

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 618.16-008.87-078

Фоменко Н.В.^{1,3}, Хворостова Ю.В.¹, Игнатьева О.А.¹, Акимов И.А.¹, Трухина А.В.¹, Гасилова Н.А.², Кабилов М.Р.³, Иванов М.К.^{1,4}

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОФЛОРЫ В ПРОБАХ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ПАЦИЕНТОК КРУПНОЙ СЕТЕВОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ЕГО ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ЛАКТОБАКТЕРИЙ

¹ЗАО «Вектор-Бест», 630128, Новосибирск, Россия; ²ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», Москва, Россия; ³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия; ⁴Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, Россия

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) проведена оценка содержания ДНК лактобактерий (ЛБ), а также некоторых видов аэробных и анаэробных условно-патогенных бактерий (УПБ) в выборке соскобов урогенитального тракта женщин – пациенток сетевой лаборатории ИНВИТРО. Показано, что снижение содержания ЛБ в общей бактериальной массе (ОБМ) сопровождается повышением встречаемости, концентрации и относительного содержания всех видов условных патогенов, кроме уреаплазм. Для разных видов условных патогенов эти изменения выражены в разной степени. Отмечено повышение видового разнообразия микрофлоры урогенитального тракта при снижении содержания ЛБ.

Ключевые слова: условно-патогенные бактерии; содержание лактобактерий; ПЦР в реальном времени; бактериальный вагиноз.

Fomenko N.V.^{1,3}, Khvorostova Yu.V.¹, Ignatieva O.A.¹, Akimov I.A.¹, Trukhina A.V.¹, Gasilova N.A.², Kabilov M.R.³, Ivanov M.K.^{1,4}

THE SPECIES VARIETY OF MICROFLORA IN SAMPLES FROM UROGENITAL TRACT OF FEMALE PATIENTS OF LARGE NETWORK LABORATORY AND ITS DEPENDENCE OF CONTENT OF LACTOBACILLI

¹The Vector Best, 630128, Novosibirsk, Russia; ²The Independent laboratory INVITRO, Moscow, Russia; ³The institute of chemical biology and fundamental medicine of the Siberian Branch of the Russian academy of sciences, 630090, Novosibirsk, Russia; ⁴The institute of cytology and genetics of the Siberian Branch of the Russian academy of sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

The evaluation of content of DNA of lactobacilli and particular types of aerobic anaerobic opportunistic bacteria in sampling of scrapes from urogenital tract of female patients of the network laboratory INVITRO was implemented. The technique of polymerase chain reaction in real-time was implemented. It is demonstrated that decreasing of content of lactobacilli in total bacterial mass is followed by increasing of occurrence, concentration and relative content of all types of opportunistic pathogens except ureaplasma. These changes are expressed in different degree for different types of opportunistic pathogens. The increasing of varieties of types of microflora of urogenital tract under decreasing of content of lactobacilli is noted.

Key words: opportunistic bacteria; content of lactobacilli; polymerase chain reaction in real-time; bacterial vaginosis.

Введение. К условно-патогенным бактериям (УПБ) относят виды, которые могут являться компонентами нормальной микрофлоры человека, но при снижении резистентности организма участвовать в развитии патологических процессов. В большинстве случаев заболевания с вовлечением УПБ развиваются как вторичные в связи с влиянием перенесенного/протекающего заболевания и/или иных факторов. Повышение концентрации УПБ – признак нарушения нормального состояния микрофлоры. Спектр видов, изменение содержания которых выявляется при дисбиозах, широк и зависит не только от заболевания, но и от анализируемой выборки. Общепринятые методы лабораторного анализа видового разнообразия УПБ, а также оценки их относительного содержания – культуральные и микроскопические. Культуральные методы далеко не во всех случаях позволяют определить вид УПБ, многие из которых являются некультивируемыми или трудно культивируемыми, а микроскопические методы характеризуются относительно низкой производительностью, высокими требованиями к подготовке исполнителя и невозможностью точного определения видов бактерий [1–3].

Для корреспонденции:

Хворостова Юлия Викторовна, науч. сотр.
Адрес: 630128, Новосибирск, ул. Пасечная, 3
E-mail: Khvorostova@ngs.ru

В качестве классического примера патологии, ассоциированной с повышением содержания УПБ, можно назвать бактериальный вагиноз (БВ) – невоспалительный синдром, важнейшим признаком которого является дисбаланс микрофлоры влагалища: снижение относительного содержания лактобактерий (ЛБ) и связанное с этим увеличение доли УПБ, прежде всего анаэробных [1, 2, 4, 5]. Результат этих событий – нарушение протективных функций микрофлоры влагалища, приводящее к повышенному риску развития воспалительных заболеваний. В последнее десятилетие появились диагностические наборы реагентов для определения ДНК УПБ в клинических пробах с помощью полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяющие выявлять различные бактерии, включая некультивируемые виды, определять их таксономическую принадлежность, а также проводить количественные оценки. Большинство этих тестов ориентировано на диагностику БВ, поскольку это заболевание широко распространено и хорошо изучено. Наиболее часто при БВ регистрируется повышение содержания *Gardnerella vaginalis*, но с БВ ассоциировано и множество других видов УПБ [6–8]. Спектр видов, выявляемых у пациенток с диагнозом БВ, может значительно варьировать, однако связь этих вариаций с особенностями развития заболевания до сих пор не ясна. Широкое разнообразие известных видов УПБ, ассоциированных с БВ, препятствует

