

КРИТЕРИИ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТА ФЕМОФЛОР-16

© В.В. Назарова, Е.В. Шипицына, Е.Н. Герасимова, А.М. Савичева

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Для цитирования: Назарова В.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н., и др. Критерии диагностики бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16 // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – № 4. – С. 57–67. doi: 10.17816/JOWD66457-67

Поступила в редакцию: 10.05.2017

Принята к печати: 30.06.2017

■ **Актуальность.** Бактериальный вагиноз (БВ) — это нарушение баланса вагинальной микрофлоры, ассоциированное с рядом инфекционных заболеваний урогенитального тракта и неблагоприятными исходами беременности. В нашей стране для выявления дисбиотических состояний влагалища широко используется тест Фемофлор-16 (ДНК-Технология, Москва), однако в алгоритмах интерпретации результатов этого теста не предусмотрена категория БВ. **Цель** — разработка диагностических критериев определения БВ при анализе отделяемого влагалища тестом Фемофлор-16. **Материалы и методы.** В исследовании участвовали женщины репродуктивного возраста, обратившиеся к акушеру-гинекологу с жалобами на выделения из половых путей. Для клинической диагностики БВ использовали критерии Амсея, лабораторный анализ на БВ производили путем микроскопического исследования отделяемого влагалища с применением метода Нуджента. Образцы отделяемого влагалища от всех женщин анализировали с применением теста Фемофлор-16, предназначенного для характеристики микробиоценоза влагалища методом мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени. **Результаты.** В исследование было включено 280 женщин. БВ был выявлен у 86 женщин (31 %) с применением критериев Амсея, у 81 женщины (29 %) с применением метода Нуджента. Ассоциация с БВ была установлена для всех групп анаэробных бактерий, включенных в тест Фемофлор-16, за исключением бактерий рода *Mobiluncus*, которые являются в совокупности с филогенетически родственными, но не связанными с БВ бактериями рода *Corynebacterium*. 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 %) определяли БВ с чувствительностью 99 % и специфичностью 93 %. **Заключение.** Разработаны критерии диагностики БВ с применением теста Фемофлор-16, которые позволяют с чувствительностью 99 % и специфичностью 93 % установить БВ или исключить его. Данные критерии БВ и критерии производителей теста Фемофлор-16 для категории выраженного анаэробного дисбиоза в значительной степени описывают одну и ту же категорию микробиоценоза влагалища.

■ **Ключевые слова:** бактериальный вагиноз; Фемофлор-16; лактобациллы; анаэробные бактерии.

CRITERIA FOR DIAGNOSIS OF BACTERIAL VAGINOSIS USING THE TEST FEMOFLOR-16

© V.V. Nazarova, E.V. Shipitsyna, E.N. Gerasimova, A.M. Savicheva

FSBSI “The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott”, Saint Petersburg, Russia

For citation: Nazarova VV, Shipitsyna EV, Gerasimova EN, et al. Criteria for diagnosis of bacterial vaginosis using the test Femoflor-16. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2017;66(4):57-67. doi: 10.17816/JOWD66457-67

Received: 10.05.2017

Accepted: 30.06.2017

■ **Background.** Bacterial vaginosis is disturbance of the balance of the vaginal microflora, associated with a number of infectious diseases of the urogenital tract and adverse pregnancy outcomes. In this country, for the detection of vaginal dysbiotic conditions, the test Femoflor-16 (DNA-Technology, Moscow) is widely used, however interpretation algorithms of this test do not include the category of BV. **Aim.** The study aimed to elaborate diagnostic criteria for the detection of

BV using Femoflor-16 test. **Materials and methods.** Women of reproductive age addressing a gynecologist with vaginal discharge were enrolled in the study. For clinical diagnosis of BV, the Amsel criteria were used, laboratory analysis for BV was performed via microscopic investigation of vaginal discharge using the Nugent score. Samples of vaginal discharge from all women were analyzed with the test Femoflor-16, intended for characterizing vaginal microbiocenosis using multiplex quantitative real-time PCR. **Results.** A total of 280 women were included in the study. BV was diagnosed in 86 women (31%) using the Amsel criteria, and in 81 women (29%) using the Nugent score. All groups of anaerobic bacteria included in Femoflor-16 test were shown to be associated with BV, with the exception of bacteria of the genus *Mobiluncus*, which are detected together with phylogenetically related but not BV-associated bacteria of the genus *Corynebacterium*. A low amount of lactobacilli (< 10% of total bacterial load) coupled with an elevated amount of *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* (> 1%) and/or *Eubacterium* (> 2%) and/or *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium* (> 0.1%) and/or *Megasphaera/Veillonella/Dialister* (> 0.1%) and/or *Lachnobacterium/Clostridium* (> 0.1%) and/or *Peptostreptococcus* (> 0.1%) and/or *Atopobium vaginae* (> 0.2%) detected BV with a sensitivity of 99% and specificity of 93%. **Conclusions.** Criteria for BV diagnosis using the test Femoflor-16 have been elaborated, which enable to detect BV or exclude it with a sensitivity of 99% and specificity of 93%. These criteria for BV and criteria of the test manufacturers for severe anaerobic dysbiosis determine to a large extent the same category of the vaginal microbiocenosis.

