

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВЛАГАЛИЩА

© Е. В. Рыбина

ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта», Санкт-Петербург

■ Обзор литературы посвящен истории изучения микрофлоры половых путей и современным представлениям о микробиоте влагалища. В статье даны определения состояния вагинальной микрофлоры в норме и при ее нарушениях, таких как бактериальный вагиноз и вагинит. Обобщены сведения об основных методах лабораторной диагностики, используемых для изучения микробиоценоза влагалища. Сделан вывод о необходимости дальнейшей оптимизации и стандартизации современных методов оценки вагинального биотопа.

■ **Ключевые слова:** микрофлора влагалища; микробиоценоз; микробиота; лабораторная диагностика; микробиологические методы.

CURRENT METHODS FOR EVALUATION OF THE VAGINAL MICROBIOCENOSIS

© E. V. Rybina

D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology RAMS, Saint Petersburg, Russia

■ The article reviews literature data on the history of research into the microflora of the genital tract, as well as current views about the vaginal microbiota. Definitions of the vaginal microflora in norm and diseases, such as bacterial vaginosis and vaginitis are presented. Data on main methods of laboratory diagnostics used for the investigation of the vaginal microbiocenosis are summarized. It was concluded that there is a need in further optimization and standardization of the current methods for evaluation of the vaginal biotope.

■ **Key words:** vaginal microflora; microbiocenosis; microbiota; laboratory diagnostics; microbiological methods.

Введение

Микробиоценоз влагалища — это совокупность микроорганизмов, населяющих данный биотоп, в норме представленный преимущественно лактобациллами и некоторыми другими микроорганизмами. Физиологический микробиоценоз влагалища определяется как комплексная, динамически изменяющаяся микроэкосистема, формирующая колонизационную резистентность этого локуса и выполняющая барьерную, ферментативную, витаминообразующую, иммунную и другие функции.

Состав влагалищного микробиоценоза различается в зависимости от возраста, расовой принадлежности, гормонального статуса, сексуальных предпочтений, гигиенических привычек, приема антибактериальных препаратов.

Состояние микробиоценоза слизистой влагалища имеет большое значение для репродуктивного здоровья. Изменение качественного и количественного состава микроорганизмов этого локуса, а также их соотношения с клетками макроорганизма может привести к развитию дисбиоза влагалища или вульвовагинита. Основным предвестником дисбиотического состояния влагалища является бактериальный вагиноз, который при микроскопическом исследовании отделяемого слизистой оболочки влагалища описывается как

снижение или полное исчезновение лактобацилл и чрезмерное размножение других, преимущественно анаэробных бактерий. Бактериальный вагиноз часто протекает бессимптомно, так как это состояние не сопровождается выраженной воспалительной реакцией, в отличие от вульвовагинита. Наиболее распространенные воспалительные заболевания влагалища — это трихомониаз и кандидоз [26]. Гораздо реже встречаются такие виды вагинита, как аэробный или неспецифический вагинит и атрофический кольпит [17, 48, 60].

Термин «аэробный вагинит» используется в настоящее время для обозначения воспалительных заболеваний влагалища, вызванных стафилококками, стрептококками и бактериями семейства *Enterobacteriaceae* [17]. Хорошо известна роль *Streptococcus agalactiae* и *Escherichia coli* в развитии инфекций матери и новорожденных [58]. Однако их значение в этиологии вагинитов изучено недостаточно.

Нарушения микроэкологии влагалища имеют отношение к септическим осложнениям послеродового периода, неонатальным инфекциям и воспалительным заболеваниям органов малого таза, выкидышам и преждевременным родам, повышенному риску заражения и дальнейшей трансмиссии инфекций, передающихся половым путем (ИППП), в том числе ВИЧ [12, 24, 34, 55, 65].

Вагинальная микрофлора большинства женщин в разные периоды жизни достаточно стабильна. Ученые расходятся во мнении относительно того, как разнообразие вагинальной микрофлоры, расцениваемое как нарушение, влияет на стабильность микроэкологии этого локуса. Имеются сообщения о том, что бактериальный вагиноз может быть достаточно продолжительным и постоянным состоянием [22]. В одной работе, посвященной исследованию микробиоценоза женщин с бактериальным вагинозом, было показано, что это состояние чаще пролонгируется в присутствии BVAB 1–3, *Peptoniphilus lacrimalis* или *Megasphaera* тип 2 [35].

В поддержании постоянства вагинальной микрофлоры важную роль играют различные виды лактобацилл. Опубликованы результаты исследований, в которых сообщается, что у женщин, в вагинальном биотопе которых преобладают *L. crispatus*, реже развивается бактериальный вагиноз, чем у женщин с наличием *L. iners* [22, 61, 41]. Более детальное изучение вагинальной микрофлоры показало, что микробиоценоз с доминированием *L. crispatus* чаще переходит в *L. iners*-доминирующий или смешанный лактобациллярный, чем в бактериальный вагиноз. В свою очередь, микробиоценоз влагиалища с преобладанием *L. iners* в два раза чаще переходит в бактериальный вагиноз, чем *L. crispatus*-доминирующий [22]. Данные о преобразовании микробиоценозов влагиалища, ассоциированных с лактобациллами других видов (*L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis*), редки и этот вопрос требует дальнейшего изучения [22, 61].

Для оценки состояния микробиоценоза влагиалища в настоящее время используют практически весь арсенал лабораторных методов и технологий, каждый из которых имеет свои достоинства и ограничения. В этих условиях выбор оптимального метода или комплекса методов позволит своевременно и качественно установить диагноз и назначить соответствующее лечение [3, 7].

История изучения микробиоценоза полового тракта женщин

Изучение вагинального микробиоценоза началось в конце XIX века, вскоре после усовершенствования светового микроскопа и внедрения метода микроскопии в медицинскую практику. Ученые разных стран практически одновременно публиковали первые работы по этой тематике. В 1892 году Альберт Додерлейн (*Albert Döderlein*) написал диссертационную работу на тему «*Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber*» («Вагинальный секрет и его значение для родильной горячки»). Используя

микроскопический метод для изучения нативных препаратов, он сравнил вагинальную микрофлору здоровых женщин и родильниц с послеродовыми эндометритами. В работе были впервые опубликованы рисунки бактерий, которые впоследствии назвали палочками Додерлейна, а в настоящее время относят к роду *Lactobacillus*. В результате было получено представление о доминировании во влагиалище здоровых женщин лактобацилл [15].

В 1893 году в России вышла диссертационная работа В.В. Строганова «Бактериологические исследования полового канала женщины в различные периоды ее жизни с включением материалов к вопросу о самозащите организма против патогенных микробов со стороны полового канала» [8].

Дальнейшее накопление клинического опыта привело к появлению классификаций вагинального микробиоценоза, который в прошлом описывался как «степень чистоты влагиалища». *Maunu Ossian af Heurlin* в 1910 году опубликовал работу «*Bakteriologische Untersuchungen des Keimgehaltes im Genitalkanale der fiebernden Wöchnerinnen mit Berücksichtigung der Gesamtmorbidität im Laufe eines Jahres*» («Бактериологические исследования содержания микробов в половых путях родильниц при воспалении с учетом общей заболеваемости в течение года»), в которой описывал четыре степени чистоты влагиалища. При оценке микробиоценоза влагиалища он учитывал не только морфотипы бактерий вагинального секрета, но также лейкоцитарную реакцию и количество эпителиальных клеток. По этой классификации I степень чистоты влагиалища — это преобладание палочек Додерлейна, отсутствие лейкоцитов и наличие единичных эпителиоцитов, II степень — снижение количества лактобацилл и появление единичных лейкоцитов, III — единичные лактобациллы и преобладание другой микрофлоры, возможно присутствие грамотрицательных диплококков и трихомонад, умеренный лейкоцитоз и единичные эпителиальные клетки, IV — полное исчезновение лактобацилл, замещение их на другие микроорганизмы, присутствие трихомонад, выраженный лейкоцитоз и увеличение количества эпителиоцитов [10].

