

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Медико-профилактический факультет с отделением микробиологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии**

Шаяхметова Альфия Камилевна

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА
МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Руководитель:
профессор, д.б.н

Т.В. Маркушева

Уфа – 2016

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БВ – бактериальный вагиноз

ДБВ – дисбактериоз влагалища

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

КОЕ – колониеобразующая единица

МКБ – международная классификация болезней

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

ТБЕ – трис-боратный буфер

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1.Нормальная микрофлора влагалища	7
1.2.Бактериальный вагиноз.	9
1.3.Микрофлора влагалища при БВ	10
1.4.Диагностика БВ	17
1.4.1 Критерии R. Amsel, 1983	17
1.4.2 Классификация Кира Е.Ф., 1995	19
1.4.3 Классификация Мавзютова А.Р., 1998	20
1.4.4 Бактериологический анализ.	22
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Анамнез и взятие материала	23
2.2 Бактериоскопическое исследование (микроскопия) микрофлоры влагалища	25
2.3 Выделение ДНК	27
2.4 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени	29
2.5 Методы статистической обработки	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Результаты бактериоскопического исследования. Определение со- стояния микрофлоры влагалища и степени БВ	34
3.2 Анализ полученных результатов	37
ВЫВОДЫ	48
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	49
ПРИЛОЖЕНИЕ	56

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Бактериальный вагиноз (БВ) занимает ведущее место в структуре гинекологической патологии у женщин репродуктивного возраста. На сегодняшний день существует несколько методов диагностики этого состояния полового тракта женщины, в то же время нет их единой интерпретации. Эталонами имеющихся классификаций данного состояния женщины являются критерии R. Amsel, которые включают клинические проявления и результаты лабораторных исследований, информативность которых существенно разнится и недостаточна для получения диагностически значимых (в том числе для определения терапевтической тактики) данных о видовом составе микробиоты. Однако, все клинические проявления есть результат изменения микрофлоры влагалища у женщин. Вагинальная микрофлора в норме представлена четырьмя доминирующими типами лактобактерий: *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* и *L. iners*. Важно, что *L. iners* нельзя признать однозначно полезной — она хорошо приспосабливается даже к условиям баквагиноза. Вместе с тем на репродуктивное здоровье женщины могут влиять БВ-ассоциированные бактерии: *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.*

Для ранней диагностики данного состояния самым перспективным является метод ПЦР в режиме реального времени. Этот метод отличается высокой чувствительностью, возможностью идентифицировать специфические фрагменты ДНК выявляемых микроорганизмов в клиническом материале без выделения чистой культуры. Огромным преимуществом является то, что появляется возможность оценить не только качественный, но и количественный состав микробиоты влагалища.

Цель исследования

Разработка тест-системы для диагностики бактериального вагиноза методом ПЦР в режиме реального времени.

Задачи исследования

1. Сбор клинического материала от пациенток с различными симптомами, характерными для проявления бактериального вагиноза, бактериоскопическое исследование и дифференцировка БВ по степени тяжести.

2. ПЦР-исследование клинического материала в режиме реального времени на клинических образцах с лабораторно подтвержденным диагнозом БВ.

3. Анализ, полученных в ходе исследования данных, их статистическая обработка. Выявление взаимосвязи между БВ ассоциированными микроорганизмами, различными штаммами лактобактерий с клиническими проявлениями бактериального вагиноза.

4. Конструирование тест-системы для ПЦР в режиме реального времени. Оценка возможности ее использования для этиологической диагностики степени БВ.

Научная новизна.

Сконструирована тест-система для быстрой и точной диагностики бактериального вагиноза. Изучена взаимосвязь между различными штаммами лактобактерий, БВ-ассоциированными микроорганизмами и клиническими проявлениями данного состояния женщины. Оценка состава микрофлоры влагалища при БВ является важным шагом для понимания динамики и функционирования экосистем. Изучение того, как различные виды бактерий взаимодействуют при БВ, поможет осветить патофизиологию этого общего, плохо изученного синдрома.

Практическая значимость

Результаты исследований могут быть использованы для этиологической расшифровки бактериального вагиноза методом ПЦР в режиме реального времени. Разработаны и внедрены в практическое здравоохранение новые диагностические подходы, основанные на более широком применении ПЦР в режиме реального времени. Предложенный вариант оценки этиологической структуры дисбиоза влагалища и степени его выраженности позволяет оптимизировать и индивидуализировать лечение и способствует решению одной из важнейших медико-социальных проблем — диагностики заболеваний репродуктивных путей женщин на ранних стадиях. Результаты проделанной работы могут быть применимы в медицине, в практическом здравоохранении, в лабораторной диагностике для оценки качественного и количественного состояния микробиоты влагалища женщины.

ГЛАВА 1.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нормальная микрофлора влагалища

Влагалище с присущей ему микрофлорой образуют единую экосистему в которой вагинальная среда контролирует микрофлору, а микрофлора, в свою очередь, оказывает воздействие на вагинальную среду. [Ленцер А.А.1988, Савичева А. М. 1996, Larsen B. 1993] Нормальная микрофлора влагалища у здоровых женщин репродуктивного возраста характеризуется большим разнообразием видов бактерий, жизнедеятельность которых во многом зависит от их способности к адгезии на клетки вагинального эпителия и возможности конкуренции между собой за места обитания и продукты питания. [Larsen B. 1993, Mehta A. 1995] Отделяемое влагалища в норме содержит 10^8 - 10^{12} КОЕ/мл микроорганизмов, при этом факультативно-анаэробные бактерии составляют 10^3 - 10^5 КОЕ/мл, анаэробные – 10^5 - 10^9 КОЕ/мл. [Никонов А.П.1993, Bartlet J. G. 1984, Hurley R. 1974] На фоне всего видового многообразия ведущее место в вагинальном микроценозе занимают микроаэрофильные лактобактерии число которых может достигать 10^9 КОЕ/мл [Corbach S. L.1973, Eshenbach D.A. 1989] Колонизируя слизистую влагалища, лактобактерии участвуют в формировании экологического барьера и обеспечивают тем самым резистентность вагинального биотопа. Защитные свойства лактобактерий реализуются по-разному: за счет антагонистической активности, способности продуцировать лизоцим, перекись водорода и адгезивных свойств. Однако основным механизмом, обеспечивающим колонизационную резистентность вагинального биотопа является способность лактобактерий к кислотообразованию. Молочная кислота – продукт метаболизма лактобактерий. Она образуется в процессе деструкции гликогена вагинального эпителия лактобак-

