав нормальной микрофлоры влагалища (Кира Е.Ф., 2001)

Факультативные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
Грамположительные кокки <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> * Group D <i>Streptococcus b-Hemolytic</i> <i>Streptococcus</i> другие виды стрептококков Грамположительные палочки <i>Lactobacillus species</i> * <i>Corinebacterium species</i> Грамотрицательные палочки <i>Echerichia coli</i> * <i>Klebsiella species</i> Другие виды семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Грамположительные кокки <i>Peptococcus species</i> * <i>Peptococcus anaerobius</i> <i>Peptococcus asacharolyticus</i> <i>Peptococcus prevotii</i> * <i>Peptococcus varibilis</i> <i>Peptostreptococcus species</i> * <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> Грамотрицательные кокки <i>Veillonella species</i> <i>Acidominococcus fermentas</i> Грамположительные палочки <i>Lactobacillus species</i> * <i>Bifidobacterium species</i> <i>Clostridium species</i> <i>Eubacterium species</i> <i>Propionacterium species</i> Грамотрицательные палочки <i>Bacteroides melaninogenicus</i> * <i>Bacteroides vulgatus</i> * <i>Bacteroides species</i> * <i>Fusobacterium nucleatum</i> * <i>Fusobacterium species</i> * <i>Leptotrichia species</i> <i>Campylobacter species</i>

Формирование и становление микробиоценоза влагалища в различные периоды жизни женщины неодинаковы и отражают влияние комплекса факторов внутренней и внешней среды.

На данный момент известно, что наиболее часто в качестве представителей аэробной и факультативно анаэробной микрофлоры обнаруживают эпидермальных и сапрофитных стафилококков, реже — кишечную палочку и энтеробактерии, в единичных случаях — бифидобактерии и лактобактерии. У 70% здоровых девочек в состав индигенной микрофлоры влагалища входят бактерии с гемолитическими свойствами. Общее микробное число у девочек от 1 месяца до 7–8 лет жизни составляет от 10^2 КОЕ/мл до 10^5 КОЕ/мл [4, 10, 11].

В составе микрофлоры влагалища девочек препубертатного возраста (9–12 лет) вплоть до менархе преобладают анаэробные и микроаэрофильные микроорганизмы: бактероиды, стафилококки, дифтероиды. Отмечают большое количество лактобактерий и молочнокислых стрептококков. В этот период микробиоценоз влагалища относительно стабилен. С момента активации овариальной функции организм девушки синтезирует «собственные», эндогенные эстрогены. Под влиянием эстрогенов клетки эпителия влагалища накапливают гликоген. Это приводит к формированию эстрогенстимулированного эпителия. На поверхности эпителиоцитов влагалища увеличено число рецепторных участков для адгезии лактобактерий, увеличивается толщина эпителиального слоя. С этого момента лактобактерии — доминирующие микроорганизмы микрофлоры влагалища, и в последующем они сохраняют это положение на протяжении всего репродуктивного периода. Метаболизм лактобактерий способствует стабильному сдвигу pH среды влагалища в кислую сторону до 3,8–4,5. Общее микробное число составляет 10^5 – 10^7 КОЕ/мл.

Пубертатный, или подростковый, период характеризует ритмичная физиологическая гипертранссудация в виде слизистых выделений. Увеличено количество эпителиальных слоев, а кольпоцитологическая картина приближена к таковой у взрослой женщины. Общее микробное число составляет 10^5 – 10^7 КОЕ/мл. В 60% случаев определяют лактобациллы, среда влагалища становится кислой, pH 4,0–4,5 [4, 10, 11].

На современном этапе много исследований посвящено изучению микроценоза влагалища, но наряду с этим крайне мало данных о видовом соотношении микроорганизмов. Учитывая важность учета количественного состава аэробных и анаэробных сообществ для дифференциальной диагностики патологических состояний в детском возрасте, нами проведено исследование, **целью** которого стало изучение частоты встречаемости, а также соотношение аэробной, факультативно анаэробной микрофлоры, облигатного сообщества

микроорганизмов влагалища и факультативных анаэробов в различные периоды полового созревания.

