

На правах рукописи

НАЗАРОВА

Вероника Викторовна

**КЛИНИКО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ
БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2020 год

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научный руководитель:

Савичева Алевтина Михайловна – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ

Официальные оппоненты:

Кира Евгений Федорович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра женских болезней и репродуктивного здоровья института усовершенствования врачей, заведующий;

Чухловин Алексей Борисович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.Горбачевой, лаборатория трансплантологии, заведующий.

Ведущая организация: ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «23» июня 2020 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 при ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://www.nrcerm.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук**

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Совершенствование методов клинической и лабораторной диагностики бактериального вагиноза (БВ) - преобладающего нарушения микробиоты влагалища у женщин репродуктивного возраста, в настоящее время является актуальной проблемой клинической лабораторной диагностики. Значимость БВ (шифр по Международной Классификации Болезней МКБ-10 – N89.8 – другие невоспалительные болезни влагалища) обусловлена широкой распространенностью – от 7% до 68%, которая обусловлена регионом проживания, этнической/расовой принадлежностью и обследуемой популяцией (Kenyon S., Colebunders R., Crucitti T., 2013). Более того, исследования последних лет показывают, что это заболевание снижает качество жизни женщины, а также ассоциировано с рядом воспалительных заболеваний органов мочеполового тракта и является одной из частых причин осложнений беременности (Donati L., Di Vico A., Nucci M., 2010; Allsworth J.E., Peipert J.F., 2011; Taylor B.D., Darville T., Haggerty C.L., 2013; Haggerty C.L., et al., 2016). Кроме всего прочего, в течение 12 месяцев после лечения у 60% женщин наблюдаются рецидивы БВ (Bradshaw C.S., 2006). Вследствие чего, модификация клинико-лабораторных критериев диагностики данного заболевания обеспечит своевременную диагностику и повысит эффективность лечения БВ, что обеспечит сохранение репродуктивного здоровья женщины.

Для диагностики БВ используется ряд клинических и лабораторных методов. Метод Амсея – основной метод клинико-лабораторной диагностики, включает в себя 4 критерия, которые отличаются друг от друга по чувствительности и специфичности: наличие специфических выделений из влагалища, рН вагинальных выделений выше 4,5, положительный аминный тест, а также обнаружение при микроскопическом исследовании нативного препарата отделяемого влагалища «ключевых» клеток (Amsel R., 1983). Для установления диагноза БВ достаточно наличия 3 из этих 4 критериев. Преимуществом метода Амсея является возможность быстро установить диагноз БВ во время приема врача и сразу назначить терапию, недостатками являются отсутствие возможности для микроскопического исследования нативного препарата у большинства врачей, а также субъективность метода.

Основным методом лабораторной диагностики БВ является метод Нуджента (Nugent P.R., Krohn M.A., Hillier S.L., 1991), основанный на подсчете 3 бактериальных морфотипов (морфотип лактобацилл, морфотип грамвариабельных палочек и морфотип

изогнутых палочек), представленных в препаратах вагинального отделяемого, окрашенных по Граму. Относительно высокая чувствительность и специфичность, высокая степень стандартизации, обеспечивающая хорошую воспроизводимость – преимущества метода Нуджента. Недостатками являются трудоемкость и наличие промежуточного варианта микробиоценоза влагалища.

Необходимо отметить, что в реальной клинической ситуации, например, в условиях женской консультации, метод Нуджента практически не используется, а диагностика БВ основана на применении только одного критерия – наличии выделений из влагалища, который обладает очень низкой чувствительностью и специфичностью. В связи с этим модификация метода Амсея, а именно, упрощение трудоемкой процедуры анализа с сохранением его диагностической точности, представляется очень актуальной задачей.

Таким образом, изучение бактериальных сообществ влагалища при БВ и совершенствование методов клинической и лабораторной диагностики данного заболевания будут способствовать пониманию механизмов его патогенеза и более эффективной его диагностике, сохранению репродуктивного здоровья женщины и улучшит качество ее жизни.

Степень разработанности темы исследования

Одним из методологических подходов к поиску общих закономерностей при изучении полимикробного заболевания, каким является БВ, представляется группирование всех бактериальных сообществ в кластеры – типы микробиоценоза, объединяющие схожие по определенным признакам бактериальные сообщества. В последние годы предпринимаются попытки кластеризации микробных сообществ влагалища, однако клинико-диагностическую значимость выделенных кластеров еще предстоит оценить.

Для диагностики БВ в последнее время разрабатываются тесты, основанные на методах амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), прежде всего, количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Преимуществами молекулярных тестов являются быстрота, объективность, высокий уровень стандартизации и возможность точной количественной оценки. Так, недавно был разработан отечественный тест АмплиСенс Флороценоз/Бактериальный вагиноз (Флороценоз/БВ, ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва), принцип которого заключается в определении соотношения концентраций лактобацилл и

ключевых БВ-ассоциированных бактерий – *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*. Однако внедрение данного теста, как любого нового метода, в работу практических лабораторий требует оценки его диагностической точности в сравнении со стандартными методами диагностики БВ.

В нашей стране в последние годы для выявления дисбиотических состояний влагалища широко используется тест Фемофлор-16 (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Тест основан на количественном выявлении ряда бактерий влагалища методом ПЦР в реальном времени. По соотношению этих бактерий определяется состояние микробиоценоза влагалища – нормоценоз или дисбиоз. Понятие «дисбиоз влагалища» описывает сдвиг от преобладания лактобациллярной микрофлоры к условно патогенной и может включать несколько нозологических форм, а также быть вариантом нормы у ряда женщин, что вызывает трудности у клиницистов при выборе тактики лечения. Разработка количественных критериев диагностики БВ с использованием теста Фемофлор-16 дала бы возможность клиницистам назначать лечение в соответствии со стандартами терапии этого заболевания.

Цель исследования

Охарактеризовать бактериальные сообщества, формирующие микрэкосистему влагалища при бактериальном вагинозе, оценить и модифицировать клинико-лабораторные критерии диагностики данного заболевания.

