

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА, ФОРМИРУЮЩИЕ МИКРОЭКОСИСТЕМУ ВЛАГАЛИЩА В НОРМЕ И ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОМ ВАГИНОЗЕ

© В.В. Назарова, Е.В. Шипицына, К.В. Шалепо, 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., Шалепо К.В., Савичева А.М. Бактериальные сообщества, формирующие микроэкосистему влагалища в норме и при бактериальном вагинозе // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – № 6. – С. 30–43. doi: 10.17816/JOWD66630-43

Поступила в редакцию: 02.10.2017

Принята к печати: 13.11.2017

■ **Актуальность.** Бактериальный вагиноз (БВ) — нарушение микробиоты влагалища, характеризующееся замещением лактобацилл анаэробными бактериями и способное оказывать неблагоприятное влияние на репродуктивное здоровье женщины. В развитие БВ вовлечен широкий спектр бактерий, существенно различающихся по своим свойствам. Группирование бактериальных сообществ влагалища в кластеры, или типы микробиоценоза, может способствовать пониманию механизмов патогенеза и разработке эффективных методов диагностики и терапии этого заболевания. **Цель** — определение и сравнительный анализ кластеров бактериальных сообществ влагалища в норме и при БВ. **Материалы и методы.** В исследовании участвовали женщины репродуктивного возраста. Для диагностики БВ использовали метод Нуджента. Микрофлору влагалища исследовали методом мультиплексной количественной ПЦР в реальном времени (тест Фемофлор-16). Для разделения бактериальных сообществ на группы применяли двухэтапный кластерный анализ. Анализ различий между кластерами проводили путем их попарного сравнения. **Результаты.** Из 280 женщин, включенных в исследование, у 172 была выявлена нормальная микрофлора, у 27 — промежуточная микрофлора, у 81 — БВ. В кластерный анализ были включены 270 образцов, имевших валидные результаты при ПЦР-исследовании. Все бактериальные сообщества влагалища были сгруппированы в четыре кластера. Кластер 1 ($n = 171$) включал случаи, когда вагинальная микрофлора состояла преимущественно из лактобацилл. В кластер 2 ($n = 11$) вошли случаи доминирования аэробной микрофлоры: *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*. Кластеры 3 ($n = 57$) и 4 ($n = 31$) были связаны с БВ, к ним были отнесены случаи доминирования факультативно-анаэробной (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) и облигатно-анаэробной (*Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*) микрофлоры соответственно. Практически все случаи кластера 1 вошли в категорию нормальной микрофлоры по шкале Нуджента. Большинство бактериальных сообществ кластера 2 вошли в категорию промежуточной микрофлоры, кластера 3 — в категорию БВ с числом баллов 7 и 8, кластера 4 — в категорию БВ с числом баллов 9 и 10. Кластеры значительно различались между собой по значению pH влагалища, при этом самые высокие показатели наблюдались для кластера 4. **Заключение.** Бактериальные сообщества влагалища группируются в четыре основных кластера, характеризующихся доминированием лактобацилл, аэробной, факультативно-анаэробной или облигатно-анаэробной микрофлоры. Описанные кластеры принадлежат разным категориям по шкале Нуджента и значительно различаются по значению pH влагалища.

■ **Ключевые слова:** бактериальный вагиноз; кластеры бактериальных сообществ; лактобациллы; аэробные бактерии; анаэробные бактерии.

BACTERIAL COMMUNITIES FORMING THE VAGINAL MICRO-ECOSYSTEM IN NORM AND IN BACTERIAL VAGINOSIS

© V.V. Nazarova, E.V. Shipitsyna, K.V. Shalepo, A.M. Savicheva

Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction named after D.O. Ott, Saint Petersburg, Russia

For citation: Nazarova VV, Shipitsyna EV, Shalepo KV, Savicheva AM. Bacterial communities forming the vaginal micro-ecosystem in norm and in bacterial vaginosis. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases*. 2017;66(6):30-43. doi: 10.17816/JOWD66630-43

Received: 02.10.2017

Accepted: 13.11.2017

■ **Background.** Bacterial vaginosis (BV) is disturbance of the vaginal microbiota, characterized by displacement of lactobacilli with anaerobic bacteria and capable of adversely affecting women's reproductive health. In the development of BV, a wide spectrum of bacteria substantially differing in their properties is involved. Grouping vaginal bacterial communities into clusters, or types of microbiocenosis, might contribute to understanding of pathogenic mechanisms and elaboration of effective tools for diagnostics and therapy of the disease. **Aim.** Determination and comparative analysis of clusters of vaginal bacterial communities in norm and in BV. **Materials and methods.** Women of reproductive age were enrolled in the study. For the diagnosis of BV, the Nugent score was used. Vaginal swab samples from all women were analyzed with the test Femoflor-16, intended for evaluation of the vaginal microbiocenosis using multiplex quantitative real-time PCR. Two-step cluster analysis was applied for grouping bacterial communities. Differences between the clusters were evaluated using pairwise comparisons. **Results.** Of 280 women enrolled in the study, 172 had normal microflora, 27 – intermediate microflora, 81 – BV. In cluster analysis, 270 samples valid in PCR testing were included. All the vaginal bacterial communities were grouped into 4 clusters. Cluster 1 ($n = 171$) included cases when the vaginal microflora consisted mostly of lactobacilli. Cluster 2 ($n = 11$) encompassed cases of domination of aerobic microflora: *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* and *Staphylococcus*. Clusters 3 ($n = 57$) and 4 ($n = 31$) were connected with BV and included cases of prevailing of facultative anaerobes (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) and obligate anaerobes (*Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*), respectively. Nearly all cases of cluster 1 belonged to the category of normal microflora of the Nugent score. The majority of bacterial communities of cluster 2 matched intermediate microflora, cluster 3 – BV category with a score of 7 or 8, cluster 4 – BV category with a score of 9 or 10. The clusters differed significantly in vaginal pH, with the highest values observed for cluster 4. **Conclusions.** Vaginal bacterial communities are grouped into 4 main clusters, characterized by domination of lactobacilli, aerobes, facultative anaerobes or obligate anaerobes. The clusters belong to different categories of the Nugent score and differ significantly in vaginal pH.

■ **Keywords:** bacterial vaginosis; clusters of bacterial communities; lactobacilli; aerobic bacteria; anaerobic bacteria.

Введение

Бактериальный вагиноз (БВ) — нарушение микробиоты влагалища, выражающееся в замещении лактобацилл анаэробными бактериями и проявляющееся специфическими вагинальными выделениями. Термин «бактериальный вагиноз» начали применять относительно недавно, около 30 лет назад, хотя впервые это состояние было описано больше 100 лет назад. Долгое время считалось, что БВ — это относительно безобидный избыточный рост анаэробных микроорганизмов, который можно легко подавить метронидазолом или клиндамицином. Однако исследования последних лет показывают, что БВ — это заболевание, которое ассоциировано с рядом заболеваний урогенитального тракта женщины, а также может приводить к осложнениям беременности [1–3]. Заболевание часто принимает рецидивирующую форму. Так, у 60 % женщин наблюдаются рецидивы БВ в течение 12 месяцев после лечения [4]. В то же время у большого числа женщин (до 60 %) заболевание протекает бессимптомно [5].