Карл Шрёдер (*Karl Schröder*) в 1921 году опубликовал свою классификацию микробиоценоза влагиалища. В соответствии с этой классификацией, различали три степени вагинальной микрофлоры. Степень I, определяемая как «здоровая» микрофлора, — преобладание во влагиалищном отделяемом морфотипа лактобацилл различного размера. Степень II — промежуточная картина микробиоценоза с частичной заменой лактоба-

цилл другими бактериями. Степень III — полная замена лактобацилл на другие бактерии [46]. Модифицированная классификация Шрёдера с изменениями, которые в 1999 году внес Г. Дондерс (*G. Donders*), используется в клиниках по сей день. Автор разделил промежуточную II степень на IIa и IIb подстепени в зависимости от выраженности преобладания лактобацилл в составе смешанной микрофлоры влагалища [19].

Британские ученые *Robert Cruickshank* и *Albert Sharman* в 1934 году в работе «*The Biology of the Vagina in the Human Subject*» описали три степени чистоты влагалища в зависимости от типов микроорганизмов в составе микробиоценоза, консистенции и значений pH влагалищного содержимого. Степень I определялась как «однородная бактериальная флора, представленная бациллами Додерлейна, возможное присутствие дрожжеподобных грибов, низкие значения pH (4,0–4,4), кремовато-белая, творожистая консистенция отделяемого влагалища». Степень III — «исчезновение палочек Додерлейна и присутствие нескольких типов бактерий, таких как дифтероиды, энтерококки, стафилококки, вибрионы и колиформные бактерии, pH выделений повышен (pH 5,6–7,6), они могут быть обильными и гнойными или довольно скудными и водянистыми». Степень II — это «промежуточная между первой и третьей: палочки Додерлейна могут присутствовать в сочетании с одним или более типом бактерий, pH варьирует от 4,6 до 5,6» [14].

В 1948 году Отто Ировец с соавт. (*O. Jirovec* at al.) предложили свою классификацию микробиоценоза влагалища, в которой выделяли шесть картин. I картина — «норма», с преобладанием палочек Додерлейна, II картина — «негнойный бактериальный кольпит»: обнаружение многочисленных негнородных бактерий без лейкоцитов. Под это описание подходят микроскопические признаки бактериального вагиноза. III картина — «гнойный бактериальный кольпит» с обнаружением в препарате большого количества лейкоцитов и гнородных микробов. IV картина, по Ировец с соавт., соответствует микроскопической картине гонококковой инфекции, V картина — трихомонадному вагиниту, VI картина — кандидозному вагиниту [29].

Дальнейшее изучение микробиологии влагалища связано с открытием *Gardner H. L.* и *Duke C. D.* в 1955 году нового вида бактерий, названного ими *Haemophilus vaginalis*. До 50-х годов XX века микробиологическая этиология состояния, соответствующего III степени микробиоценоза влагалища, описываемого как «неспецифический вагинит» или «негнойный бактериальный кольпит», оставалась все еще неизвестной. Гарднер и Дюк

показали, что описанный ими микроорганизм преимущественно представлен во влагалищном отделяемом женщин с бактериальным вагинозом. Дальнейшие исследования нового вида бактерий привели к тому, что он был выделен в новый род *Gardnerella* по имени одного из первооткрывателей [23].

Для микроскопической диагностики самого распространенного нарушения микробиоценоза влагалища, а именно бактериального вагиноза, Кэрол Шпигель с соавторами (*Carol A. Spiegel* at al.) в 1983 году разработали критерии, основанные на количественной оценке морфотипов лактобацилл и морфотипов гарднерелл в мазке отделяемого слизистой оболочки влагалища, окрашенного по Граму. Количество бактерий каждого морфотипа предлагалось подсчитывать при увеличении $\times 1000$ с использованием масляной иммерсии по следующей схеме: 1+, если данный морфотип представлен не в каждом поле зрения или менее одного в поле зрения; 2+ (++) , если в каждом поле зрения обнаруживались 1–5 бактерий; 3+ (+++), если в поле зрения было 6–30 бактерий; 4+ (++++), если >30 в поле зрения. Крупные грамположительные палочки определялись как морфотип *Lactobacillus*. Мелкие грам-вариабельные палочки представлялись как морфотип *Gardnerella*. Другие микроорганизмы характеризовались только по морфологии, а именно грамотрицательные палочки, изогнутые палочки, грамположительные кокки в цепочках и фузиформные бактерии. Если морфотип *Lactobacillus* был представлен изолированно или в сочетании только с морфотипом *Gardnerella*, микробиоценоз оценивали как нормальный. Если в отделяемом влагалища преобладала смешанная микрофлора, а морфотип *Lactobacillus* отсутствовал или количество лактобацилл было снижено, состояние микробиоценоза интерпретировали как бактериальный вагиноз [50].

Позже Роберт Нуджент с соавт. (*Nugent R. P.* at al., 1991) вернулись к критериям Шпигель и на их основе разработали метод оценки микробиоценоза влагалища для диагностики бактериального вагиноза, который используется до сих пор. Метод Нуджента основан на балльной оценке соотношения трех морфотипов бактерий, а именно *Lactobacillus* (грамположительные крупные палочки), *Gardnerella/Bacteroides* (грамвариабельные или грамотрицательные мелкие палочки) и *Mobiluncus* (изогнутые грамотрицательные бактерии) в препаратах отделяемого слизистой влагалища, окрашенных по Граму. Баллы присваиваются в соответствии с количеством каждого из трех морфотипов, которое оценивается аналогично методу Шпигель. Сумма баллов

7–10 интерпретируется как наличие бактериального вагиноза, 4–6 — промежуточный тип микробиоценоза влагалища, а 0–3 баллов — отсутствие бактериального вагиноза [42]. Метод Нуджента хорошо подходит для диагностики бактериального вагиноза, но остается спорной интерпретация промежуточного варианта, соответствующая 4–6 баллам. Часть исследователей связывает этот вариант микробиоценоза с различными осложнениями беременности, в других работах подобных корреляций не выявлено. Кроме того, традиционное лечение бактериального вагиноза не дает эффекта в большинстве случаев, сопровождающихся промежуточной картиной по Нудженту.

В 1994 году Е. Ф. Кира предложил классификацию микроскопической оценки микробиоценоза влагалища, описав четыре типа его состояния и соответствующие каждому типу нозологические формы. Так, первый тип «нормоценоз» определяется как физиологическое состояние влагалища и характеризуется доминированием лактобацилл, отсутствием грамотрицательной микрофлоры и элементов дрожжеподобных грибов, наличием единичных лейкоцитов и «чистых» эпителиальных клеток. «Промежуточный тип» является пограничным и часто наблюдается у здоровых женщин, не сопровождаясь клиническими проявлениями и жалобами. При микроскопическом исследовании обнаруживаются умеренное или сниженное количество лактобацилл, наличие грамположительных кокков и грамотрицательных палочек, лейкоциты, моноциты, макрофаги и эпителиальные клетки. «Дисбиоз влагалища» описывается как полное отсутствие лактобацилл или их малое количество, обилие полиморфной грамположительной микрофлоры, наличие «ключевых клеток». Количество лейкоцитов может варьировать, отмечается незавершенный фагоцитоз. Этот тип микробиоценоза соответствует микроскопической картине бактериального вагиноза. Четвертый тип микробиоценоза описывается как воспалительный или соответствующий диагнозу «Вагинит». Отмечается выраженный лейкоцитоз, наличие макрофагов, эпителиальных клеток [5].

