

УДК 618.15-008.8+618.173-007.44

О.А. Боровлева¹, Ю. Л. Набока², А. Н. Рымашевский¹, С.А. Заруцкий³

МИКРОБИОТА ВЛАГАЛИЩА В ПОСТМЕНОПАУЗЕ ПРИ ПРОЛАПСЕ ГЕНИТАЛИЙ И У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН

*Ростовский государственный медицинский университет,**¹кафедра акушерства и гинекологии № 1,**²кафедра микробиологии и вирусологии № 1,**³лаборатория биоинформатики, медицинской статистики и компьютерного моделирования ЦНИЛ.**Россия, 344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29. E-mail: 30203020@bk.ru***Цель:** изучить микробиоту влагалища в постменопаузе у женщин при пролапсе гениталий и у здоровых женщин.**Материалы и методы:** обследованы 84 женщины (возраст 54-76 лет), из них 20 здоровых женщин (первая группа) и 64 пациентки (вторая группа) с диагностированным пролапсом гениталий, требующим хирургической коррекции. Всем обследуемым проведены микроскопическое и бактериологическое исследования микрофлоры заднего свода влагалища.**Результаты:** в первой группе лактобациллы выделяют из влагалища в 10,0% случаев, во второй данные микроорганизмы отсутствуют. В первой и второй группах среди факультативно-анаэробных бактерий преобладают коагулазо-отрицательные стафилококки (70,0% - 93,7%) и *Corynebacterium* spp. (30,0% - 68,7%), в группе неклостридиально-анаэробных бактерий - *Eubacterium* spp. (70,0% - 84,4%).**Заключение:** в постменопаузе выявлены микробные паттерны влагалища, характерные для здоровых женщин и для пациенток с пролапсом гениталий, что необходимо учитывать при коррекции дисбиотических сдвигов в данном биотопе.**Ключевые слова:** пролапс гениталий, микробиота влагалища, постменопауза.O.A. Borovleva¹, Y.L. Naboka², A.N. Rymashevsky¹, S.A. Zarutskiy³

VAGINAL MICROBIOTA IN POSTMENOPAUSAL HEALTHY WOMEN AND WOMEN WITH GENITAL PROLAPSE

*Rostov State Medical University,**¹Obstetrics and Gynecology Dept. No. 1,**²Microbiology and Virology Dept. No. 1,**³Central Research Laboratory,**Department of Bioinformatics, Medical Statistics, and Computer Simulation.**29 Nakhichevansky Ave., Rostov-on-Don, 344022, Russia. E-mail: 30203020@bk.ru***Purpose:** to study the microbiota of postmenopausal vagina both in women with genital prolapse and healthy women.**Materials and methods:** we examined 84 females (54 - 76 years old) including 20 healthy women (Group 1) and 64 patients with diagnosed genital prolapse requiring surgical correction (Group 2). Microscopic and bacteriological examinations of the microflora in posterior vaginal fornix were performed for all participants.**Results:** in Group 1 lactobacilli were revealed in the vagina in 10,0% of cases, in the second group these microorganisms are not found. In Groups 1 and 2 coagulase-negative staphylococci (70,0% - 93,7%) and *Corynebacterium* spp. (30,0% - 68,7%) are dominant among facultative anaerobic bacteria, with *Eubacterium* spp. prevailing (70,0% - 84,4%) among nonclostridial anaerobes.**Summary:** we revealed vaginal flora patterns typical of postmenopausal women (healthy and patients with genital prolapse), which should be considered during correction of dysbiotic changes in the given biotope.**Key words:** genital prolapse, vaginal microbiota, postmenopause.

Введение

Изучение микробиоты влагалища женщин различных возрастных групп вошло в фундаментальный исследовательский проект «Human microbiome project» (2008-2012) и во многом расширило существующие представления о микробиоте данного биотопа.