■ **Keywords:** bacterial vaginosis; Femoflor-16; lactobacilli; anaerobic bacteria.

Введение

Бактериальный вагиноз (БВ) — основная причина патологических выделений из влагалища у женщин репродуктивного возраста. Исследования последних лет показывают, что БВ сопряжен с рядом воспалительных заболеваний органов мочеполового тракта и является одной из частых причин осложнений беременности [1–4]. Распространенность заболевания широко варьирует (от 7 до 68 %) в зависимости от региона, этнической/расовой принадлежности, а также обследуемой популяции [5].

Основным методом клинической диагностики БВ является метод Амсея [6]. Для лабораторной диагностики используют главным образом метод Нуджента, основанный на определении бактериальных морфотипов при микроскопии окрашенных по Граму препаратов [7]. В нашей стране эти методы используются очень редко.

Бактериальный вагиноз представляет собой нарушение баланса между физиологической микрофлорой влагалища, представленной преимущественно лактобациллами, и условно патогенной микрофлорой, в норме обнаруживаемой во влагалище в небольшом количестве. Применительно к таким состояниям в отечественной литературе часто используется термин «дисбиоз влагалища». Другим известным дисбиозом влагалища является аэробный вагинит (АВ). Сходство БВ с АВ заключается в том, что при обоих состояниях наблюдается уменьшение количества лактобацилл, приводящее к снижению концентрации молочной кислоты и, соответственно, повышению pH среды влагалища, и их замещение условно патогенными микроорганизмами. Различия

между этими заболеваниями существенны. Для БВ характерны отсутствие воспаления и присутствие большого количества анаэробной микрофлоры (типично выявляются *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, представители родов *Prevotella*, *Megasphaera*, *Leptotrichia*, *Sneathia*, *Mobiluncus* и др.). Аэробный вагинит в его типичном проявлении характеризуется повышенным воспалительным ответом и/или выраженными признаками атрофии эпителия влагалища и наличием умеренного количества комменсальной кишечной микрофлоры [8]. Чаще всего при АВ выявляются стрептококки (до 59 % случаев), *Staphylococcus aureus* (до 42 %), коагулазаотрицательные стафилококки (до 37 %), *Escherichia coli* (до 23 %) [9].

В нашей стране в последние годы для выявления дисбиотических состояний влагалища широко используется тест отечественного производства Фемофлор-16 (ДНК-Технология, Москва). Тест основан на мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени. С помощью теста определяют общую концентрацию бактериальной ДНК — общую бактериальную массу (ОБМ) и концентрацию (абсолютную и относительную) следующих видов/родов микроорганизмов: *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*, *Corynebacterium/Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*, *Atopobium vaginae*. По соотношению этих бактерий определяется состояние микробиотоза влагалища — нормоценоз или дисбиоз. Дисбиоз, в свою очередь, оценивается по степени выраженности (умеренный или выражен-

ный дисбиоз) и преобладанию аэробной или анаэробной условно патогенной микрофлоры (аэробный или анаэробный дисбиоз соответственно). Кроме того, оценивается абсолютная концентрация микроорганизмов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* и *Candida*, наличие ДНК которых в концентрации $> 10^4$ геном-эквивалентов в образце в отсутствие другой условно патогенной микрофлоры дает основание отнести нормоценоз к категории условного.

Алгоритмы интерпретации результатов теста Фемофлор-16 не включают категорию БВ. Однако для ведения пациента, основанного на принципах доказательной медицины, лабораторное заключение должно давать информацию, позволяющую с высокой точностью установить или опровергнуть определенный общепринятый диагноз. Целью исследования явилась разработка диагностических критериев определения БВ при анализе отделяемого влагалища тестом Фемофлор-16.

Материалы и методы

В исследовании участвовали женщины репродуктивного возраста, обратившиеся к акушеру-гинекологу с жалобами на дискомфорт и выделения из половых путей в поликлиническое отделение ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» и СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 34». Критериями исключения являлись беременность и применение антибактериальных препаратов в течение последних четырех недель.

Клиническим материалом для исследования служило отделяемое влагалища, которое получали с помощью двух дакроновых тампонов. Содержимое одного тампона наносили на предметное стекло для микроскопического исследования. Содержимое второго тампона использовали для анализа с применением теста Фемофлор-16.

