

育龄期细菌性阴道病伴盆腔炎性疾病患者阴道菌群和微生态改变及意义

陈云^{1*}, 朱一喜², 袁洁姣¹, 罗喜¹, 唐征宇³

作者单位: 412000 湖南 株洲, 湖南中医药高等专科学校附属第一医院, 1. 妇科; 2. 检验科; 3. 产科

作者简介: 陈云, 毕业于赣南医科大学, 本科, 副主任医师, 主要研究方向为妇科相关疾病治疗

* 通信作者, E-mail: gunsh68@163. com

【摘要】目的 分析育龄期细菌性阴道病(BV)伴盆腔炎性疾病(PID)患者阴道菌群和微生态改变情况及意义。**方法** 选取2020年9月至2022年12月湖南中医药高等专科学校附属第一医院76例育龄期BV患者, 按照是否伴PID, 分为BV组(33例)与BV伴PID组(43例), 并选取同期50例育龄期体检健康者作为对照组, 比较3组阴道菌群密集度、阴道菌群多样性及16S rRNA测序结果。**结果** BV伴PID组、BV组与对照组阴道菌群密集度分级、阴道菌群多样性分级比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比, BV组、BV伴PID组厚壁菌门减少, 并且放线菌门增多; 对照组无加德纳菌, BV组、BV伴PID组加德纳菌较多, 且乳酸菌相较于对照组减少, BV组厌氧菌(如加特纳菌、普雷沃氏菌等)增多, BV伴PID组厌氧菌(如 *G. vaginalis* 等)存在增加趋势, 卷曲乳杆菌存在减少趋势。**结论** 育龄期BV及BV伴PID患者阴道菌群密集度、阴道菌群多样性增加, 微生态平衡发生变化, 厌氧菌增多, 其检测可为疾病诊治提供指导。

【关键词】 育龄期; 细菌性阴道病; 盆腔炎性疾病; 阴道菌群; 微生态

【中图分类号】 R 711. 33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-4020(2024)05-079-04

doi: 10. 3969/j. issn. 1674-4020. 2024. 05. 16

Changes and significance of vaginal microbiota and microecology in patients with bacterial vaginosis and pelvic inflammatory disease of childbearing age

Chen Yun^{1*}, Zhu Yixi², Yuan Jiejiao¹, Luo Xi¹, Tang Zhengyu³

1. Department of Gynecology; 2. Department of Laboratory; 3. Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Zhuzhou Hunan 412000, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: gunsh68@163. com

【Abstract】Objective To analyze the changes and significance of vaginal microbiota and microecology in patients with bacterial vaginosis (BV) and pelvic inflammatory disease (PID) of childbearing age. **Methods** A total of 76 patients with BV of childbearing age who were admitted to the First Affiliated Hospital of Hunan College of Traditional Chinese Medicine from September 2020 to December 2022 were selected. They were divided into BV group (33 cases) and BV with PID group (43 cases) according to the presence or absence of PID. At the same time, 50 healthy individuals of childbearing age were selected as the control group. The density and diversity of vaginal microbiota, and 16S rRNA sequencing results of the three groups were compared. **Results** There were significant differences in the classification of the density and diversity of vaginal microbiota among the BV with PID group, the BV group and the control group ($P < 0.05$). Compared with the control group, Firmicutes was less and Actinobacteria was more in the BV group and the BV with PID group. No *Gardnerella* was found in the control group, while there was much *Gardnerella* in the BV group and the BV with PID group. *Lactobacillus* was less in the BV group and the BV with PID group than in the control group. Anaerobic bacteria such as *G. vaginalis* and *P. vaginalis* in the BV group increased. In the BV with PID group, anaerobic bacteria like *G. vaginalis* showed an

increasing trend, and *L. crispatus* showed a decreasing trend. **Conclusion** The density and diversity of vaginal microbiota in patients with BV and patients with BV complicated with PID of childbearing age are increased. Their microecological balance is changed, and anaerobic bacteria are increased. The detection of vaginal microbiota and microecology can provide guidance for diagnosis and treatment.