Молекулярные исследования, основанные на индикации 16S рРНК бактерий, выявили 265 видов микроорганизмов во влагалище [1,2,3]. Несмотря на существование фундаментальных различий микробиоты влагалища у женщин различного возраста и этнической принадлежности [1,4] *Lactobacillus* spp. являются доминирующими симбионтами данного биотопа. В настоящее время не существует единого стандарта качественного и количественного составов микробиоты влагалища у женщин различных возрастных групп в мено- и постменопаузе. У женщин репродуктивного возраста и в период менопаузы выделяют пять типов микрофлоры влагалища (community state types (CST)). Первый тип (CST I) характеризуется доминированием *L.crispatus*, второй тип (CST II) — доминированием *L.gasseri*, третий тип (CST III) — доминированием *L.iners*, пятый тип (CST V) — доминированием *L.gensei*. Четвёртый тип (CST IV) характеризуется низким содержанием *Lactobacillus*. Этот тип подразделяют на две подгруппы: CST IV A, который содержит анаэробные бактерии *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella* и *Streptococcus* spp, и CST IV B, в котором доминируют *Atopobium* и *Megasphaera* [5]. Важнейшая функция нормального биоценоза женских половых органов состоит в обеспечении колонизационной резистентности организма в целом и данного биотопа в частности [6]. По мере старения организма женщины происходит постепенное снижение функции яичников, что приводит к эстрогендефицитному состоянию в постменопаузе [7]. Дефицит эстрогенов блокирует пролиферацию влагалищного эпителия, вследствие чего происходит исчезновение гликогена, питательной среды для лактобактерий. Таким образом, в мено- и постменопаузе уменьшается количество лактобактерий и сужаются паттерны влагалищной флоры в целом. Среди лактобацилл в постменопаузе преобладают *L.iners* и *L.crispatus*. Пропад гениталий (ПГ) в постменопаузе может усугублять имеющийся дисбиоз на фоне атрофии слизистой влагалища и недостаточного количества эстрогенов [8,9,10].

В метаанализе H.D. Nelson (2004) доказано, что все пути введения эстрогенов (пероральные, трансдермальные, вагинальные) эффективны для облегчения симптомов менопаузы и благоприятно влияют на микрофлору влагалища [11]. По данным ряда авторов, у женщин, не принимающих эстрогены в постменопаузе, лактобациллы отсутствуют, но преобладают различные таксоны анаэробных бактерий [12,13,14]. Таким образом, уровни эстрогенов оказывают влияние на паттерны вагинальной микрофлоры [15]. Поэтому особую актуальность приобретает изучение микробиоты влагалища в мено- и постменопаузе.

Цель исследования — изучить микробиоту влагалища в постменопаузе у женщин при пролапсе гениталий и у здоровых женщин.

Материалы и методы

На базе гинекологического отделения клиники РостГМУ проведено обследование 84 женщин, из которых 20 условно здоровы (первая группа) и 64 пациентки с диагностированным ПГ, требующего хирургической коррекции (вторая группа).

Критерии включения в исследование: отсутствие менструации в течение года и более; отсутствие данных о перенесенных заболеваниях, передаваемых половым путем; отсутствие антибактериальной терапии в течение 1 месяца до исследования; отсутствие гормональной терапии в течение 6 месяцев до исследования; согласие пациентки на участие в исследовании.

Дополнительным критерием включения в исследование для пациенток второй группы являлось наличие ПГ, требующего хирургической коррекции.

Всем пациенткам выполнены микроскопическое и бактериологическое исследования микрофлоры влагалища. Вагинальную жидкость забирали из заднего свода влагалища стерильным тампоном Sorap innovation (Италия). Посевы проводили на расширенный набор питательных сред «Himedia» (Индия) для факультативно-анаэробных (ФАБ) и неклостридиальных анаэробных бактерий (НАБ). Для культивирования ФАБ использовали следующие питательные среды: Mac Conkey Agar, HiCrome Candida Differential Agar, HiCrome Enterococci Agar, HiCrome Aureus Agar Base, Streptococcus Selective Agar, Blood Agar Base с добавлением бараньих эритроцитов. Для выделенных НАБ использовали среды Блаурокка, Shedler Agar and Broth, Bacteroides Bile Esculin Agar, Bifidobacterium Agar and Broth, MRS Agar, Clostridial Agar.

Качественное и количественное изучение микробиоты влагалища выполняли по методике В.В. Меньшикова (2009) с использованием аэробной и анаэробной техники культивирования. Посевы инкубировали при температуре 37,0 °C. Для создания анаэробнозона применяли AnaeroHiGas Pack с индикатором анаэробнозона (HiAnaero Indicator Tablet). Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим признакам с помощью энтеро-, стафило- и анаэротестов (Lachema, Чехия).

Расчёты выполнялись в среде статистической обработки и визуализации данных R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ver 3.2). Результаты бактериологического исследования были рассмотрены в форме концентраций (как количественный фактор) и встречаемости (как бинарный фактор). Сравнение медиан концентраций в группах пациентов проводилось с помощью теста Манна-Уитни, частот встречаемости бактерий — с помощью точного теста Фишера.