Для клинической диагностики БВ использовали критерии Амсея [6] с небольшой модификацией, заключавшейся в том, что для определения ключевых клеток в отделяемом влагалища использовали не нативный, а окрашенный по Граму препарат. При выполнении как минимум трех из четырех критериев, а именно наличия специфических выделений из влагалища, повышенного рН влагалища ($> 4,5$), положительного аминного теста; наличия «ключевых» клеток при микроскопическом исследовании отделяемого влагалища, устанавливали диагноз БВ.

Лабораторный анализ на БВ производили путем исследования отделяемого влагалища с применением метода Нуджента [7]. 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 образцы расценивали как нормальную микрофлору (число баллов от 0 до 3), промежуточную микрофлору (число баллов от 4 до 6) и БВ (число баллов от 7 до 10).

Анализ образцов отделяемого влагалища с использованием теста Фемофлор-16 проводили в соответствии с инструкцией производителя. Интерпретацию результатов осуществляли с применением алгоритма производителя (см. рис. 1).

При разработке диагностических критериев БВ количество всех микроорганизмов, за исключением *M. hominis*, *Ureaplasma* и *Candida*, было представлено как соотношение концентрации их ДНК к ОБМ в долях единицы. Количество *M. hominis*, *Ureaplasma* и *Candida* представляли в абсолютных значениях концентрации ДНК (геном-эквивалентов в образце). Для изучения ассоциации микроорганизмов/групп микроорганизмов, определяемых тестом Фемофлор-16, с БВ проводили анализ корреляции их количества с клиническими и микроскопическими показателями БВ: числом баллов по шкале Нуджента, суммой положительных критериев Амсея и со значениями рН влагалища. Для оценки способности потенциальных бактериальных маркеров, определяемых с применением теста Фемофлор-16, правильно классифицировать образцы с нормальной микрофлорой и БВ использовали ROC-анализ (ROC — receiver operating characteristic). Оптимальный порог содержания бактерий определяли по максимальной пропорции правильно классифицированных образцов. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием статистических пакетов Statistica (StatSoft) и SPSS (IBM).

Результаты

В исследование было включено 280 женщин в возрасте от 20 до 45 лет ($29 \pm 5,7$ года). С использованием критериев Амсея БВ был выявлен у 86 женщин, 194 женщины не имели БВ.