Задачи

1. Сформировать группы девочек, участвующих в исследовании, учитывая этапы формирования репродуктивной системы.
2. Определить микробиологические характеристики влагалища методом комплексной количественной полимеразной цепной реакции с использованием тест-систем «Фемофлор-17» в группах девочек от 0 до 7 лет, от 8 лет до менархе, от менархе до 18 лет.
3. Выявить закономерности изменения соотношения видового состава влагалищного биотопа у здоровых девочек в периоде детства, препубертата и пубертата.

Материалы и методы исследования

Взятие биоматериала осуществлялось на базе детского поликлинического отделения № 1 ГБУЗ СО СГП № 13 с февраля по август 2015 г., при подписании пациенткой или законным представителем информированного согласия на проведение исследования.

Количество обследованных девочек составило 226 человек, из них девочек от 0 до 7 лет – 74 человека, от 8 лет до менархе – 37, от менархе до 18 лет – 115. Критерии возрастного интервала выбранных групп были обусловлены основными этапами формирования репродуктивной системы.

Критерии включения: здоровые девочки, проходившие профилактический осмотр с отсутствием жалоб, неизменной слизистой влагалища, а также физиологическими выделениями из половых путей.

Критерии исключения: применение антибактериальных препаратов за месяц до обследования, отсутствие тяжелой экстрагенитальной патологии и наличие острых воспалительных заболеваний на момент осмотра и забора материала.

Исследование состояния влагалищного микробиоценоза проводили при помощи комплексной количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест-систем «Фемофлор-17» (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Материалом для исследования методом комплексной количественной ПЦР у девочек являлся соскоб эпителиальных клеток, который забирался из заднего свода влагалища через гименальное кольцо. Хранение материала осуществлялось при температуре 2–8°C не более 8 ч, далее при температуре –20°C в течение 1 месяца или при температуре –70°C в течение 1 года.

Всего исследовано 226 образцов соскобов отделяемого слизистой влагалища. Спектр диагностируемых показателей включал КВМ (контроль взятия материала), ОБМ (общая бактериальная масса), наличие микоплазм (*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*),

дрожжеподобных грибов (*Candida* spp.); *Lactobacillus* spp., (*Enterobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp.), (*Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp./*Leptotrichia* spp./*Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp./*Corinebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*), а также идентификацию патогенов (*Mycoplasma genitalium*).

Заключение по результатам диагностического теста Real-Time PCR получали в виде диаграммы, которая описывала вид микробной флоры влагалища.

Рассчитывали абсолютные (в логарифмах полученных показателей бактериальной массы условно-патогенного организма Lg_{10} УПМ) и относительные показатели (разница логарифмов полученных показателей общей бактериальной массы условно-патогенного организма (УПМ) и общей бактериальной массы (ОБМ) — Lg_{10} УПМ – Lg_{10} ОБМ). Оценку наличия *Candida* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium* проводили только в абсолютных показателях.

При оценке состава условно-патогенной флоры учитывалось не только ее присутствие, но и количество по отношению к общей бактериальной массе (ОБМ). Также определялось количество лактобактерий по отношению к общей бактериальной массе.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерного программного пакета (Microsoft Office Excel 2007).

Результаты исследования

Проанализировав частоту встречаемости и количественное содержание аэробной и факультативно анаэробной микрофлоры, облигатного сообщества микроорганизмов влагалища и факультативных анаэробов, мы определили, что у девочек нейтрального возраста микрофлора влагалища характеризуется преобладанием облигатных анаэробов (табл. 2), Lg_{10} которых соответствует $5,87 \pm 0,13$. Относительное содержание данной группы микроорганизмов в этом возрастном периоде $92,24 \pm 2,19$. Аэробы и факультативные анаэробы встречаются в микроценозе влагалища в 71,6% случаев. Относительное содержание незначительное и составляет $7,32 \pm 2,17$.