Несмотря на существенный прогресс в области изучения этиологии, патогенеза и путей передачи этого заболевания, многие вопросы до сих пор остаются открытыми. Во многом это связано с тем, что БВ ассоциирован с огромным спектром бактерий. Эти бактерии

принадлежат четырем бактериальным типам, а именно *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria* [6], и существенно различаются по биохимическим, морфологическим, тинкториальным характеристикам, а также по чувствительности к антибактериальным препаратам. Это разнообразие в значительной степени усложняет не только выявление патогенетических механизмов заболевания, но и поиски эффективных способов диагностики и лечения БВ. Одним из методологических подходов к поиску общих закономерностей при изучении какого-либо аспекта полимикробного заболевания, каким является БВ, представляется группирование всех бактериальных сообществ влагалища в кластеры — типы микробиоценоза, объединяющие схожие по определенным признакам бактериальные сообщества, и изучение их клинико-диагностической значимости.

Целью данного исследования было определение и сравнительный анализ кластеров бактериальных сообществ, формирующих микроэкосистему влагалища в норме и при БВ.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие женщины репродуктивного возраста, обратившиеся с жалобами на дискомфорт и/или 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 молекулярно-биологического анализа микрофлоры влагалища.

Диагностику БВ проводили путем исследования отделяемого влагалища с применением метода Нуджента [7]. В окрашенных по Граму препаратах определяли следующие бактериальные морфотипы: крупные грамположительные палочки (морфотип лактобациллы), небольшие грамвариабельные кокки и коккобациллы (морфотип *Gardnerella* и *Bacteroides*) и 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).

Для включения в кластерный анализ оценивали клинические критерии Амсея [8]: pH влагалища (представляли в количественной шкале), наличие специфических выделений из влагалища, положительный аминный тест, наличие ключевых клеток при микроскопическом исследовании отделяемого влагалища (в окрашенном по Граму препарате).

Исследование микрофлоры влагалища проводили с использованием теста Фемофлор-16 (ДНК-Технология, Москва). Тест основан на методе количественной ПЦР в реальном времени и предназначен для выявления дисбиотических состояний влагалища. 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. Кроме того, оценивается абсолютная концентрация *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma* и *Candida*. ПЦР-анализ осуществляли согласно инструкции производителя. Количественное содержание анализируемых микроорганизмов представляли в виде соотношения концентрации их ДНК к ОБМ в долях единицы.

Статистический анализ результатов осуществляли с использованием пакетов для статистического анализа GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) и SPSS (IBM). Для группирования бактериальных сообществ в кластеры использовали метод неиерархического двухэтапного кластерного анализа. Неиерархические методы, в отличие от иерархических, характеризуются более высокой устойчивостью к шумам и выбросам, неоднородностью переменных, присутствием незначимых переменных в наборе, участвующих в кластеризации, и не имеют ограничений в объеме данных. Принцип метода двухэтапного кластерного анализа заключается в том, что на первом этапе работы объекты предварительно кластеризуются в большое количество субкластеров. На втором этапе полученные субкластеры группируются в необходимое количество кластеров. Данный метод кластеризации позволяет использовать как количественные, так и категориальные переменные.

Количественное содержание бактерий/групп бактерий в составе вагинальной микрофлоры всех пациенток представляли в виде тепловой карты. Для характеристики совокупности объектов в пределах каждого кластера использовали медиану, нижний и верхний квартили, минимальное и максимальное значения, которые представляли графически. Сравнительный анализ кластеров по количественным и категориальным признакам осуществляли путем их попарного сравнения с применением теста Манна – Уитни и точного критерия Фишера соответственно.

Результаты

Всего в исследование было включено 280 женщин в возрасте от 20 до 45 лет ($29 \pm 5,7$ года). С использованием метода Нуджента 172 образца были причислены к категории нормальной микрофлоры, 27 — промежуточной микрофлоры, 81 — БВ.

Образцы отделяемого влагалища от всех женщин были протестированы при помощи теста Фемофлор-16. Результаты 10 проб были

признаны невалидными ввиду низкого значения контроля взятия материала и исключены из анализа. Таким образом, в кластерный анализ было включено 270 проб.

Особенностью неиерархической кластеризации является то, что она требует предположения о числе кластеров. При выборе числа кластеров мы руководствовались следующими соображениями. Известно, что основная микробиологическая характеристика БВ — низкое содержание лактобацилл. Однако это свойство присуще не только БВ, но и так называемому аэробному (неспецифическому) вагиниту, который характеризуется замещением лактобацилл бактериями кишечной группы. Далее, микрофлора при БВ включает широкий спектр анаэробных бактерий, среди которых можно выделить факультативно-анаэробные (*Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*) и облигатно-анаэробные (бактероиды, фузобактерии, клостридии) бактерии. Таким образом, мы предположили, что все изучаемые случаи могут быть разделены на четыре кластера, или типа микробиоценоза, в зависимости от домини-

рования тех или иных групп бактерий: с преобладанием лактобацилл, аэробных бактерий (семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококков и стрептококков), факультативно-анаэробных бактерий и облигатно-анаэробных бактерий.

Кластеризацию проводили по микробиологическим (количественное содержание бактерий в образцах) и клиническим (значение pH влагалища, наличие или отсутствие выделений, положительный или отрицательный аминный тест, наличие или отсутствие ключевых клеток) признакам. Были включены следующие бактерии/группы бактерий: *Lactobacillus*/ОБМ, *Enterobacteriaceae*/ОБМ, *Streptococcus*/ОБМ, *Staphylococcus*/ОБМ, *Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas*/ОБМ, *Eubacterium*/ОБМ, *Sneathia*/*Leptotrichia*/*Fusobacterium*/ОБМ, *Megasphaera*/*Veillonella*/*Dialister*/ОБМ, *Lachnobacterium*/*Clostridium*/ОБМ, *Corynebacterium*/*Mobiluncus*/ОБМ, *Peptostreptococcus*/ОБМ, *Atopobium vaginae*/ОБМ, *Mycoplasma hominis*/ОБМ (в тесте Фемофлор-16 количество ДНК *M. hominis* выражается в абсолютных единицах концентрации, однако для кластерного анализа количе-

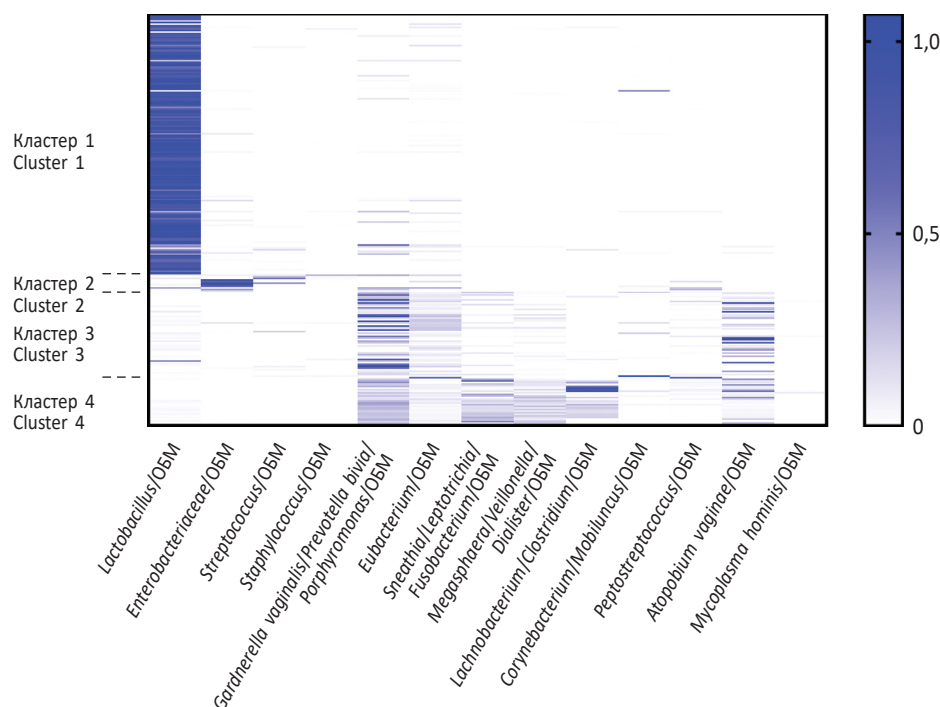


Рис. 1. Бактериальные сообщества влагалища, сгруппированные в четыре кластера. Каждый столбец представляет собой соотношение концентрации ДНК определенных бактерий/групп бактерий и общей бактериальной массы (ОБМ). Каждый ряд (тонкая горизонтальная линия) представляет собой состав микрофлоры влагалища каждой из 270 женщин