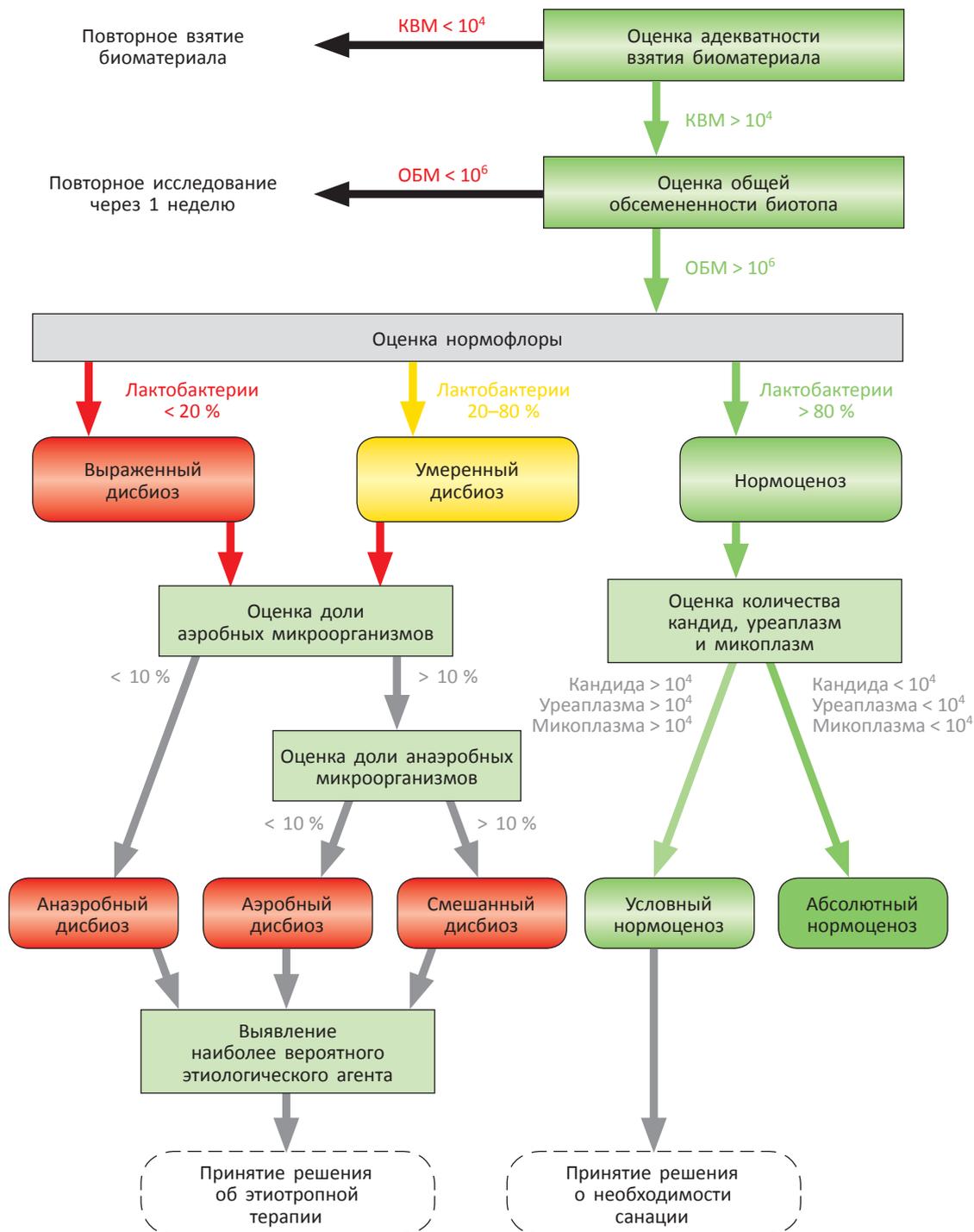


Рис. 1. Алгоритм интерпретации результатов теста Фемофлор-16

Fig. 1. Algorithm of interpretation of Femoflor-16 test results

Согласно классификации вагинальных проб по методу Нуджента 172 образца были причислены к категории нормальной микрофлоры, 27 — промежуточной микрофлоры, 81 — БВ (табл. 1).

Пробы от всех женщин были протестированы с использованием теста Фемофлор-16. Результаты 10 проб были признаны невалид-

ными 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. В соответствии с алгоритмами интерпретации результатов теста Фемофлор-16 100 случаев были

Таблица 1

Результаты исследования отделяемого влагалища с использованием методов Амсея и Нуджента

Table 1

Results of the analysis of vaginal samples using the Amsel criteria and Nugent score

Категория по Амсею	Категория по Нудженту			Всего
	нормальная микрофлора	промежуточная микрофлора	бактериальный вагиноз	
Норма	172	21	1	194
Бактериальный вагиноз	0	6	80	86
Всего	172	27	81	280

Таблица 2

Результаты исследования отделяемого влагалища с использованием метода Нуджента и теста Фемофлор-16

Table 2

Results of the analysis of vaginal samples using the Nugent score and Femoflor-16 test

Результат теста Фемофлор-16	Категория по Нудженту			Всего
	нормальная микрофлора	промежуточная микрофлора	бактериальный вагиноз	
Нормоценоз	98	2	0	100
Условный нормоценоз	23	1	0	24
Умеренный анаэробный дисбиоз	37	6	1	44
Умеренный аэробный дисбиоз	1	0	0	1
Выраженный анаэробный дисбиоз	2	10	78	90
Выраженный аэробный дисбиоз	2	5	1	8
Выраженный смешанный дисбиоз	1	2	0	3
Всего	164	26	80	270

классифицированы как нормоценоз, 24 — условный нормоценоз, 45 — умеренный дисбиоз (44 — анаэробный, 1 — аэробный), 101 — выраженный дисбиоз (90 — анаэробный, 8 — аэробный, 3 — смешанный) (табл. 2).

Для изучения ассоциации микроорганизмов/групп микроорганизмов, определяемых тестом Фемофлор-16, с БВ был проведен анализ корреляции их количества с клиническими и микроскопическими показателями БВ, а именно числом баллов по шкале Нуджента, суммой положительных критериев Амсея и со значениями pH влагалища (рис. 2, 3).

Отрицательная корреляция с БВ была установлена для соотношения *Lactobacillus*/ОБМ. Анаэробные бактерии/группы бактерий предсказуемо показали положительную корреляцию с БВ, при этом самые высокие коэффициенты корреляции наблюдались для групп *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas, Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium* и *Megasphaera/Veillonella/Dialister*. Положительная корреляция с БВ также наблюдалась для *M. hominis*. Из бактерий,

традиционно связываемых с БВ, *Mobiluncus* не показал значимой корреляции ни с одним из показателей БВ, что может быть связано с тем, что эти бактерии в тесте Фемофлор-16 являются в совокупности с филогенетически родственными, но не связанными с БВ бактериями рода *Corynebacterium*. Содержание ДНК аэробных бактерий кишечной группы (энтеробактерий, стрептококков и стафилококков), а также уреоплазм и дрожжеподобных грибов рода *Candida* ожидаемо не коррелировало с показателями БВ.