Для оценки различия микробных спектров и концентраций микроорганизмов в группах был проведен кластерный анализ. Результатом кластерного анализа стали построенные дендрограммы. Дендрограмма — древовидная структура, где каждая конечная точка ветви представляет наблюдение (ось X), а длина каждой ветви характеризует меру сходства между рассматриваемыми группами наблюдений (ось Y). Чем более однородны группы, тем длина ветви короче. С помо-

щью группировки ветвей можно получить кластеры. Их число может быть различным, но чем выше ветвь дендрограммы, тем меньшее число кластеров можно получить. Для анализа сходства использовался метод Варда (расстояние Брея-Кёртиса) [16].

Результаты и их обсуждение

При микроскопическом исследовании отделяемого заднего свода влагалища у обследуемых обеих групп отсутствовала лейкоцитарная реакция (более 15 лейкоцитов в поле зрения), а также трихомонады, хламидии и гонококки.

При бактериологическом исследовании отделяемого заднего свода влагалища у женщин первой группы основные симбионты генитального тракта — лактобациллы — выделены в 10,0% случаев (табл. 1). НАБ обнаружены у всех обследуемых первой группы с доминированием *Eubacterium* spp. (70,0%). Практически с одинаковой частотой из влагалища выделяли *Peptostreptococcus* spp. (60,0%) и *Propionibacterium* spp. (50,0%) (табл. 1).

Среди ФАБ преобладали коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) — 70,0%, спектр которых был представлен видами *S.haemolyticus* (40,0%) *S.epidermidis* (15,0%) *S.warneri* (10,0%) *S.coagulans* (5,0%). Практически с одинаковой частотой во влагалище присутствовали *Corynebacterium* spp. (30,0%) и *E.coli* (25,0%) (табл. 1).

Средний уровень обсемененности влагалища ФАБ составил $\lg 3,2 \pm 1,2$ КОЕ/мл, НАБ — $\lg 5,1 \pm 2,1$ КОЕ/мл.

При бактериологическом исследовании отделяемого заднего свода влагалища у женщин второй группы лактобациллы отсутствовали. В единичных случаях (6,2%) обнаруживали бифидобактерии (табл. 1). В кластере НАБ доминировали *Eubacterium* spp. и *Peptostreptococcus* spp. по (84,4%) (табл. 1).

Среди ФАБ преобладали КОС (93,7%) и *Corynebacterium* spp. (68,7%). Паттерн КОС был представлен *S.haemolyticus* (79,7%), *S.epidermidis* (14,0%). Реже во влагалище регистрировали *Streptococcus* spp. (37,5%), *E.coli* (25,0%), *Enterococcus* spp. (12,5%), *S.aureus* (9,4%) (табл. 1).

Средний уровень обсемененности влагалища ФАБ составил $\lg 3,1 \pm 0,7$ КОЕ/мл, НАБ — $\lg 5,2 \pm 2,6$ КОЕ/мл.

Таблица 1.

Микробиота влагалища обследуемых I и II групп

Виды микроорганизмов	I группа		II группа		p	
	1	2	1	2	1	2
<i>Lactobacillus</i> spp.	10,0	3,0±0,1	0	0	0.054	-
КОС	70,0	2,6±0,6	93,7	2,7±0,7	<0.0001	0.6
<i>S.aureus</i>	0	0	9,4	2,5±0,5	0.3	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	30,0	2,0±0,1	68,7	4,0±0,1	<0.001	0.004
<i>E.coli</i>	25,0	5,0±0,1	25,0	3,3±0,3	0.8	0.04
<i>Enterococcus</i> spp.	15,0	3,5±0,4	12,5	3,0±0,5	0.5	0.8
<i>Streptococcus</i> spp.	10,0	3,0±0,1	37,5	3,0±0,5	0.026	1
<i>Eubacterium</i> spp.	70,0	5,7±0,5	84,4	6,4±0,6	0.2	0.02
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	60,0	6,7±0,3	84,4	6,0±0,1	0.03	0.055
<i>Propionibacterium</i> spp.	50,0	7,0±0,1	37,5	4,5±0,5	0.4	0.5
<i>Peptococcus</i> spp.	20,0	3,5±0,5	18,7	6,6±0,8	1	0.007
<i>Bacteroides</i> spp.	20,0	4,5±0,6	6,2	4,5±0,5	0.09	1
<i>Bifidobacterium</i> spp.	0	0	6,2	3,5±0,4	0.6	-

Примечание: 1 — частота выделения (%), 2 — количество (\lg КОЕ/мл), p — уровень значимости различия между исследуемыми группами

При сравнении частот встречаемости во влагалище различных родов микроорганизмов у здоровых женщин и у женщин с ПГ (тест Фишера) выявлены значимые различия для КОС, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. (табл. 1).

Сравнение медианных уровней концентрации микроорганизмов (тест Манна-Уитни), выделенных из изучаемого биотопа женщин обеих групп, выявило значимые различия для *Corynebacterium* spp., *E.coli*, *Eubacterium* spp., *Peptococcus* spp.