Fig. 1. Vaginal bacterial communities grouped into 4 clusters. Each column is the ratio of DNA concentration of a certain bacterium/group of bacteria to total bacteria. Each row (thin horizontal line) is the composition of the vaginal microflora in each of the 270 women

ственное содержание этих бактерий было представлено в относительном выражении). Микроорганизмы родов *Ureaplasma* и *Candida* в кластерный анализ не включили, так как в нашем предыдущем исследовании, посвященном разработке критериев диагностики БВ с применением теста Фемофлор-16 и выполненном на этой же выборке пациенток [9], мы не выявили их корреляции с количественными показателями БВ (числом баллов по шкале Нуджента, числом положительных критериев Амсея, значением pH влагалища). Необходимо отметить, что группа бактерий *Corynebacterium/Mobiluncus* также не показала корреляции с БВ в вышеупомянутой работе, что может быть связано с отсутствием связи между БВ и бактериями рода *Corynebacterium*. Несмотря на это, данный параметр также был включен в кластерный анализ ввиду того, что *Mobiluncus* spp. традиционно рассматривается как важный компонент БВ.

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

(*Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*) микрофлоры соответственно. Полученная модель кластеризации была оценена как «хорошее разделение кластеров».

Распределение частоты представителей разных кластеров в зависимости от числа баллов по шкале Нуджента изображено на рис. 2. Подавляющее большинство представителей кластера 1 (160 из 171, 94 %) вошли в категорию нормальной микрофлоры по шкале Нуджента. Большая часть случаев из кластера 2 (7 из 11, 64 %) попала в категорию промежуточной микрофлоры. Представители кластеров 3 и 4 распределились, главным образом, в категории БВ по шкале Нуджента, при этом большинство представителей кластера 3 (35 из 57, 61 %) вошли в подкатегории с числом баллов 7 и 8, тогда как большинство представителей кластера 4 (24 из 31, 77 %) — в подкатегории с числом баллов 9 и 10.

Обращает на себя внимание гетерогенность промежуточной микрофлоры по шкале Нуджента. Большая часть подкатегории с числом баллов 4 состояла из случаев нормальной микрофлоры. Подкатегория с числом баллов 5 включала практически в равных долях представителей кластеров нормальной, аэробной и факультативно-анаэробной микрофлоры. Подкатегория с числом баллов 6 делилась поровну на представителей аэробного и факультативно-анаэробного кластеров (рис. 2).

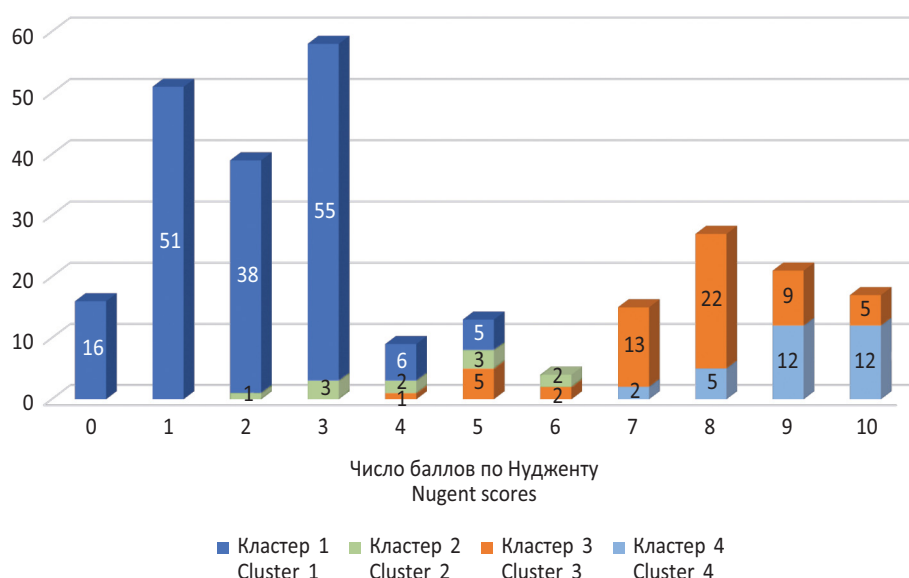
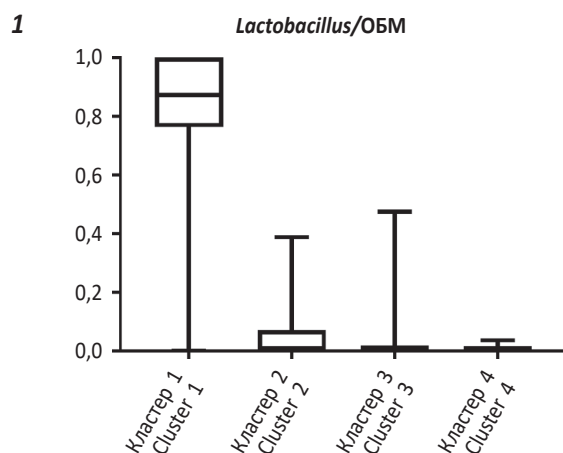


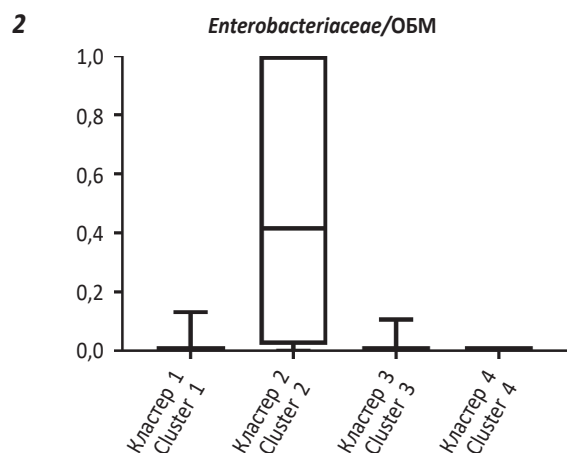
Рис. 2. Распределение бактериальных кластеров влагалища в зависимости от числа баллов по Нудженту

Fig. 2. Distribution of the bacterial clusters of the vagina depending on the Nugent score



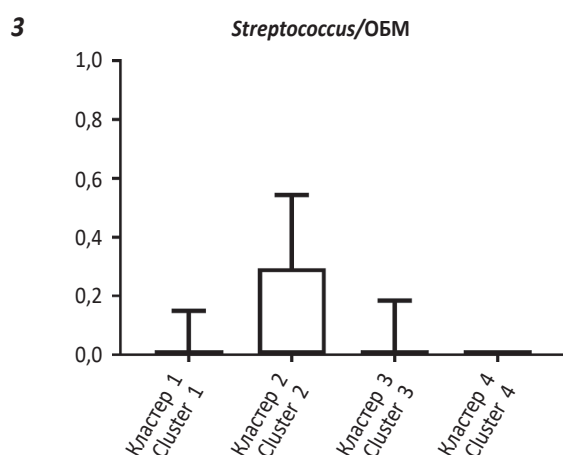
Значения p :