Следующим этапом нашего анализа была оценка способности бактериальных маркеров, определяемых с применением теста Фемофлор-16, правильно классифицировать образцы с нормальной микрофлорой и БВ. Для этой цели 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

$r \geq$	-1	-0,80	-0,60	-0,40	-0,20	0	0,20	0,40	0,60	0,80	1
Микроорганизмы/группы микроорганизмов											
<i>Lactobacillus</i> /ОБМ											
<i>Enterobacteriaceae</i> /ОБМ											
<i>Streptococcus</i> /ОБМ											
<i>Staphylococcus</i> /ОБМ											
<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas</i> /ОБМ											
<i>Eubacterium</i> /ОБМ											
<i>Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium</i> /ОБМ											
<i>Megasphaera/Veillonella/Dialister</i> /ОБМ											
<i>Lachnobacterium/Clostridium</i> /ОБМ											
<i>Corynebacterium/Mobiluncus</i> /ОБМ											
<i>Peptostreptococcus</i> /ОБМ											
<i>Atopobium vaginae</i> /ОБМ											
<i>Mycoplasma hominis</i>											
<i>Ureaplasma</i>											
<i>Candida</i>											

Рис. 2. Коэффициенты корреляции (r) количества микроорганизмов/групп микроорганизмов, определяемых тестом Фемофлор-16, с количественными показателями бактериального вагиноза. ОБМ — общая бактериальная масса

Fig. 2. Correlation coefficients (r) of the amount of the microorganisms/groups of microorganisms detected by Femoflor-16 test with quantitative parameters of bacterial vaginosis. TBM — total bacterial mass

Нудженту были исключены из анализа. В анализ включили ОБМ и относительную концентрацию ДНК бактерий, показавших значительную корреляцию с БВ, а именно лактобацилл и всех групп анаэробных бактерий, за исключением *Corynebacterium/Mobiluncus*. Вычисляли значения площади под ROC-кривой, а также значения чувствительности и специфичности при оптимальном пороге относительной концентрации ДНК.

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) (рис. 4). Маркеры *Lachnobacterium/Clostridium*/ОБМ и *Pepto-*

streptococcus/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 (площадь под ROC-кривой ниже 0,7).

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. 3). Самые высокие показатели чувствительности и специфичности были показаны для соотношения концентрации ДНК лактобацилл к ОБМ. При пороге $< 0,1$ (иными словами, если содержание лактобацилл в отделяемом влагалища ниже 10 %) данный показатель предсказывает БВ с чувствительностью и специфичностью, равными 99 %. Самыми высокими показателями чувствительности и специфичности обладал маркер *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas*/ОБМ —

$r \geq$	0,001	0,010	0,025	0,050	0,100	0,150	0,200	0,350	0,500	1
Микроорганизмы/группы микроорганизмов	Число баллов по Нудженту	Сумма положительных критериев Амсея	Значение p							
<i>Lactobacillus</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Enterobacteriaceae</i> /ОБМ	0,919	0,563	0,799							
<i>Streptococcus</i> /ОБМ	0,775	0,489	0,833							
<i>Staphylococcus</i> /ОБМ	0,502	0,676	0,909							
<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Eubacterium</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Megasphaera/Veillonella/Dialister</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Lachnobacterium/Clostridium</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Corynebacterium/Mobiluncus</i> /ОБМ	0,186	0,173	0,343							
<i>Peptostreptococcus</i> /ОБМ	0,073	0,016	0,016							
<i>Atopobium vaginae</i> /ОБМ	0,000	0,000	0,000							
<i>Mycoplasma hominis</i>	0,001	0,001	0,000							
<i>Ureaplasma</i>	0,116	0,076	0,061							
<i>Candida</i>	0,990	0,987	0,846							

Рис. 3. Статистическая значимость (p) корреляции количества микроорганизмов/групп микроорганизмов, определяемых тестом Фемофлор, с количественными показателями бактериального вагиноза. ОБМ — общая бактериальная масса

Fig. 3. Statistical significance (p) for the correlation of the amount of the microorganisms/groups of microorganisms detected by Femoflor-16 test with quantitative parameters of bacterial vaginosis. TBM — total bacterial mass

95 и 94 % соответственно, при пороге $> 0,01$ (т. е. при содержании выше 1 %). Чувствительность остальных маркеров варьировала от 39 до 80 %, специфичность — от 93 до 99 %.

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», также характеризующихся низким содержанием лактобацилл. В связи с этим использование соотношения лактобацилл к ОБМ как единственного критерия может приводить к ложноположительным результатам, хотя и немногочисленным. Принимая во внимание этот факт, представляется целесообразным рассматривать микрофлору влагалища как соответствующую БВ, если выполняются два условия: низкое содер-

жание лактобацилл и повышенное содержание (выше порога, обозначенного в табл. 3) 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. Иначе говоря, все случаи были разделены на БВ ($n = 80$) и отсутствие БВ ($n = 190$). Если в качестве критерия БВ использовали только низкое содержание лактобацилл, чувствительность и специфичность выявления БВ равнялись 99 и 89 % соответственно (табл. 4). Когда же в качестве критерия БВ использовали низкое содержание лактобацилл в совокупности с повышенным содержанием анаэробных бактерий, количество ложноположительных случаев ожидаемо уменьшилось (с 20 до 13), что привело к повышению специфичности до 93 %.