При кластеризации результатов бактериологического

исследования по спектру микроорганизмов во влагалище обследуемых обеих групп (рис. 1) сформированы два кластера: первый полностью состоит из обследуемых второй группы (его также можно разбить на два подкластера), а во второй кластер вошли 7 пациенток с ПГ и все обследуемые (20 женщин) первой группы (табл. 2). На основании дендрограммы можно сделать заключение о высоком уровне подобия бактериальных спектров микробиоты влагалища у обследуемых каждой группы, т.е. существуют микробные паттерны, характерные для здоровых женщин и для женщин с пролапсом гениталий.

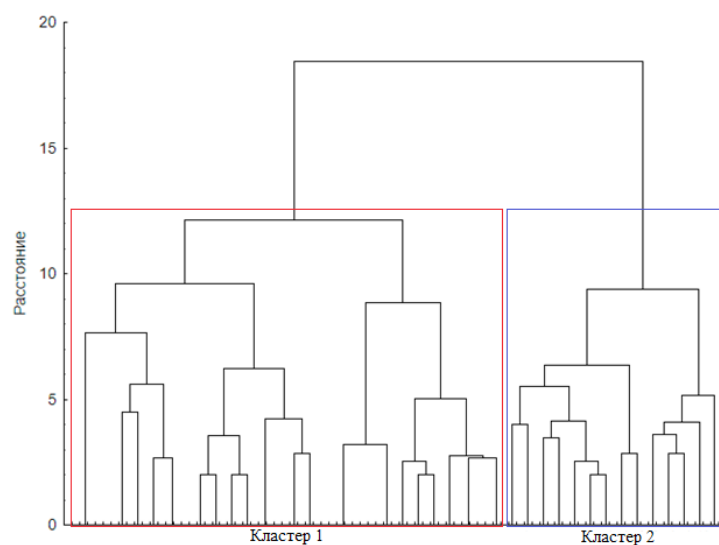


Рисунок 1. Иерархическая кластеризация по спектру микроорганизмов во влагалище у здоровых женщин и с пролапсом гениталий.

Таблица 2.

Характеристика кластеров

	Кластер 1	Кластер 2
I группа	нет значений	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
II группа	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64	4, 13, 27, 30, 35, 36, 44

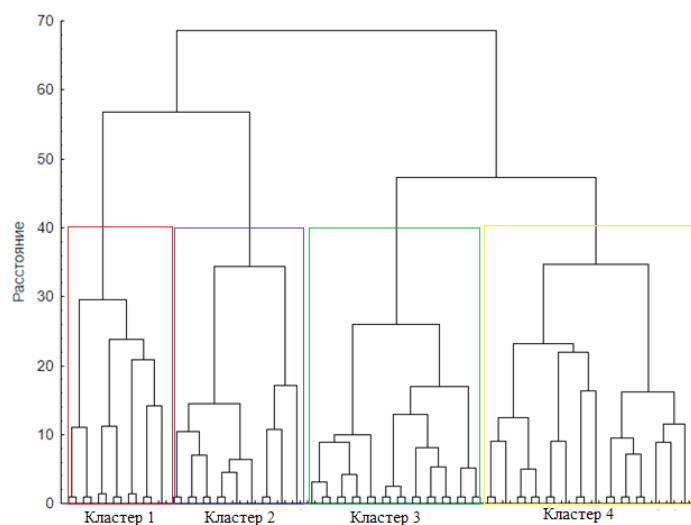


Рисунок 2. Иерархическая кластеризация по концентрации микроорганизмов, выделенных из влагалища здоровых женщин и при пролапсе гениталий

Таблица 3.

Результаты разбиения дендрограммы на 4 кластера

	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3	Кластер 4
I группа	7, 19	4, 6, 8, 10, 13, 14, 18, 20	нет значений	1, 2, 3, 5, 9, 11, 12, 15, 16, 17
II группа	4, 11, 26, 27, 31, 34, 40, 43, 44, 59	12, 13, 15, 22, 30, 35, 36, 38, 48, 55	3, 5, 6, 7, 10, 14, 14, 18, 20, 21, 25, 28, 32, 37, 45, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 60, 62, 64	1, 2, 8, 16, 17, 19, 23, 24, 29, 33, 39, 42, 45, 51, 57, 58, 61, 63

При проведении иерархической кластеризации по концентрации микроорганизмов (рис. 2), выделенных из влагалища обследуемых обеих групп, формируются четыре кластера. Причем в каждом кластере присутствуют пациентки второй группы. Необходимо отметить, что в третьем кластере отсутствуют обследуемые первой группы, тогда как в первом, втором и четвертом кластерах они присутствуют в различных соотношениях (табл. 3). На основании полученных данных можно сделать заключение о том, что уровень подобия по концентрации выделенных микроорганизмов внутри рассматриваемых групп ниже, чем по частоте обнаружения.

