

УДК 618.16-002-053.84:616-072.7

© А. В. Чайка, А. В. Рутинская, И. А. Кузнецова, 2011.

ДИАГНОСТИКА СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА У ДЕВОЧЕК ПУБЕРТАТНОГО ВОЗРАСТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КОМПЛЕКСНОЙ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «ФЕМОФЛОР-16»

А. В. Чайка, А. В. Рутинская, И. А. Кузнецова

*НИИ медицинских проблем семьи (директор – проф. А. В. Чайка),
Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, г. Донецк.*

DEFINITION OF VAGINAL MICROBIOCENOSIS IN GIRLS OF PUBERTAL AGE BY THE METHOD OF COMPLEX QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION IN REAL TIME USING THE TEST SYSTEM «FEMOFLOR-16»

A. V. Chaika, A. V. Rutinskaya, I. A. Kuznecova

SUMMARY

The article analyzes peculiarities of vaginal microflora in pubertal girls in the presence of vaginal dysbiosis today. Study of vaginal microflora was performed by the method of complex quantitative polymerase chain reaction in real time using the test systems «Femoflor».

ДІАГНОСТИКА СТАНУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ ПІХВИ У ДІВЧАТОК ПУБЕРТАТНОГО ВІКУ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ КОМПЛЕКСНОЇ КІЛЬКІСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ В РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТ-СИСТЕМИ «ФЕМОФЛОР-16»

А. В. Чайка, А. В. Рутинська, І. А. Кузнецова

РЕЗЮМЕ

У статті проаналізовані особливості складу мікробіоценозу піхви у дівчаток пубертатного періоду при наявності вагінального дисбіозу на сучасному етапі. Дослідження вагінального мікробіоценозу виконувалося за допомогою методу комплексної кількісної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу із застосуванням тест-систем «Фемофлор».

Ключевые слова: девочки пубертатного возраста, микробиоценоз, влагалище, метод комплексной количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Диагностика и адекватное лечение заболеваний, вызванных нарушениями микробной среды влагалища у девочек пубертатного возраста, возможны при наличии четких представлений о составе нормальной микробиоты влагалища в этом возрасте. До сих пор существуют противоречивые сведения о критериях нормы в отношении состава микрофлоры влагалища у девочек в различные возрастные периоды [6]. Общепринятым в отечественной практике детского гинеколога считается этапный подход оценки микробиоценоза, при котором определенный влагалищный биотоп соответствует определенному периоду развития девочки. Существует мнение, что у новорожденной девочки влагалище заполнено густой слизью и потому стерильно [1]. В течение 1-4 дней после рождения вследствие процессов распада поверхностного эпителиального слоя влагалища под влиянием половых гормонов матери влагалище новорожденной девочки заселяют лактобактерии (85-90%), бифидобактерии (до 10%) и пептострептокок-

ки (до 5%). Продуцируемая лактобактериями молочная кислота создает кислую среду во влагалище (рН 4,0-4,5). Таким образом, в этот период вагинальный микробиоценоз девочки во многом сходен с таковым у здоровой взрослой женщины. Однако через 10 дней уровень эстрогенов снижается, в результате чего эпителий влагалища истончается до 2-4 слоев, снижается содержание гликогена в нем, что, в свою очередь, приводит к снижению содержания лактобактерий и нейтрализации вагинальной среды до 7,0. В течение первых двух месяцев жизни микрофлора замещается на кокковую и факультативно-анаэробную, рН влагалища повышается до 7,0-8,0, общее микробное число составляет от 10^2 КОЕ/мл до 10^5 КОЕ/мл, и это состояние рассматривается многими авторами как нейтральный период, или период гормонального покоя [2].

Вход во влагалище зияет за счет тонкой девственной плевы, но его глубокое расположение и ограничение от анального отверстия высокой задней спай-

кой в норме препятствует заселению влагалища экзогенной микрофлорой. Данный период продолжается до 8-9 лет (начала развития вторичных половых признаков). В течение следующего, препубертатного, периода в связи с активацией гипоталамо-гипофизарной области, яичников и надпочечников девочки нарастает число слоев влагалищного эпителия, возрастает содержание гликогена в нем, увеличивается количество вагинального отделяемого, реакция среды влагалища постепенно переходит в кислую. Происходит постепенная замена кокковой флоры на кокково-бациллярную. В возрасте 10-10,5 лет, когда концентрация эстрадиола в крови достигает 100 нмоль/л, влагалище заселяется преимущественно лактобактериями, общее микробное число увеличивается до 10^5 - 10^6 КОЕ/мл [7].