Заключительным этапом нашей работы было сопоставление разработанных нами критериев

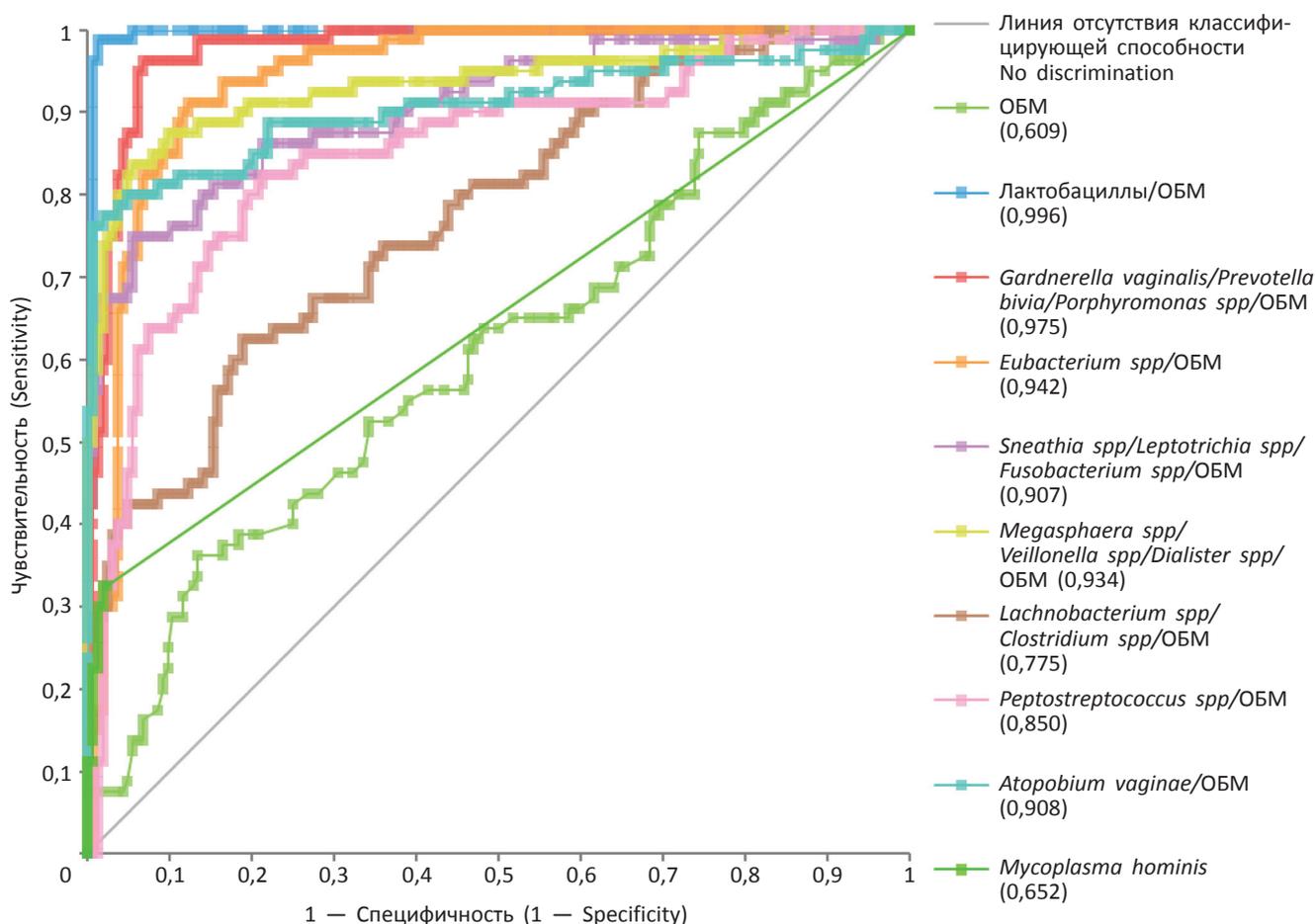


Рис. 4. ROC-анализ способности бактериальных маркеров, определяемых тестом Фемофлор-16, выявлять бактериальный вагиноз. Чем ближе ROC-кривая к верхнему левому углу (точка 100 % чувствительности и 100 % специфичности), тем выше точность классификатора

Fig. 4. ROC-analysis of the capability of the bacterial markers detected by Femoflor-16 test to diagnose bacterial vaginosis. The closer ROC-curve is to the left upper corner (the point of 100 % sensitivity and 100 % specificity), the higher accuracy of the classifier