Впоследствии ученые продолжали модифицировать и обобщать существующие классификации, примером чего может служить опубликованная в 2002 году работа Catherine A. Ison и Phillip E. Nay. Авторы предлагают оценивать окрашенные по Граму препараты отделяемого влагалища по пяти степеням. При этом I, II, III степени соответствуют классификации Шрёдера (1921 г.). Дополнительно нулевая (0) степень описывает состояние микробиоценоза влагалища, представленного только эпителиальными клет-

ками с полным отсутствием микроорганизмов, а IV степень — эпителиальные клетки, покрытые только грамположительными кокками [27].

В 2003 году Всемирная организация здравоохранения предложила свои критерии диагностики бактериального вагиноза. Нормой считается наличие только лактобацилл или преимущественно лактобацилл в сочетании с небольшим количеством коккобацилл/коротких палочек. Микроскопической картине бактериального вагиноза соответствует присутствие в препарате «ключевых клеток», смешанной микрофлоры в виде грамположительных и грамположительных палочек при значительном уменьшении количества лактобацилл или их полном отсутствии [66].

Клинические критерии оценки микробиоценоза влагалища были предложены Ричардом Амселем с соавт. (Amsel R. et al.) в 1983 году и используются в настоящее время в качестве диагностических критериев и для контроля лечения бактериального вагиноза. Авторы предлагали сначала оценивать консистенцию вагинальных выделений, pH влагалища, запах после смешивания вагинального секрета с каплей 10% КОН, затем проводить микроскопическое исследование нативных препаратов отделяемого влагалища. Критериями бактериального вагиноза, по Амселю с соавт., являются наличие гомогенных и жидких вагинальных выделений, pH вагинальных выделений выше 4,5, наличие «ключевых клеток» в нативном препарате и положительный «аминовый тест» (появление специфического «рыбного запаха»). Для диагностики бактериального вагиноза достаточно наличия трех из четырех критериев Амсея [11]. В работах, исследующих эффективность лечения бактериального вагиноза, отсутствие всех четырех критериев Амсея после терапии расценивают как «излечение», наличие у пациентки первого или второго критерия (типичные выделения или pH более 4,5) интерпретируют как «улучшение». В случае, когда после окончания лечения у пациентки присутствуют третий и четвертый критерии Амсея, а именно положительный «аминовый тест» и «ключевые клетки» в нативном препарате, терапия признается неэффективной [32].

Классические культуральные методы исследования вагинальной микрофлоры основаны на выделении чистых культур микроорганизмов, представляющих микробное сообщество этого локуса и их видовой идентификации. Этот метод, наряду с микроскопическими методами, долгое время считался «золотым стандартом» лабораторной диагностики. Специфичность бактериологического метода при выявлении возбудителя приближается к 100%. Однако ограничения этого метода,

особенно в плане выявления трудно культивируемых или некультивируемых микроорганизмов, не позволяли дать полную оценку состояния вагинальной микрофлоры. До 70-х годов XX века, когда в лабораторную практику были внедрены анаэробные техники культивирования, бактериологические методы не обеспечивали выделения облигатных анаэробных микроорганизмов данного биотопа. Кроме того, идентификация микроорганизмов с использованием рутинных биохимических тестов более трудоемкая, дорогостоящая, требовательная к соблюдению всех этапов анализа, длительная по времени процедура.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — это метод амплификации *in vitro* заданных фрагментов ДНК с полностью или частично известной последовательностью.

В 1983–1984 гг. Кэри Маллис (К. Mullis) провел ряд экспериментов по разработке метода ПЦР. Результатом открытия ПЦР стало почти немедленное практическое использование метода. В 1985 году Рэндалл Сайки с соавт. опубликовали статью, в которой была описана амплификация геномной последовательности β -глобина [44]. С этого момента количество публикаций о применении ПЦР в различных областях науки стало увеличиваться в геометрической прогрессии.

Технологии ДНК-секвенирования появились благодаря работам ученых Аллана Максама, Уолтера Гилберта и Фредерика Сенгера в 70-х годах прошлого века [37, 45]. В процессе секвенирования генома (или полногеномного секвенирования, *whole genome sequencing*) исследователь получает информацию о всей ДНК, содержащейся в генетическом аппарате клетки макро- или микроорганизма. Непрерывное совершенствование этих технологий привело к тому, что проект по секвенированию человеческого генома «Геном человека» (*Human Genome Project*, HGP), после десяти лет работы был закончен за один год [64, 57]. Автоматизированное секвенирование по Сенгеру считается «методом первого поколения», тогда как современные методы называются «методами следующего или второго поколения» (*Next-Generation Sequencing*, NGS). В основе этих технологий находятся различные стратегии, основанные на уникальных комбинациях приготовления ДНК-матриц, секвенирования, визуализации, а также выравнивания и составления последовательностей (*sequences* или «сиквенсов») ДНК [40].

Молекулярные методы для изучения микробиоценоза влагалищного биотопа используются уже более 12 лет [13]. Учеными предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения

микроорганизмов, выявления точечных мутаций, описаны десятки различных применений метода. Таким образом, открытие метода ПЦР стало одним из наиболее выдающихся событий за последние десятилетия в области молекулярной биологии. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

Работы Менарда с соавт. в 2008–2010 годах показали высокую специфичность и чувствительность количественной ПЦР для диагностики бактериального вагиноза [38, 39]. Новые молекулярные технологии, такие как пиросеквенирование, MALDI-TOF масспектрометрия, техники ДНК-микрочипов, являются перспективными для изучения микрофлоры влагалища в норме и при ее нарушении.

Исследования А. Свидзинского с соавт. основаны на анализе методом флюоресценции *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*, FISH) вагинальных препаратов и десквамированного вагинального эпителия, обнаруженного в моче женщин и их половых партнеров. Возможно, в будущем будет доказана вероятная роль биопленок, содержащих *Gardnerella vaginalis*, в передаче бактериального вагиноза между сексуальными партнерами и неудачах терапии этого состояния [53, 54, 62].

Микроскопические методы исследования микробиоценоза влагалища

Микроскопические методы исследования микробиоценоза влагалища применяются в лабораторной и клинической практике давно, но до сих пор остаются актуальными и востребованными, так как позволяют установить диагноз пациентке с наименьшими временными и материальными затратами. Чувствительность микроскопического метода диагностики бактериального вагиноза составляет 93 %, а специфичность 70 % [4].

В настоящее время для оценки микробиоценоза влагалища используется традиционная световая микроскопия или микроскопия с дополнительными методами контрастирования, такими как фазовый контраст. В качестве объектов исследования используют неокрашенные препараты отделяемого влагалища (нативный или влажный мазок, высушенный и регидратированный мазок) и окрашенные простыми и сложными методами препараты. Самыми распространенными методами окрашивания являются окраска по Граму и метиленовым синим. Микроскопический метод дает возможность увидеть целостную картину микробиоценоза влагалища, состояние эпителия, наличие и выраженность воспалительной реакции, количественный и качественный состав микрофлоры, наличие патогенных агентов, таких как трихомонады и элементы дрожжеподобных гри-

бов. Кроме того, развитие технологий позволило усовершенствовать микроскопическую технику, оснастить ее дополнительными устройствами для получения цифровых изображений, их хранения, программной обработки и документирования полученных результатов.