включению всех их в один молекулярный тест. В результате такие тесты могут различаться как по перечню выявляемых маркеров, так и по формату получаемых результатов в их трактовке [9–12].

В настоящем исследовании методом ПЦР-РВ проведены оценка видового разнообразия УПБ в соскобах урогенитального тракта женщин – пациенток сетевой лаборатории ИНВИТРО, собранных в разных городах России, и количественный анализ содержания ДНК отдельных видов в зависимости от доли ЛБ в общей бактериальной массе.

Материалы и методы. Для исследования использовали 620 урогенитальных соскобов от пациенток репродуктивного возраста (14–50 лет), каждый из которых ресуспендировали в 300 мкл транспортного раствора (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Образцы любезно предоставлены отделениями независимой лаборатории ИНВИТРО (Москва и Новосибирск). Предварительно из выборки исключили образцы, в которых выявлена ДНК *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* и *Trichomonas vaginalis*, а также пробы, содержащие менее 10^5 копий и 250 копий в ПЦР-пробе ДНК бактерий и человека соответственно.

Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл пробы с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (ЗАО «Вектор-Бест»). Наличие ингибирования ПЦР контролировали, учитывая результаты амплификации ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО), входящего в состав набора для выделения. Наборы реагентов «РеалБест ДНК *Candida albicans*/Fungi», «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis*/*Ureaplasma species*», «РеалБест ДНК *Mycoplasma hominis*/*Mycoplasma genitalium*», «РеалБест ДНК *Trichomonas vaginalis*/*Neisseria gonorrhoeae*», «РеалБест ДНК *Mobiluncus mulieris*/*Mobiluncus curtisii*», «РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum* / *Ureaplasma parvum*» (ЗАО «Вектор-Бест») использовали для определения ДНК соответствующих микроорганизмов в анализируемых пробах. Содержание суммарной бактериальной ДНК, ДНК ЛБ и ДНК человека в пробах оценивали с помощью наборов «РеалБест ЛактоНорм» и «РеалБест Валидация образца» (ЗАО «Вектор-Бест»). Для выявления и количественных оценок содержания ДНК *Lactobacillus iners*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Leptotrichia* spp., *L. amnionii* group, бактерий BVAB2, BVAB3, *Candidatus Saccharimonas aalborgensis* (*Bacteria Candidate Division* TM7), *Veillonella*/*Dialister* spp., *Gemella* spp., *Aerococcus* spp., *Anaerococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* сконструированы лабораторные варианты комплектов реагентов для ПЦР-РВ, включающие родоспецифичные или видоспецифичные праймеры и флуоресцентно меченные зонды. Для большинства перечисленных видов мишенью для амплификации были консервативные участки гена 16S рРНК, для *Mobiluncus curtisii* – консервативный участок гена *Cpn60*, для *E. coli* – *UidA*, для *Streptococcus* spp. – *tuf*. Перечень выявляемых видов бактерий, повышение количества которых характерно для дисбиозов урогенитального тракта женщин, составлен на основании анализа данных литературы.

Для ПЦР-РВ использовали амплификатор с детекцией в режиме реального времени CFX96 Touch™ («Bio-Rad», США). Количественную оценку ДНК проводили по калибровочным кривым, построенным по результатам анализа серии разведений известных концентраций стандартного

образца на транспортном растворе. Стандартные образцы представляли собой синтетические фрагменты ДНК, включавшие фрагмент анализируемого гена. Если концентрация ДНК какой-либо УПБ в пробе соответствовала содержанию, характерному для БВ, пробу считали положительной по данному маркеру. Пороговое содержание, при превышении которого концентрацию данного вида УПБ считали характерной для БВ, выбирали с учетом данных литературы [8, 11, 13, 14]. Для ДНК *G. vaginalis*, *Prevotella* spp., *Veillonella* spp., *Anaerococcus* spp. и *Atopobium vaginae* считали положительными пробы с содержанием $>10^5$ копий на соскоб, для остальных видов бактерий – $>10^4$ копий на соскоб.