Задачи исследования:

1. Определить бактериальные сообщества, формирующие микрэкосистему влагалища в норме и при бактериальном вагинозе, и провести их сравнительный анализ;
2. Модифицировать тест Фемофлор-16, предназначенный для описательной характеристики микробиоценоза влагалища, путем разработки количественных критериев диагностики бактериального вагиноза;
3. Оценить диагностические характеристики теста Флороценоз/БВ для молекулярно-биологической диагностики бактериального вагиноза в сравнении с критериями Нуджента;
4. Определить диагностические характеристики критериев Амсея и модифицировать их для использования в условиях женской консультации.

Научная новизна

Определены и охарактеризованы кластеры бактериальных сообществ при физиологическом и нарушенном микробиоценозе влагалища. Впервые показано, что

бактериальные сообщества при бактериальном вагинозе группируются в два кластера – с доминированием факультативно-анаэробных бактерий (*G. vaginalis* и *A. vaginae*) и облигатно-анаэробных бактерий (фузобактерий, клостридий, вейлонелл). Кластеры значительно различаются по числу баллов по шкале Нуджента и значению рН вагинального отделяемого.

Впервые разработаны количественные критерии диагностики бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16. Установлено, что низкое содержание лактобацилл в совокупности с повышенным содержанием ряда анаэробных бактерий/групп бактерий определяют бактериальный вагиноз с чувствительностью 99% и специфичностью 93%.

Впервые проведена оптимизация критерия рН вагинального отделяемого, которая привела к существенному повышению его диагностической точности и сделала возможным его применение в качестве самостоятельного критерия клинической диагностики бактериального вагиноза.

Теоретическая значимость

Теоретически обосновано разделение бактериальных сообществ, формирующих микроэкосистему влагалища, в четыре основных кластера: нормальная микрофлора, аэробная микрофлора, факультативно-анаэробная микрофлора и облигатно-анаэробная микрофлора. Кластер нормальной микрофлоры состоит преимущественно из лактобацилл. Кластер аэробной микрофлоры включает, главным образом, энтеробактерии, стрептококки и стафилококки. Кластеры факультативно-анаэробной и облигатно-анаэробной микрофлоры отличаются доминированием факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий и ассоциированы с БВ.

Установлена этиологическая значимость повышения количества анаэробных микроорганизмов с одновременным снижением количества лактобацилл в генезе бактериального вагиноза.

Практическая значимость

Количественные критерии, разработанные в данной работе для диагностики бактериального вагиноза с применением теста Фемофлор-16, позволяют определять это заболевание с чувствительностью 99% и специфичностью 93%.

Проведена клиническая валидация молекулярно-биологического теста для выявления бактериального вагиноза Флороценоз/БВ, который может использоваться в

качестве высокочувствительной и высокоспецифичной альтернативы клиническим и микроскопическим методам диагностики этого заболевания.

Разработана модификация метода Амсея, позволяющая существенно упростить трудоемкую процедуру анализа с сохранением его диагностической точности для использования в условиях женской консультации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Бактериальные сообщества влагалища при бактериальном вагинозе группируются в два кластера, которые значительно различаются между собой по типу доминирующей микрофлоры и значению рН влагалища.

2. Модификация теста Фемофлор-16 существенно расширяет его возможности, позволяя не только констатировать факт дисбиоза влагалища, но и с высокой точностью устанавливать диагноз бактериального вагиноза.

3. Оптимизация критерия вагинального рН (в сторону повышения) приводит к существенному увеличению его диагностической точности, что позволяет использовать его в качестве основного клинико-лабораторного критерия диагностики бактериального вагиноза.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа проводилась с соблюдением всех правил научных исследований и строилась на принципах биоэтики. Для реализации цели исследования и обоснования основных положений были использованы анализ литературы, лабораторные методы (микроскопический метод, метод количественной ПЦР в реальном времени) и методы статистической обработки данных.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность полученных результатов обеспечена теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объемом выборок обследованных пациентов (280 обследованных женщин и 1120 клинических материалов), достаточным количеством выполненных наблюдений с использованием современных методов исследования (микроскопических, молекулярно-биологических, а также определения рН вагинальных выделений) и адекватным статистическим анализом данных.

Основные положения работы, а также содержание её отдельных этапов были представлены на Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2010» (Санкт-Петербург, 2010), Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина:

взгляд молодых – 2012» (Санкт-Петербург, 2012), XI Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2010), VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014), III Национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург, 2015) и на 14 Всемирном конгрессе по инфекциям, передающимся половым путем (Вена, Австрия, 2013).

Результаты исследования внедрены в клинико-диагностическую работу ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», женской консультации №14 СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №32» и отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 работ, в их числе 7 статей в научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, в журналах, рекомендованных ВАК для опубликования основных результатов диссертации.

Личное участие автора

Диссертант лично участвовала в планировании и организации работы, проведении лабораторных исследований, обработке, анализе, обобщении, подготовке научных публикаций, текста диссертации и автореферата.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 112 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 13 таблицами. Список литературы включает 94 публикации, из них 14 – отечественных авторов и 80 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клиническая характеристика обследованных женщин.

В исследование включены 280 женщин репродуктивного возраста, обратившихся к акушеру-гинекологу в поликлиническое отделение ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» и СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №34» Петроградского района Санкт-Петербурга.

Возраст обследованных женщин был следующим: от 19 до 20 лет было 1,8% женщин, от 21 года до 30 лет - 19,6%, от 31 до 45 лет 78,6%. Средний возраст женщин составил $32,4 \pm 1,2$ года. Жалобы на обильные патологические выделения предъявляли все обследованные женщины. В 35,1% случаев наблюдались обильные слизистые выделения, у остальных 64,9% – умеренные выделения из влагалища. Второй по распространенности жалобой было наличие неприятного запаха влагалищных выделений – 29,6% случаев. Реже беспокоил дискомфорт, жжение во влагалище, его испытывали 12,3% женщин. Дискомфорт при мочеиспускании испытывали 5,9% женщин. Из анамнеза известно, что у 22,2% женщин выявлялась гормональная недостаточность яичников, у 27,3% женщин встречались воспалительные заболевания органов малого таза (хронический сальпингоофорит, спаечная болезнь малого таза). При осмотре врач акушер-гинеколог отмечал у этих женщин изменения с вовлечением шейки матки: дисплазия шейки матки разной степени тяжести была у 20,5% пациенток. Кондиломатоз вульвы и влагалища был у 30,3% женщин.