【Key words】childbearing age; bacterial vaginosis; pelvic inflammatory disease; vaginal microbiota; microecology

细菌性阴道病(bacterial vaginosis, BV)主要为阴道中有益乳酸菌数目明显减少,其他各类厌氧菌等大量增加,使得阴道微生物失衡所引起的临床症候群^[1]。BV属于下生殖道感染,好发于育龄期妇女。有报道称,育龄期妇女BV发生率高达15%~50%,每年确诊患者达数百万^[2]。与正常育龄期妇女相比,存在BV患者更易出现子宫内膜炎、羊水感染及早产结局,同时盆腔炎症性疾病(pelvic inflammatory disease, PID)与尿路感染风险增加。相关报道称,根据女性群体生殖系统解剖结构与免疫学特征可知,女性生殖系统具有完善自然防御能力,通常难以因感染引发PID,但如果生殖防御系统受损,也有可能因感染引起PID^[3,4]。亦有报道表明,不良性行为及生殖卫生也与PID有关^[5]。女性生殖道属于重要微生态部位,阴道菌群失调和各种妇科疾病存在相互作用以及互为因果关系。阴道微生态保持着动态平衡,一旦受到内源性 & 外源性因素影响,十分容易产生波动,最终转变成病理性组合状态,引起相关疾病^[6]。了解阴道菌群与微生态组成情况,对预防及进一步了解BV及PID具有重要意义。本文探究育龄期BV伴PID患者阴道菌群和微生态改变情况及意义,希望为临床诊治提供依据。

1 临床资料

1.1 一般资料

选取2020年9月至2022年12月湖南中医药高等专科学校附属第一医院76例育龄期BV患者。纳入标准:①子宫完整;②育龄期(绝经前),有性生活史;③符合BV诊断标准^[7];④精神意识正常。排除标准:①处于月经期、妊娠期以及哺乳期;②月经不调女性;③近1周内接受过抗生素治疗;④近48h内发生过性行为;⑤合并阴道出血或除PID外其他生殖系统病变;⑥合并除淋病奈瑟菌和沙眼衣原体感染以外的其他性传播疾病,比如人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染、艾滋病、梅毒等;⑦就诊前存在阴道冲洗、上药或者盆浴行为;⑧宫颈癌患者;⑨当月接受过宫腔或腹腔手术治疗;⑩合并糖尿病、严重脏器(包括心肝肾等)疾病。按照是否伴PID,分为BV组与BV伴PID组。PID诊断标准^[8]:具有宫颈举痛/附件区域压痛/子宫部位压痛症状,宫颈脆性提高、阴道分泌物白细胞水平升高与宫颈粘液脓性,红细胞沉降率增大,血C反应蛋白水平升高,并且实验室显示宫颈衣原体或者淋病奈瑟球菌呈现阳性,同时满足以上标准则诊断为PID。并取同期50

例育龄期体检健康者(阴道清洁度达到I级,未见临床症状,并且Nugent评分范围0~3分)作为对照组。本研究对象均签署知情同意书,研究经医院伦理委员会审批(审批号:HYB-854693)。

1.2 方法

1.2.1 检测标本采集 使用两个无菌棉拭子于受检者阴道侧壁1/3部位取分泌物标本,一个标本用革兰染色,了解阴道微生态情况,另一个标本置于无菌干燥试管之中,存储于-80℃条件下。

1.2.2 阴道微生态评估 革兰染色后予以显微镜检测,相关项目如下:菌群密集度:按照油镜下所示每视野平均细菌数目进行分级,其中,1~9个/视野为I级,10~99个/视野为II级,达到100个/视野为III级,光镜下显示细菌满视野,如果细菌成团或者大量密集覆盖于相应黏膜上皮细胞则为IV级,未见细菌分布为0级。阴道菌群多样性:按照光镜下所示细菌形态进行分级,其中,可以辨别细菌种类为1~3种表示I级,可以辨别细菌种类为4~6种表示II级,可以辨别细菌种类为7~10种表示III级,可以辨别达到11种表示IV级,未见细菌表示0级。