Пубертатный период делится на 2 фазы [5]: первая фаза – подростковый период (с менархе до 15 лет включительно) определяется наличием циклических слизистых выделений, связанных с гипертрансудацией влагалищного эпителия, значительным увеличением количества эпителиальных слоев и общим микробным числом в пределах 10^5 - 10^7 КОЕ/мл. Среда влагалища становится кислой (рН 4,0-4,5), в 60% случаев доминируют лактобактерии. Во вторую фазу (юношеский период – с 16 до 18 лет) завершается созревание гипоталамических структур, регулирующих функцию репродуктивной системы. В этот период устанавливается стабильный тип секреции лютеинизирующего рилизинг-гормона по цирхоральному типу, менструальный цикл стабилизируется и микробиоценоз влагалища начинает соответствовать таковому у женщин репродуктивного возраста [3].

Таким образом, с наступлением менархе состав вагинальной микробиоты девочек постепенно изменяется, приближаясь к таковому у взрослых женщин. Однако результаты исследований, проведенных по изучению влагалищного микробиоценоза у менструирующих девочек, носят противоречивый характер. Так, одни авторы считают нормой наличие строгих анаэробов, в том числе, *Gardnerella vaginalis* и *Mycoplasma hominis* в вагинальном содержимом в титрах не более 10^4 КОЕ/мл [1]. Другие указывают на то, что значимым является не наличие определенных бактериальных, грибковых или вирусных агентов, а сдвиг баланса в микробном равновесии в сторону патогенной и условно-патогенной микрофлоры (УПМ), вызывающей заболевание [7]. Большинство авторов сходятся во мнении, что уменьшение количества лактобактерий обуславливает изменение влагалищной среды, провоцирующее развитие условно-патогенной и/или экзогенной патогенной микрофлоры.

Учитывая неоднозначность в подходе к оценке микрофлоры влагалища у девочек-подростков, целью нашего исследования стало изучение особенностей видового состава микробиоценоза влагалища у девочек пубертатного периода при наличии вагинального дисбиоза на современном этапе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами было проведено исследование микробиоценоза влагалища у 46 девочек пубертатного возраста, обратившихся к детскому гинекологу за консультацией или для прохождения профилактического осмотра. По результатам исследования девочки были распределены в две группы: основную, представленную 30 девочками с наличием микробного дисбаланса влагалища различной степени, и группу контроля, представленную 16 девочками с нормальным влагалищным микробиоценозом.

Критериями отбора были: возраст от 13 до 17 лет; наличие менархе; отсутствие хламидиоза, трихомониаза, гонореи, сифилиса, ВИЧ, гепатита В.

Изучались клинические и анамнестические данные. Исследование состояния влагалищного микробиоценоза проводили при помощи комплексной количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием тест-систем «Фемофлор-16» в сертифицированной лаборатории ООО «Надія».

Материал для исследования методом комплексной количественной ПЦР у девочек, не ведущих половую жизнь, соскоб эпителиальных клеток забирался из заднего свода влагалища через гименальные кольца, а у пациенток, ведущих половую жизнь – из бокового или заднего свода влагалища. Для получения объективного результата было необходимо, чтобы материал содержал возможно большее количество клеточного материала и минимальное количество примесей слизи и крови. Клинический материал брали одноразовыми стерильными инструментами типа «Cytobrush», помещали взятый образец в одноразовую стерильную пробирку с транспортной средой типа «Эппендорф» и доставляли в лабораторию, соблюдая рекомендуемый температурный режим. Показателем правильного взятия материала было достаточное количество геномной ДНК человека в пробе, что оценивалось по показателю контроля взятия материала (КВМ). Оптимальная величина этого показателя должна была по инструкции фирмы составлять не менее 10^5 . При величине КВМ менее 10^4 результат считался недостоверным, и в 2 случаях было проведено повторное взятие биоматериала.