Кластеры 1 и 2 — <0,0001	Кластеры 2 и 3 — 0,781
Кластеры 1 и 3 — <0,0001	Кластеры 2 и 4 — 0,706
Кластеры 1 и 4 — <0,0001	Кластеры 3 и 4 — 0,638



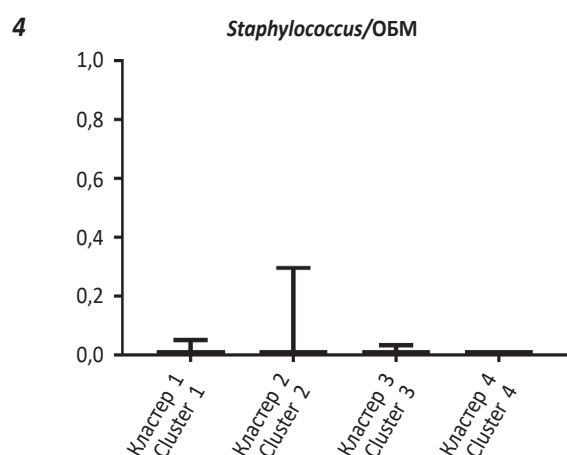
Значения p :

Кластеры 1 и 2 — <0,0001	Кластеры 2 и 3 — <0,0001
Кластеры 1 и 3 — 0,192	Кластеры 2 и 4 — <0,0001
Кластеры 1 и 4 — 0,193	Кластеры 3 и 4 — 0,022



Значения p :

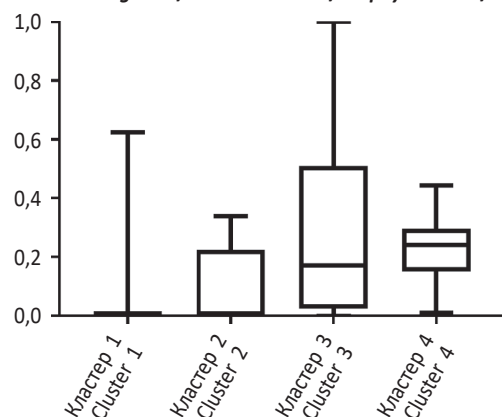
Кластеры 1 и 2 — <0,0001	Кластеры 2 и 3 — 0,0005
Кластеры 1 и 3 — <0,315	Кластеры 2 и 4 — <0,0001
Кластеры 1 и 4 — 0,003	Кластеры 3 и 4 — 0,0011



Значения p :

Кластеры 1 и 2 — 0,019	Кластеры 2 и 3 — 0,114
Кластеры 1 и 3 — 0,240	Кластеры 2 и 4 — 0,0007
Кластеры 1 и 4 — 0,067	Кластеры 3 и 4 — 0,018

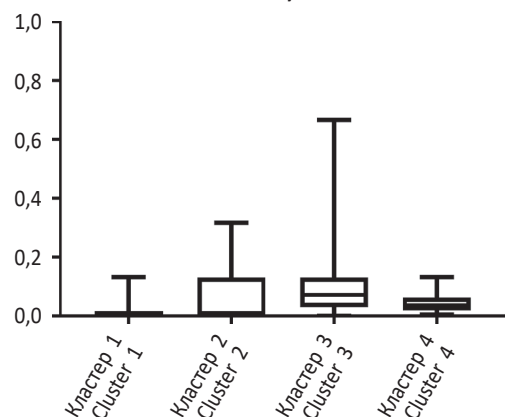
5 *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas*/ОБМ



Значения p :

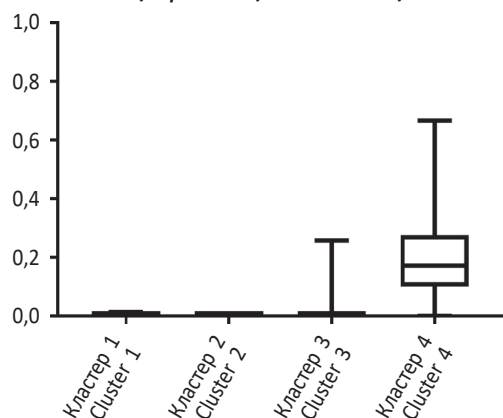
Кластеры 1 и 2 — 0,110	Кластеры 2 и 3 — 0,002
Кластеры 1 и 3 — <0,0001	Кластеры 2 и 4 — 0,002
Кластеры 1 и 4 — <0,0001	Кластеры 3 и 4 — 0,335

6 *Eubacterium*/ОБМ

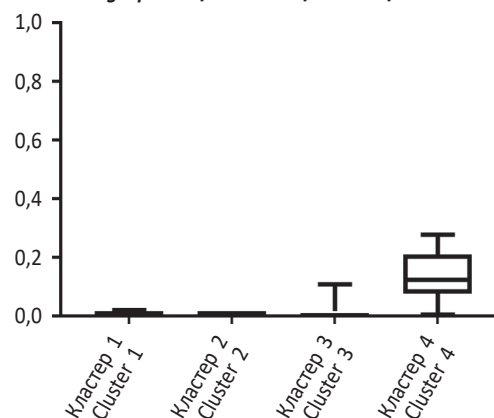


Значения p :

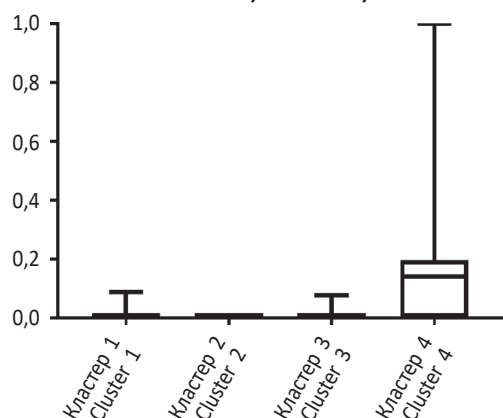
Кластеры 1 и 2 — 0,018	Кластеры 2 и 3 — 0,019
Кластеры 1 и 3 — <0,0001	Кластеры 2 и 4 — 0,027
Кластеры 1 и 4 — <0,0001	Кластеры 3 и 4 — 0,017

7 *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium/ОБМ*Значения p :

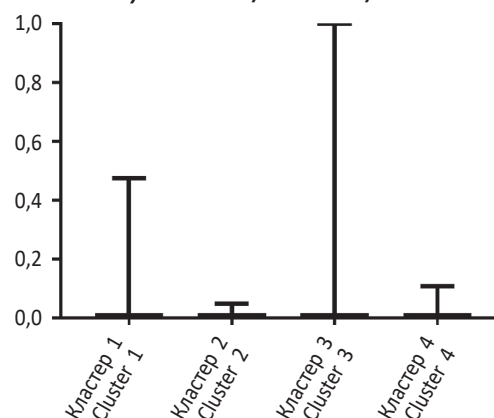
Кластеры 1 и 2 — 0,059
 Кластеры 1 и 3 — <0,0001
 Кластеры 1 и 4 — <0,0001
 Кластеры 2 и 3 — <0,01
 Кластеры 2 и 4 — <0,0001
 Кластеры 3 и 4 — <0,0001

8 *Megasphaera/Veillonella/Dialister/ОБМ*Значения p :