1.2.3 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增与16S rRNA测序 通过Foregene Blood mini试剂盒完成菌群DNA提取过程。扩增序列选择16S rRNA V3可变区,相关通用引物见表1。PCR反应体系(总共50 μL)如下:10×^{Ex}PCR buffer(Mg^{2+})体积5 μL,1% BSA溶液5 μL,Reverse primer(20 μM)体积1 μL,dNTPs mixture体积8 μL,^{Ex}Taq DNA polysaccharase(浓度5 U/μL)体积0.5 μL,Forward primer(20 μM)体积1 μL,双蒸水(ddH₂O)体积26.5 μL,Total DNA体积3 μL。PCR反应条件如下:95℃下连续预变性5 min,接着94℃处理30 s,54℃处理30 s以及72℃处理30 s,总共30个循环,接着72℃处理7 min。进行Nanodrop检测,在保证样品浓度≥500 ng/μL之后,通过Illumina HiSeq测序平台完成测序过程。

表1 引物序列

名称	引物序列
F-341f	5'-GC 夹-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
R-518r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'
GC 夹	CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGGCGGGGCACGGGGG

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理,计数资料用例(%)表示,等级资料比较使用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组阴道菌群密集度比较

BV 伴 PID 组、BV 组与对照组阴道菌群密集度分级比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 3 组阴道菌群密集度比较[例(%)]

组别	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级
BV 伴 PID 组($n=43$)	6(13.95)	8(18.60)	10(23.26)	9(20.93)	10(23.26)
BV 组($n=33$)	6(18.18)	7(21.21)	9(27.27)	5(15.15)	6(18.18)
对照组($n=50$)	0(0.00)	1(2.00)	18(36.00)	29(58.00)	2(4.00)
Z 值			6.443		
P 值			0.040		

2.2 3 组阴道菌群多样性比较

BV 伴 PID 组、BV 组与对照组阴道菌群多样性分级比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组阴道菌群多样性比较[例(%)]

组别	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级
BV 伴 PID 组($n=43$)	0(0.00)	9(20.93)	14(32.56)	11(25.58)	9(20.93)
BV 组($n=33$)	0(0.00)	6(18.18)	6(18.18)	10(30.30)	11(33.33)
对照组($n=50$)	1(2.00)	25(50.00)	23(46.00)	1(2.00)	0(0.00)
Z 值			33.585		
P 值			<0.001		

2.3 3 组 16S rRNA 测序比较

与对照组相比,BV 组、BV 伴 PID 组厚壁菌门(Firmicutes)减少,放线菌门(Actinobacteria)增多(详见图 1);对照组无加德纳菌(Gardnerella),BV 组、BV 伴 PID 组 Gardnerella 较多,且乳酸菌(Lactobacillus)相较于对照组减少(详见图 2),BV 组厌氧菌[比如加特纳菌(*G. vaginalis*)、普雷沃氏菌(*P. vaginalis*)等]增多,BV 伴 PID 组厌氧菌(比如 *G. vaginalis* 等)存在增加趋势,卷曲乳杆菌(*L. crispatus*)存在减少趋势。