Материалы и методы исследования

Критерии включения в исследование: возраст 18-45 лет, жалобы на выделения из половых путей, первичное обращение к акушеру-гинекологу с подобными жалобами и отсутствие приема антибиотиков в течение последних 4 недель.

Критериями исключения служили: беременность и период лактации; прием системных антибактериальных препаратов в течение 4 недель до исследования; использование интравагинальных антибактериальных препаратов в течение последних 72 часов; использование для контрацепции комбинированных оральных контрацептивов, спермицидов, внутриматочной спирали, влагалищного кольца; наличие инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) – вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), сифилис, гонорея, хламидиоз, трихомоноз, остроконечные кондиломы, генитальный герпес (с манифестными проявлениями); острые или хронические воспалительные заболевания малого таза в стадии обострения; менопауза в возрасте менее 45 лет; тяжелые соматические заболевания в фазе декомпенсации; злокачественные заболевания любой локализации.

Образцами биологического материала для исследования явилось отделяемое влагалища. Для клинической диагностики БВ использовали критерии Амсея, диагноз БВ устанавливали при наличии как минимум 3 из 4 из критериев:

1. Специфические вагинальные выделения – жидкие, однородные, серовато-белые с неприятным запахом;

2. рН отделяемого влагалища выше 4,5. Для этого использовали универсальные индикаторные полоски с эталонной шкалой, позволяющие проводить измерения в пределах от 3,5 до 5,5.

3. Положительный аминный тест. С целью обнаружения «рыбного» аминного запаха каплю влагалищных выделений помещали на предметное стекло, затем к ней добавляли каплю 10% раствора КОН.

4. Обнаружение при микроскопическом исследовании «ключевых» клеток – отслоившихся клеток эпителия влагалища, поверхность которых покрыта бактериями, за счет чего клетки имеют зернистый вид.

Лабораторную диагностику БВ проводили путем исследования отделяемого влагалища с применением метода Нуджента. В окрашенных по Граму препаратах определяли следующие бактериальные морфотипы: крупные грамположительные палочки (морфотип лактобациллы), небольшие грамотрицательные или грамвариабельные кокки и коккобациллы (морфотип *Gardnerella* и *Bacteroides*) и грамотрицательные или грамвариабельные изогнутые палочки (морфотип *Mobiluncus*). В зависимости от суммы баллов делали следующие заключения: отсутствие БВ (число баллов от 0 до 3), промежуточный вариант микробиоценоза (число баллов от 4 до 6) и БВ (число баллов от 7 до 10).

Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из клинических образцов для ПЦР в реальном времени с использованием теста Фемофлор-16 проводили комплектом реагентов Проба-ГС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва), ДНК анализировали в детектирующем амплификаторе DTrime (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва). Выделение ДНК из клинических материалов для исследования с использованием теста Флороценоз/БВ проводили с применением набора реагентов ДНК-сорб-АМ (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва), ДНК анализировали в детектирующем амплификаторе RotorGene (Qiagen, Австралия).

Статистический анализ результатов. Для группирования бактериальных сообществ в кластеры использовали метод неиерархического, двухэтапного кластерного анализа. Количественное содержание бактерий/группы бактерий в составе вагинальной микрофлоры всех пациенток представляли в виде тепловой карты. Для характеристики совокупности объектов в пределах каждого кластера использовали медиану, нижний и

верхний квартили, минимальное и максимальное значения, которые представляли графически. Сравнительный анализ кластеров осуществляли с использованием теста Манна-Уитни и точного критерия Фишера.

При разработке диагностических критериев БВ количество всех микроорганизмов, за исключением *M. hominis*, *Ureaplasma* и *Candida*, было представлено как соотношение концентрации их ДНК к общей бактериальной массе (ОБМ) в долях единицы. Количество *M. hominis*, *Ureaplasma* и *Candida* представляли в абсолютных значениях концентрации ДНК (геном-эквивалентов в образце). Для оценки способности потенциальных бактериальных маркеров, определяемых с применением теста Фемофлор-16, правильно классифицировать образцы с нормальной микрофлорой и БВ использовали ROC-анализ.

Результаты тестирования образцов отделяемого влагалища тестом Флороценоз/БВ сравнивали с результатами анализа образцов методом Нуджента, используя таблицу сопряженности. В анализ были включены только случаи, однозначно интерпретированные как норма или БВ с использованием обоих методов.

Чувствительность и специфичность критериев Амсея по отдельности и в совокупности определяли с использованием метода Нуджента как референтного стандарта, посредством построения таблицы сопряженности. Так как определение диагностических характеристик требует бинарной классификации случаев («есть болезнь» или «нет болезни»), случаи промежуточной микрофлоры были исключены из анализа. С целью оптимизации порогового значения влагалищного pH, был проведен ROC-анализ данного параметра. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов статистики GraphPad Prism (GraphPad Software, США), Statistica (StatSoft, США) и SPSS (IBM, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальные сообщества, формирующие микроэкосистему влагалища в норме и при бактериальном вагинозе

С использованием критериев Амсея БВ был выявлен у 86 женщин, 194 женщины не имели БВ. Согласно классификации вагинальных проб по методу Нуджента, 172 образца были причислены к категории нормальной микрофлоры, 27 – промежуточной микрофлоры, 81 – БВ (табл. 1).

Таблица 1 - Результаты исследования отделяемого влагалища с использованием методов Амселя и Нуджента

Категория по Амселю	Категория по Нудженту			Всего
	Нормальная микрофлора	Промежуточная микрофлора	БВ	
Норма	172	21	1	194
БВ	0	6	80	86
Всего	172	27	81	280

Всего с использованием теста Фемофлор-16 было протестировано 280 проб отделяемого влагалища. Результаты 10 проб были признаны невалидными ввиду низкого значения контроля взятия материала и исключены из анализа. Таким образом, в анализ было включено 270 проб. Из них 164 пробы были из категории нормальной микрофлоры по Нудженту, 26 – промежуточной микрофлоры и 80 – БВ.