Для установления или подтверждения видовой принадлежности всех видов УПБ определяли нуклеотидные последовательности переменных участков гена 16S рРНК с помощью праймеров, соответствующих анализируемому ПЦР-фрагменту, и набора «Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit» («Applied Biosystems», США) в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (Новосибирск). При определении последовательностей ПЦР-фрагмента гена 16S рРНК использовали праймеры F8 5'-TTTGATCTTGGCTCAGGACGAACG-3' и R1110 5'-CTCACGACACGAGCTG-3'. Сравнение и анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программ BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Секвенирование гена 16S рРНК (участки V3–V4) в 8 пробах, не содержащих ЛБ, для которых не удалось выявить доминирующий вид бактерий, проведено на платформе MiSeq («Illumina», США) с использованием парно-концевого чтения 2x250 нуклеотидов. Секвенирование и анализ полученных данных осуществлены в ЦКП «Геномика» СО РАН.

Результаты и обсуждение. Видовое и генетическое разнообразие бактерий в проанализированной выборке. В выборке обнаружены все виды УПБ, выбранные в качестве маркеров, как минимум 1 вид УПБ выявлен в 68,1% проб. Частота встречаемости различных бактерий приведена в таблице, в которой отдельно представлена оценка встречаемости УПБ в образцах с разным содержанием ЛБ.

Выявление различных видов УПБ в выборке из 620 урогенитальных соскобов от пациенток лаборатории ИНВИТРО

Вид (группа) бактерий, содержание в соскобе	Встречаемость в концентрации не ниже указанной, %			А/В
	в общей выборке (n = 620)	А (n = 97)	В (n = 401)	
<i>Gardnerella vaginalis</i> > 10^{5*}	47,9 ± 2,1	74 ± 1,9	24,4 ± 3,9	3,03
<i>Prevotella</i> spp. > 105	47,3 ± 2,1	76,4 ± 1,8	33,2 ± 3,4	2,30
<i>Anaerococcus</i> spp. > 10^5	42,8 ± 2,3	74,2 ± 1,9	24,9 ± 3,8	2,98
<i>Veillonellaceae</i> > 10^5	34,8 ± 2,6	77,4 ± 1,7	17,5 ± 4,2	4,22
<i>Atopobium vaginae</i> > 10^5	22,9 ± 3,1	60,9 ± 2,9	1,8 ± 5,0	33,83
<i>Gemella</i> spp. > 10^4	18,6 ± 3,3	24,6 ± 5,7	12 ± 4,5	2,05
<i>Leptotrichia amnionii</i> group > 10^4	14,6 ± 3,4	46,8 ± 4,0	1,5 ± 5,1	31,2
<i>Mycoplasma hominis</i> > 10^4	10,3 ± 3,6	33,5 ± 5,0	2,1 ± 5,0	15,95
Bacteria BVAB2 > 10^4	9,2 ± 3,6	39,6 ± 4,6	0	∞
<i>Mobiluncus mulieris</i> > 10^4	4,3 ± 3,8	17,2 ± 6,3	0	∞
<i>Mobiluncus curtisii</i> > 10^4	3,1 ± 3,9	23,3 ± 5,8	0	∞
<i>Candidatus Saccharimonas aalborgensis</i> (TM7) > 10^4	2,3 ± 3,9	8,1 ± 6,9	0	∞

Примечание. А – встречаемость в группе с 0–20% ЛБ в общей бактериальной массе (ОБМ); В – встречаемость в группе с 80–100% ЛБ в ОБМ; А/В – соотношение значений встречаемости в группах А и В; * – критерий, при котором проба считалась положительной.

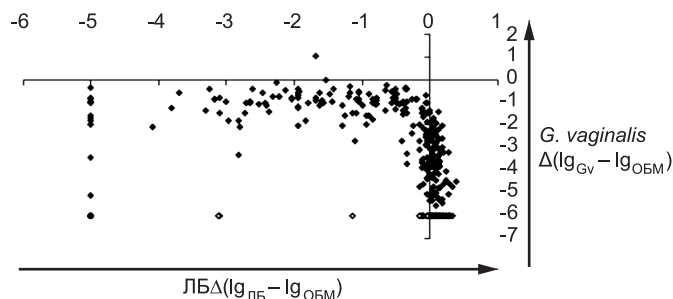


Рис. 1. Корреляция содержания ЛБ и *G. vaginalis* в индивидуальных пробах.

Наиболее часто выявляемым видом УПП, как и ожидалось, оказался факультативный анаэроб *G. vaginalis*, длительное время считавшийся этиологическим агентом БВ. Достаточно высокие концентрации *G. vaginalis* могут наблюдаться при отсутствии клинических проявлений, в том числе на фоне преобладания лактофлоры [6, 8]. *G. vaginalis* инициирует образование биопленок, в составе которых как гарднереллы, так и иные виды УПП приобретают дополнительную устойчивость к антибиотикам, что затрудняет лечение БВ и приводит к рецидивам после его завершения. У здоровых женщин биопленки, образованные *G. vaginalis*, практически не выявляются [15–17].