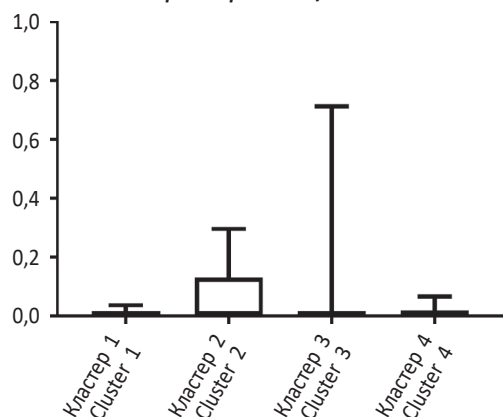
Кластеры 1 и 2 — 0,024
 Кластеры 1 и 3 — <0,0001
 Кластеры 1 и 4 — <0,0001
 Кластеры 2 и 3 — 0,003
 Кластеры 2 и 4 — <0,0001
 Кластеры 3 и 4 — <0,0001

9 *Lachnabacterium/Clostridium/ОБМ*Значения p :

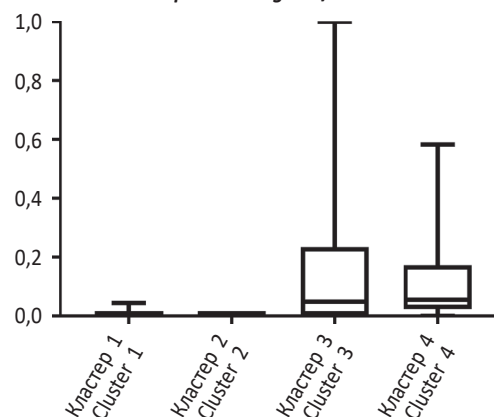
Кластеры 1 и 2 — 0,021
 Кластеры 1 и 3 — <0,0001
 Кластеры 1 и 4 — <0,0001
 Кластеры 2 и 3 — 0,804
 Кластеры 2 и 4 — 0,0005
 Кластеры 3 и 4 — <0,0001

10 *Corynebacterium/Mobiluncus/ОБМ*Значения p :

Кластеры 1 и 2 — 0,006
 Кластеры 1 и 3 — <0,0001
 Кластеры 1 и 4 — <0,0001
 Кластеры 2 и 3 — 0,870
 Кластеры 2 и 4 — 0,135
 Кластеры 3 и 4 — 0,025

11 *Peptostreptococcus/ОБМ*Значения p :

Кластеры 1 и 2 — 0,028
 Кластеры 1 и 3 — <0,0001
 Кластеры 1 и 4 — <0,0001
 Кластеры 2 и 3 — 0,678
 Кластеры 2 и 4 — 0,108
 Кластеры 3 и 4 — 0,001

12 *Atopobium vaginae/ОБМ*Значения p :

Кластеры 1 и 2 — 0,447
 Кластеры 1 и 3 — <0,0001
 Кластеры 1 и 4 — <0,0001
 Кластеры 2 и 3 — 0,0005
 Кластеры 2 и 4 — <0,0001
 Кластеры 3 и 4 — 0,297

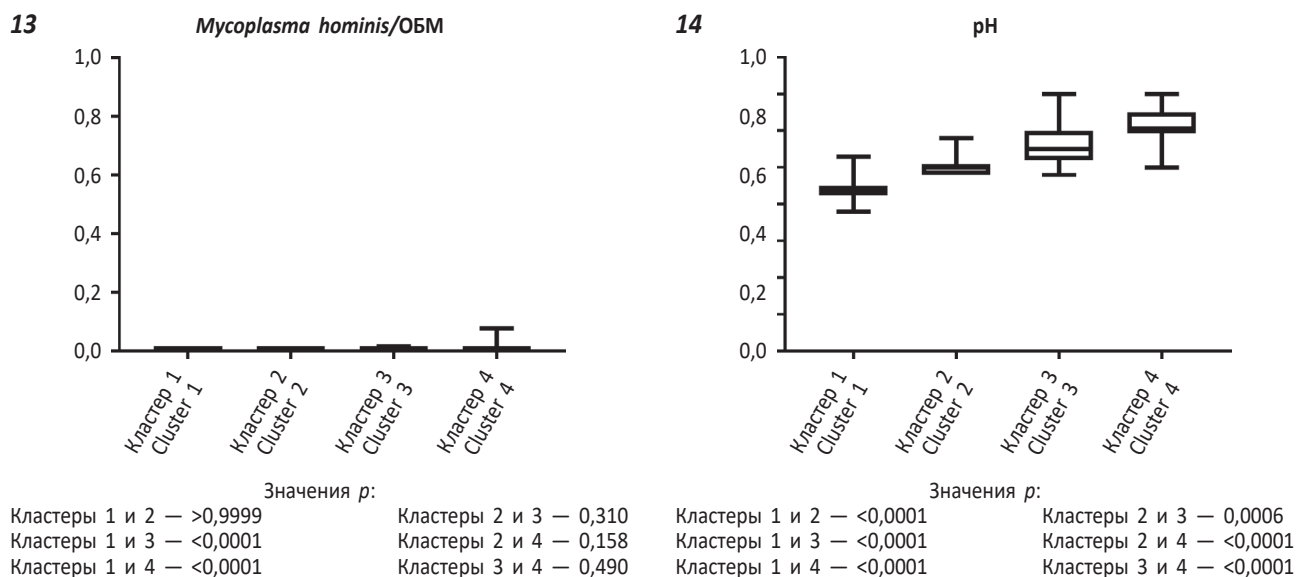
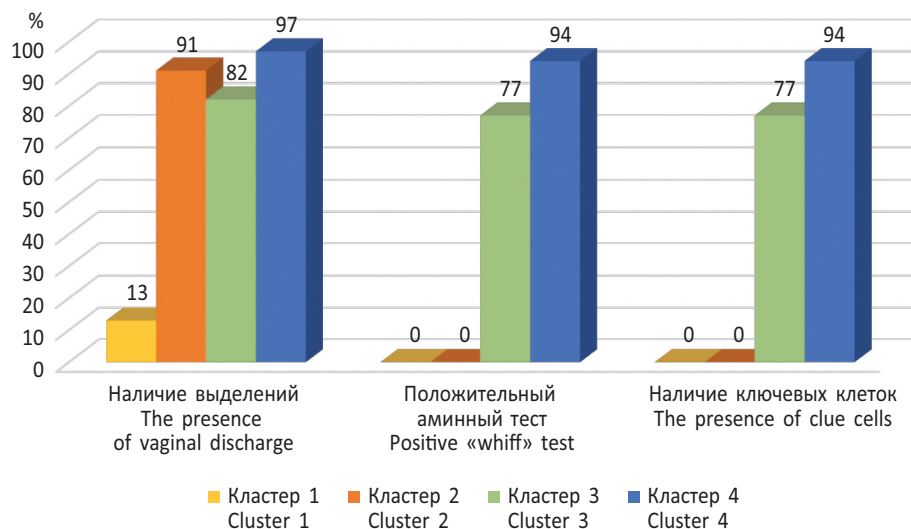


Рис. 3. Сравнительный анализ бактериальных кластеров влагалища по содержанию *Lactobacillus* (1), *Enterobacteriaceae* (2), *Streptococcus* (3), *Staphylococcus* (4), *Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas* (5), *Eubacterium* (6), *Sneathia*/*Leptotrichia*/*Fusobacterium* (7), *Megasphaera*/*Veillonella*/*Dialister* (8), *Lachnobacterium*/*Clostridium* (9), *Corynebacterium*/*Mobiluncus* (10), *Peptostreptococcus* (11), *Atopobium vaginae* (12), *Mycoplasma hominis* (13), значению pH влагалища (14)