Следующим этапом нашего анализа было изучение микробных сообществ методом кластерного анализа. Кластеризацию проводили по микробиологическим (количественное содержание бактерий в образцах) и клиническим (значение рН влагалища, наличие или отсутствие выделений, положительный или отрицательный аминный тест, наличие или отсутствие ключевых клеток) признакам.

В результате анализа все случаи были отнесены к одному из 4 кластеров. Кластер 1, самый многочисленный (n=171), включал случаи, когда вагинальная микрофлора состояла преимущественно из лактобацилл. В кластер 2, самый малочисленный (n=11), вошли случаи доминирования аэробной микрофлоры: *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*. К кластерам 3 (n=57) и 4 (n=31) были отнесены случаи доминирования факультативно-анаэробной (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) и облигатно-анаэробной (*Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*) микрофлоры, соответственно.

С целью статистической интерпретации полученных результатов мы провели попарное сравнение всех кластеров по всем признакам, включенным в анализ.

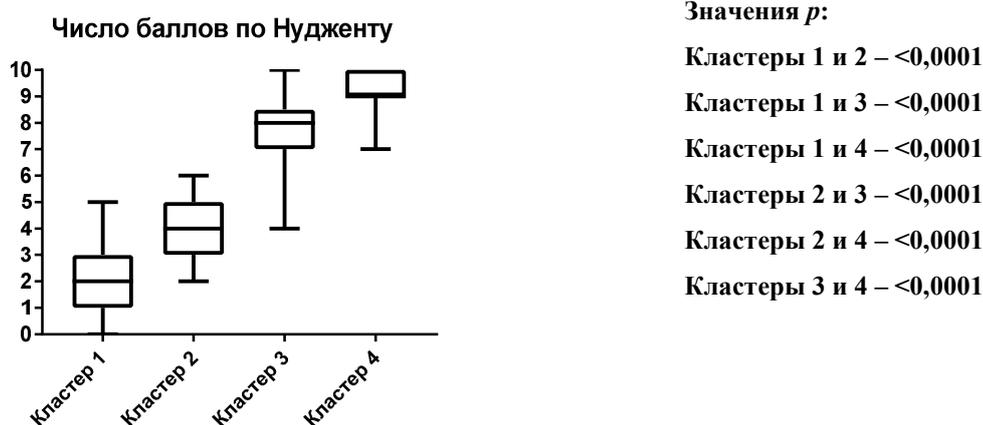


Рис. 1. Сравнительный анализ бактериальных кластеров по числу баллов по шкале Нуджента

При сравнительном анализе бактериальных кластеров по числу баллов по шкале Нуджента все кластеры значительно различались между собой, а самые высокие показатели наблюдались для кластера 4 (рис. 1). Все кластеры также различались между собой по значению рН влагалища, при этом самые высокие показатели наблюдались для кластера 4 (рис. 2).

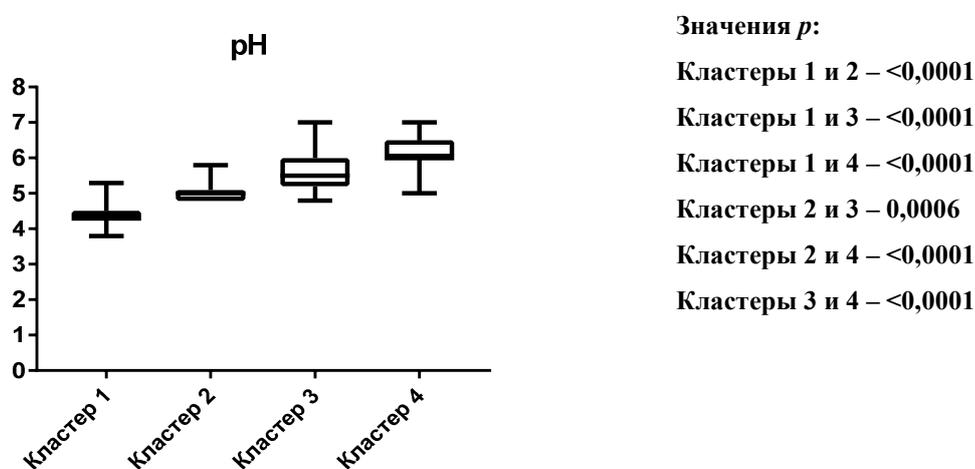
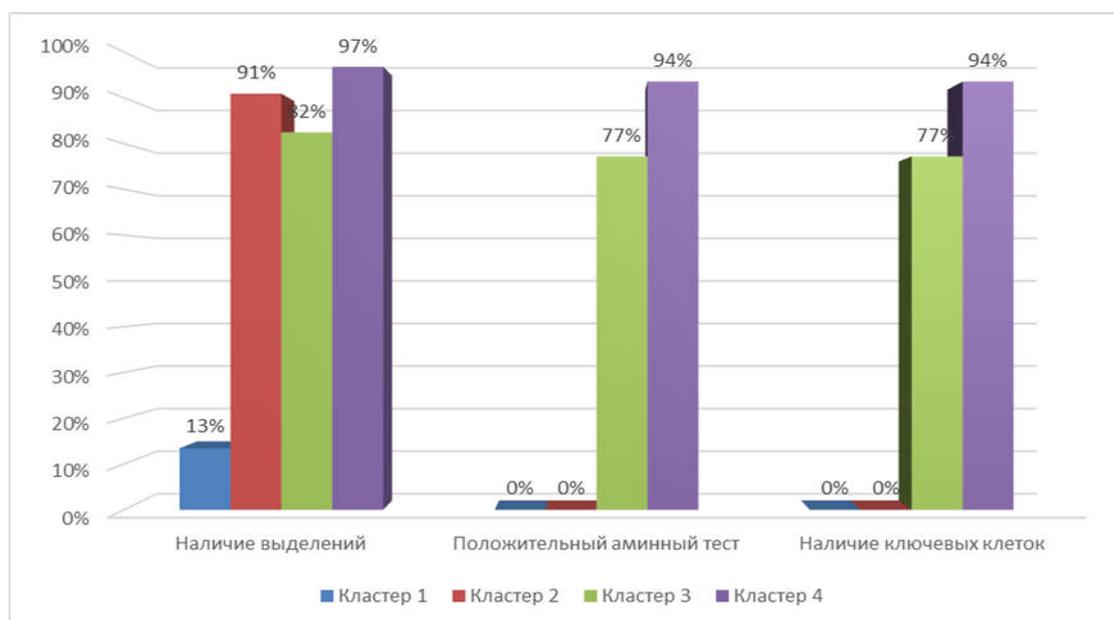