3 讨论

女性阴道内部为复杂微生态系统,组成包括解剖结

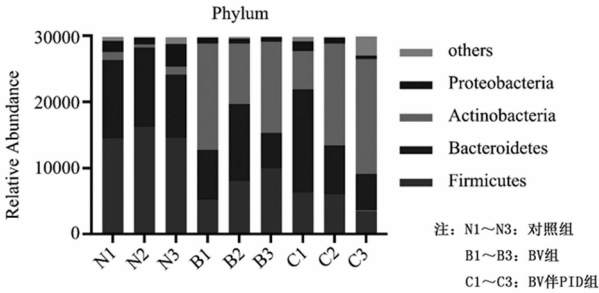


图 1 16S rRNA 测序菌门分布

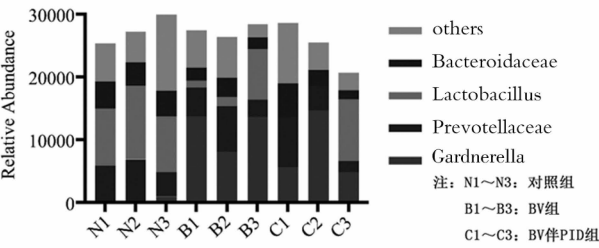


图 2 16S rRNA 测序菌属分布

构、微生态菌群、内分泌调节体系与局部免疫功能等,其和宿主、周围环境共同构成相互制约、相互协调的微生态系统,并且保持动态平衡。随着现代高通量测序技术不断发展,人类微生物项目开展不同状态阴道菌群变化的研究,总共鉴定出超 250 种细菌^[9-10]。育龄期女性体内雌激素表达上调、外源性操作、性生活过多以及阴道分娩等都会对阴道 pH 值产生影响,增加阴道微生态失衡风险。

既往研究指出,每个女性阴道菌群具有独特性,但基本受产乳酸菌调控,而该类细菌大部分源于乳酸菌属,可以起到保护作用,主要通过形成乳酸维持阴道内酸性环境,以此制约病原菌生长^[11-12]。本研究发现,BV 伴 PID 组、BV 组与正常对照组阴道菌群密集度分级比较差异有统计学意义,前两组 IV 级占比较高,提示 BV、BV 伴 PID 患者阴道菌群含量异常增多,炎症反应活跃。对于健康女性而言,阴道菌群构成包括需氧菌以及厌氧菌,比例约为 1:5 ~ 1:10,始终维持动态平衡,并且共同形成一种生物膜屏障,于保持阴道微生态动态平衡、预防相关生殖道感染疾病方面发挥着重要作用^[13-14]。相关报道称,BV 主要特征为阴道之中产生过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)物质导致乳杆菌减少,使得其他微生物大量生长,尤其是厌氧细菌与相关条件致病性细菌大量生长^[15]。本研究中,BV 伴 PID 组、BV 组与正常对照组阴道菌群多样性分级比较差异有统计学意义,前两组 III 级、IV 级占比较高,与谢鲁寒等^[16]研究观点一致,表明 BV、BV 伴 PID 患者阴道菌群多样性增加。本研究发现,与健康对照组相比,BV 组、BV 伴 PID 组 Firmicutes 减少,并且 Actinobacteria 增多,提示

Actinobacteria 可能参与 BV 及 BV 伴 PID 的发生。以往研究表明,阴道加特纳菌、阿托波菌与普雷沃氏菌属于常见条件性致病菌^[17]。本研究发现,健康育龄期妇女阴道微生物之中主要优势菌是 *Lactobacillus*, 包括 *L. crispatus*、加氏乳酸杆菌 (*L. gasseri*) 与惰性乳杆菌 (*L. iners*) 等,其他厌氧菌较少;BV 患者阴道内部菌群多样性明显升高,厌氧菌 (包括 *G. vaginallis* 以及 *P. vaginallis* 等) 替代了优势菌 *Lactobacillus*, BV 伴 PID 患者优势菌 *Lactobacillus* 数量明显减少,同时厌氧菌 *G. vaginallis* 等存在增加趋势。女性阴道 *G. vaginallis* 能够形成生物膜,让 *G. vaginallis* 和其他厌氧菌有效逃避抗生素药物作用^[18]。以往研究指出,*L. crispatus* 增殖水平和健康存在紧密联系,BV 患者阴道内 *L. crispatus* 主导菌群较少,考虑和强酸性阴道环境密切相关^[19]。本研究中,BV 伴 PID 组 *L. crispatus* 存在减少趋势,并且 *G. vaginallis* 等异常增加。提示 BV 可能属于 PID 诱因,并不是造成 PID 直接原因。故猜测 BV 打破了女性生殖道微生态平衡,导致生殖道疾病各种相关致病菌损害微环境定植抗力,相关有害细菌上行到达盆腔诱发 PID 或通过影响女性生殖系统微生态诱发 PID。育龄期女性 BV 能够促使阴道微生态平衡发生变化,影响阴道常驻菌群分布与潜在益生菌属数量的稳定,增加有害厌氧菌数量,最终增加 PID 风险。