Таблица 3

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

Table 3

Diagnostic accuracy of the bacterial markers detected by Femoflor-16 test for bacterial vaginosis

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

Таблица 4

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

Table 4

Sensitivity and specificity of the diagnostic criteria for bacterial vaginosis using Femoflor-16 test

Критерии		Категория по Нудженту		Чувствительность, %	Специфичность, %
		отсутствие бактериального вагиноза (нормальная и промежуточная микрофлора)	бактериальный вагиноз		
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
	Да	13	79		

Таблица 5

Сопоставление категорий микробиоценоза влагалища, определенных с помощью критериев бактериального вагиноза, и результатов теста Фемофлор-16

Table 5

Comparison of the categories of the vaginal microbiocenosis determined using the criteria for bacterial vaginosis with the results of Femoflor-16 test

Результат теста Фемофлор-16	Разработанные в данном исследовании критерии бактериального вагиноза		Всего
	отсутствие бактериального вагиноза	бактериальный вагиноз	
Нормоценоз	100	0	100
Условный нормоценоз	24	0	24
Умеренный анаэробный дисбиоз	44	0	44
Умеренный аэробный дисбиоз	1	0	1
Выраженный анаэробный дисбиоз	3	87	90
Выраженный аэробный дисбиоз	6	2	8
Выраженный смешанный дисбиоз	0	3	3
Всего	178	92	270

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 (табл. 5). 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.

Обсуждение результатов

В последние годы молекулярные методы активно внедряются в диагностику урогенитальных инфекций, в том числе ассоциированных с условно патогенными микроорганизмами. Условно патогенная микрофлора влагалища является частью эндогенной (нормальной) микрофлоры, поэтому при анализе связанных с ней дисбиотических состояний необходимо учитывать ее количественный состав. Тест Фемофлор-16, основанный на количественной ПЦР в реальном времени, был внедрен в клиническую лабораторную диагностику в 2009 г. и нашел достаточно широкое применение. Тест обладает рядом преимуществ перед традиционными методами выявления нарушений микро-

биоценоза влагалища — бактериологическим и микроскопическим. Его преимущества перед обоими методами заключаются в высоком уровне стандартизации анализа и интерпретации результатов, исключении фактора субъективности, точной количественной оценке. От бактериологического метода тест Фемофлор-16 отличается также быстротой анализа, возможностью выявлять некультивируемые и трудно культивируемые микроорганизмы. Далее, тест позволяет дифференцировать бактерии, имеющие сходные морфотипы и поэтому неразличимые при бактериоскопии. Суммируя вышесказанное, можно утверждать, что тест дает возможность быстрой, объективной, стандартизованной характеристики микробиоценоза влагалища.

Лабораторное заключение исследования отделяемого влагалища тестом Фемофлор-16 включает следующие основные категории вагинальной микрофлоры: нормоценоз (включая условный нормоценоз), умеренный дисбиоз (анаэробный и аэробный) и выраженный дисбиоз (анаэробный и аэробный). Иницируя данное исследование, мы исходили из убеждения, что тест Фемофлор-16 обладает потенциалом достаточно точно выявлять два основных нарушения баланса вагинальной микрофлоры — БВ и АВ. Данную работу мы посвятили разработке критериев диагностики БВ. По нашему мнению, с помощью теста возможно, после разработки соответствующих критериев, с высокой долей определенности выявлять тип вагинальной микрофлоры, соответствующий аэробному вагиниту (для точной диагностики аэробного вагинита необходима также оценка воспалительной реакции).

Первым этапом нашего анализа была оценка ассоциации выявляемых микроорганизмов/ групп микроорганизмов с БВ. Все группы анаэробных бактерий, за исключением группы *Corynebacterium/Mobiluncus*, коррелировали в той или иной степени с БВ. Оба рода бактерий принадлежат порядку *Actinomycetales* класса *Actinobacteria*, однако *Mobiluncus* spp. ассоциирован с БВ, а *Corynebacterium* spp. — нет. Результаты метагеномных исследований микрофлоры влагалища свидетельствуют, что содержание бактерий рода *Corynebacterium* в некоторых случаях, хоть и немногочисленных, может быть существенным, выше 10 % [10]. В связи с этим совокупное выявление *Mobiluncus* spp. и *Corynebacterium* spp. может приводить к необоснованному заключению о дисбиотическом состоянии влагалища.