териями и определяет кислую реакцию pH вагинального содержимого, которое в норме составляет 3,8-4,5. Лактобактерии продуцируют молочную кислоту в количествах, достаточных для создания выраженной кислой среды вагинального отделяемого и, тем самым, препятствуют размножению ацидофобных бактерий. Таким образом, определяющим фактором состояния вагинального микроценоза является лактофлора, ее концентрация и совокупность свойств [Brown W. J. 1982, Skarin A.1987]

В ходе реализации международного проекта «Микробиом человека» было установлено, что влагалище здоровой женщины могут колонизировать до 20 видов различных представителей лактофлоры. При этом для нормоценоза характерно доминирование одного вида *Lactobacillus spp.* [Айламазян Э.К. 1992, Баранов А.Н.1995] Ранее в качестве превалирующего вида «здоровой» вагинальной микрэкосистемы рассматривали вид *L. acidophilus*. В соответствии с современной таксономической классификацией комплекс *L. acidophilus* включает в себя несколько видов, в том числе собственно *L. acidophilus*, а также *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners*, *L. johnsoni*, *L. amylovorus*, *L. amylolyticus*, *L. gallinarium*. [Айламазян Э.К. 1992]

В настоящее время большинство исследователей указывают на явное доминирование вида *L.crispatus* в вагинальном биотопе здоровых женщин (32%). Наряду с *L.crispatus* в условиях нормофлоры с различной частотой выделяются *L. gasseri* (5%), *L. jensenii* (23%) и *L. iners* (15%). В последние годы особый научно-практический интерес вызывает идентифицированный в 1999 г. вид *L. iners*, не способный к продукции H₂O₂ и обладающий уникальным свойством адаптироваться к повышенным значениям pH вагинальной среды (свыше 4,5) при БВ. [Баранов А.Н. 1995] *L. iners* имеют уникальный геном, позволяющий им находить способ выживания как среды близкородственных представителей, так и в условиях смещённого баланса вагинальной микрофлоры. *L. iners* проявили большие таланты «всеядности»: они могут переключать свой метаболизм и питаться другими

веществами, отличными от гликогена. При недостаточном количестве «благонравных» штаммов лактобактерий закономерно снижается концентрация молочной кислоты (конечного продукта распада гликогена, их основной пищи) и защелачивается вагинальная среда. [Руднева О.Д. 2013]

1.2. Бактериальный вагиноз.

БВ – это клинический симптомокомплекс развивающийся в результате изменения экологии влагалища, при котором нормальная микрофлора представленная преимущественно лактобациллами, полностью или частично замещается высокими концентрациями другой анаэробной микрофлоры. БВ определяется как инфекционно-воспалительное поражение слизистой нижних отделов репродуктивного тракта женщин. На фоне дисбиоза многократно возрастает риск заражения ИППП и развития воспалительных заболеваний, осложняется течение беременности и родов, растет частота осложнений после гинекологических операций, аборт, снижается эффективность ЭКО.

Микробиота влагалища может существенно влиять на здоровье женщины, плода и новорожденных младенцев [Hillier SL 1995, Krohn 1997, Regan JA 1996]. Возможные осложнения БВ: увеличивается риск возникновения воспалительных заболеваний органов малого таза, преждевременные роды, рост осложнений после кесарева сечения, хориоамнионит, преждевременное излитие околоплодных вод, внутриутробное инфицирование плода, аномалия родовой деятельности, после родовой эндометрит – и это не полный список возможных осложнений у пациенток, страдающих бактериальным вагинозом. [Eckert L.O., 2006; Haggerty CL 2004, Hillier S.L. et al., 1995; Hillier S.L. et al., 1996; Hillier S.L., 2005; Leitich H. et al., 2003; Livengood C.H., 2009; Peipert J.F. et al., 2001; Wiesenfeld H.C. et al., 2003]

В настоящее время место БВ среди других инфекционных заболеваний влагалища окончательно не установлено. Вероятно, поэтому БВ не вошел в МКБ-10, где под шифром N89.5 имеется лишь «Бели, не уточнен-

ные как инфекционные» или под шифром N76 – «Другие воспалительные болезни влагалища и вульвы». Возможно, что составление МКБ-10 во временном отношении происходило раньше, чем медицинской общественностью был принят и узаконен термин «бактериальный вагиноз». Скорее всего, уже в следующем пересмотре МКБ этому заболеванию будет найдено соответствующее место среди прочих [Кира Е.Ф., 2012].

Хотя БВ можно лечить с помощью антибиотиков, включая метронидазол и клиндамицин [Нау РЕ 1998], частота рецидивов остается высокой и факторы, ведущие к рецидиву, мало изучены. Кроме того, патогенез БВ остается неясным. Важным первым шагом в понимании этого процесса является изучение микроорганизмов, ассоциированных с бактериальным вагинозом.

1.3. Микрофлора влагалища при БВ

Бактериальный вагиноз – это инфекционный синдром, связанный с дисбиозом экосистемы влагалища, характеризующийся усиленным ростом облигатно и факультативно анаэробных условно патогенных микроорганизмов и резким уменьшением количества доминирующей микрофлоры – лактобактерий *Lactobacillus spp.* в вагинальном отделяемом или их отсутствием [Eckert L.O., 2006; Hillier S.L., 2005, Hillier S 2008]. «Бактериальный» называют из-за повышения количества аэробных/анаэробных бактерий, «вагиноз» – отсутствия лейкоцитов. Нежелание организма реагировать воспалением на «нелигитимное» поведение влагалищной микрофлоры при БВ объясняется тем, что для вольготной жизни условно-патогенных анаэробов, облигатных и факультативных, слизистая оболочка влагалища продуцирует достаточно питательных субстратов и данные условно-патогенные бактерии не «покушаются» на живые эпителиоциты влагалищной стенки. Питательные вещества для микроорганизмов слизистая оболочка продуцирует даже с запасом, иначе неоткуда настолько стремительно взяться такому количеству вагинального отделяемого – один из прямых

признаков БВ на фоне резкого сокращения или полного отсутствия лактофлоры.