Рис. 2. Сравнительный анализ бактериальных кластеров влагалища по значению рН влагалища

Содержание лактобацилл в кластере 1 значительно превышало содержание лактобацилл в остальных кластерах. Кластеры 2, 3 и 4 не различались между собой по данному показателю. Кластер 2, как и ожидалось, значительно превосходил бактериальные кластеры 1, 3 и 4 по содержанию энтеробактерий, стрептококков и стафилококков. Кластеры 1 и 2 значительно отличались от кластеров 3 и 4 по содержанию *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas*, при этом содержание данной группы бактерий в кластерах 3 и 4 было примерно одинаковым. При сравнительном анализе

бактериальных кластеров влагалища по содержанию *Eubacterium*, все 4 кластера отличались незначительно. Содержание групп облигатно-анаэробных бактерий *Sneathia/Leptotrichia/ Fusobacterium, Megaspheera/Veillonella/Dialister* и *Lachnobacterium/Clostridium* было значительно выше в кластере 4, чем в остальных кластерах. Содержание *Mycoplasma hominis, Peptostreptococcus* и группы бактерий *Corynebacterium/Mobiluncus* определялось во всех четырех бактериальных кластерах, и в каждом из них было относительно невысоким.

При сравнительном анализе бактериальных кластеров влагалища по содержанию *Atopobium vaginae* кластеры 1 и 2 значительно отличались от кластеров 3 и 4, кроме того, содержание этого микроорганизма в кластерах 3 и 4 было примерно одинаковым.



Значение *p* (наличие выделений):

Кластеры 1 и 2 – <0,0001
 Кластеры 1 и 3 – <0,0001
 Кластеры 1 и 4 – <0,0001
 Кластеры 2 и 3 – 0,677
 Кластеры 2 и 4 – 0,460
 Кластеры 3 и 4 – 0,088

Значение *p* (положительный аминный тест):

Кластеры 1 и 2 – Нв
 Кластеры 1 и 3 – <0,0001
 Кластеры 1 и 4 – <0,0001
 Кластеры 2 и 3 – <0,0001
 Кластеры 2 и 4 – <0,0001
 Кластеры 3 и 4 – 0,074

Значение *p* (наличие ключевых клеток):

Кластеры 1 и 2 – Нв
 Кластеры 1 и 3 – <0,0001
 Кластеры 1 и 4 – <0,0001
 Кластеры 2 и 3 – <0,0001
 Кластеры 2 и 4 – <0,0001
 Кластеры 3 и 4 – 0,074

Рис. 3. Сравнительный анализ бактериальных кластеров влагалища по наличию выделений, результатам аминного теста и наличию ключевых клеток. Нв – критерий не вычислялся, так как значения переменной в обеих группах равны нулю

Мы пришли к выводу, что бактериальные сообщества, формирующие микрэкосистему влагалища, могут быть сгруппированы в четыре основных кластера,

которые могут быть условно обозначены как нормальная микрофлора, аэробная микрофлора, факультативно-анаэробная микрофлора и облигатно-анаэробная микрофлора. Кластер нормальной микрофлоры состоит преимущественно из лактобацилл. Кластер аэробной микрофлоры включает, главным образом, энтеробактерии, стрептококки и стафилококки. Кластеры факультативно-анаэробной и облигатно-анаэробной микрофлоры отличаются доминированием факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий, соответственно, и ассоциированы с БВ. Описанные кластеры относятся к разным категориям по шкале Нуджента и значительно различаются по значению pH влагалища. Различия по другим клиническим признакам представлены на рис. 3.

Критерии диагностики бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16

Для того чтобы оценить способность бактериальных маркеров, определяемых с применением теста Фемофлор-16, правильно классифицировать образцы с нормальной микрофлорой и БВ, был использован ROC-анализ. В качестве референтного стандарта применяли метод Нуджента. Так как определение диагностических характеристик требует бинарной классификации случаев («есть болезнь» или «нет болезни»), случаи промежуточной микрофлоры по Нудженту были исключены из анализа. Самую высокую диагностическую точность (площадь под ROC-кривой превышает значение 0,9, что рассматривается как отличная диагностическая точность) продемонстрировали следующие маркеры: соотношение лактобацилл и ОБМ (площадь под ROC-кривой 0,996), *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas*/ОБМ (0,975), *Eubacterium*/ОБМ (0,942), *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*/ОБМ (0,907), *Megasphaera/Veillonella/Dialister*/ОБМ (0,934) и *Atopobium vaginae*/ОБМ (0,908). Маркеры *Lachnobacterium/Clostridium*/ОБМ и *Peptostreptococcus*/ОБМ обладали удовлетворительной (площадь под ROC-кривой 0,775) и хорошей (0,850) диагностической точностью, соответственно. Общая бактериальная масса и концентрация *M. hominis* показали низкую диагностическую точность. Для маркеров с площадью под ROC-кривой выше 0,7 был рассчитан оптимальный порог относительной концентрации и показатели чувствительности и специфичности при данном пороге (табл. 2).