С помощью комплексной количественной ПЦР оценивали: КВМ, общую микробную массу, количество *Lactobacterium* spp., количество условно-патогенных бактерий (факультативных и облигатных аэробов), *Candida* spp., а также патогенного возбудителя *Mycoplasma genitalium*. Результаты микробиологического исследования оценивались по референсным нормам для тест-системы «Фемофлор-16» [4]. Рассчитывали абсолютные (в логарифмах полученных показателей общей бактериальной массы условно-патогенного организма Lg_{10} УПМ) и относительные показатели (разница логарифмов полученных показателей общей бактериальной массы условно-патогенного организма и лактобактерий – Lg_{10} УПМ-

Lg₁₀ ЛБ). Оценку наличия *Candida* spp., *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium* проводили только в абсолютных показателях.

Статистическая обработка данных проводилась согласно рекомендациям с использованием компьютерного программного пакета Microsoft Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст девочек в основной группе составил 15,19±0,38 лет, в контрольной – 15,53±0,26 лет, $p>0,05$. Средний возраст менархе распределился соответственно – 12,38±0,19 и 12,53±0,32, $p>0,05$. У всех девочек контрольной группы менструации были регулярными. В основной группе у 29 (99,67±0,34%) пациенток регистрировался регулярный менструальный цикл, одна пациентка (3,33±0,34%) предъявляла жалобы на периодические задержки менструаций, $p>0,05$. Половую жизнь вели в основной группе 13 (43,33±1,22%) пациенток, в контроле – 6 (37,50±1,58%), $p>0,05$.

В основной группе выделения из половых путей в виде белей и других патологических выделений (творожистых, желтоватых, пенистых и пр.) имели 16 (53,33±1,27%) пациенток, в контроле только 2 девочки имели выделения из половых путей в виде белей (13,33±2,48%), $p<0,003$.

При анализе общей бактериальной массы (ОБМ) вагинальной микрофлоры с помощью комплексной количественной ПЦР в режиме реального времени было установлено, что в группе контроля Lg₁₀ ОБМ составил в среднем 6,84±0,11, в основной группе этот

показатель составил 6,96±0,11, $p>0,05$. Наличие лактобактерий (ЛБ) определялось у 100% девочек группы контроля, при этом количественный показатель варьировал от 10⁶ до 10^{7,4} КОЕ и в среднем Lg₁₀ ЛБ составил 6,69±0,13. В основной группе лактобактерии были обнаружены у 27 (90,00%), при этом Lg₁₀ ЛБ в среднем составил 5,96±0,41 ($p>0,05$).

При анализе процентного распределения состава микроорганизмов в микробиоценозе влагалища обследованных девочек пубертатного возраста установлено, что микрофлора девочек с урогенитальным дисбиозом достоверно отличалась по содержанию следующих микроорганизмов: *Staphylococcus* spp. регистрировался чаще в 3,47 ($p<0,024$) раза; *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas* spp. – в 3,91 ($p<0,0004$); *Eubacterium* spp. – в 2,67 ($p<0,0004$); *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* – в 2,13 ($p<0,02$); *Atopobium vaginae* – в 9,07 ($p<0,0008$); *Ureaplasma* spp. – в 4,8 ($p<0,002$); *Candida* spp. – в 3,73 ($p<0,0009$). При этом *Staphylococcus* spp. встречался у 13 (43,33%) девочек, а в диагностически значимых количествах – у 1 (3,33%); *Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas* spp. – соответственно у 22 (73,33%) и у 13 (43,33%); *Eubacterium* spp. – у 25 (83,33%) и у 20 (66,67%); *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* – у 20 (66,67%) и у 10 (33,33%); *Atopobium vaginae* – у 17 (56,67%) и у 7 (23,33%); *Ureaplasma* spp. – у 18 (60,00%) и у 10 (33,33%); *Candida* spp. – у 21 (70,00%) и у 20 (66,67%) (табл. 1).