При БВ происходит увеличение на несколько порядков концентрации аэробных и анаэробных микроорганизмов. Так, концентрация микроаэрофильных бактерий (*Gardnerella vaginalis*) повышается в 100 раз, а анаэробных бактерий (*Peptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*) повышается в 1000 раз и больше. Также увеличивается концентрация анаэробных лактобактерий, которые не продуцируют H_2O_2 . Это приводит к возникновению некоторых симптомов БВ. Происходит снижение количества факультативных лактобацилл. Вследствие этого происходит снижение синтеза молочной кислоты, уменьшение уровня кислотности и росту анаэробов [Ефимов Б.А. с соавт., 2008; Тютюнник В.Л., 2005; Eckert L.O., 2006; Hillier S.L., 2005; Sobel J.D., 2005].

Безусловным признаком (маркером) бактериального вагиноза считали *Gardnerella vaginalis*. Однако уже вскоре было установлено, что *G. vaginalis* присутствует в небольшом количестве во влагалище у многих здоровых женщин. Следовательно, гарднереллы не являются «специфичными» возбудителями БВ, а понятие «гарднереллез» не может считаться отдельно нозологической формой [Causi S. 1996, Chaudhuri M. 1996]. При сопоставлении результатов бактериоскопии и культуральных методов исследования показано, что высеивание *G. vaginalis* и наличие ключевых клеток ассоциировано только у половины пациенток с БВ, в то же время обнаружение КК не всегда является признаком присутствия *G. vaginalis* [Cook R.L. 1989]. Следующим претендентом на маркер бактериального вагиноза считался *Mobiluncus spp.*, но было также установлено, что частота его обнаружения высока у женщин и без бактериального вагиноза [Sturm P.D.J. 2001]. Впоследствии попытки найти микроорганизм, наличие которого было бы специфично только для бактериального вагиноза были оставлены и диагностика его была основана только на клинико-лабораторных критериях R. Amsel и баллах Nugent.

Традиционные микробиологические методы имеют ограничения в диагностике БВ у пациентов. Многие из ключевых микроорганизмов, связанных с БВ, являются облигатными анаэробами либо трудно культивируемыми или некультивируемыми и с помощью культурального метода невозможно дать истинную оценку состава микрофлоры влагалища [Fredricks D.N. et al., 2005; Ravel J. et al., 2011]. Исследования, проводимые с использованием молекулярно-генетических методов анализа, показали, что состав микрофлоры влагалища существенно отличается от результатов, получаемых с помощью культурального метода [Burton J.P. et al., 2002; Devillard E. et al., 2004; Ferris M.J. et al., 2004; Ferris M.J. et al., 2004 (2); Hebb J.K. et al., 2004; Verhelst R. et al., 2004; Verstraelen H. et al., 2004; Zhou X. et al., 2004]. Это может иметь серьезные последствия для здоровья женщины.

Так в 1992 году был открыт *Atopobium vaginae* – это анаэробные, грамположительные, короткие кокковидные бактерии [Collins M.D. et al., 1992]. В 1999 году была установлена его связь с бактериальным вагинозом [Rodriguez J.M. et al., 1999], а в настоящее время данный микроорганизм рассматривается в качестве маркера бактериального вагиноза [Ferris M.J. et al., 2004; Fredricks DN 2005, Fredricks D.N. et al., 2007; Datcu R., 2014]. Высокоспецифичными для БВ микроорганизмами также являются *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens*, *Eggerthella spp.*, *Megasphaera spp.*, *Dialister spp.* и BVAB1, BVAB2 и BVAB3, родственные *Clostridium phylum*, условно обозначенные авторами как БВ-ассоциированные бактерии и определяемые более чем у 90% женщин с БВ и практически не встречающиеся у здоровых [Fredricks DN 2005].

Класс *Actinobacteria*, Порядок *Coriobacteriales*, Семейство *Coriobacteriaceae*, род *Atopobium*, вид *Atopobium vaginae*

Atopobium vaginae – грамположительные, эллиптические кокки или палочки, расположенные в виде отдельных клеток, парами или короткими цепочками. Прихотлив, растет в анаэробных условиях, на питательных средах формирует небольшие серовато-белые колонии, которые трудно

обнаружить [Rodriguez J.M. et al., 1999]. Критерии Nugent предполагают окрашивание по Граму мазков вагинального отделяемого на предметных стеклах. Наличие *Atopobium vaginae* в образцах вагинального отделяемого может добавить путаницы в систему оценки критериев Nugent, так как морфологически это грамположительные палочки и ранее были классифицированы как виды лактобацилл, поэтому результат может быть истолкован как нормофлора [Olsen I. et al., 1991]. Кроме того, представители рода *Atopobium spp.* легко обесцвечиваются и выглядят как грамотрицательная или грамвариабельная флора [Downes J. et al., 2001].

Atopobium vaginae – микроорганизм, имеющей этиологическое значение в развитии бактериального вагиноза [Ferris M.J. et al., 2004; Fredricks D.N. et al., 2007; Datcu R., 2014]. *Atopobium vaginae* был обнаружен при хронических и острых формах эндометритов, а также при эндометритах в раннем послеродовом периоде как после кесарева сечения, так и при родоразрешении через естественные родовые пути [Yamagishi Y, 2011]. Исследования показывают, что *Atopobium vaginae* обычно ассоциируется с БВ у женщин репродуктивного возраста и постменопаузального периода [Ferris M.J. et al., 2004, Burton J.P. et al., 2004]. Статистические данные ряда авторов, занимающихся данной проблемой, имеют несущественные расхождения: *Atopobium vaginae* обычно обнаруживается во влагалище женщин с БВ с частотой встречаемости 50% [Burton J.P. et al., 2004], 70% [Ferris M.J. et al., 2004], и более 95% [Verhelst R. et al., 2004, Verstraelen H. et al., 2004].