Далее, нами были разработаны критерии, которые позволяют с чувствительностью 99 % и специфичностью 93 % установить диагноз БВ или исключить его. Необходимо отметить, что при оценке разработанных критериев мы объединили категории нормальной и промежуточной микрофлоры по Нудженту, определив эту сборную категорию как отсутствие БВ. Известно, что категория промежуточной микрофлоры по Нудженту неоднородна по своему составу, и на сегодняшний день нет единого мнения относительно ведения пациенток с данной категорией вагинальной микрофлоры. Полагают, что эта категория содержит по большей части микрофлору, соответствующую аэробному вагиниту, а также действительно промежуточную микрофлору, т. е. переходную от нормы к БВ [8]. Наши результаты служат этому косвенным подтверждением: 5 из 8 случаев (63 %) выраженного аэробного дисбиоза, определенных тестом Фемофлор-16, вошли в категорию промежуточной микрофлоры по Нудженту. Важно отметить, что при сопоставлении результатов тестирования на БВ с использованием разработанных нами критериев и тестирования на выраженный анаэробный дисбиоз (неформально приравнивается к БВ) с использованием критериев производителя теста количество дискордантных результатов было относительно небольшим.

Еще одним побудительным мотивом для данного исследования послужили трудности, испытываемые клиницистами при интерпретации категории умеренного дисбиоза, которая подразумевает промежуточное состояние между нормоценозом и выраженным дисбиозом. Особенно проблематичной является категория умеренного анаэробного дисбиоза, так как она выявляется довольно часто. Так, в нашем исследовании 44 из 270 случаев (16 %) были отнесены к этой категории. Сравнение результатов теста Фемофлор-16 и метода Нуджента показало, что подавляющее большинство проб из категории умеренного анаэробного дисбиоза (37 из 44, 84 %) были классифицированы как нормальная микрофлора по шкале Нуджента и только 6 случаев (14 %) были отнесены к категории промежуточной микрофлоры, и один случай (2 %) — к категории БВ. На наш взгляд, категория промежуточного состояния, определяемая тестом Фемофлор-16 как умеренный дисбиоз, должна быть сужена и включать только пограничные, трудно интерпретируемые случаи.

В порядке дискуссии хотелось бы отметить существенный потенциал теста Фемофлор-16 для анализа вагинальной микрофлоры в научных целях, который, на наш взгляд, несколько ограничен тем, что *Gardnerella vaginalis* — факультативный анаэроб, представитель порядка *Bifidobacteriales* класса *Actinobacteria* — выявляется в совокупности с *Prevotella bivia* и *Porphyromonas* spp. — облигатными анаэробными бактериями порядка *Bacteroidales* класса *Bacteroidetes*. К ограничениям подобного рода также можно отнести уже упомянутое совместное выявление бактерий рода *Corynebacterium* с бактериями рода *Mobiluncus*.

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 *Atorobium 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.

Литература

- Allsworth JE, Peipert JF. Severity of bacterial vaginosis and the risk of sexually transmitted infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(2):113.e1-6. doi: 10.1016/j.ajog.2011.02.060.
- Taylor BD, Darville T, Haggerty CL. Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Dis.* 2013;40(2):117-122. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31827c5a5b.
- Donati L, Di Vico A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;281(4):589-600. doi: 10.1007/s00404-009-1318-3.
- Haggerty CL, Totten PA, Tang G, et al. Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. *Sex Transm Infect.* 2016.92(6):441-6. doi: 10.1136/sextrans-2015-052285.
- Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;209(6):505-23. doi: 10.1016/j.ajog.2013.05.006.
- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983;74:14-22. doi: 10.1016/0002-9343(83)91112-9.
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29:297-301.
- Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG.* 2002;109(1): 34-43. doi: 10.1111/j.1471-0528.2002.00432.x.
- Tansarli GS, Kostaras EK, Athanasiou S, Falagas ME. Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(8):977-84. doi: 10.1007/s10096-013-1846-4.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:S4680-7. doi: 10.1073/pnas.1002611107.

■ Адреса авторов для переписки (Information about the authors)

Вероника Викторовна Назарова — врач-бактериолог лаборатории микробиологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. E-mail: iagmail@ott.ru.

Елена Васильевна Шипицына — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. E-mail: iagmail@ott.ru.

Екатерина Николаевна Герасимова — младший научный сотрудник лаборатории микробиологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. E-mail: iagmail@ott.ru.

Алевтина Михайловна Савичева — д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией микробиологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург. E-mail: savitcheva@mail.ru.

Veronika V. Nazarova — bacteriologist, Laboratory of Microbiology, FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. E-mail: iagmail@ott.ru.

Elena V. Shipitsyna — PhD, Leading Researcher, Laboratory of Microbiology, FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. E-mail: iagmail@ott.ru.

Ekaterina N. Gerasimova — Junior Researcher, Laboratory of Microbiology, FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. E-mail: iagmail@ott.ru.

Alevtina M. Savicheva — PhD, MD, Professor, Head of Laboratory of Microbiology, FSBSI "The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott", Saint Petersburg, Russia. E-mail: savitcheva@mail.ru.