Ограничения микроскопического метода во многом связаны с разрешающей способностью микроскопической техники, которая не позволяет обнаружить в препаратах вагинального отделяемого микоплазмы, хламидии, вирусы.

Кроме того, на результаты микроскопического исследования имеют влияние не только субъективное мнение специалиста, выбор репрезентативной части препарата, но и технические параметры микроскопического оборудования. Так, площадь поля зрения микроскопа зависит от показателей увеличения оптической части микроскопа. Результаты оценки количества лейкоцитов или морфотипов бактерий могут быть разными для одного препарата, просмотренного на двух микроскопах с разными техническими характеристиками, или для участков препарата различной толщины. Все это обуславливает необходимость стандартизации микроскопического метода оценки микробиоценоза влагалища.

Микроскопическое исследование нативного препарата («bed-side» microscopy)

Микроскопическое исследование нативного препарата может проводиться как в лаборатории, так и непосредственно лечащим врачом во время приема пациентов. В качестве объекта исследования могут быть использованы свежие или высушенные и регидратированные препараты отделяемого влагалища. Чувствительность этого варианта микроскопического исследования при обнаружении «ключевых клеток» достигает 77%, а специфичность 92%, что выше, чем аналогичный показатель для окрашенных препаратов [18, 33, 49].

Микроскопия окрашенных препаратов

Этот метод используется в рутинной практике большинства диагностических лабораторий.

Чувствительность и специфичность микроскопической оценки окрашенных препаратов для диагностики нарушений микробиоценоза влагалища сравнимы с показателями для микроскопии нативных препаратов, то есть достаточно высоки. Что касается чувствительности микроскопического метода для диагностики трихомониаза и гонореи, то она ниже, чем у микроскопии нативного препарата и в большей степени зависит от квалификации и опыта специалиста, проводящего исследование. В случае достаточного про-

фессионализма исследователя чувствительность микроскопического метода для диагностики трихомонадного вагинита достигает 85,7% при 100% специфичности [5]. Отмечается высокий уровень ложно-положительных диагнозов у пациенток в постменопаузе, так как в клинических материалах часто присутствуют клетки парабазального и базального слоев слизистой оболочки влагалища, которые нередко принимают за трихомонады из-за похожих размеров [16].

При проведении микроскопического исследования последовательно оценивают препараты, окрашенные двумя способами: метиленовым синим и по Граму. Метод окраски по Граму позволяет дифференцировать микроорганизмы на грамположительные, грамотрицательные и грамвариабельные в соответствии с их способностью удерживать основной краситель. В свою очередь, эта способность зависит от строения клеточной стенки: грамположительные микроорганизмы после окраски имеют фиолетовый цвет, грамотрицательные — розовый. Лактобациллы являются крупными грамположительными палочками, а морфотип гарднерелл описывается как грамотрицательные или грамвариабельные коккобациллы. Окрашенные препараты могут быть сохранены и использованы в дальнейшем для повторного исследования другими специалистами [31].

Культуральный (бактериологический) метод

Современные техники анаэробного и аэробного культивирования, и идентификации бактерий делают бактериологический метод полезным и бесспорным для количественного и видового определения микроорганизмов, населяющих исследуемый биотоп. В частности, можно обнаружить лактобациллы, как основные представители физиологического микробиоценоза влагалища, гарднереллы, другие бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом, а также энтеробактерии, стрептококки группы В, стафилококки при дифференцировании аэробного вагинита и бактериального вагиноза. Большое значение имеет выделение *Trichomonas vaginalis* и дрожжеподобных грибов рода *Candida* при смешанной инфекции. В некоторых случаях микоплазмы и уреаплазмы могут усугублять течение бактериального вагиноза и быть причиной осложнений беременности, таких как выкидыши и преждевременные роды. Культивирование генитальных микоплазм может помочь в понимании патогенеза подобных нарушений микробиологии влагалища [25, 63].

Бактериологический метод является трудоемким и затратным, так как требует использования большого ассортимента питательных сред и реа-

гентов, высокотехнологичного оборудования для обеспечения необходимых условий культивирования, бактериологических анализаторов, систем документирования полученных результатов, высококвалифицированного и опытного персонала. Однако полученные чистые культуры дают возможность их дальнейшего изучения, а также определения чувствительности к антибактериальным или антимикотическим препаратам.

К последним внедренным способам идентификации бактерий относится метод белкового профилирования MALDI-TOF MS (от англ. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass-Spectrometry*). Метод время пролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией используется в рутинной лабораторной практике для быстрой видовой идентификации микроорганизмов с 2009 года. В настоящее время база данных MALDI *BioTyper* содержит около 5 тысяч бактерий, в том числе 236 видов лактобацилл, и периодически обновляется [20].

Молекулярные методы

В последние десятилетия филогенетический анализ, прежде всего секвенирование гена 16S рРНК микробной клетки, показывает, что сообщества бактерий в составе вагинального биотопа более сложны, чем это считалось раньше. Появление молекулярных методов в лабораторной практике и их усовершенствование позволили расширить спектр определяемых микроорганизмов за счет выявления трудно культивируемых и прихотливых, преимущественно анаэробных бактерий, которые ранее не выделялись при традиционном культуральном анализе [52]. Например, это относится к обнаружению некоторых видов лактобацилл и бактерий, ассоциированных с бактериальным вагинозом (*Atopobium vaginae*, BVAB 1, 2, 3 и др.) [13, 59].

В последних исследованиях, посвященных определению состава вагинальной микрофлоры, были использованы данные полногеномного секвенирования следующего поколения (*Next-Generation Sequencing*, NGS) как вагинальных образцов, так и чистых культур микроорганизмов, выделенных из этого биотопа, фингерпринтинга (*fingerprinting*) и количественной ПЦР (qPCR) [28, 30, 36, 43, 47, 51, 67, 68].

Для анализа большого объема полученной генетической информации исследователи использовали статистический метод кластеризации. Кластер — это группа из нескольких однородных элементов, которая может рассматриваться как самостоятельная единица, обладающая определенными свойствами. Результатом стало обнаруже-

ние от 3 до 9 кластеров в составе микробиоценоза влагалища. Наиболее часто описывали кластеры с преобладанием *L. iners*, кластеры, содержащие несколько видов *Lactobacillus* spp. или сочетание их с *Gardnerella vaginalis*. В каждом исследовании описан хотя бы один кластер, в котором не было доминирования какого-то одного таксона, но сохранилась смесь анаэробных микроорганизмов с лактобациллами или без них. Такие кластеры типично содержали *L. iners* (реже *L. gasseri*), *G. vaginalis* и смесь из других строго анаэробных микроорганизмов. Кроме этого, были обнаружены *Atopobium vaginae*, *Eggerthella* spp., *Mobiluncus* spp., *Lachnospiraceae* (включая BVAB 1–3), *Dialister* spp., *Megasphaera* spp., *Parvimonas* spp. (ранее известный как *Peptostreptococcus*), *Veillonella* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Gemella* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Escherichia coli/Shigella* spp. и другие.