Таким образом, низкое содержание лактобацилл является самым чувствительным и специфичным критерием БВ. Однако необходимо учитывать, что при расчете диагностических характеристик мы исключили промежуточную категорию по Нудженту,

в которую входит большинство проб из категории выраженный аэробный и смешанный дисбиоз с высоким содержанием аэробных бактерий и также характеризующихся низким содержанием лактобацилл. В связи с этим использование соотношения лактобацилл к ОБМ как единственного критерия может приводить к ложноположительным результатам, хоть и немногочисленным.

Таблица 2. - Диагностическая точность бактериальных маркеров, выявляемых с применением теста Фемофлор-16, для определения бактериального вагиноза

Бактерии	Площадь под ROC-кривой	Оптимальный порог	Чувствительность, %	Специфичность, %
Лактобациллы/ОБМ	0,996	<0,1	99	99
<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas/</i> ОБМ	0,975	>0,01	95	94
<i>Eubacterium/</i> ОБМ	0,942	>0,02	83	93
<i>Sneathia/Leptotrichia /Fusobacterium/</i> ОБМ	0,907	>0,001	68	99
<i>Megasphaera /Veillonella/Dialister /</i> ОБМ	0,934	>0,001	80	96
<i>Lachnobacterium/ Clostridium/</i> ОБМ	0,775	>0,001	39	97
<i>Peptostreptococcus/</i> ОБМ	0,850	>0,001	61	94
<i>Atopobium vaginae/</i> ОБМ	0,908	>0,002	76	99

Принимая во внимание этот факт, представляется целесообразным рассматривать микрофлору влагалища как соответствующую БВ, если выполняются два условия: низкое содержание лактобацилл и повышенное содержание (выше порога, обозначенного в табл. 2) как минимум одного из бактериальных маркеров БВ.

Для того чтобы оценить чувствительность и специфичность предлагаемого подхода к диагностике БВ, мы включили в анализ промежуточную микрофлору по Нудженту, объединив ее с нормальной микрофлорой (табл. 3). Иначе говоря, все случаи были разделены на БВ (n=80) и отсутствие БВ (n=190).

Таблица 3 - Чувствительность и специфичность диагностических критериев бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16

Критерии		Категория по Нудженту		Чувствительность, %	Специфичность, %
		Отсутствие БВ (нормальная и промежуточная микрофлора)	БВ		
Низкое содержание лактобацилл	Нет	170	1	99	89
	Да	20	79		
Низкое содержание лактобацилл в совокупности с повышенным содержанием анаэробных бактерий	Нет	177	1	99	93

Заключительным этапом нашей работы было сопоставление разработанных нами критериев выявления БВ с критериями производителя теста для выраженного анаэробного дисбиоза, который неформально приравнивается к БВ. Из 92 проб, интерпретированных нами как БВ, 87 проб были отнесены к категории выраженного анаэробного дисбиоза, 2 – выраженного аэробного дисбиоза, 3 – выраженного смешанного дисбиоза. В то же время, 3 из 90 проб из категории выраженного анаэробного дисбиоза были интерпретированы нами как отсутствие БВ. Таким образом, разработанные в данном исследовании диагностические критерии БВ и критерии, разработанные производителями теста Фемофлор, в значительной степени описывают одну и ту же категорию микробиоценоза влагалища.

Таким образом, нами разработаны критерии диагностики БВ с применением теста Фемофлор-16, предназначенного для характеристики микробиоценоза влагалища. Низкое содержание лактобацилл (<10% от общей бактериальной массы) в совокупности с повышенным содержанием *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* (>1%) и/или *Eubacterium* (>2%) и/или *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium* (>0,1%) и/или *Megasphaera/Veillonella/Dialister* (>0,1%) и/или *Lachnobacterium/Clostridium* (>0,1%) и/или *Peptostreptococcus* (>0,1%) и/или *Atopobium vaginae* (>0,2%) определяют БВ с чувствительностью 99% и специфичностью 93%. Данные критерии БВ и критерии, разработанные производителями теста Фемофлор-16 для категории выраженного анаэробного дисбиоза, в значительной степени описывают одну и ту же категорию микробиоценоза влагалища.

Диагностические характеристики теста для выявления бактериального вагиноза Флороценоз/БВ

Тест Флороценоз/БВ направлен на количественную оценку ДНК лактобацилл (всех основных видов), ДНК *G. vaginalis*, ДНК *A. vaginae* и ДНК различных бактерий, колонизирующих слизистую влагалища. Результаты тестирования образцов отделяемого влагалища сравнивали с результатами анализа образцов методом Нуджента (табл. 4).

Таблица 4 - Результаты исследования отделяемого влагалища с использованием метода Нуджента и теста Флороценоз/БВ

Результат теста Флороценоз/БВ	Категория по Нудженту			Всего
	Нормальная микрофлора	Промежуточная микрофлора	БВ	
Нормоценоз	156	7	3	166
Промежуточный тип микробиоценоза	0	1	2	3
Дисбиоз неуточненной этиологии	9	10	5	24
БВ	7	9	71	87
Всего	172	27	81	280

В анализ были включены только случаи, однозначно интерпретированные как норма или БВ с использованием обоих методов – всего 237 случаев. С применением теста Флороценоз/БВ были правильно определены 71 из 74 случаев БВ и 156 из 162 случаев нормальной микрофлоры (табл. 5).

Таблица 5 - Чувствительность и специфичность теста Флороценоз/БВ в сравнении с методом Нуджента

Результат теста Флороценоз/БВ	Категория по Нудженту		Чувствительность, %	Специфичность, %
	Нормальная микрофлора	БВ		
Нормоценоз	156	3	96	96
БВ	7	71		

Таким образом, тест Флороценоз/БВ для молекулярной диагностики БВ обладает достаточно высокими показателями чувствительности и специфичности – 96% для обоих показателей.