Этот микроорганизм играет важную роль в неэффективности лечения БВ, т.к. *Atopobium vaginae* устойчив к метронидазолу [Ferris M.J. et al., 2004] и секнизадолу [De Backer E. et al., 2010], но очень чувствителен к клиндамицину [Ferris M.J. et al., 2004].

Класс *Fusobacteria*, Порядок *Fusobacteriales*, Семейство *Leptotrichiaceae*, род *Leptotrichia*, вид *Leptotrichia amnionii*

Leptotrichia amnionii – грамотрицательные извитые анаэробные микроорганизмы. Инкубация только в анаэробных условиях. Наблюдается

медленный рост на шоколадном агаре в течение 3 дней при 37°C [Hanff P.A. et al., 1995].

Leptotrichia amnionii – микроорганизм, ассоциированный с развитием бактериального вагиноза [Datcu R., 2014; Fredricks D.N. et al., 2007]. *Leptotrichia amnionii* идентифицируется при диагностике раннего послеродового эндометрита и антенатальной гибели плода [Gundi V.A. et al., 2004; Shukla S.K. et al., 2002], послеродовых инфекциях женских половых органов [Thielsen CM, 2007; Koumans EH, 2002]. Микроорганизм был обнаружен в амниотической жидкости при преждевременных излитиях околоплодных вод, что привело к преждевременным родам [DiGiulio D.B. et al., 2010; Han Y.W. et al., 2009].

Все штаммы чувствительны к амоксициллину, амоксициллин-клавулановой кислоте, пиперациллину, пиперациллина-тазобактаму, цефотаксиму, имипенему, хлорамфениколу и метронидазолу, и устойчивы к ванкомицину [De Martino S.J. et al., 2004].

Класс *Fusobacteria*, Порядок *Fusobacteriales*, Семейство *Leptotrichiaceae*, род *Sneathia*, вид *Sneathia sanguinegens*.

Sneathia sanguinegens – грамотрицательные палочки, труднокультивируемые анаэробы, при культивировании нуждаются в крови или сыворотке. Культуральные характеристики: слабый рост после 3 дней инкубации при 37°C на шоколадном агаре при анаэробных условиях [Collins M.D. et al., 2001].

Sneathia sanguinegens – микроорганизм, участвующий в формировании бактериального вагиноза [Fredricks D.N. et al., 2007]. Также связан с серьезными осложнениями беременности, спонтанных абортов, преждевременных родов. Так как полость матки и амниотическая жидкость, как правило стерильны, то возникшая бактериальная инфекция часто ассоциируется с преждевременными родами и преждевременным разрывом плодных оболочек. [Goldenberg RL, Culhane JF, 2003]. *Sneathia sanguinegens* об-

наружен у новорожденных с бактериемией в раннем и позднем неонатальном периоде [De Martino S.J. et al., 2004].

S. sanguinegens и *L. amnionii* были идентифицированы у беременных [Joesoef M., 2002] и при диагностике восходящей инфекции матки и фаллопиевых труб [Thielsen C.M., 2007], околородовой лихорадки [Koumans ЕН, 2002], послеродовых инфекций [Thielsen СМ, 2007; Koumans ЕН, 2002], бактериемий [De Martino SJ, 2004]. Многие исследования показывают о случаях детекции данных микроорганизмов у внутриутробно инфицированных плодов [Thielsen C.M., 2007], в биоматериалах самопроизвольных аборт [Thielsen C.M., 2007, Shukla S.K., 2002], септических абортов [Koumans ЕН, 2011],

Все штаммы чувствительны к амоксициллину, амоксициллин-клавулановой кислоте, пиперациллину, пиперациллина-тазобактаму, цефотаксиму, имипенему, хлорамфениколу и метронидазолу, и устойчивы к ванкомицину [De Martino S.J. et al., 2004].

Класс *Actinobacteria*, Порядок *Coriobacteriales*, Семейство *Coriobacteriaceae*, род *Eggerthella*.

Eggerthella – грамположительные, споронеобразующие палочки. Облигатные анаэробы. Ранее принадлежали к роду *Eubacterium*. Виды *Eggerthella* были отнесены к новому роду из-за отличий в их последовательности 16S рНК [Kageyama A. et al., 1999]. Узоры кислоты, образующиеся в бульоне, содержащий глюкозу и пептон-дрожжевой экстракт, можно использовать для дифференцировки *Eggerthella* от других тесно связанных родов, например, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Actinomyces* [Kageyama A. et al., 1999]. Даже биохимически и по реакциям брожения роды не могут быть надежно дифференцированы [Kageyama A. et al., 1999; Lau S.K. et al., 2004]. Кроме того, новые роды *Eggerthella* не включены в базы данных коммерческих экспресс-систем для идентификации.

Eggerthella – микроорганизм, ассоциированный с развитием бактериального вагиноза [Datcu R., 2014; Fredricks D.N. et al., 2007]. Некоторые виды *Eggerthella* являются желудочно-кишечными комменсалами и обнаруживаются в ассоциации с другими микроорганизмами при интраабдоминальных инфекциях, бактериемии. Они были выделены из ротовой полости, органов дыхательной системы, желудочно-кишечного тракта, женских половых органов и мужской мочеполовой системы [Lau S.K. et al., 2004].

Штаммы *Eggerthella* и имеют высокий уровень резистентности к пенициллину, устойчивы к ампициллину, метронидазолу, карбапенемам и даптомицину [Meng-Rui Lee et al., 2012].

Медленное и трудное культивирование *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.*, а также отсутствие точных методов обнаружения данных микроорганизмов, безусловно, способствует недооценке их клинического значения и росту числа случаев бактериемии [De Martino S.J. et al., 2004].