В практической работе диагностических лабораторий молекулярные методы представлены прежде всего различными модификациями полимеразной цепной реакции. Чувствительность ПЦР достигает единичных копий ДНК бактериальных клеток в биопробе, что позволяет существенно повысить эффективность выявления инфекционных агентов непосредственно в клиническом образце, минуя стадию бактериологического посева. Если традиционная ПЦР позволяет обнаруживать фрагменты ДНК в исследуемом образце, то мультипраймерная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени определяет количественное содержание нескольких ДНК-мишеней в исследуемом образце. Именно на основе мультипраймерной количественной *Real-Time* PCR созданы отечественные коммерческие наборы для оценки микробиоценоза влагалища женщин репродуктивного возраста ФЕМОФЛОР® и «АмплиСенс® ФлороЦеноз/Бактериальный вагиноз-FL». Тест ФЕМОФЛОР® предназначен для определения общего количества бактерий в клиническом материале и ДНК *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, а также дрожжеподобных грибов рода *Candida*, генитальных микоплазм и других микроорганизмов, в зависимости от комплектации набора. ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволяет определить количество геном-эквивалентов, которое пропорционально количеству клеток микроорганизма. На основании расчета относительного количества определенной группы микроорганизмов в общей бактериальной массе в формате десятичного логарифма и в процентах делают заключение о состоянии микробио-

ценоза. «Нормоценоз» определяется, если доля лактобацилл относительно общей бактериальной массы составляет более 80% (0,1 lg), «умеренный дисбиоз» при содержании лактобацилл от 20 до 80% (0,7–0,1 lg). «Выраженный дисбиоз» характеризуется уменьшением доли лактобацилл менее 20% (более 0,7 lg). Тест «АмплиСенс® ФлороЦеноз/Бактериальный вагиноз-FL» предназначен для диагностики бактериального вагиноза. В его основе лежит определение соотношения лактобацилл и двух ключевых для бактериального вагиноза микроорганизмов — *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*.

Диагностическая чувствительность теста ФЕМОФЛОР® для выявления дисбиотических состояний составляет 88,7%, специфичность — 89,6%. В случае бактериального вагиноза чувствительность достигает 95%. Чувствительность теста «АмплиСенс® ФлороЦеноз/Бактериальный вагиноз-FL» составила 94% при 97% специфичности [2, 9].

Метод газожидкостной хроматографии

Этот метод применяют для определения конечных продуктов метаболизма бактерий (короткоцепочечные летучие жирные кислоты) и длинноцепочечных жирных кислот наружной мембраны и других компонентов клеточной стенки бактерий и грибов. Так как каждый род и вид бактерий образует разные летучие жирные кислоты и в разных концентрациях, результаты газожидкостной хроматографии представляют собой «метаболический паспорт» выделенного штамма. Качественный и количественный состав этих кислот уникален для каждого вида микроорганизмов, что позволяет различить даже близкородственные виды. Использование метода газожидкостной хроматографии для оценки микробиоты влагалища основано на идентификации группы веществ — продуктов метаболизма микроорганизмов, связанных с нарушениями микробиоценоза, и микроорганизмов, присутствующих в норме. К числу таких метаболитов относят летучие жирные кислоты (уксусная, изопропионовая, пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая) и нелетучие органические кислоты (молочная и янтарная). Соотношение лактата и сукцината — метаболитов основных представителей микробиоценоза влагалища, а именно лактобацилл и гарднерелл, меняется в зависимости от их представительства в вагинальном биотопе. Для физиологического микробиоценоза это соотношение составляет 0,4. При бактериальном вагинозе показатель становится больше и появляются метаболиты строгих анаэробов — пропионат, ацетат и бутират.

Чувствительность и специфичность метода газожидкостной хроматографии, по данным зарубежных авторов, составляют от 78–81 до 100% [56]. В работе Анкирской А. С. и соавт. сообщается о чувствительности и специфичности метода 80 и 88,6% соответственно [1]. Однако метод используется чаще в исследовательских лабораториях из-за высокой степени сложности и дороговизны. В практической работе для оценки микробиоценоза урогенитального тракта этот метод не регламентирован.

Заключение

Оценка микробиоценоза влагалища имеет большое значение для диагностики инфекций репродуктивного тракта, бактериального вагиноза, а также для определения необходимости лечения и адекватного назначения терапии. Лабораторная диагностика или методы, применяемые у постели пациента, должны быть быстрыми, точными и максимально полно представлять картину микробиоценоза. Микроскопические методы, несмотря на то, что используются давно, не потеряли своей актуальности, совершенствуются и широко применяются в диагностических и исследовательских лабораториях, а также на приеме практикующего врача. Актуальной задачей и обсуждаемым вопросом в современных научных работах является необходимость стандартизации микроскопических методов оценки микробиоценоза влагалища, особенно в части определения количества лейкоцитов и морфотипов бактерий. Кроме того, дальнейшая оптимизация микроскопических методов дает возможность снизить степень субъективности результатов за счет применения автоматизированных анализаторов изображений.

Бактериологический метод в настоящее время располагает технологиями культивирования и идентификации анаэробных и аэробных микроорганизмов, представляющих вагинальный биотоп. Требования к оснащенности лаборатории и высокой квалификации исследователя, трудоемкость и высокая стоимость анализа делают его применимым преимущественно для исследовательских и научных целей.

Молекулярные методы оценки микробиоценоза влагалища подтвердили традиционные представления о преобладании лактобацилл в составе влагалищного биотопа и расширили представления об их разнообразии, а также определили наличие и соотношение микроорганизмов, не выделяемых ранее традиционными бактериологическими методами.

Многообразие и сложность современных лабораторных методов определяет необходимость

выбора оптимального их сочетания и позволяет наиболее полно оценить микробиоценоз влагалища и урогенитального тракта в целом.

Статья представлена А. М. Савичевой,
ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта»,
Санкт-Петербург