Количественные оценки содержания гарднерелл свидетельствуют об их антагонизме с ЛБ (рис. 1), являющемся известным фактом.

Следующими по частоте встречаемости были бактерии рода *Prevotella*, представленные как минимум 5 видами (*P. amnii*, *P. timonensis*, *P. intermedia*, *P. disiens*, *P. bivia*). Как и гарднереллы, представители рода *Prevotella* часто (до 55%) встречаются в низких титрах у клинически здоровых женщин и способны к формированию биопленок [6, 18, 19]. В нашей работе в пробах с содержанием *G. vaginalis* < 10⁵ *Prevotella spp.* в количестве > 10⁵ копий обнаружены в 33% проб.

Выявленные представители рода *Anaerococcus*, оказавшегося на 3-м месте по встречаемости, были представлены видами *A. vaginalis*, *A. hydrogenalis*, *A. lactolyticus*, *A. tetradius*. *Veillonella spp.* представлены видами *V. montpelierensis* и *V. parvula*, кроме того выявлены *Dialister microaerophilus*.

Atopobium vaginae является наряду с *G. vaginalis* одним из наиболее известных маркеров БВ и часто обнаруживается в составе нормальной микрофлоры урогенитального тракта женщин [19, 20]. В нашем исследовании *A. vaginae* выявляли реже, чем вышеперечисленные виды, и практически всегда – на фоне высокого содержания *G. vaginalis*. В 2 случаях *A.*

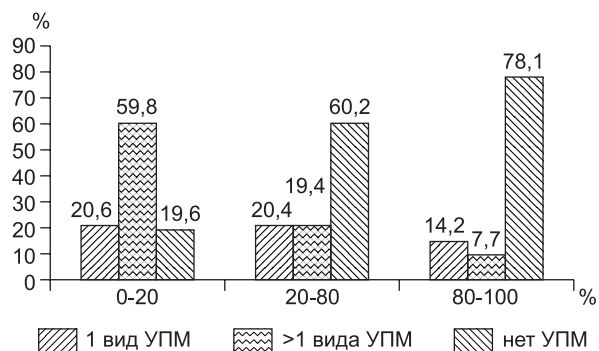


Рис. 2. Выявление ≥ 1 вида УПП в группах, различающихся по содержанию ЛБ. Внизу приведено содержание ЛБ в пробе.

vaginae выявлен в пробах с низким (< 10⁵) содержанием *G. vaginalis*.

Бактерии семейства *Leptotrichiaceae*, для повышенного содержания которых показана ассоциация с репродуктивными патологиями у женщин [21], оказались на 7-м месте по встречаемости. *L. amnionii* и *Sneathia sanguinegens*, генетически близкая к лептотрихиям, выявлены с равной частотой. В 6 случаях *L. amnionii* и *Sneathia sanguinegens* обнаружены в пробах с низким (< 10⁵) содержанием *G. vaginalis*.

Mycoplasma hominis, *M. mulieris*, *M. curtisii*, BVAB2 и бактерии ТМ7 выявляли реже, полученный результат согласуется с данными литературы: эти виды УПП считаются более специфичными маркерами БВ и гораздо реже обнаруживаются у здоровых женщин [2, 4, 8, 19, 22]. Последние 2 разновидности некультивируемых в стандартных условиях бактерий охарактеризованы в последние годы при помощи секвенирования в исследованиях, направленных на поиск более специфичных маркеров БВ. Первые сообщения о бактериях ТМ7, ДНК которых выделена из проб окружающей среды, включая почву, пресную и морскую воду, появились в 2001 г. Позже найдена их ассоциация с некоторыми заболеваниями: БВ, пародонтитом и воспалительными заболеваниями кишечника. В 2013 г. на основании полной последовательности генома уточнено филогенетическое положение бактерий ТМ7 и предложено новое название «*Candidatus Saccharimonas aalborgensis*» gen. et sp. nov. [23].

Нельзя исключить присутствие в пробах и других видов из данных групп, поскольку не все образцы секвенированы. Также нельзя исключить возможности микстинфицирования несколькими видами из одной группы, что затрудняет выявление менее представленного вида секвенированием [24].

Особенности видового состава бактерий в пробах с разной долей ДНК ЛБ. Как видно из таблицы, для всех рассмотренных УПП показана корреляция между частотой обнаружения каждого из перечисленных видов УПП и снижением доли ДНК ЛБ. В наименьшей степени это касалось *G. vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Anaerococcus spp.* и *Veillonellaceae*, относительно часто обнаруживаемых при высоком содержании ЛБ. Встречаемость остальных видов в группах с высоким и низким содержанием ЛБ различалась более чем на порядок. При этом *M. mulieris*, *M. curtisii*, ТМ7 и BVAB2 в группе с высоким содержанием ЛБ (80–100%), характерным для нормальной микрофлоры, вообще не выявлены. Содержание *M. hominis* также коррелировало со снижением доли ЛБ, и в данном отношении этот вид вел себя так же, как общепризнанные маркеры БВ. Генетически близкие виды рода *Ureaplasma* не продемонстрировали корреляции с содержанием ЛБ в пробе, в некоторых случаях при нормальном (преобладающем) содержании ЛБ наблюдалось высокое содержание как *U. parvum*, так и *U. urealyticum*. Полученные результаты соответствуют данным литературы, согласно которым *M. hominis* в отличие от видов рода *Ureaplasma* является маркером БВ (см. *Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus*, World Health Organization, 2013, и ссылки в источнике).