综上,与健康育龄期女性相比,育龄期 BV 及 BV 伴 PID 患者阴道菌群密集度、阴道菌群多样性均异常增加,微生态失衡,存在乳酸菌明显减少与厌氧致病细菌大量增殖情况,检测菌群改变情况,了解其结构演替规律,有利于为疾病诊治提供可靠依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

【参考文献】

- [1] Reiter S, Kellogg Spadt S. Bacterial vaginosis: a primer for clinicians [J]. Postgrad Med,2019,131(1):8-18.
- [2] Mizgier M, Jarzabek-Bielecka G, Mruczyk K, et al. The role of diet and probiotics in prevention and treatment of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in adolescent girls and non-pregnant women [J]. Ginek Pol,2020,91(7):412-416.
- [3] Ravel J, Moreno I, Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease [J]. Am J Obstet Gynecol,2021,224(3):251-257.
- [4] Muzny CA, Taylor CM, Swords WE, et al. An updated conceptual model on the pathogenesis of bacterial vaginosis [J]. J Infect Dis,2019,220(9):1399-1405.
- [5] 陈妍,王旺. 中药热奄包及心理干预治疗气滞血瘀型盆腔炎性疾病后遗症疗效及对生活质量影响 [J]. 中国计划生育学杂志,2022,30(9):2054-2059.
- [6] 姚艳红,王丽洁. 白带常规及细菌性阴道病 3 项检测对女性阴道微生态的临床价值 [J]. 中国卫生检验杂志,2022,32(24):3024-3027.
- [7] 向俊秋,刘原君. 2021 年美国 CDC 性传播感染诊疗指南解读 [J]. 中国皮肤性病杂志,2023,37(1):74-81.
- [8] 刘晓娟,范爱萍,薛凤霞. 《2015 年美国疾病控制和预防中心关于盆腔炎性疾病的诊治规范》解读 [J]. 国际妇产科学杂志,2015,42(6):674-675,684.
- [9] Faught BM, Reyes S. Characterization and treatment of recurrent bacterial vaginosis [J]. J Womens Health (Larchmt),2019,28(9):1218-1226.
- [10] Cohen CR, Wierzbicki MR, French AL, et al. Randomized trial of Lactin-V to prevent recurrence of bacterial vaginosis [J]. N Engl J Med,2020,382(20):1906-1915.
- [11] Lev-Sagie A, Goldman-Wohl D, Cohen Y, et al. Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis [J]. Nat Med,2019,25(10):1500-1504.
- [12] Swidsinski S, Moll WM, Swidsinski A. Bacterial vaginosis-vaginal polymicrobial biofilms and dysbiosis [J]. Dtsch Arztebl Int,2023,120(20):347-354.
- [13] Webb L. Probiotics for preventing recurrent bacterial vaginosis [J]. JAAPA,2021,34(2):19-22.
- [14] Falconi-McCahill A. Bacterial vaginosis: a clinical update with a focus on complementary and alternative therapies [J]. J Midwifery Womens Health,2019,64(5):578-591.
- [15] Numanovic N, Ribis S, Cukic J, et al. Quantification of Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae and Lactobacillus spp. in bacterial vaginosis [J]. J Infect Dev Ctries,2021,15(9):1293-1298.
- [16] 谢鲁寒,高爽,彭琳洁,等. 细菌性阴道病及其合并盆腔炎患者的阴道菌群分析 [J]. 中国微生态学杂志,2019,31(5):588-591,600.
- [17] Soper DE. Bacterial vaginosis and surgical site infections [J]. Am J Obstet Gynecol,2020,222(3):219-223.
- [18] 吴君梅,郭宝芝,刘爱珍,等. 宫颈上皮内瘤变与宫颈微生物群落结构的相关性 [J]. 中国微生态学杂志,2020,32(2):211-214,223.
- [19] Deng T, Shang A, Zheng Y, et al. Log (*Lactobacillus crispatus*/*Gardnerella vaginalis*): a new indicator of diagnosing bacterial vaginosis [J]. Bioengineered,2022,13(2):2981-2991.

(收稿日期:2023-09-01 编辑:牟术容)