Литература

1. Анкирская А. С., Прилепская В. Н., Байрамова Г. Р., Муравьева В. В. Бактериальный вагиноз: особенности клинического течения, диагностика и лечение. Русский медицинский журнал. 1998; 5: 276–84.
2. Болдырева М. Н., Донников А. Е., Тумбинская Л. В. Фемофлор. Исследование биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Методическое пособие для лаборантов. М.; 2009.
3. Вагорас А., Савичева А., Галлен А, Домейка М. Основы микроскопии мазков мочеполового тракта. Каунас: «Kata studio»; 2001.
4. Кира Е. Ф. Бактериальный вагиноз (клиника, диагностика, лечение). Автореферат дис... д-ра. мед. наук. СПб.; 1995.
5. Кира Е. Ф. Клиника и диагностика бактериального вагиноза. Акушерство и Гинекология. 1994; 2: 32–5.
6. Мартикайнен З. М., Григорьев А. Н., Рыжкова О. С., Шипицына Е. В., Литвиненко И. В., Галкина А. В., Кудрявцева Н. И., Тангатарова Е. М., Ломакина О. А., Протасова Е. П., Романцева С. Ю., Савичева А. М. Сравнение лабораторных методов диагностики инфекций, вызываемых *Trichomonas vaginalis*. Журнал акушерства и женских болезней. 2014; LXIII (1): 5–9.
7. Савичева А. М., Соколовский Е. В., Домейка М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путем. СПб.: Фолиант; 2004.
8. Строганов В. В. Бактериологические исследования полового канала женщины в различные периоды ее жизни с включением материалов к вопросу о самозащите организма против патогенных микробов со стороны полового канала. Дис... д-ра медицины. СПб.; 1893.
9. Шалепо К. В., Назарова В. В., Менухова Ю. Н., Румянцева Т. А., Гуцин А. Е., Савичева А. М. Оценка современных методов лабораторной диагностики бактериального вагиноза. Журнал акушерства и женских болезней. 2014; LXIII (1): 26–32.
10. Af Heurlin M. O. Bakteriologische Untersuchungen des Keimgehaltes im Genitalkanale der fiebernden Wöchnerinnen mit Berücksichtigung der Gesamtmorbidität im Laufe eines Jahres. Helsingfors; 1910.
11. Amsel R., Totten P. A., Spiegel C. A., Chen K. C., Eschenbach D., Holmes K. K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. The American Journal of Medicine. 1983; 74 (1): 14–22.
12. Beverly E. S., Zariffard M. R., Wang Q. J., Chen H. Y., Bremer J., Cohen M. H., Spear G. T. Female genital-tract HIV load correlates inversely with Lactobacillus species but positively with bacterial vaginosis and Mycoplasma hominis. Journal of Infectious Diseases. 2005; 191 (1): 25–32.
13. Burton J. P., Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. Journal of Infectious Diseases. 2002; 186 (12): 1770–80.
14. Cruickshank R., Sharman A. The biology of the vagina in the human subject. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 1934; 41 (2): 208–226.
15. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das puerperalfieber. Leipzig: E. Besold; 1892. Доступен по: <https://archive.org/stream/dasscheidensekre00dd> (дата обращения 12.02.2015 г.).
16. Donders G. G. G. Definition and classification of abnormal vaginal flora. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology. 2007; 21 (3): 355–73.
17. Donders G. G. G., Vereecken A., Bosmans E., Dekeersmaecker A., Salembier G., Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 2002; 109 (1): 34–43.
18. Donders G. G. G., Larsson P. G., Platz-Christensen J. J., Hallen A., van der Meijden W., Wölnner-Hanssen P. Variability in diagnosis of clue cells, lactobacillary grading and white blood cells in vaginal wet smears with conventional bright light and phase contrast microscopy. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2009; 145 (1): 109–12.
19. Donders G. G. G. Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 1999; 7 (4): 177.
20. Emonet S., Shah H. N., Cherkaoui A., Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. Clinical Microbiology and Infection. 2010; 16(11): 1604–1613.
21. Fredricks D. N., Fiedler T. L., Marrazzo J. M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. New England Journal of Medicine. 2005; 353 (18): 1899–911.
22. Gajer P., Brotman R. M., Bai G., Sakamoto J., Schütte U. M., Zhong X., Koenig S. S., Fu L., Ma Z., Zhou X, Abdo Z., Forney L. J., Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. Science Translational Medicine. 2012; 4 (132): 132ra52.
23. Gardner H. L., Dukes C. D. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 1955; 69 (5): 962–76.
24. Hayes R. J., Watson-Jones D., Celum C., van de Wijgert J., Wasserheit J. Treatment of sexually transmitted infections for HIV prevention: end of the road or new beginning? AIDS. 2010; 24 (04).
25. Hillier S. L., Nugent R. P., Eschenbach D. A., Krohn M. A., Gibbs R. S., Martin D. H., Cotch M. F., Edelman R., Pastorek J. G., Rao V. A., McNellis D., Regan J. A., Carey J. C., Klebanoff M. A. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. New England Journal of Medicine. 1995; 333 (26): 1737–42.

26. Holmes K.K., Sparling P.F., Stamm W.E., Piot P., Wasserheit J.N., Cory L., Cohen M., Watts H. Sexually Transmitted Diseases. 4th edn. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
27. Ison C.A., Hay P.E. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sexually Transmitted Infections*. 2002; 78 (6): 413–5.
28. Jespers V., Menten J., Smet H., Poradosú S., Abdellati S., Verhelst R., Hardy L., Buvé A., Crucitti T. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiology*. 2012; 12 (1): 83.
29. Jirovec O., Peter R., Málek I. Neue Klassifikation der Vaginalbiocoenose auf sechs Grundbilder. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1948; 126 (2): 77–99.
30. Kim T.K., Thomas S.M., Ho M., Sharma S., Reich C.I., Frank J.A., Yeater K.M., Biggs D.R., Nakamura N., Stumpf R., Leigh S.R., Tapping R.I., Blanke S.R., Slauch J.M., Gaskins H.R., Weisbaum J.S., Olsen G.J., Hoyer L.L., Wilson B.A. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47 (4): 1181–1189.
31. Krohn M.A., Hillier S.L., Eschenbach D.A. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989; 27 (6): 1266–71.
32. Larsson P.G., Forsum U. Bacterial vaginosis—a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *Apmis*. 2005; 113 (5): 305–16.
33. Larsson P.G., Platz-Christensen J.J. Enumeration of clue cells in rehydrated air-dried vaginal wet smears for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 1990; 76 (4): 727–30.
34. Li J., McCormick J., Bocking A., Reid G. Importance of vaginal microbes in reproductive health. *Reproductive Sciences*. 2012; 19 (3): 235–42.
35. 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. *Annals of Internal Medicine*. 2008; 149 (1): 20–8.
36. Martin D.H., Zozaya M., Lillis R., Miller J., Ferris M.J. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2012; 123: 242.
37. Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977; 74 (2): 560–4.
38. 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. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2010; 29 (12): 1547–52.
39. Menard J.-P., Fenollar F., Henry M., Bretelle F., Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47 (1): 33–43.
40. Metzker M.L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11 (1): 31–46.
41. Mitchell C., Moreira C., Fredricks D., Paul K., Caliendo A.M., Kurpewski J., Ingersoll J., Cu-Uvin S. Detection of fastidious vaginal bacteria in women with HIV infection and bacterial vaginosis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2009; 2009: Article ID 236919: 6 pages.
42. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29 (2): 297–301.
43. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S.K., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108 (Suppl 1): 4680–7.
44. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230 (4732): 1350–4.
45. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975; 94 (3): 441–8.
46. Schröder K. Zur Pathogenese und Klinik des vaginalen Fluors. *Zentralbl Gynäkol*. 1921; 38: 1350–61.
47. Shipitsyna E., Roos A., Datcu R., Hallén A., Fredlund H., Jensen J.S., Engstrand L., Unemo M. 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.
48. Sobel J.D., Reichman O., Misra D., Yoo W. Prognosis and treatment of desquamative inflammatory vaginitis. *Obstetrics & Gynecology*. 2011; 117 (4): 850–5.
49. Sodhani P., Garg S., Bhalla P., Singh M.M., Sharma S., Gupta S. Prevalence of bacterial vaginosis in a community setting and role of the pap smear in its detection. *Acta Cytologica*. 2005; 49 (6): 634–8.
50. Spiegel C.A., Amsel R., Holmes K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18 (1): 170–7.
51. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W., Ross F.J., McCoy C.O., Bumgarner R., Marrazzo J.M., Fredricks D.N. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PloS one*. 2012; 7 (6): e37818.
52. Srinivasan S., Fredricks D.N. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008; 2008: Article ID 750479: 22 pages.
53. Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., Ladhoff A., Swidsinski S., Hale L.P., Lochs H. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 2005; 106 (5, Part 1): 1013–23.
54. Swidsinski A., Doerffel Y., Loening-Baucke V., Swidsinski S., Verstraelen H., Vanechoutte M., Lemm V., Schilling J.,