Еще одним параметром, отличающим пробы с разным содержанием ЛБ, явился процент проб, в котором преобладающим видом ЛБ был *Lactobacillus iners*. Данный вид составлял большую часть лактофлоры в 66,7% проб с долей ЛБ < 20%, в 51,6% проб с долей ЛБ 20–80% и в 46,8% проб с долей ЛБ > 80%.

Для проб с низким содержанием ДНК ЛБ оказалась характерной не только повышенная частота встречаемости ДНК любой УПП, но и их более широкое видовое разнообразие. Более 1 вида УПП детектировано в 59,8% проб со

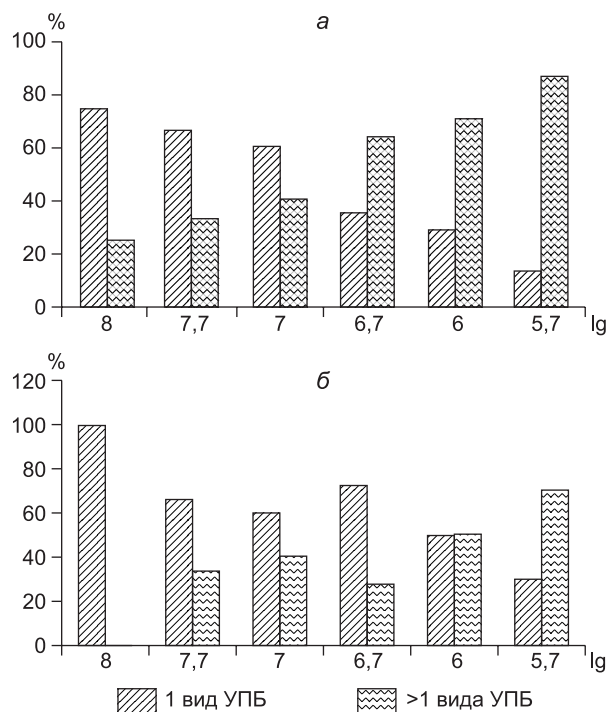


Рис. 3. Зависимость частоты выявления 1 или > 1 вида УПБ в пробе от содержания в ней ДНК *G. vaginalis* (а) и *Prevotella* spp. (б).

сниженным содержанием ЛБ (рис. 2), в то же время в 78,1% проб с высоким содержанием ЛБ не выявлен ни один из рассматриваемых патогенов.

В 21,9% проб с преобладанием ЛБ также обнаружены УПБ в высоких концентрациях, что, возможно, связано с индивидуальными особенностями или переходным статусом биоценоза влагалища. Ни в одной из проб не выявлено одновременного присутствия всех рассмотренных УПБ, однако в 2 пробах присутствовали все УПБ, кроме *M. mulieris*, а в 1 – кроме ТМ7. В 19 пробах с низким содержанием ЛБ ни один из рассмотренных видов УПБ не определен в качестве доминирующего при помощи ПЦР-РВ, что можно объяснить либо недостаточным набором выявляемых видов, либо тем, что ОБМ представлена большим числом видов, каждый из которых присутствует в относительно невысокой концентрации. Для 7 из этих проб при помощи секвенирования по Сэнгеру удалось определить следующие виды: в 1 случае *Atopobium rinae*, в 2 – *Streptococcus anginosus*, в 3 – *Escherichia coli*, в 1 – *Klebsiella pneumoniae*. При высокопроизводительном секвенировании гена 16S рРНК на платформе MiSeq в пробах с невыявленным доминирующим видом УПБ в количестве > 1% обнаружены *Gemella* spp., *Granulicatella* spp., *Porphyromonas* spp., *Haemophilus* spp., *Scardovia inopinata* и *Streptobacillus moniliformis*. Фрагменты гена 16S рРНК ЛБ при этом анализе выявлены в 0,1% случаев.

Для наиболее часто встречающихся УПБ (*G. vaginalis* и *Prevotella* spp.) отмечена положительная корреляция между содержанием ДНК этих видов в пробе и видовым разнообразием УПБ. Из рис. 3 видно, что чем выше содержание ДНК как *G. vaginalis*, так и *Prevotella* spp. в пробе, тем характернее для этой пробы выявление более 1 вида УПБ. Это может быть связано с тем, что биопленки, образуемые *G. vaginalis*, способствуют размножению других УПБ, защищая их от воздействия перекиси водорода и молочной кислоты, вырабатываемых с участием ЛБ. Наличие биопленки, образованной *G. vaginalis*, значительно активизирует рост *P. bivia* [25].