Таблица 2

Соотношения видового состава микрофлоры девочек нейтрального возраста

Микроорганизм	n	%	Абсолютное содержание M±m	Относительное содержание M±m
Аэробы, факультативные анаэробы	53	71,60%	4,10±0,11	7,32±2,17

Облигатные анаэробы	72	97,30%	5,87±0,13	92,24±2,19
Факультативные анаэробы	50	67,60%	4,11±0,11	6,31±2,01

В препубертатном периоде происходит увеличение встречаемости и количества аэробов и факультативных анаэробов (табл. 3), тогда как встречаемость и количество анаэробной микрофлоры не меняются. При этом относительное содержание абсолютных анаэробов снижается от 92,24±2,19 до 56,50±7,76.

Таблица 3

Соотношения видового состава микрофлоры девочек в препубертатном периоде

Микроорганизм	n	%	Абсолютное содержание М±m	Относительное содержание М±m
Аэробы, факультативные анаэробы	34	91,90%	5,34±0,32	42,71±7,65
Облигатные анаэробы	36	97,30%	5,37±0,26	56,50±7,76
Факультативные анаэробы	24	64,90%	3,91±0,15	7,91±3,57

С менархе у девочек в составе микроценоза влагалища происходит увеличение встречаемости аэробной и анаэробной микрофлоры (табл. 4). Количество аэробной микрофлоры увеличивается с 5,34±0,32 в препубертатном периоде до 7,10±0,13 с началом менструальной функции. Относительное содержание групп микроорганизмов меняется в сторону преобладания аэробных микроорганизмов 68,43±3,83.

Таблица 4

Соотношения видового состава микрофлоры девочек в пубертатном периоде

Микроорганизм	n	%	Абсолютное содержание М±m	Относительное содержание М±m
Аэробы, факультативные анаэробы	111	96,50%	7,10±0,13	68,43±3,83
Облигатные анаэробы	113	98,30%	5,90±0,14	30,68±3,78
Факультативные анаэробы	77	76,00%	4,35±0,13	3,03±1,24

Сравнительный анализ абсолютного и относительного содержания микроорганизмов и соотношение долей во влагалище девочек разной возрастной группы представлены в таблице 5.

Достоверные различия в абсолютном содержании аэробов во влагищном биоценозе выявлены среди всех групп обследованных. Так, у девочек нейтрального периода самое низкое содержание аэробов ($4,10 \pm 0,11$), тогда как в препубертатном периоде эти значения возрастают до $5,34 \pm 0,32$ ($p < 0,001$), а в периоде пубертата аэробные микроорганизмы увеличиваются относительно препубертатного возраста до $7,10 \pm 0,13$ ($p < 0,001$).

Относительное содержание микробов во влагище девочек разных возрастов показало, что с периодом взросления происходит достоверное увеличение содержание аэробов. В 6 раз увеличивается содержание аэробов у девочек препубертатного периода ($p < 0,001$), в 1,6 раза происходит увеличение количества между препубертатным и пубертатным периодом ($0,008$).

Обратные изменения прослеживаются в группе анаэробов. В нейтральном периоде максимальное содержание анаэробов $92,24 \pm 2,19$. В возрасте 7 лет и до менархе количество анаэробов снижается в 1,6 раза ($p < 0,002$), и с наступлением первой менструации происходит снижение микроорганизмов еще в 1,8 раза ($p < 0,008$).