- Mending W. Gardnerella biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2010; 70: 256–263.
55. Taylor B. D. P., Darville T., Haggerty C. L. Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease? *Sexually Transmitted Diseases*. 2013; 40 (2): 117–22.
56. Thomason J. L., Gelbart S. M., Wilcoski L. M., Peterson A. K., Jilly B. J., Hamilton, P. R. Proline aminopeptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 1988; 71 (4): 607–11.
57. Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., et al. The Sequence of the Human Genome. *Science*. 2001; 291 (5507):1304–51.
58. Verani J. R., McGee L., Schrag S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC, 2010. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2010.
59. Verhelst R., Verstraelen H., Claeys G., Verschraegen G., Delanghe J., Van Simaey L., De Ganck C., Temmerman M., Vaneechoutte M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiology*. 2004; 4(1):11 pages.
60. Verstraelen H., Verhelst R., Vaneechoutte M., Temmerman M. Group A streptococcal vaginitis: an unrecognized cause of vaginal symptoms in adult women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2011; 284 (1): 95–8.
61. Verstraelen H. et al. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiology*. 2009; 9 (1): 116.
62. Verstraelen H., Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2013; 26 (1): 86–9.
63. Vogel I., Thorsen P., Hogan V. K., Schieve L. A., Jacobsson B., Ferre C. D. The joint effect of vaginal *Ureaplasma urealyticum* and bacterial vaginosis on adverse pregnancy outcomes. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2006; 85 (7): 778–85.
64. Watson J. D. The human genome project: past, present, and future. *Science*. 1990; 248 (4951): 44–9.
65. Wiesenfeld H. C., Hillier S. L., Krohn M. A., Landers D. V., Sweet R. L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36 (5): 663–8.
66. World Health Organization et al. Sexually transmitted and other reproductive tract infections: a guide to essential practice; 2005.
67. Yamamoto T., Zhou X., Williams C. J., Hochwalt A., Forney L. J. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. 2009; 22 (1): 11–8.
68. Yoshimura K., Morotomi N., Fukuda K., Nakano M., Kashimura M., Hachisuga T., Taniguchi H. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 205 (3): 235.e1–235.e9.

References

- Ankirkaya A. S., Prilepskaya V. N., Bayramova G. R., Murav'eva V. V. Bakterial'nyy vaginoz: osobennosti klinicheskogo techeniya, diagnostika i lechenie. [Bacterial vaginosis: clinical features, diagnosis and treatment] *Russkiy Meditsinskiy Zhurnal*. 1998; 5: 276–84. (in Russian).
- Boldyreva M. N., Donnikov A. E., Tumbinskaya L. V. Femoflor. Issledovanie biotsenoza urogenital'nogo trakta u zhen-shchin metodom PTsR s detektsiyey rezul'tatov v rezhime real'nogo vremeni [Femoflor. Women biocenosis urogenital tract study with detection by PCR results in real time]. *Metodicheskoe posobie dlya laborantov*. M.; 2009. (in Russian).
- Vagoras A., Savicheva A., Gallen A, Domejka M. Osnovy mikroskopii mazkov mocheполоvogo trakta [Basics of microscopy of urinary tract smears]. Kaunas: "Kata studio"; 2001. (in Russian).
- Kira E. F. Bakterial'nyj vaginoz (klinika, diagnostika, lechenie) [Bacterial vaginosis (clinical features, diagnosis, treatment)] MD thesis. SPb.; 1995. (in Russian).
- Kira E. F. Klinika i diagnostika bakterial'nogo vaginoza [Clinic and diagnosis of bacterial vaginosis]. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 1994; 2: 32–5. (in Russian).
- Martikajnen Z. M., Grigor'ev A. N., Ryzhkova O. S., Shipitsyna E. V., Litvinenko I. V., Galkina A. V., Kudrjavceva N. I., Tangatarova E. M., Lomakina O. A., Protasova E. P., Romanceva S. Ju., Savicheva A. M. Sravnenie laboratornykh metodov diagnostiki infekcij, vyzvaemykh *Trichomonas vaginalis* [Comparison of laboratory methods for diagnosis of infections caused by *Trichomonas vaginalis*]. *Zhurnal Akusherstva i Zhenskih Boleznej*. 2014; LXIII (1): 5–9. (in Russian).
- Savicheva A. M., Sokolovskij E. V., Domejka M. Kratkoe rukovodstvo po mikroskopicheskoj diagnostike infekcij, peredavaemykh polovym putem [Quick Guide to the microscopic diagnosis of STI]. SPb.: Foliant; 2004. (in Russian).
- Stroganov V. V. Bakteriologicheskie issledovaniya polovogo kanala zhenshhiny v razlichnye periody ee zhizni s vklucheniem materialov k voprosu o samozashhite organizma protiv patogennykh mikrobov so storony polovogo kanala [Bacteriological studies of sexual channel women in different periods of her life with the inclusion of material to the issue of self-defense of the body against pathogenic microbes by sexual channel]. MD thesis. SPb.; 1893. (in Russian).
- Shalepo K. V., Nazarova V. V., Menuhova Ju. N., Rumjanceva T. A., Gushhin A. E., Savicheva A. M. Ocenka sovremennykh metodov laboratornoj diagnostiki bakterial'nogo vaginoza [Evaluation of current methods of laboratory diagnosis of bacterial vaginosis]. *Zhurnal Akusherstva i Zhenskih Boleznej*. 2014; LXIII (1): 26–32. (in Russian).
- Af Heurlin M. O. Bakteriologische Untersuchungen des Keimgehaltes im Genitalkanale der fiebernden Wöchnerinnen mit Berücksichtigung der Gesamtmorbidität im Laufe eines

- Jahres [Bacteriological studies of germ content in the genital ducts of the fevered have recently given birth, taking into account the overall morbidity in the course of a year]. Helsingfors; 1910. (in German).
11. Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.C., Eschenbach D., Holmes K.K. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *The American Journal of Medicine*. 1983; 74 (1): 14–22.
 12. Beverly E.S., Zariffard M.R., Wang Q.J., Chen H.Y., Bremer J., Cohen M.H., Spear G.T. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *Journal of Infectious Diseases*. 2005; 191 (1): 25–32.
 13. Burton J.P., Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 186 (12): 1770–80.
 14. Cruickshank R., Sharman A. The biology of the vagina in the human subject. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1934; 41 (2): 208–26.
 15. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das puerperalfieber. [The vaginal secretions and its importance for the puerperal fever] Leipzig: E. Besold; 1892. Available at: <https://archive.org/stream/dasscheidensekre00dd> (accessed 12.02.2015). (in German).
 16. Donders G.G.G. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007; 21 (3): 355–73.
 17. Donders G.G.G., Vereecken A., Bosmans E., Dekeersmaecker A., Salembier G., Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2002; 109 (1): 34–43.
 18. Donders G.G.G., Larsson P.G., Platz-Christensen J.J., Hallem A., van der Meijden W., Wölnher-Hanssen P. Variability in diagnosis of clue cells, lactobacillary grading and white blood cells in vaginal wet smears with conventional bright light and phase contrast microscopy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2009; 145 (1): 109–12.
 19. Donders G.G.G. Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 1999; 7 (4): 177.
 20. Emonet S., Shah H.N., Cherkaoui A., Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010; 16(11): 1604–13.
 21. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *New England Journal of Medicine*. 2005; 353 (18): 1899–911.
 22. Gajer P., Brotman R.M., Bai G., Sakamoto J., Schütte U.M., Zhong X., Koenig S.S., Fu L., Ma Z., Zhou X., Abdo Z., Forney L.J., Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science Translational Medicine*. 2012; 4 (132): 132ra52.
 23. Gardner H.L., Dukes C.D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1955; 69 (5): 962–76.
 24. Hayes R.J., Watson-Jones D., Celum C., van de Wijgert J., Wasserheit J. Treatment of sexually transmitted infections for HIV prevention: end of the road or new beginning? *AIDS*. 2010; 24 (04).
 25. Hillier S.L., Nugent R.P., Eschenbach D.A., Krohn M.A., Gibbs R.S., Martin D.H., Cotch M.F., Edelman R., Pastorek J.G., Rao V.A., McNellis D., Regan J.A., Carey J.C., Klebanoff M.A. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *New England Journal of Medicine*. 1995; 333 (26): 1737–42.
 26. Holmes K.K., Sparling P.F., Stamm W.E., Piot P., Wasserheit J.N., Cory L., Cohen M., Watts H. *Sexually Transmitted Diseases*. 4th edn. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
 27. Ison C.A., Hay P.E. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sexually Transmitted Infections*. 2002; 78 (6): 413–5.
 28. Jespers V., Menten J., Smet H., Poradosú S., Abdellati S., Verhelst R., Hardy L., Buvé A., Crucitti T. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiology*. 2012; 12 (1): 83.
 29. Jirovec O., Peter R., Málek I. Neue Klassifikation der Vaginalbiocoenose auf sechs Grundbilder. [New classification of vaginal biocenosis in six grades] *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1948; 126 (2): 77–99. (in German).
 30. Kim T.K., Thomas S.M., Ho M., Sharma S., Reich C.I., Frank J.A., Yeater K.M., Biggs D.R., Nakamura N., Stumpf R., Leigh S.R., Tapping R.I., Blanke S.R., Schlauch J.M., Gaskins H.R., Weisbaum J.S., Olsen G.J., Hoyer L.L., Wilson B.A. Heterogeneity of vaginal microbial communities within individuals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; 47(4): 1181–9.
 31. Krohn M.A., Hillier S.L., Eschenbach D.A. Comparison of methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989; 27 (6): 1266–71.
 32. Larsson P.G., Forsum U. Bacterial vaginosis—a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *Apmis*. 2005; 113 (5): 305–16.
 33. Larsson P.G., Platz-Christensen J.J. Enumeration of clue cells in rehydrated air-dried vaginal wet smears for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 1990; 76 (4): 727–30.
 34. Li J., McCormick J., Bocking A., Reid G. Importance of vaginal microbes in reproductive health. *Reproductive Sciences*. 2012; 19 (3): 235–42.
 35. 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. *Annals of Internal Medicine*. 2008; 149 (1): 20–8.
 36. Martin D.H., Zozaya M., Lillis R., Miller J., Ferris M.J. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*. 2012; 123: 242.