Fig. 3. Comparative analysis of the bacterial clusters of the vagina for the abundance of *Lactobacillus* (1), *Enterobacteriaceae* (2), *Streptococcus* (3), *Staphylococcus* (4), *Gardnerella vaginalis*/*Prevotella bivia*/*Porphyromonas* (5), *Eubacterium* (6), *Sneathia*/*Leptotrichia*/*Fusobacterium* (7), *Megasphaera*/*Veillonella*/*Dialister* (8), *Lachnobacterium*/*Clostridium* (9), *Corynebacterium*/*Mobiluncus* (10), *Peptostreptococcus* (11), *Atopobium vaginae* (12), *Mycoplasma hominis* (13), vaginal pH (14)



Значение p (наличие выделений):

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

Значение p (положительный аминный тест):

Кластеры 1 и 2 — Нв (Nc)
 Кластеры 1 и 3 — $<0,0001$
 Кластеры 1 и 4 — $<0,0001$
 Кластеры 2 и 3 — $<0,0001$
 Кластеры 2 и 4 — $<0,0001$
 Кластеры 3 и 4 — $0,074$

Значение p (наличие ключевых клеток):

Кластеры 1 и 2 — Нв (Nc)
 Кластеры 1 и 3 — $<0,0001$
 Кластеры 1 и 4 — $<0,0001$
 Кластеры 2 и 3 — $<0,0001$
 Кластеры 2 и 4 — $<0,0001$
 Кластеры 3 и 4 — $0,074$

Рис. 4. Сравнительный анализ бактериальных кластеров влагалища по наличию выделений, результатам аминного теста и наличию ключевых клеток. Нв — критерий не вычислялся, так как значения переменной в обеих группах равны нулю

Fig. 4. Comparative analysis of the bacterial clusters of the vagina for the presence of vaginal discharge, «whiff» test results, the presence of clue cells. Nc — the criterion was not calculated because of zero values of a variable in both groups

Кластерный анализ относится к так называемым разведочным типам анализа, и результаты кластеризации не имеют достаточного статистического обоснования. С целью статистической интерпретации полученных результатов мы провели попарное сравнение всех кластеров по всем признакам, включенным в анализ. Результаты сравнительного анализа кластеров по количественным показателям (соотношение ДНК бактерий/групп бактерий к ОБМ и значение рН влагалища) представлены на серии графиков (рис. 3). Приведены медиана, нижний и верхний квартили, минимальное и максимальное значения показателей, а также значения p , полученные при сравнении показателей с применением теста Манна–Уитни.

Содержание лактобацилл в кластере 1 значительно превышало содержание лактобацилл в остальных кластерах (рис. 3.1). Кластеры 2, 3 и 4 не различались между собой по данному показателю. Кластер 2, как и ожидалось, значительно превосходил кластеры 1, 3 и 4 по содержанию энтеробактерий, стрептококков и стафилококков (рис. 3.2–3.4). Кластеры 1 и 2 значительно отличались от кластеров 3 и 4 по содержанию *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas*, при этом содержание данной группы бактерий в кластерах 3 и 4 было примерно одинаковым (рис. 3.5). Похожая картина наблюдалась также для показателя *Atopobium vaginae*/ОБМ (рис. 3.12). Содержание облигатно-анаэробных бактерий (группы *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*) было значительно выше в кластере 4, чем в остальных кластерах (рис. 3.7–3.9). Все кластеры значительно различались между собой по значению рН влагалища, при этом самые высокие показатели наблюдались для кластера 4 (рис. 3.14).

Кроме рН влагалища, мы исследовали различия между кластерами по их связи с другими клиническими признаками, такими как наличие выделений, результаты аминного теста и наличие ключевых клеток (рис. 4). Женщины с доминированием лактобацилл значительно реже имели вагинальные выделения (13 %), чем женщины с доминированием аэробной (91 %), факультативно-анаэробной (82 %) и облигатно-анаэробной (97 %) микрофлоры. Все женщины с доминированием лактобацилл и аэробной микрофлоры предсказуемо имели отрицательный результат аминного теста, и ни у одной из

них не выявлялись ключевые клетки. Из двух кластеров, ассоциированных с БВ, кластер с преобладанием облигатных анаэробов был связан с более высокой частотой выделений, положительного аминного теста и выявления ключевых клеток, однако статистической значимости данные различия не достигли.

Обсуждение результатов

Впервые кластеризация микробных сообществ влагалища, охарактеризованных с использованием технологий глубокого секвенирования ДНК, была проведена в 2011 г. J. Ravel et al. [10]. Изучая микробиоту влагалища у здоровых женщин репродуктивного возраста ($n = 396$), исследователи выделили пять основных групп. Группы отличались друг от друга по значению рН отделяемого влагалища. Четыре группы характеризовались доминированием одного из четырех видов лактобацилл — *Lactobacillus crispatus* (рН $4,0 \pm 0,3$), *L. iners* (рН $4,4 \pm 0,6$), *L. gasseri* (рН $5,0 \pm 0,7$) или *L. jensenii* (рН $4,7 \pm 0,4$). Микрофлора пятой группы была представлена факультативными или облигатными анаэробами с рН влагалища $5,3 \pm 0,6$. Такой «нелактобациллярный» тип микробиоценоза выявлялся почти у трети всех женщин, при этом его доля составляла около 10 % среди женщин европейской, 20 % — азиатской и 40 % — афроамериканской и латиноамериканской этнических/расовых групп. У женщин с «нелактобациллярным» типом микробиоценоза были обнаружены представители бактериальных родов *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Dialister*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Finegoldia* и *Mobiluncus*, при этом доминирования какого-либо определенного бактериального таксона в этом типе микробиоценоза авторы не наблюдали. Важно подчеркнуть, что обследуемую популяцию составляли здоровые женщины, то есть женщины без симптомов БВ (выделений из влагалища и/или специфического запаха). Большинство женщин с «нелактобациллярным» типом микробиоценоза предсказуемо имели число баллов по шкале Нуджента ≥ 7 и высокие значения рН отделяемого влагалища ($> 4,5$), тем не менее они не имели вульво-вагинальных симптомов. Позднее P. Gajer et al. (2012) модифицировали классификацию J. Ravel et al. [9], разделив «нелактобациллярную» группу бактериальных сообществ на две подгруппы [11]. В первой подгруппе, наряду с умеренным количеством лактобацилл, вы-

являлись представители видов *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Finegoldia* или *Streptococcus*. Вторая подгруппа характеризовалась присутствием большого количества представителей родов *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus*, *Peptoniphilus* и некоторых других. Авторы исследовали динамику изменения различных типов вагинальной микрофлоры в течение 16 недель и показали, что наиболее стабильными были типы микробиоценоза с доминированием *L. crispatus* и *L. gasseri*. Среди остальных типов микробиоценоза единообразия не наблюдалось: в одних случаях видовой и количественный состав претерпевал существенные изменения, в других — оставался стабильным в течение всего периода наблюдения. В нескольких последующих работах было проведено похожее разделение бактериальных сообществ влагалища на кластеры с тем различием, что в некоторых работах не выявляли групп с доминированием *L. gasseri* или *L. jensenii*, так как эти группы малочисленные и при выборке небольшого размера могут не выявляться [12–14].

S. Srinivasan et al. (2012) показали, что среди женщин без БВ во влагалище доминируют лактобациллы (*L. crispatus* или *L. iners*), тогда как при БВ вагинальная микрофлора исключительно разнообразна, и только четыре бактериальных таксона, а именно BVAB1 (bacterial vaginosis associated bacteria — бактерии, ассоциированные с бактериальным вагинозом), *Prevotella spp.*, *Sneathia sanguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, имели тенденцию доминировать в качестве единственного таксона [15]. В недавней работе J.A. Dols et al. (2016) было выявлено два кластера у здоровых женщин: один с доминированием *L. iners*, другой — *L. crispatus* [16]. У женщин с БВ бактериальные сообщества были сгруппированы в три кластера. Один из них характеризовался доминированием *G. vaginalis* и *L. amnionii*, второй — доминированием представителей семейства *Lachnospiraceae*. Третий кластер отличался высоким уровнем видового разнообразия, тем не менее доминирующими видами были *S. sanguinegens* и *G. vaginalis*. Авторы не выявили ассоциации индивидуальных кластеров с возрастом, наличием урогенитальных инфекций и воспалительными заболеваниями органов малого таза.