Оценка и модификация критериев Амселя

Чувствительность и специфичность критериев Амселя определяли с использованием метода Нуджента как референтного стандарта. Случаи промежуточной микрофлоры были исключены, в результате в анализ было включено 253 случая. В качестве самых объективных критериев Амселя рассматриваются повышенное значение вагинального рН (>4,5) и обнаружение ключевых клеток. Из этих двух критериев только критерий рН является количественным параметром. Кроме того, этот критерий нередко используется при синдромном подходе к диагностике и лечению БВ. Так как специфичность данного критерия при общепринятом пороге >4,5 была относительно низкой (81%), мы решили выяснить, можно ли ее улучшить путем оптимизации порогового значения. С этой целью был проведен ROC-анализ данного параметра. Площадь под ROC-кривой составила 0,991, что можно интерпретировать как отличную классифицирующую способность. Координаты ROC-кривой параметра рН представлены в табл. 6. При значении рН $\geq 5,0$ чувствительность данного критерия составила 99%, специфичность – 91%. Таким образом, оптимизация порогового значения рН позволила существенно повысить специфичность при несущественной потере чувствительности.

Таблица 6 - Координаты ROC-кривой параметра рН отделяемого влагалища

Пороговое значение рН	Чувствительность, %	Специфичность, %
$\geq 4,0$	100	5
$\geq 4,2$	100	26
$\geq 4,5$	100	72
$\geq 4,8$	100	84
$\geq 5,0$	99	91
$\geq 5,5$	74	100
$\geq 6,0$	49	100

Мы предположили, что можно ограничить применение всей совокупности критериев Амселя только случаями, когда рН влагалища равняется 5, в остальных же случаях использовать для установления диагноза БВ критерий рН >5. В результате необходимость применения всей совокупности критериев Амселя сокращается практически на 90% (32 из 280). Чувствительность и специфичность такого комбинированного подхода к диагностике БВ составляют 99% (80 из 81) и 98% (168 из 172), соответственно.

Таким образом, оптимизация стандартного порога рН, входящего в критерии Амселя, приводит к существенному повышению специфичности этого критерия (с 81% до 90%) при несущественной потере его чувствительности (со 100% до 99%). Применение

совокупности критериев Амселя только для разрешения случаев, когда рН равняется 5, позволяет сократить его использование на 90%, при этом сохраняется высокая чувствительность и специфичность клинической диагностики БВ – 99% и 98%, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Бактериальные сообщества, формирующие микроэкосистему влагалища, группируются в четыре основных бактериальных кластера. Кластер нормальной микрофлоры характеризуется преобладанием лактобацилл, кластер аэробной микрофлоры – преобладанием энтеробактерий, стрептококков и стафилококков. Кластеры факультативно-анаэробной и облигатно-анаэробной микрофлоры ассоциированы с бактериальным вагинозом и отличаются доминированием факультативно-анаэробных бактерий (*Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*) и облигатно-анаэробных бактерий (фузобактерий, кластридий, вейлонелл), соответственно.

2. Кластеры, ассоциированные с бактериальным вагинозом, значительно различаются по числу баллов по шкале Нуджента (медианы 8 и 9, соответственно; $pH < 0,0001$) и значению рН вагинального отделяемого (медианы 5,5 и 6, соответственно; $pH < 0,0001$).

3. Разработаны критерии диагностики бактериального вагиноза для теста Фемофлор-16. Низкое содержание лактобацилл (<10% от общей бактериальной массы) в совокупности с повышенным содержанием *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* (>1%) и/или *Eubacterium* (>2%) и/или *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium* (>0,1%) и/или *Megasphaera/Veillonella/Dialister* (>0,1%) и/или *Lachnobacterium/Clostridium* (>0,1%) и/или *Peptostreptococcus* (>0,1%) и/или *Atopobium vaginae* (>0,2%) определяют бактериальный вагиноз с чувствительностью 99% и специфичностью 93%.

4. Тест Флороценоз/БВ для диагностики бактериального вагиноза на основе количественной мультиплексной ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью и специфичностью – 96% для каждого показателя по сравнению с методом Нуджента.

5. При использовании универсальных индикаторных полосок с эталонной шкалой, позволяющих проводить измерения рН влагалища в пределах от 3,5 до 5,5, повышение стандартного порога рН с 4,5 до 5 приводит к существенному повышению

специфичности этого критерия (с 81% до 90%), с сохранением высокой чувствительности (99%).

6. Применение всей совокупности критериев Амсея только для разрешения случаев, когда значение рН равно 5, позволяет снизить их применение на 90% и при этом осуществлять клиническую диагностику бактериального вагиноза с высокой чувствительностью (99%) и специфичностью (98%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для специалистов клинической лабораторной диагностики:

1. При использовании теста Фемофлор-16 для анализа микробиоценоза влагалища ориентироваться на следующие показатели: низкое содержание лактобацилл (<10% от общей бактериальной массы) в совокупности с повышенным содержанием *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* (>1%) и/или *Eubacterium* (>2%) и/или *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium* (>0,1%) и/или *Megasphaera/Veillonella/Dialister* (>0,1%) и/или *Lachnobacterium/Clostridium* (>0,1%) и/или *Peptostreptococcus* (>0,1%) и/или *Atopobium vaginae* (>0,2%). Данные критерии БВ и критерии, разработанные производителями теста Фемофлор-16 для категории выраженного анаэробного дисбиоза, в значительной степени описывают одну и ту же категорию микробиоценоза влагалища.

2. Применение молекулярно-биологического теста Флороценоз/БВ рекомендуется в качестве высокочувствительной (96%) и высокоспецифичной (96%) альтернативы методам микроскопической диагностики бактериального вагиноза, таким как метод Нуджента, используемый в единичных лабораториях, и метод выявления «ключевых» клеток, являющийся субъективным и не стандартизованным.

Для клинических врачей акушеров-гинекологов:

3. В качестве основного критерия клинической диагностики бактериального вагиноза у женщин с вульвовагинальными симптомами рекомендуется использовать критерий рН вагинального отделяемого. При значении рН $\geq 5,0$ чувствительность данного критерия для диагностики БВ составляет 99%, специфичность – 91%.