37. Maxam A.M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977; 74 (2): 560–4.
38. 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. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2010; 29 (12): 1547–52.
39. Menard J.-P., Fenollar F., Henry M., Bretelle F., Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 47 (1): 33–43.
40. Metzker M.L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*. 2010; 11 (1): 31–46.
41. Mitchell C., Moreira C., Fredricks D., Paul K., Caliendo A.M., Kurpewski J., Ingersoll J., Cu-Uvin S. Detection of fastidious vaginal bacteria in women with HIV infection and bacterial vaginosis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2009; 2009: Article ID 236919: 6 pages.
42. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29 (2): 297–301.
43. Ravel J., Gajer P., Abdo Z., Schneider G.M., Koenig S.S.K., McCulle S.L., Karlebach S., Gorle R., Russell J., Tacket C.O., Brotman R.M., Davis C.C., Ault K., Peralta L., Forney L.J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108 (Suppl 1): 4680–7.
44. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230 (4732): 1350–4.
45. Sanger F., Coulson A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975; 94 (3): 441–8.
46. Schröder K. Zur Pathogenese und Klinik des vaginalen Fluors. [The pathogenesis and clinic of vaginal discharge] *Zentralbl Gyn«kol*. 1921; 38: 1350–1361. (in German).
47. Shipitsyna E., Roos A., Datcu R., Hallén A., Fredlund H., Jensen J.S., Engstrand L., Unemo M. 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.
48. Sobel J.D., Reichman O., Misra D., Yoo W. Prognosis and treatment of desquamative inflammatory vaginitis. *Obstetrics & Gynecology*. 2011; 117 (4): 850–5.
49. Sodhani P., Garg S., Bhalla P., Singh M.M., Sharma S., Gupta S. Prevalence of bacterial vaginosis in a community setting and role of the pap smear in its detection. *Acta Cytologica*. 2005; 49 (6): 634–8.
50. Spiegel C.A., Amsel R., Holmes K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18 (1): 170–7.
51. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W., Ross F.J., McCoy C.O., Bumgarner R., Marrazzo J.M., Fredricks D.N. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PloS one*. 2012; 7 (6): e37818.
52. Srinivasan S., Fredricks D.N. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008; 2008: Article ID 750479: 22 pages.
53. Swidsinski A., Mendling W., Loening-Baucke V., Ladhoff A., Swidsinski S., Hale L.P., Lochs H. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 2005; 106 (5, Part 1): 1013–23.
54. Swidsinski A., Doerffel Y., Loening-Baucke V., Swidsinski S., Verstraelen H., Vaneechoutte M., Lemm V., Schilling J., Mendling W. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2010; 70: 256–63.
55. Taylor B.D.P., Darville T., Haggerty C.L. Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease? *Sexually Transmitted Diseases*. 2013; 40 (2): 117–22.
56. Thomason J.L., Gelbart S.M., Wilcoski L.M., Peterson A.K., Jilly B.J., Hamilton, P.R. Proline aminopeptidase activity as a rapid diagnostic test to confirm bacterial vaginosis. *Obstetrics & Gynecology*. 1988; 71 (4): 607–11.
57. Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., et al. The Sequence of the Human Genome. *Science*. 2001; 291 (5507): 1304–51.
58. Verani J.R., McGee L., Schrag S.J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: revised guidelines from CDC, 2010. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2010.
59. Verhelst R., Verstraelen H., Claeys G., Verschraegen G., Delanghe J., Van Simaey L., De Ganck C., Temmerman M., Vaneechoutte M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiology*. 2004; 4 (1): 11 pages.
60. Verstraelen H., Verhelst R., Vaneechoutte M., Temmerman M. Group A streptococcal vaginitis: an unrecognized cause of vaginal symptoms in adult women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2011; 284 (1): 95–8.
61. Verstraelen H. et al. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiology*. 2009; 9 (1): 116.
62. Verstraelen H., Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2013; 26 (1): 86–9.
63. Vogel I., Thorsen P., Hogan V.K., Schieve L.A., Jacobsson B., Ferre C.D. The joint effect of vaginal *Ureaplasma urealyticum* and bacterial vaginosis on adverse pregnancy outcomes. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2006; 85 (7): 778–85.

64. Watson J.D. The human genome project: past, present, and future. *Science*. 1990; 248 (4951): 44–9.
65. Wiesenfeld H.C., Hillier S.L., Krohn M.A., Landers D.V., Sweet R.L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36 (5): 663–8.
66. World Health Organization et al. Sexually transmitted and other reproductive tract infections: a guide to essential practice; 2005.
67. Yamamoto T., Zhou X., Williams C.J., Hochwalt A., Forney L.J. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. 2009; 22 (1): 11–8.
68. Yoshimura K., Morotomi N., Fukuda K., Nakano M., Kashimura M., Hachisuga T., Taniguchi H. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011; 205 (3): 235.e1–235.e9.

■ Адреса автора для переписки

Рыбина Елена Владимировна — лаборатория микробиологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии». 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3. **E-mail:** elena.rybina@gmail.com.

Rybina Elena Vladimirovna — laboratory of microbiology. FSBSI “Ott’s Scientific Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction”. 199034, St Petersburg, Mendeleevskaya line, 3, Russia. **E-mail:** elena.rybina@gmail.com.