Таблица 1

Процентное распределение состава микроорганизмов в микробиоценозе влагалища обследованных девочек пубертатного возраста, M±m

	Основная группа, n=30	Контрольная группа, n=16
<i>Lactobacillus</i> spp.	27 (90,00±1,75)	16 (100,00±0,00)
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	4 (13,33±0,68)	2 (12,50±0,91)
<i>Streptococcus</i> spp.	6 (20,00±0,83)	2 (12,50±0,91)
<i>Staphylococcus</i> spp.	13 (43,33±1,22) ^k	2 (12,50±0,91)
<i>Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas</i> spp.	22 (73,33±1,58) ^k	3 (18,75±1,12)
<i>Eubacterium</i> spp.	25 (83,33±1,69) ^k	5 (31,25±1,44)
<i>Sneathia</i> spp. / <i>Leptotrichia</i> spp. / <i>Fusobacterium</i> spp.	9 (30,00±1,02)	2 (12,50±0,91)
<i>Megasphaera</i> spp. / <i>Veillonella</i> spp. / <i>Dialister</i>	20 (66,67±1,51) ^k	5 (31,25±1,44)
<i>Lachnobacterium</i> spp. / <i>Clostridium</i> spp.	8 (26,67±0,96)	3 (18,75±1,12)
<i>Mobiluncus</i> spp. / <i>Corynebacterium</i> spp.	16 (53,33±1,35)	5 (31,25±1,44)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	20 (66,67±1,51)	6 (37,50±1,58)
<i>Atopobium vaginae</i>	17 (56,67±1,39) ^k	1 (6,25±0,65)
<i>Mycoplasma hominis</i>	2 (6,67±0,48)	2 (12,50±0,91)
<i>Ureaplasma (urealyticum+parvum)</i>	18 (60,00±1,43) ^k	2 (12,50±0,91)
<i>Candida</i> spp. ^k	21 (70,00±1,55) ^k	3 (18,75±1,12)

Примечание: ^k – достоверная разница с аналогичным показателем контроля ($p<0,05$).

В 30 образцах основной группы, в которых результаты исследования методом количественной комплексной ПЦР были интерпретированы как нарушение микробиоценоза влагалища, было выявлено до-

стоверное повышение относительного показателя Lg_{10} УПМ в основной группе по сравнению с группой контроля для ряда условно-патогенных микроорганизмов (табл. 2).

Таблица 2

Абсолютное и относительное содержание микроорганизмов в микробиоценозе влагалища обследованных девочек пубертатного возраста, $M \pm m$

Показатель	Основная группа, n=30		Контрольная группа, n=30	
	Lg_{10} УПМ	Lg_{10} ОБМ- Lg_{10} ЛБ	Lg_{10} УПМ	Lg_{10} УПМ- Lg_{10} ЛБ
Семейство Enterobacteriaceae	0,48±0,23	-5,48±0,49	0,43±0,30	-6,26±0,36
Streptococcus spp.	0,92±0,35	-5,04±0,62 ^к	0,26±0,18	-6,43±0,26
Staphylococcus spp.	1,56±0,35 ^к	-4,40±0,53 ^к	0,23±0,16	-4,40±0,53
Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp.	3,64±0,46 ^к	-2,32±0,75 ^к	0,48±0,29	-6,21±0,26
Eubacterium spp.	3,98±0,36 ^к	-1,98±0,64 ^к	0,94±0,38	-5,75±0,40
Sneathia spp. / Leptotrihia spp. / Fusobacterium spp.	1,30±0,39 ^к	-4,66±0,57 ^к	0,27±0,21	-6,42±0,21
Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister	2,87±0,41 ^к	-3,09±0,58 ^к	0,61±0,28	-6,08±0,26
Lachnobacterium spp. / Clostridium spp.	1,02±0,32	-4,94±0,47 ^к	0,38±0,22	-6,31±0,25
Mobiluncus spp. / Corynebacterium spp.	2,13±0,38 ^к	-3,83±0,53 ^к	0,93±0,38	-5,76±0,32
Peptostreptococcus spp.	2,56±0,34 ^к	-3,40±0,51 ^к	0,93±0,32	-5,76±0,31
Atopobium vaginae	1,99±0,46 ^к	-3,97±0,64 ^к	0,19±0,19	-6,49±0,22
Mycoplasma hominis	0,19±0,13	–	0,23±0,16	–
Ureaplasma (urealyticum + parvum)	2,46±0,42 ^к	–	0,36±0,25	–
Candida spp. ^к	2,37±0,30 ^к	–	0,49±0,27	–

Примечание: ^к – достоверная разница с аналогичным показателем контроля ($p < 0,05$).