Таким образом, в постменопаузе выявлены микробные паттерны, характерные для здоровых женщин и женщин с ПГ. Различия в концентрациях обнаруженных во влагалище микроорганизмов менее существенны.

Заключение

1. У женщин в постменопаузе (здоровых и с ПГ) во влагалище отсутствуют лейкоцитарная реакция и, соответственно, воспалительный процесс.
2. В постменопаузе во влагалище здоровых женщин лактобациллы регистрируют в 10,0% случаев. У женщин с ПГ данные микроорганизмы отсутствуют. У обследуемых обеих групп среди ФАБ преобладают КОС и *Corynebacterium spp.*, в группе НАБ - *Eubacterium spp.*
3. В постменопаузе выявлены паттерны влагалищной микробиоты, характерные для здоровых женщин и для пациенток с пролапсом гениталий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Усов В.В. Морфологические изменения в аутодермотранспланте. J. Vaginal microbiome of reproductive – age women. / J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2011. – Vol. 108. – P. 7-4680.
2. Gajer P. Temporal Dynamics of the human vaginal microbiota. / P. Gajer, R. M. Brotman, G. Bai [et al.] // Sci Transl Med. – 2012. – Vol. 46. – P. 132.
3. Mendling W. Adv. Exp. Med. Biol. / W. Mendling // January 1. – 2016. – Vol. – 902. – P. 83-93.
4. Fredricks D. N. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. / D. N. Fredricks, T. L. Fiedler, J. M. Marrazzo // N Engl J Med. – 2005. – Vol. – 353. – P. 911-1899.
5. Ravel J. Vaginal microbiome of reproductive – age women. / J. Ravel, P. Gajer, Z. Abdo [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2011. – Vol. – 108 (1). – P. 4680-4687.
6. Datcu. R-Dan. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. / Datcu. R-Dan // Med J: Apr. – 2014. – Vol. – 61 (4). – P. 4830.
7. Goedert J. J. Investigation of the association between the fecal microbiota and breast cancer in postmenopausal women a population - based case - control pilot study. / J. J. Goedert, G. Jones, X. Hua [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – August 1. – 2015. – Vol. – 107 (8).
8. Petricevic L. Characterisation of the oral vaginal and rectal Lactobacillus flora in healthy pregnant and postmenopausal women. / L. Petricevic, K.J. Domig, F.J. Niersher [et al.] // European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive biology. – 2012. – Vol. 160 (1). – P. 93-99.
9. Yoshimura K. Intravaginal microbial flora by the 16srNA gene sequencing. / K. Yoshimura, N. Morotomi, K. Fucuda. // American Journal of obstetrics and Gynecology. – 2011. – Vol. 205 (3). – P. 235.
10. Larsen B. Effect of estrogen treatment on the genital tract flora of postmenopausal women. / B. Larsen, C.P. Goplerud, C.R. Petzold [et al.] // Obstet Gynecol. – 1982. – Vol. – 606. – P. 20-24.
11. Nelson H. D. Commonly used types of postmenopausal estrogen for treatment of hot flashes: scientific review. / H. D. Nelson // JAMA. – 2004. – Vol. – 291 (13). – P.1610-1620.
12. Ginkel P. D. Vaginal flora in postmenopausal women: the effect of estrogen replacement. / P. D. Ginkel, D. E. Soper, R. C. Bump [et al.] // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. – 1993. – Vol 1 (2). – P. 94 -97.
13. Heinemann C. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. / C. Heinemann, G. Reid // Can. J. Microbiol. – 2005. Vol 51(9). – P. 777-781.
14. Setty P. Vaginal estrogen use and effects on quality of life and urogenital morbidity in postmenopausal women after publication of the Womens Health initiative in New York City. / P. Setty, L. Redekal, M. P. Warren // Menopause. – 2016. – Vol 23 (1). – P. 7-10.
15. Goldstein I. Practical aspects in the management of vaginal atrophy and sexual dysfunction in perimenopausal and postmenopausal women. / I. Goldstein, J. L. Alexander // J. Sex Med. – 2005. – Vol. – 2 (3). – P. 154-165.
16. Ward J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. / J. H. Ward // J. Am. Stat. Assoc. – 1963. – Vol. – 58. – P. 236-244.

ПОСТУПИЛА: 20.02.2016