Для ранней диагностики БВ самым перспективным является метод ПЦР в режиме реального времени. Этот метод отличается высокой чувствительностью, возможностью идентифицировать специфические фрагменты ДНК выявляемых микроорганизмов в клиническом материале без выделения чистой культуры. Главное преимущество – возможность оценить не только качественный, но и количественный состав микробиоты влагалища, что позволяет назначить врачу гинекологу грамотное лечение(каждый микроорганизм чувствителен к разным антибиотикам), которое окажет «мягкое» воздействие на индивидуальную микрофлору пациентки в целом(не будет дисбактериоза кишечника из-за лишних антибиотиков. Таким образом, ПЦР диагностика в режиме реального времени позволяет за несколько часов определить нахождение БВ-ассоциированных микроорганизмов в микрофлоре влагалища пациентки и дает возможность врачу гинекологу назначить лечение в день обращения женщины за помощью.

1.4. Диагностика БВ

1.4.1. Критерии R. Amsel, 1983

Диагностика, основанная на критериях Amsel (Amsel, 1983)

R. Amsel и др. в 1983 г. предложили диагностировать БВ на основе 4 критериев.

1) *Специфические вагинальные выделения* (при БВ жидкие и однородные).

2) *pH вагинальных выделений выше 4,5.*

Для определения уровня pH вагинальной жидкости используется универсальная индикаторная бумага с эталонной шкалой, позволяющая проводить измерения в пределах от 3.0 до 5,5.

Для измерения pH отделяемое либо наносится тампоном непосредственно на бумагу, либо полоска бумаги помещается в вагинальную жидкость, сохраняющуюся на стенках извлеченного из влагалища вагинального зеркала. Материалом для исследования может быть также смыв содержимого влагалища стерильным физиологическим раствором. Значение pH вагинального отделяемого при БВ превышает нормальные показатели (более 4,5), что зависит от элиминации лактофлоры или резкого снижения ее содержания и уменьшения образования молочной кислоты. Следует учитывать возможность ложноположительных результатов pH при попадании в вагинальное отделяемое цервикальной слизи, крови, спермы, поскольку эти биологические жидкости имеют более высокий по сравнению с влагалищным секретом pH.

Чувствительность и специфичность теста при БВ относительно невысоки (89 и 85% соответственно). Необходимо отметить, что pH при трихомонадной инфекции также повышается.

3) *«Аминовый» тест.*

С целью обнаружения «рыбного» аминового запаха капля влагалищной жидкости помещается на предметное стекло, затем к ней добавля-

ют каплю 10% раствора КОН. Появляющийся при этом запах оценивают немедленно после добавления щелочи, поскольку он быстро рассеивается.

Появление запаха обусловлено изменением состава органических кислот в вагинальной жидкости повышением уровня органических аминов (кадаверина, триэтиламина и др.) в процессе реакции декарбоксилирования аминокислот анаэробными бактериями. Нелетучие соли этих соединений при щелочном значении pH превращаются в летучие амины, и «рыбный» запах становится ощутимым или усиливается. Вместе с тем *G. vaginilis*, с высокой частотой выделяемая при БВ, не продуцирует эти соединения. Поэтому в случаях полного доминирования *G. vaginalis* в составе вагинального микробиоценоза аминотест будет отрицательным

Чувствительность и специфичность этого диагностического теста равны 79 и 97% соответственно.

4) *Обнаружение «ключевых» клеток при микроскопическом исследовании.*

«Ключевые» клетки — это отслоившиеся клетки эпителия влагалища, поверхность которых усеяна размножившимися бактериями, за счет чего клетка имеет «зернистый» вид. Края ключевых клеток выглядят нечеткими или «пунктирными» вследствие адгезии мелких палочек и кокков, в частности *Gardnerella*, *Mobiluncus* и других бактерий, и часто их невозможно различить. Международными исследованиями было выявлено, что количество «ключевых» клеток в полях зрения, обнаруживаемых при большом увеличении светового микроскопа (x 1000), не влияет на результаты диагностики БВ (Forsum U., 2002). Результат исследования на наличие «ключевых» клеток считается положительным, если в трех исследованных полях зрения обнаруживается хотя бы одна клетка (Schmidt, 2001).

По Aimsel, диагноз БВ правомочен при наличии минимум трех из перечисленных четырех признаков. (Таблица 1)

Таблица 1

Критерии R. Amsel, 1983

Критерии	№	Определение	Признак БВ
Клинический	I	Осмотр влагалища зеркалом, кольпоскопия	Обильные гомогенные, бело-серые с неприятным запахом выделения
Клинико-лабораторный	II	Определение pH влагалища индикаторной полоской	pH >4,5
	III	Аминный тест (whiff test) – добавление к выделениям из влагалища в пробирке 10% KOH	Появление специфического запаха
Лабораторный	IV	Микроскопия мазка из выделений из влагалища, окрашенного по Граму	Обнаружение "ключевых клеток"

1.4.2. Классификация Кира Е.Ф., 1995

В классификации Кира Е.Ф. (1995) отражены 4 типа (состояния) биоценоза влагалища, микроскопические признаки каждого типа и соответствующие нозологические формы (таблица 2) [Кира Е.Ф., 2012]. Именно благодаря этой классификации в отечественной профессиональной медицинской терминологии прочно укоренились синонимичные понятия «дисбиоз влагалища» или «бактериальный вагиноз», что способствовало кардинальному изменению подходов к диагностике, лечению и профилактике указанных пограничных состояний.