Таблица 5

Сравнительный анализ абсолютного и относительного содержания микроорганизмов и соотношение долей во влагище девочек разной возрастной группы

		Аэробы + факультативные анаэробы	Облигатные анаэробы	Факультативные анаэробы
Абсолютное содержание микроорганизмов				
Нейтральный период		$4,10 \pm 0,11$	$5,87 \pm 0,13$	$4,11 \pm 0,11$
Препубертат		$5,34 \pm 0,32$	$5,37 \pm 0,26$	$3,91 \pm 0,15$
Пубертат		$7,10 \pm 0,13$	$5,90 \pm 0,14$	$4,35 \pm 0,13$
Различия абсолютного содержания	p1-2	<0,001	0,167	0,402
	p1-3	<0,001	0,962	0,741
	p2-3	<0,001	0,146	0,292
Относительное содержание микроорганизмов				
Нейтральный период		$7,32 \pm 2,17$	$92,24 \pm 2,19$	$6,31 \pm 2,01$
Препубертат		$42,71 \pm 7,65$	$56,50 \pm 7,76$	$7,91 \pm 3,57$
Пубертат		$68,43 \pm 3,83$	$30,68 \pm 3,78$	$3,03 \pm 1,24$
Различия относительно содержания	p1-2	0,001	0,002	0,285
	p1-3	<0,001	<0,001	0,001
	p2-3	0,008	0,008	0,171
Содержание микроорганизмов в долях				
Нейтральный период		71,60%	97,30%	67,60%
Препубертат		91,90%	97,30%	64,90%
Пубертат		96,50%	98,30%	76,00%
Различия содержания долей	p1-2	0,028	<0,001	0,478
	p1-3	0,535	0,959	0,763
	p2-3	0,943	0,272	0,265

Изучив относительное и абсолютное содержание сообществ микроорганизмов у девочек в различные периоды полового развития, необходимо подчеркнуть, что основные изменения микробиоты влагалища происходят в препубертатном периоде. Можно предположить, что это связано с началом функционирования гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы.

Список литературы

1. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов // Медицинская технология. М., 2011.
2. Диагностика и лечение заболеваний, сопровождающихся патологическими выделениями из половых путей женщин// Клинические рекомендации под ред. В.Н.Прилепской и соавт. – М., 2013. – 50 с.
3. Ефимов Б.А., Тютюнник В.Л., Бактериальный вагиноз: современный взгляд на проблему // РМЖ. – 2008. – Т. 16, № 1. – С. 18–22.
4. Коколина В.Ф. Диагностика и лечение урогенитальных инфекций у детей и подростков: пособие для врачей. М.: Копиринг, 2010. – 36 с.
5. Основные закономерности развития репродуктивной системы девочек: пособие для врачей / А.В. Казакова, Н.В. Спиридонова, О.И. Линева. Самара: Офорт, 2013. – 52 с.
6. Плотко Е.Э., Донников А.Е., Ворошила Е.С., Хаютин Л.В., Тумбинская Л.В. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? // «Акушерство и гинекология». – 2011. – № 1. — С. 66–70.
7. Спиридонова Н.В. Неспецифический вагинит у беременных: возможно ли лечение с сохранением вагинальных лактобацилл? [Текст] / Н.В. Спиридонова, Е.И. Басина, Е.В. Мелкадзе // «Акушерство. Гинекология. Репродукция». – 2012. – Т. 6, № 1. — С. 6–13.
8. Спиридонова Н.В., Казакова А.В. Особенности микробного пейзажа влагалища у девочек со слипчивым процессом наружных половых органов // «Российский вестник акушера-гинеколога». – 2014. – № 2.– С. 82–86.
9. Спиридонова Н.В. Микробный пейзаж влагалища в зависимости от слипчивого процесса гениталий девочек нейтрального возраста/ Н.В. Спиридонова, А.В. Казакова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1-3. – С. 603–608.
10. Уварова Е.В. Детская и подростковая гинекология: руководство для врачей. М.: Литерра, 2009. – 375 с.

11. Уварова Е.В. Специалистам об интимной гигиене девочек от рождения до половой зрелости // Репродукт. здоровье детей и подростков. – 2010. – № 2. – С. 87–92.
12. Яковлева Э.Б., Роговая О.Н., Жердева И.В., Резниченко Н.А. // Медико-социальные проблемы семьи. – 2003. – Т. 8, № 4. – С. 113–119.