4. Применение всей совокупности критериев Амсея (наличия 3 из этих 4 критериев, таких как наличие специфических выделений из влагалища, рН вагинальных выделений выше 4,5, положительный аминный тест, а также обнаружение при микроскопическом исследовании нативного препарата отделяемого влагалища «ключевых» клеток) рекомендуется ограничить случаями, когда рН влагалища равняется

5. Чувствительность и специфичность такого комбинированного подхода к диагностике БВ составляют 99% и 98%, соответственно.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанные методические подходы клинико-лабораторной диагностики бактериального вагиноза позволят исследовать особенности микробиоты влагалища при других состояниях микробиоценоза, таких как аэробный вагинит, смешанные вагинальные инфекции, а также изучать механизмы развития восходящих инфекций, влияющих на репродуктивное здоровье женщин, и причины рецидивирования вагинальных инфекций с формированием бактериальных пленок микроорганизмов, объединенных в определенные кластеры.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ по специальности
14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

1) Назарова, В.В. Бактериальные сообщества, формирующие микрорекосистему влагалища в норме и при бактериальном вагинозе / В.В. Назарова, Е.В. Шипицына, К.В. Шалепо, А.М. Савичева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – №6. – С. 30-43.

2) Назарова, В.В. Критерии диагностики бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16 / В.В. Назарова, Е.В. Шипицына, Е.Н. Герасимова, А.М. Савичева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – №4. – С.57-67.

3) Назарова, В.В. Микрофлора влагалища женщин репродуктивного возраста при бактериальном вагинозе – соответствие критериям Amsel / В.В. Назарова, К.В. Шалепо, Ю.Н. Менухова, А.М. Савичева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. 65. – №1. – С. 48-53.

4) Назарова, В.В. Микробиота влагалища при физиологическом микробиоценозе и при бактериальном вагинозе / В.В. Назарова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2013. – Т. 62. – №5. – С. 66-74.

5) Савичева, А.М. Опыт комбинированной терапии у больных с бактериальным вагинозом / А.М. Савичева, Ю.Н. Менухова, Н.Е. Воробьева, В.В. Назарова, К.В. Шалепо, Н.Ю. Ширшова, М.А. Башмакова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2011. – Т. 11. – №3. – С. 69-73.

6) Шалепо, К.В. Оценка современных методов лабораторной диагностики бактериального вагиноза / К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова, Т.А. Румянцева, А.Е. Гуцин, А.М. Савичева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2014. – Т. 63. – №1. – С. 26-29.

7) Савичева, А.М. Сравнительное контролируемое рандомизированное исследование оценки эффективности двухэтапного лечения бактериального вагиноза / А.М. Савичева, К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова // Гинекология. – 2013. – Т. 15. – №5. – С. 12-15.

Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций

8) Назарова, В.В. Микрoэкология влагалища женщин с клиническими проявлениями бактериального вагиноза / В.В. Назарова // Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2010: Материалы I научной конференции молодых ученых и специалистов 23 апреля 2010г. – СПб. – 2010. – С. 31-32.

9) Менухова, Ю.Н. Эффективность комплексной терапии бактериального вагиноза: клинико-лабораторные параллели / Ю.Н. Менухова, В.В. Назарова, К.В. Шалепо, Н.Е. Воробьева, Н.Ю. Ширшова, А.М. Савичева // Материалы XI Всероссийского научного форума «Мать и дитя». – Москва. – 2010. – С. – 447-448.

10) Назарова, В.В. Сравнительная оценка методов диагностики бактериального вагиноза / В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова // Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2012. Материалы III ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов. – СПб. – 2012. – 61с.

11) Назарова, В.В. Диагностика бактериального вагиноза, основанная на критериях Nugent / В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова // Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2012. Материалы III ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов. – СПб. – 2012. – 61с.

12) Shalepo, K.V. Evaluation of the vaginal microbiota using quantitative real-time PCR / K.V. Shalepo, J.N. V.V. Nazarova, Menukhova, A.M. Savicheva, M.Domeika // Proc. STI & AIDS World Congress 2013, July 14-17, Viena, Austria (Joint Meeting of the 20th ISSTD and 14th IUSTI Meeting) P2.028 (Doi:10.1136/sextrans-2013-051184.0293)

13) Шалепо, К.В. Диагностика и терапия бактериального вагиноза при беременности / К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Е.В. Шипицына, А.М. Савичева // Педиатр. – 2014. – Т. 5. – №3. – С. 92-99.

14) Савичева, А.М. Все ли лактобациллы одинаково полезны? Полнота

восстановления вагинальной микроэкологии как критерий эффективности двухэтапной терапии бактериального вагиноза / А.М. Савичева, К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова // Status Praesens. – 2014. – №3[20]. – С. 33-37.

15) Савичева, А.М. Место молекулярных методов в диагностике бактериального вагиноза / А.М. Савичева, К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова, Т.А. Румянцева, А.Е. Гушин // Молекулярная диагностика – 2014: сб. трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Т.1. / ред. В.И. Покровский. - М.: Изд-во МБ, 2014. – С. 166-167

16) Шалепо, К.В. Вагинальная микрофлора влагалища женщин репродуктивного возраста при различных значениях рН / К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Ю.Н. Менухова, А.М. Савичева // Материалы III Национального конгресса «Дискуссионные вопросы современного акушерства», СПб., 28-30 мая 2015. - Журнал акушерства и женских болезней. Спец выпуск. – Т. 64. – С. 74-75.

Прочие публикации

17) Савичева, А.М. Лабораторная диагностика бактериального вагиноза: методические рекомендации / А.М. Савичева, М.А. Башмакова, Т.В. Красносельских, Е.В. Рыбина, Е.В. Соколовский, В.И. Кисина, Т.С. Смирнова, Г.В. Гриненко, А.В. Игнатовский, И.В. Литвиненко, З.М. Мартикайнен, Е.В. Шипицына, С.Л. Зацюрская, К.В. Шалепо, В.В. Назарова, Ю. Дзак, Р. Баллард, А.Халлен, К. Исон, М. Унемо, М. // Санкт-Петербург: Н-Л, 2011. – 28 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БВ – бактериальный вагиноз

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот

ОБМ – общая бактериальная масса

ПЦР – полимеразная цепная реакция