Таблица 2

Микроскопическая характеристика микробиоценоза
влагалища по классификации Кира Е.Ф., 1995

Биоценоз	Признаки	Нозология
Нормоценоз	Доминирование лактобацилл, отсутствие грамотрицательной микрофлоры, спор, мицелия, псевдогифов, лейкоцитов, единичные “чистые” эпителиальные клетки	Типичное состояние нормального биотопа влагалища
Промежуточный тип	Умеренное или незначительное количество лактобацилл, наличие грамположительных кокков, грамотрицательных палочек. Обнаруживаются лейкоциты, макрофаги, эпителиальные клетки.	Часто наблюдается у здоровых женщин, редко сопровождается субъективными жалобами и клиническими проявлениями.
Дисбиоз влагалища	Незначительное количество, но чаще полное отсутствие лактобацилл, обильная, полиморфная грамотрицательная и грамположительная палочковая и кокковая микрофлора. Наличие "ключевых клеток", количество лейкоцитов варьиabelно, отсутствие или незавершенность фагоцитоза. Полимикробная картина мазка.	Бактериальный вагиноз
Вагинит	Большое количество лейкоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток, выраженный фагоцитоз. При обнаружении: – гонококков – трихомонад – мицелия, псевдогифов, спор	Неспецифический вагинит Гонорея Трихомониаз Микотический вагинит

1.4.3. Классификация Мавзютова А.Р., 1998

Клинические проявления дисбиозов – это всегда следствие изменений, раннее обнаружение которых и оценка специфики могут быть осуществлены только на лабораторном уровне. В качестве критериев дифференцирования степени выраженности дисбиотических изменений при БВ было предложено определение сопряженного изменения количества грам-вариабельных полиморфных бактерий, лактобациллярной микробиоты и

«ключевых клеток» в формате – «не обнаруживаются», «единичные в поле зрения», «в большом количестве» / «сплошь в поле зрения». В дальнейшем указанные критерии были положены в основу классификации Мавзютова А.Р. и соавт. (1998), позволяющей на практике успешно дифференцировать 3 степени бактериального вагиноза (дисбиоза влагалища): дисбиоз влагалища 1 степени (компенсированный), дисбиоз влагалища 2 степени (субкомпенсированный) и дисбиоз влагалища 3 степени (декомпенсированный) с формулировкой соответствующего врачебного лабораторного заключения (таблица 3).

Таблица 3

Лабораторная классификация дисбиозов влагалища по степени выраженности (тяжести) Мавзютова А.Р. и соавт., 1998

Степень выраженности (тяжести) дисбиоза влагалища	Критерий	Количественная оценка
1 степень (компенсированный)	Грамвариабельные полиморфные бактерии	- представлены единичными бактериальными клетками или не обнаруживаются
	Лактобациллярная микробиота	- представлены единичными бактериальными клетками или не обнаруживаются
	«Ключевые клетки»	- не обнаруживаются
2 степень (субкомпенсированный)	Грамвариабельные полиморфные бактерии	- в большом количестве (количественно преобладают)
	Лактобациллярная микробиота	- представлены единичными бактериальными клетками или не обнаруживаются
	«Ключевые клетки»	- единичные в поле зрения или не обнаруживаются
3 степень (декомпенсированный)	Грамвариабельные полиморфные бактерии	- сплошь в поле зрения
	Лактобациллярная микробиота	- не обнаруживаются
	«Ключевые клетки»	- сплошь в поле зрения

1.4.4. Бактериологический анализ.

Классический бактериологический анализ отделяемого из влагалища позволяет оценить как качественный, так и количественный состав бактериальной микрофлоры. Дифференциация и идентификация микроорганизмов – определение родовой, видовой и типовой принадлежности микроорганизмов является наиболее трудоемким и ответственным этапом бактериологического исследования. Он осуществляется на основании изучения целого комплекса свойств: морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных и антигенных. Широкий спектр микроорганизмов, играющих роль в формировании микробиоценоза влагалища, требует изучения их ферментативной активности путем постановки большого количества различных биохимических реакций, позволяющих по сочетанию полученных результатов в комплексе с другими данными определить вид микроорганизма. Этот раздел работы наиболее трудоемкий, проводится в несколько этапов, требует приготовления большого количества питательных сред, дефицитных реактивов, посуды и т.д., что делает этот метод исследования достаточно дорогостоящим. Изоляция анаэробных бактерий остается самой деликатной процедурой. Для выращивания анаэробов необходимо создать определенные условия, сущность которых заключается в удалении молекулярного кислорода из питательной среды и пространства, окружающего эти культуры. Для создания бескислородных условий используют физические, химические и биологические факторы. [Муравьева В. В.1997]

ГЛАВА 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Анамнез и взятие материала

Было проведено клинико-лабораторное обследование 405 женщин репродуктивного возраста (18 – 53 лет; средний возраст 33-34 лет), обратившихся за амбулаторной гинекологической помощью в специализированное подразделение Верхнеяркеевской ЦРБ и ООО «Медсервис» в Илшевском районе РБ в 2013 – 2016 году.

При обследовании регистрировали:

- общие сведения о пациентке,
- данные акушерско-гинекологического анамнеза: дата последней менструации, роды, аборт, самопроизвольные выкидыши, контрацепция
- жалобы: зуд/жжение, диспареуния, дизурические расстройства, неприятный запах
- данные осмотра: характер выделений, аминный тест, значение pH
- гинекологические заболевания: кольпиты, эктопия шейки матки, лейкоплакия шейки матки, эндоцервицит, хронический цервицит шейки матки и др.

Диагноз дисбиоза влагалища был установлен на основании результатов клинико-лабораторных и специальных исследований. Диагноз БВ был поставлен, используя критерии Amsel (жидкие серовато-белые выделения с неприятным запахом, pH > 4.5, «рыбный» запах при добавлении 10% KOH) с последующим подтверждением микроскопическим методом с окраской метиленовым синим («ключевые» клетки).

Критерии включения:

- репродуктивный возраст;
- БВ, диагностированный на основании критериев Амсея и результатов молекулярно-биологического исследования;
- желание и возможность участвовать в исследовании.

Критерии исключения:

- беременность;
- менопаузальный возраст
- участие в других клинических исследованиях в период 30 дней до проведения данного исследования.

Материал для исследования – отделяемое с заднего свода влагалища.

С целью микроскопии взятую стерильным урогенитальным зондом биопробу переносят на предметное стекло, перекатывая рабочую часть зонда всеми сторонами по стеклу, стараясь, чтобы материал распределился равномерно, сохраняя естественное взаиморасположение всех компонентов биоценоза. Микропрепарат высушивают на воздухе, фиксируют, маркируют стекло и в закрытой емкости отправляют в лабораторию.