Для *A. vaginae*, *L. amnionii* group, *M. mulieris*, BVAB2, ТМ7, *Veillonella* spp., *Gemella* spp. и *Anaerococcus* spp. подобной зависимости не отмечено. В единичных пробах с содержанием *G. vaginalis* и/или *Prevotella* spp. не выше 10^5 на соскоб в более высокой концентрации выявлены иные виды УПБ, в том числе характерные для аэробного вагинита (*A. vaginae*, *L. amnionii* group, *M. mulieris*, BVAB2, ТМ7, *E. coli*, *Streptococcus* spp. и *Staphylococcus* spp.).

В исследованной выборке лишь в единичных пробах выявлены *Aerococcus* spp. и BVAB3, и ни в одном случае они не были доминирующим видом, несмотря на то что во многих публикациях для этих видов показана высокая частота встречаемости и концентрация при снижении содержания ЛБ, характерном для БВ.

Как содержание, так и видовое разнообразие УПБ, выявляемых в урогенитальных соскобах пациенток репродуктивного возраста, существенно повышается при снижении доли ЛБ в ОБМ. В большинстве случаев содержание УПБ демонстрирует обратную корреляцию не только с долей ЛБ в ОБМ, но и с их абсолютным содержанием в пробе (данные не приводятся). Несмотря на то что *G. vaginalis* и *Prevotella* spp., как правило, являются преобладающими видами в случае низкого содержания ЛБ в ОБМ, возможны ситуации, когда доминирует иной вид УПБ. Можно выделить небольшое число УПБ, повышение содержания хотя бы одной из которых регистрируется в подавляющем большинстве случаев БВ. К ним можно отнести *G. vaginalis* и виды рода *Prevotella*, которые выявлены в качестве доминирующих у большинства пациенток с проявлениями БВ. Другие виды, список которых значителен, более специфичны для БВ и практически не встречаются при преобладании ЛБ. Частота их обнаружения при нарушениях микрофлоры может быть низкой и значительно сильнее зависеть от анализируемой выборки. Не исключено, что задача улучшения диагностических характеристик молекулярных тестов для диагностики БВ может требовать учета возрастных, расовых и популяционных особенностей микрофлоры женщин репродуктивного возраста.

Диагностические характеристики коммерческих молекулярных тестов в отношении клинических симптомов БВ, как правило, близки, несмотря на различия в спектре маркеров и алгоритмах учета результатов. Следует учитывать общие ограничения молекулярных методов при диагностике дисбиотических состояний. «Золотыми стандартами» диагностики БВ до сих пор являются критерии, основанные на клинических признаках заболевания и микроскопическом анализе окрашенных мазков. Если учесть характер получаемой информации, диагностические характеристики молекулярных тестов должны в целом соответствовать характеристикам микроскопических методов. ПЦР-анализ по сравнению с микроскопией обладает рядом ограничений, в частности не дает информации о таких важных критериях, как содержание лейкоцитов и ключевых клеток. Поэтому нередки расхождения между результатами молекулярного тестирования и оценками, полученными с помощью классических подходов [13, 26, 27]. Существует возрастной, расовое и популяционное разнообразие вариантов микрофлоры урогенитального тракта клинически здоровых женщин, у которых могут наблюдаться низкое содержание ЛБ, функции которых компенсируются иными микроорганизмами, а также существенные изменения состава микрофлоры, не связанные с БВ [20, 28, 29]. Учитывая, что этиология БВ неясна, а вопрос о необходимости медицинского вмешательства в случае бессимптомного БВ до сих пор открыт, на наш взгляд, следует с осторожностью относиться к постановке диагноза и выбору терапии на основании данных, полученных исключительно методом ПЦР.