Основной целью нашей работы было изучение бактериальных сообществ нарушенной микрофлоры влагалища, в связи с чем видо-

специфический анализ лактобацилл не проводился. В результате кластеризации мы разделили бактериальные сообщества влагалища на группы, характеризующиеся доминированием лактобацилл (кластер 1), аэробных бактерий — *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* и *Staphylococcus* (кластер 2), факультативно-анаэробных бактерий — *G. vaginalis* и *A. vaginae* (кластер 3) и облигатно-анаэробных бактерий — *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium* (кластер 4). Необходимо отметить, что термины «аэробные бактерии» или «анаэробные бактерии» были использованы нами скорее с номинальной целью (обозначить кластер), чем с целью акцентировать внимание на типе дыхания бактерий и их отношении к свободному кислороду. Известно, что большинство бактерий кишечной группы (как и большинство лактобацилл), строго говоря, являются факультативными анаэробами, тем не менее их традиционно называют аэробными бактериями.

При распределении кластеров по шкале Нуджента практически все представители кластера 1 предсказуемо вошли в категорию нормальной микрофлоры. Большинство представителей кластера 2 попали в категорию промежуточной микрофлоры. Это согласуется с данными G. Donders (2002), свидетельствующими о том, что категория промежуточной микрофлоры по Нудженту включает в себя микрофлору, свойственную аэробному вагиниту [17]. Представители кластеров 3 и 4 вошли преимущественно в категорию БВ по шкале Нуджента. Интересно отметить, что большинство представителей кластера 3 имели число баллов 7 и 8, тогда как большинство представителей кластера 4 — 9 и 10. Объяснить это можно тем, что представители кластера 4 содержали как гарднереллы, так и другие БВ-ассоциированные бактерии, так как получить максимальное число баллов по Нудженту (9 или 10) можно только в том случае, если в образце наряду с морфотипом небольших грамвариабельных кокков и коккобацилл присутствует морфотип грамвариабельных изогнутых палочек и при этом отсутствует морфотип лактобацилл.

В нашем исследовании оба кластера БВ-ассоциированных бактериальных сообществ (3 и 4) содержали *G. vaginalis* и *A. vaginae*, при этом их количество в обоих кластерах было примерно одинаковым. Однако если в кластере 3 эти бактерии доминировали, то

в кластере 4 преобладали *Sneathia/Leptotrichia/Fusobacterium*, *Megasphaera/Veillonella/Dialister*, *Lachnobacterium/Clostridium*. Результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу гипотезы, рассматривающей БВ как полимикробную биопленочную инфекцию, в которой *G. vaginalis* является инициатором патологического процесса, ведущего к развитию БВ [18–21]. Биопленка — это микробное сообщество, в котором клетки прикреплены к какой-либо поверхности и/или друг к другу и заключены в межбактериальный матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ. Полагают, что *G. vaginalis* первыми прикрепляются к вагинальному эпителию, выступая в роли «первичного колонизатора», и затем служат своего рода каркасом для прикрепления других бактерий [18, 19]. J.L. Patterson et al. (2010) показали, что *G. vaginalis* по вирулентности, а именно адгезивным свойствам, цитотоксичности и способности формировать биопленки, превосходит другие ассоциированные с БВ бактерии [19]. Позднее P. Alves et al. (2014) выделили около 30 видов бактерий, ассоциированных с БВ, и в модельных экспериментах продемонстрировали, что большинство бактерий имеет тенденцию расти как биопленки, однако не обладает такой же способностью, как *G. vaginalis*, образовывать первичные биопленки на эпителии влагалища [22]. J. Schellenberg et al. (2011) по результатам своей работы сформулировали концепцию, заключающуюся в том, что доминирование *G. vaginalis* в микробиоте влагалища — это переходное состояние между физиологическим, представленным лактобациллами, микробиоценозом и БВ, характеризуемым кодоминированием гарднерелл, бактероидов и клостридий [23].

Если роль *G. vaginalis* в развитии БВ изучается много лет, то ассоциация *A. vaginae* с БВ была описана относительно недавно [24]. *A. vaginae*, наряду с *G. vaginalis*, обнаруживаются у большинства женщин с БВ и предположительно участвуют в формировании биопленок. Так, в недавнем исследовании L. Hardy et al. (2015) биопленки были обнаружены у половины женщин, включенных в исследование. *G. vaginalis* присутствовали в 82 % всех биопленок, *A. vaginae* — в 54 %, при этом практически во всех случаях выявления *A. vaginae* обнаруживали также *G. vaginalis*. Авторы предположили, что симбиоз этих двух микроорганизмов играет важную роль в формировании биопленки и развитии БВ [25].

Отдельного внимания заслуживают результаты тестирования вагинального отделяемого на *Eubacterium* — грамположительные бактерии семейства *Eubacteriaceae* порядка *Clostridiales*. Мы выявили этот микроорганизм практически у всех женщин с БВ, причем его содержание в некоторых образцах было довольно высоким (до 60 % общей массы бактерий). В нашей предыдущей работе по разработке критериев диагностики БВ с использованием теста Фемофлор-16 мы показали, что эти бактерии имеют значимую ассоциацию с БВ [9]. Наши данные не соответствуют результатам работ, проведенных с применением технологий глубокого секвенирования ДНК, согласно которым бактерии рода *Eubacterium* выявляются в незначительном числе образцов и их содержание относительно невелико [10, 11, 15]. Объяснением этому может служить то, что род *Eubacterium* отличается исключительной гетерогенностью, включая целый ряд видов с различающимися фенотипами. Многие виды этого рода по мере их детальной характеристики относят к другим родам (например, родственному роду *Clostridium*) и даже перемещают в другие более крупные таксоны, такие как тип *Actinobacteria* [26]. Можно предположить, что род *Eubacterium* включает виды, существенно различающиеся по ассоциации с БВ, и тест Фемофлор-16 выявляет вид/виды, связанные с БВ в высокой степени.

Содержание остальных бактерий/групп бактерий, а именно *Corynebacterium/Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*, *M. hominis*, в исследованных образцах было относительно невысоким, в связи с чем их место в каком-либо типе микробиоценоза сложно определить. Что касается группы *Corynebacterium/Mobiluncus*, трудности интерпретации связаны еще и с тем, что, хотя оба рода бактерий принадлежат порядку *Actinomycetales* (тип *Actinobacteria*), *Mobiluncus* spp. ассоциирован с БВ, а *Corynebacterium* spp. нет.