Образцы для выделения ДНК и ПЦР были получены при использовании стерильного одноразового урогенитального зонда, которым касались боковой стенки влагалища из заднего свода. Зонд с достаточным количеством отделяемого помещают в стерильную пробирку. Рабочую часть зонда обламывают и оставляют в пробирке. Пробирку плотно закрывают крышкой, не допуская зазора и смятия внутренней части крышки, маркируют и немедленно замораживали при -20°C .

Транспортировку в лабораторию взятого материала проводили в максимально короткие сроки (не более 1 – 1,5 часов).

2.2. Бактериоскопическое исследование (микроскопия) микрофлоры влагалища

Для лабораторного подтверждения диагноза БВ исследовали микропрепараты отделяемого заднего свода влагалища. Окрашивание фиксированных препаратов отделяемого со сводов влагалища проводили согласно патенту РФ «Способ дифференцирования грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших рода *Trichomonas*» (Мавзютов А.Р. с соавт., 2002).

Способ дифференцировки осуществляли следующим образом: исследуемый материал фиксировали ацетоном, затем наносили насыщенный щелочной раствор метиленового синего. Окрашивание препарата проводили в течение 20-25 мин в эксикаторе, при температуре 37°C. Щадящая фиксация мазка и продолжительное инкубирование в условиях термостата обеспечивали максимально эффективную картину его окрашивания. Грамположительные микроорганизмы при этом окрашивались в серо-голубой цвет, а грамотрицательные - в иссиня-черный. Простейшие окрашивались в голубой цвет, с иссиня-черными ядрами и четко видимым контуром. Способ обеспечивает повышение информативности и диагностической ценности, сокращение времени исследования и стоимости за счет одномоментной дифференцировки грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших [Мавзютов А.Р., 2002].

Препараты исследовали методом световой микроскопии под иммерсией (увеличение $\times 1000$) на микроскопе Люмам-Р8 (ЛОМО, г. Санкт-Петербург) и оценивали следующие показатели: соотношение лактобактерий (грамположительные палочки) и грамположительной коккобациллярной флоры, количество лейкоцитов, наличие «ключевых» клеток.

Полученные данные дифференцировали в соответствии с лабораторными критериями, предложенными Кира Е.Ф. (1995) на «нормоценоз»,

«бактериальный вагиноз», «неспецифический вагинит» и «специфический вагинит» [Кира Е.Ф., 2012]:

- нормоценоз – доминирование лактобацилл, отсутствие грамотрицательной микрофлоры, спор, мицелия, псевдогифов, лейкоцитов, единичные «чистые» эпителиальные клетки;

- промежуточный тип – умеренное или незначительное количество лактобацилл, наличие грамположительных кокков, грамотрицательных палочек. Обнаруживаются лейкоциты, макрофаги, эпителиальные клетки;

- бактериальный вагиноз – незначительное количество, но чаще полное отсутствие лактобацилл, обильная, полиморфная грамотрицательная и грамположительная палочковая и кокковая микрофлора; наличие «ключевых клеток», количество лейкоцитов варьиabelно, отсутствие или незавершенность фагоцитоза; полимикробная картина мазка;

- неспецифический вагинит – большое количество лейкоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток, выраженный фагоцитоз;

- специфический вагинит – при обнаружении возбудителей специфических инфекций (гонококков, трихомонад, мицелия, псевдогифов, спор и т.д.) выставляется соответствующий этиологический диагноз: гонорея, трихомониаз, микотический вагинит.

Микропрепараты пациенток с БВ дополнительно дифференцировали в соответствии с критериями, предложенными Мавзютовым А.Р. с соавт. (1998) (наличие и количественное соотношение бактериальной лактобациллярной микробиоты, бактериальной полиморфной грамвариabelной микробиоты и «ключевых» клеток) по степеням [Мавзютов А.Р. с соавт., 2001]:

- БВ 1 степени (компенсированный) – полное отсутствие микрофлоры в исследуемом материале;

- БВ 2 степени (субкомпенсированный) – сопоставимое снижение количества лактобациллярной микробиоты, увеличение количества грам-

вариабельной полиморфной бактериальной флоры, единичные «ключевые клетки»;

– БВ 3 степень (декомпенсированный) – лактобациллярная микробиота не обнаруживается, грамвариабельная полиморфная бактериальная флора и «ключевые клетки» - сплошь в поле зрения.

2.3. Выделение ДНК

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов методом нуклеосорбции использовали стандартный набор «ДНК-сорб-АМ» серии «АмплиПрайм» фирмы «ИнтерЛабСервис». Набор реагентов «ДНК-сорб-АМ» — одна из модификаций метода Boom, максимально адаптированная к выделению ДНК из различных типов клинического материала для диагностики урогенитальных инфекций.

Клинический материал обрабатывается лизирующим раствором в присутствии сорбента – частиц силики. В результате происходит деструкция клеточных мембран и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывке. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования [Boom R. et al., 1990].

Ход работы:

1. Подготовить и расставить в штативе пробирки с клиническим материалом, необходимое количество одноразовых стерильных пробирок объемом 1.5 мл и промаркировать их.
2. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 25 мкл ресуспендированного сорбента, после чего внести по 300 мкл лизирующего раствора, используя наконечники с фильтром.
3. Внести по 100 мкл клинического образца, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
4. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе и инкубировать 5 мин при температуре 65°C. После окончания инкубации содержимое повторно перемешать на вортексе и оставить при комнатной температуре на 2 мин.
5. Осадить сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс об/мин в течение 30 сек. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без фильтра.
6. Добавить в пробы по 1 мл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспензирования сорбента.
7. Повторить п. 5.
8. Поместить пробирки в термостат с температурой 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, при этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, используя наконечник с фильтром. Перемешать на вортексе до полного ресуспензирования сорбента. Поместить в термостат с температурой 65°C на 5 мин.
10. Центрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Полученные пробы можно хранить в течение 1 недели при температуре 2-8°C или в течении года при температуре не выше -16°C.

В дальнейшем полученную ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации нужного фрагмента гена 16S рРНК, выявляемого методом ПЦР.