Заключение. В настоящее время важно не подвергать сомнению, что качественное выявление любых УПБ без оценки их содержания может приводить к гипердиагностике при анализе нарушений биоценоза урогенитального тракта. Поэтому уместно применение молекулярных тестов, предполагающих оценку концентрации ДНК разных групп микроорганизмов, то или иное содержание которых может быть характерно для разных состояний микробиоценоза. В целом выбор списка определяемых видов при построении теста для диагностики БВ является компромиссом между потребительскими (пропускная способность и стоимость) и диагностическими (специфичность, чувствительность, возможность однозначно классифицировать состояния биоценоза) характеристиками теста. Чем шире список видов, тем меньше вероятность ситуации, когда у пациентки на фоне низкого относительного содержания ЛБ в ОБМ, указывающего на дисбиоз, не выявлен доминирующий представитель условно-патогенной микрофлоры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кира Е.Ф. *Бактериальный вагиноз*. М.: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2012.
2. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Thomas K.K., Mitchell C.M., Marrazzo J.M. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(3): 721–6.
3. Srinivasan S., Fredricks D.N. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008, Article ID 750479, doi:10.1155/2008/750479.
4. Srinivasan U., Ponnaluri S., Villareal L., Gillespie B., Wen A., Miles A. Gram stains: A resource for retrospective analysis of bacterial pathogens in clinical studies. *PLoS ONE*. 2012; 7(10): e42898. doi:10.1371/journal.pone.0042898.
5. Oakley B.B., Fiedler T.L., Marrazzo J.M., Fredricks D.N. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl. Env. Microbiol.* 2008; 74(15): 4898–909.
6. Zozaya-Hinchliffe M., Lillis R., Martin D.H., Ferris M.J. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1812–9.
7. Ling Z., Kong J., Liu F., Zhu H., Chen X., Wang Y. et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*. 2010; 11:488. doi: 10.1186/1471-2164-11-488.
8. Shipitsyna E., Roos A., Datcu R., Hallén A., Fredlund H., Jensen J.S. et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age—sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One*. 2013; 8(4): e60670. doi: 10.1371/journal.pone.0060670.
9. Шипицына Е.В., Мартикийнен З.М., Воробьева Н.Е. Ермошкина М.С., Степанова О.С., Донников А.Е. и др. Применение теста Фемофлор для оценки микробиоценоза влагалища. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2009; 3: 44–50.
10. Menard J.P., Mazouni C., Fenollar F., Raoult D., Boubli L., Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 29(12): 1547–52.
11. Cartwright C.P., Lembke B.D., Ramachandran K., Body B.A., Nye M.B., Rivers C.A. et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2321–9.
12. Андосова Л.Д., Конторщикова К.Н., Качалина О.В., Белов А.В., Гонова Е.С., Куделькина С.Ю. Характеристика биоценозов урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 1: 51–3.
13. Menard J.P., Fenollar F., Henry M., Bretelle F., Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(1): 33–43.
14. Twin J., Bradshaw C.S., Garland S.M., Fairley C.K., Fethers K., Fethers K. et al. The potential of metatranscriptomics for identifying screening targets for bacterial vaginosis. *PLoS ONE*. 2013; 8(9): e76892. doi:10.1371/journal.pone.0076892.
15. Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., Ladhoff A., Swidsinski S., Hale L. et al. Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 2005; 106: 1013–23.
16. Patterson J.L., Stull-Lane A., Girerd P.H., Jefferson K.K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 2010; 156(Pt 2): 392–9.
17. Muzny C.A., Schwebke J.R. *Gardnerella vaginalis*: Still a prime suspect in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Curr Infect Dis Rep*. 2013; DOI 10.1007/s11908-013-0318-4.
18. Кулакова В.И., Савельева Г.М., Манухина И.Б., ред. *Гинекология. Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
19. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W. et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*. 2012; 7(6): e37818. doi: 10.1371/journal.pone.0037818.
20. Zhou X., Brown C.J., Abdo Z., Davis C.C., Hansmann M.A., Joyce P. et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*. 2007; 1: 121–33.
21. Decroix V., Goudjil S., Kongolo G., Mammeri H. ‘Leptotrichia amnionii’, a newly reported cause of early onset neonatal meningitis. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62: 785–8.
22. Marrazzo J.M., Thomas K.K., Fiedler T.L., Ringwood K., Fredricks D.N. Relationship of Specific Vaginal Bacteria and Bacterial Vaginosis Treatment Failure in Women Who Have Sex with Women: A Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* 2008; 149(1): 20–8.
23. Albertsen M., Hugenholtz P., Skarshewski A., Nielsen K.L., Tyson G.W., Nielsen P.H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat. Biotechnol.* 2013; 6: 533–8.
24. Gonzalez J.M., Portillo M.C., Belda-Ferre P., Mira A. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS ONE*. 2012; 7(1): e29973. doi: 10.1371/journal.pone.0029973.
25. Machado A., Jefferson K.K., Cerca N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(6): 12004–12.
26. Brotman R.M., Ravel J. *Ready or Not: The molecular diagnosis of bacterial vaginosis*. CID, 2008; 47: 44–6.
27. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S.K., McCulle S.L. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108 (Suppl. 1): 4680–7.
28. Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004; 150: 2565–73.
29. Srinivasan S., Liu C., Mitchell C.M., Fiedler T.L., Thomas K.K., Agnew K.J. et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS ONE*. 2010; 5(4): e10197. doi: 10.1371/journal.pone.0010197.