Ограничением данного исследования является то, что *G. vaginalis* — факультативный анаэроб, представитель порядка *Bifidobacteriales* (тип *Actinobacteria*) — в тесте Фемофлор-16 выявляется в совокупности с *Prevotella bivia* и *Porphyromonas* spp. — облигатными анаэробными бактериями порядка *Bacteroidales* (тип *Bacteroidetes*). Известно, что бактероиды (в первую очередь, превотеллы) имеют высокие показатели распространенности и ко-

личественного содержания при БВ. Однако с применением технологий глубокого секвенирования ДНК было показано, что *P. bivia* не единственный распространенный при БВ вид превотелл, часто также выявляются *P. timonensis*, *P. amnii*, *P. melaninogenica*, *P. disiens* [15, 23]. Так, в работе J. Shellenberg et al. (2011) самым распространенным видом превотелл были *P. timonensis*, встречавшиеся практически у всех женщин и отвечавшие за 8 % общего содержания бактерий во всех исследованных образцах [23]. В исследовании S. Srinivasan et al. (2012) *P. timonensis*, *P. bivia*, *P. amnii* выявлялись у 76, 64, 50 % женщин с БВ соответственно, а совокупный вклад этих трех видов в общее содержание бактерий у женщин с БВ составлял 12 %, по 4 % каждого вида [15]. Для сравнения: *G. vaginalis* встречались у 98 % женщин с БВ с показателем содержания 14 %. Что касается другого представителя *Bacteroidales* — *Porphyromonas* spp., наиболее часто при БВ встречаются виды *P. asaccharolytica* и *P. uenonis*, и их распространенность и количественное содержание существенно ниже соответствующих показателей для превотелл [15, 23]. Эти данные, в совокупности с хорошо задокументированным фактом практически повсеместного присутствия *G. vaginalis* во влагалище у женщин с БВ, дают основания полагать, что в большинстве случаев при выявлении группы бактерий *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas* доминирующими бактериями были *G. vaginalis*. С другой стороны, из-за того, что представители порядка *Bacteroidales* в тесте Фемофлор-16 обнаруживаются вместе с гарднереллами, нам не удалось определить, к какому кластеру принадлежал этот важный бактериальный таксон. Логично предположить, что бактериоиды относятся к кластеру облигатных анаэробов.

В нашем исследовании все кластеры значительно различались по значению рН влагалища. Известно, что низкое значение рН при физиологическом состоянии микробиоценоза влагалища обеспечивается за счет продукции молочной кислоты и перекиси водорода лактобактериями. В нашем исследовании низкое содержание лактобактерий в «нелактобактериальных» бактериальных сообществах (кластеры 2, 3 и 4) было связано с намного более высокими значениями рН. Интересно отметить, что, хотя кластер аэробной микрофлоры, как и кластер анаэробной микрофлоры, характеризуется низким содержанием лакто-

бактерий, он значительно уступает им по этому показателю. Более того, для кластера с преобладанием облигатных анаэробов характерно значительно более высокое значение рН, чем для кластера факультативных анаэробов. Это говорит о том, что высокое значение рН при БВ обеспечивается не только за счет снижения содержания лактобактерий, но и за счет особенностей метаболизма доминирующих бактерий. Так, продукция анаэробными бактериями полиаминов, таких как путресцин и кадаверин, ассоциирована не только с неприятным запахом выделений при БВ, но и с повышенными значениями рН влагалища, так как данные соединения являются сильными основаниями [27].

При изучении других характерных для БВ клинических признаков — наличие выделений, положительный аминный тест, наличие ключевых клеток — мы не выявили статистически значимых различий между двумя ассоциированными с БВ кластерами. Предметом следующих исследований может стать вопрос о связи определенных бактериальных кластеров с клинически выраженным БВ, а также с рецидивирующим БВ.

Таким образом, бактериальные сообщества влагалища группируются в четыре основных кластера, или типа, вагинальной микрофлоры. Кластер нормальной микрофлоры состоит преимущественно из лактобактерий. Кластер аэробной микрофлоры характеризуется преобладанием энтеробактерий, стрептококков или стафилококков. Кластеры с доминированием факультативно-анаэробной или облигатно-анаэробной микрофлоры ассоциированы с БВ. Описанные кластеры принадлежат разным категориям по шкале Нуджента и различаются по значению рН влагалища.

Литература

1. Taylor BD, Darville T, Haggerty CL. Does bacterial vaginosis cause pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Dis*. 2013;40(2):117-22. doi: 10.1097/OLQ.0b013e31827c5a5b.
2. 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.
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.

4. Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, et al. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis.* 2006;193:1478-86. doi: 10.1086/503780.
5. Klebanoff MA, Schwabke JR, Zhang J, et al. Vulvo-vaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2004;104(2):267-272. doi: 10.1097/01.AOG.0000134783.98382.b0.
6. Ling Z, Kong J, Liu F, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics.* 2010;11(Sep7):488. doi:10.1186/1471-2164-11-488.
7. 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.
8. 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.
9. Назарова В.В., Шипицына Е.В., Герасимова Е.Н., Савичева А.М. Критерии диагностики бактериального вагиноза с использованием теста Фемофлор-16 // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т. 66. – № 4. – С. 57–67. [Nazarova VV, Shipitsyna EV, Gerasimova EN, Savicheva AM. Criteria for diagnosis of bacterial vaginosis using the test Femoflor-16. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2017;66(4):57-67. (In Russ.)]. doi: 10.17816/JOWD66457-67.
10. 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.
11. Gajer P, Brotman RM, Bail G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science Translational Medicine.* 2012;4. doi: 10.1126/scitranslmed.3003605.
12. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, et al. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep.* 2015;5:8988. doi: 10.1038/srep08988.
13. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis.* 2014;210(11):1723-33. doi: 10.1093/infdis/jiu330.
14. Huang YE, Wang Y, He Y, et al. Homogeneity of the vaginal microbiome at the cervix, posterior fornix, and vaginal canal in pregnant Chinese women. *Microb Ecol.* 2015;69(2):407-14. doi: 10.1007/s00248-014-0487-1.
15. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLOS One.* 2012;7(6):e37818. doi: 10.1371/journal.pone.0037818.
16. Dols JA, Molenaar D, van der Helm JJ, et al. Molecular assessment of bacterial vaginosis by *Lactobacillus* abundance and species diversity. *BMC Infect Dis.* 2016;16:180. doi: 10.1186/s12879-016-1513-3.
17. 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.
18. Swidsinski A, Verstraelen H, Loening-Baucke V, et al. Presence of a polymicrobial endometrial biofilm in patients with bacterial vaginosis. *PLOS one.* 2013;8(1):e53997. doi: 10.1371/journal.pone.0053997.
19. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK. Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology.* 2010;156:392-9. doi: 10.1099/mic.0.034280-0.
20. Verstraelen H, Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(1):86-9. doi: 10.1097/QCO.0b013e32835c20cd.
21. Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis.* 2015;212(12):1856-61. doi: 10.1093/infdis/jiv338.
22. Alves P, Castro J, Sousa C, et al. *Gardnerella vaginalis* outcompetes 29 other bacterial species isolated from BV patients in an *in vitro* biofilm formation model. *J Infect Dis.* 2014;210(4):593-6. doi: 10.1093/infdis/jiu131.
23. Schellenberg JJ, Links MG, Hill JE, et al. Molecular definition of vaginal microbiota in East African commercial sex workers. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(12):4066-74. doi: 10.1128/AEM.02943-10.
24. Ferris MJ, Masztal A, Aldridge KE, et al. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis.* 2004;4:5. doi: 10.1186/1471-2334-4-5.
25. Hardy L, Jespers V, Abdellati S, De Baetselier I, et al. A fruitful alliance: the synergy between *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in bacterial vaginosis-associated biofilm. *Sex Transm Infect.* 2016. pii: sextrans-2015-052475. doi: 10.1136/sextrans-2015-052475.
26. Wade WG. The Genus *Eubacterium* and Related Genera. *Prokaryotes.* 2006;4:823-35. doi: 10.1007/0-387-30744-3_28.
27. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, et al. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *MBio.* 2015;6(2). pii: e00204-15. doi: 10.1128/mBio.00204-15.

■ 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.

Кира Валентиновна Шалепо — старший 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, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

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

Kira V. Shalepo — PhD, Senior Researcher of Laboratory of Microbiology, The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, St. Petersburg, Russia. **E-mail:** iagmail@ott.ru.

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