Так, Lg_{10} УПМ Staphylococcus spp. в основной группе был выше, чем в контроле в 6,78 ($p < 0,001$) раза; Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp. – в 7,58 ($p < 0,0001$); Eubacterium spp. – в 4,23 ($p < 0,0001$); Sneathia spp. / Leptotrihia spp. / Fusobacterium spp. – в 4,81 ($p < 0,03$); Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp. – в 4,70 ($p < 0,0001$); Mobiluncus spp. / Corynebacterium spp. – в 2,29 ($p < 0,03$); Peptostreptococcus spp. – в 2,75 ($p < 0,001$); Atopobium vaginae – в 10,47 ($p < 0,0009$); Ureaplasma spp. – в 6,83 ($p < 0,0001$); Candida spp. – в 4,84 ($p < 0,0001$).

ВЫВОДЫ

1. При вагинальном дисбиозе у девочек пубертатного периода на современном этапе в диагностически значимых количествах регистрируются такие микроорганизмы, как: Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp. – у 43,33%; Eubacterium

spp. – у 66,67%; Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister – у 33,33%; Atopobium vaginae – у 23,33%; Ureaplasma spp. – у 33,33%; Candida spp. – у 66,67%.

2. При вагинальном дисбиозе наиболее превышают концентрации в контроле такие микроорганизмы, как: Atopobium vaginae – в 10,47 ($p < 0,0009$) раза; Gardnerella vaginalis / Prevotella bivia / Porphyromonas spp. – в 7,58 ($p < 0,0001$); Staphylococcus spp. – в 6,78 ($p < 0,001$); Ureaplasma spp. – в 6,83 ($p < 0,0001$); Candida spp. – в 4,84 ($p < 0,0001$); Sneathia spp. / Leptotrihia spp. / Fusobacterium spp. – в 4,81 ($p < 0,03$); Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp. – в 4,70 ($p < 0,0001$); Eubacterium spp. – в 4,23 ($p < 0,0001$); Peptostreptococcus spp. – в 2,75 ($p < 0,001$); Mobiluncus spp. / Corynebacterium spp. – в 2,29 ($p < 0,03$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Возрастные особенности диагностики и лечения бактериального вагиноза в детском и подростковом

возрасте / Е. В. Уварова, Н. Х. Латыпова, В. В. Муравьева [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 57–61.

2. Коколина В. Ф. Детская и подростковая гинекология : руководство для врачей / Коколина В. Ф. – Москва : ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2006. – 640 с.

3. Маркин Л. Б. Справочник детского гинеколога / Л. Б. Маркин, Э. Б. Яковлева. – К.: Интермед, 2004. – 384 с.

4. Метод діагностики бактеріального вагінозу за допомогою комплексної кількісної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу : методичні рекомендації / [А. В. Чайка, О. М. Носенко, О. І. Остапенко та ін.]. – Київ, 2010. – 35 с.

5. Орлова О. О. Терапия неспецифических вульвовагинитов и вагинозов: поиски путей решения про-

блемы / О. О. Орлова, Е. А. Михнина, О. Н. Аржанова // Научно-практический журнал TERRA MEDICA. – 2003. – № 1 (29). – С. 30–32.

6. Особенности нормальной микрофлоры влагалища у девочек дошкольного возраста / А. С. Анкирская, Е. В. Уварова, В. В. Муравьева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – № 4. – С. 54–58.

7. Руководство по гинекологии детей и подростков / под ред. В. И. Кулакова, Е. А. Богдановой. – М.: Трида-Х, 2005. – 336 с.

8. Уварова Е. В. Пособие по обследованию состояния репродуктивной системы детей и подростков : для врачей педиатров, акушеров-гинекологов и урологов-андрологов / Е. В. Уварова, Д. И. Тарусин. – М.: Трида-Х, 2009. – 232 с.