REFERENCES

1. Kira E.F. *Bacterial vaginosis*. М.: ООО «Медитсинское информатсионное агентство»; 2012. (in Russian)
2. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Thomas K.K., Mitchell C.M., Marrazzo J.M. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(3): 721–6.
3. Srinivasan S., Fredricks D.N. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008, Article ID 750479, doi:10.1155/2008/750479.
4. Srinivasan U., Ponnaluri S., Villareal L., Gillespie B., Wen A., Miles A. Gram stains: A resource for retrospective analysis of bacterial pathogens in clinical studies. *PLoS ONE*. 2012; 7(10): e42898. doi:10.1371/journal.pone.0042898.
5. Oakley B.B., Fiedler T.L., Marrazzo J.M., Fredricks D.N. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl. Env. Microbiol.* 2008; 74(15): 4898–909.

6. Zozaya-Hinchliffe M., Lillis R., Martin D.H., Ferris M.J. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48: 1812–9.
7. Ling Z., Kong J., Liu F., Zhu H., Chen X., Wang Y. et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics.* 2010; 11:488. doi: 10.1186/1471-2164-11-488.
8. Shipitsyna E., Roos A., Dactu R., Hallén A., Fredlund H., Jensen J.S. et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age—sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One.* 2013; 8(4): e60670. doi: 10.1371/journal.pone.0060670.
9. Shipitsyna E.V., Martikajnen Z.M., Vorob'eva N.E. Ermoshkina M.S., Stepanova O.S., Donnikov A.E. et al. Application of the test Femoflor to assess vaginal microbiocenosis. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2009; 3: 44–50. (in Russian)
10. Menard J.P., Mazouni C., Fenollar F., Raoult D., Boubli L., Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 29(12): 1547–52.
11. Cartwright C.P., Lembke B.D., Ramachandran K., Body B.A., Nye M.B., Rivers C.A. et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2321–9.
12. Andosova L. D., Kontorshhikova K.N., Kachalina O.V., Belov A.V., Gonova E.S., Kudel'kina S.Ju. Characteristic of biocenosis urogenital tract of reproductive age women. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2013; 1: 51–3. (in Russian)
13. Menard J.P., Fenollar F., Henry M., Bretelle F., Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(1): 33–43.
14. Twin J., Bradshaw C.S., Garland S.M., Fairley C.K., Fethers K., Fethers K. et al. The potential of metatranscriptomics for identifying screening targets for bacterial vaginosis. *PLoS ONE.* 2013; 8(9): e76892. doi:10.1371/journal.pone.0076892.
15. Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., Ladhoff A., Swidsinski S., Hale L. et al. Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis. *Obstetrics & Gynecology.* 2005; 106: 1013–23.
16. Patterson J.L., Stull-Lane A., Girerd P.H., Jefferson K.K. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology.* 2010; 156(Pt 2): 392–9.
17. Muzny C.A., Schwabke J.R. *Gardnerella vaginalis*: Still a prime suspect in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Curr Infect Dis Rep.* 2013; DOI 10.1007/s11908-013-0318-4.
18. Kulakova V.I., Savel'eva G.M., Manuhina I.B., red. *Ginekologiya. National guidelines.* M.: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
19. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W. et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One.* 2012; 7(6): e37818. doi: 10.1371/journal.pone.0037818.
20. Zhou X., Brown C.J., Abdo Z., Davis C.C., Hansmann M.A., Joyce P. et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.* 2007; 1: 121–33.
21. Decroix V., Goudjil S., Kongolo G., Mammeri H. 'Leptotrichia amnionii', a newly reported cause of early onset neonatal meningitis. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62: 785–8.
22. Marrazzo J.M., Thomas K.K., Fiedler T.L., Ringwood K., Fredricks D.N. Relationship of Specific Vaginal Bacteria and Bacterial Vaginosis Treatment Failure in Women Who Have Sex with Women: A Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* 2008; 149(1): 20–8.
23. Albertsen M., Hugenholtz P., Skarshewski A., Nielsen K.L., Tyson G.W., Nielsen P.H. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes. *Nat. Biotechnol.* 2013; 6: 533–8.
24. Gonzalez J.M., Portillo M.C., Belda-Ferre P., Mira A. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS ONE.* 2012; 7(1): e29973. doi: 10.1371/journal.pone.0029973.
25. Machado A., Jefferson K.K., Cerca N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(6): 12004–12.
26. Brotman R.M., Ravel J. Ready or Not: *The molecular diagnosis of bacterial vaginosis.* CID, 2008; 47: 44–6.
27. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S.K., McCulle S.L. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108 (Suppl. 1): 4680–7.
28. Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* 2004; 150: 2565–73.
29. Srinivasan S., Liu C., Mitchell C.M., Fiedler T.L., Thomas K.K., Agnew K.J. et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS ONE.* 2010; 5(4): e10197. doi: 10.1371/journal.pone.0010197.

Поступила 14.05.14
Received 14.05.14

Вниманию авторов!

Начинается подписка на журнал
«Клиническая лабораторная диагностика»
на II полугодие 2015 г.
Индекс журнала – 71442,
в Каталоге агентства «Роспечать».