2.4. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени

9 бактериальных видов/родов были отобраны для проведения количественного ПЦР на основе их важности в диагностике БВ в соответствии с предыдущими исследованиями. Олигонуклеотидные праймеры и TaqMan зонды, специфичные к гену 16S рРНК бактерий, приведены в таблице 4. Разработанные специфичные праймеры и зонды были проверены в программе BLAST.

Амплификацию участков ДНК проводили с использованием стандартных наборов реагентов «ПЦР-микс: 2,5-кратная реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (Синтол). Набор содержит все необходимые реактивы: дезоксинуклеозидтрифосфаты, ПЦР-буфер, $MgCl_2$, Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами, деионизированную воду, кроме праймеров и зондов.

Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом в 25 мкл, содержащей 3 мкл исследуемого образца ДНК, 10 мкл 2.5× ПЦР-микс, по 0.5 мкл прямого и обратного праймера (по 2 о.е. каждого), 0.5 мкл TaqMan зонда.

Реакцию амплификации проводили по программе со следующими параметрами. На начальном этапе проводилась денатурация ДНК при 94°C в течение 1 мин, после чего следовали 30 циклов амплификации, каждый из которых включал стадию денатурации ДНК в течение 30 сек при 94°C, стадию отжига праймеров продолжительностью 30 сек при

температуре 60°C и стадию элонгации в течение 30 сек при температуре 72°C, которая оптимальна для активности Taq-полимеразы (дополнительно считывание уровня флюоресценции). На заключительной стадии реакционная смесь выдерживалась при температуре 72°C в течение 2 мин для завершения построения комплементарных цепей фрагментов ДНК и исключения копий, содержащих не полностью построенные молекулы. (Таблица 5)

Для ПЦР в режиме реального времени использовали амплификатор CFX96 Touch™ («BioRad», США). Результаты представлены в виде графиков амплификации.

В качестве стандартного образца использовали чистую культуру штамма *Lactobacillus crispatus* 2029, выделенного из влагалища здоровых женщин репродуктивного возраста, идентифицированного методом секвенирования гена 16S rRNA и депонированного во Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (Московская обл., г. Пушкино) под регистрационным номером ВКМ В-2727D. Согласно инструкции концентрация штамма составляла $5,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Исходную концентрацию бактерий учитывали по уровню порогового цикла (Ct).

Таблица 4. Последовательности праймеров и TaqMan зондов, температуры отжига и размеры продуктов

Объект (GenBank)	Последовательность	Темп. от- жига (°C)	Размер продукта (п.н.)
<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	5' tggaaacagrtgctaataccg 3' 5' gtccattgtggaagattccc 3'	62	231
<i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> (AF257096.1)	5' tcttgacatctagtgccatttgt 3' 5' tgcaccacctgtcttagc 3' 5' FAM-agagatacaaagttcccttcgg- RTQ-1 3'	63	67
<i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i> (NR_075051.1)	5' agcgagcttgccctagatgaatttg 3' 5' tcttttaaactctagacatgcgtc 3' 5' FAM-tgccggtgtaatctacctcgtgcg- RTQ-1 3'	63	171
<i>Lactobacillus</i> <i>jensenii</i> (AF243176.1)	5' aagtcgagcgagcttgccctataga 3' 5' cttctttcatgcgaaagtagc 3' 5' FAM-ctaagttagtatatcgcatgatag- RTQ-1 3'	60	160
<i>Lactobacillus</i> <i>iners</i> (AY526083.1)	5' cgagtctgccttgaagatcgg 3' 5' gttatcccgatctcttgggca 3' 5' FAM- cttgcaactctgtgaaacaagatacactagc- RTQ-1 3'	60	108

Таблица 4. Последовательности праймеров и TaqMan зондов, температуры отжига и размеры продуктов (продолжение)

Объект (GenBank)	Последовательность	Темп. от- жига (°C)	Размер продукта (п.н.)
<i>Atopobium vaginae</i> (Y17195.1)	5' cggctctgtaggtcaggagttaaатс 3' 5' ccattctcccctaccagactca 3' 5' ROX- ctcaaccctatccgctcctgataccg-RTQ-2 3'	60	88
<i>Leptotrichia amnionii</i> (EF218612)	5' gactgggataacagagggaacttc 3' 5' ggacgcaaagctctccttttagtg 3' 5' ROX-ataagttagttatatcgcatgatat- RTQ-2 3'	60	101
<i>Sneathia sanguinegens</i> (AJ344093)	5' gactgggataacagagggaacttc 3' 5' tcatatagcgtattgctacctttcattac 3' 5' ROX-ataagttagttatatcgcatgatat- RTQ-2 3'	60	90
<i>Eggerthella spp.</i> (AY738656)	5' aacctcgagccgggttc 3' 5' tcggcacggaagatgtaatct 3' 5' ROX-agccgggtgtaatctacctcgtgca- RTQ-2 3'	57	236

Таблица 5

Режим амплификации

	Температура	Время	Количество циклов
Исходная денатурация	94 °С	1 мин	1
Денатурация	94 °С	30 сек	30
Отжиг	60 °С	30 сек	
Элонгация + чтение плашки	72 °С	30 сек	
Финальное удлинение	72 °С	2 мин	1

2.5. Методы статистической обработки

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica for Windows (v7).

Для определения статистической достоверности различий между группами пациенток рассчитывали критерий χ^2 с поправкой Йетса для категориальных значений (наличие и отсутствие бактерий) и критерий Манна-Уитни для количественных данных (относительное содержание и концентрация бактерий). Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

ГЛАВА 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Результаты бактериоскопического исследования. Определение состояния микрофлоры влагалища и степени БВ

В результате проведенного клинического обследования отклонения от нормы были констатированы у всех 405 обследованных, однако, лабораторно в 126 (31.1%) случаях картина микропрепарата соответствовала нормоценозу. Лабораторно патологические и пограничные состояния были подтверждены лишь у 279 (68.9%) женщин. Промежуточное состояние микробиоценоза влагалища диагностировано у 24 (5.9%) женщин.

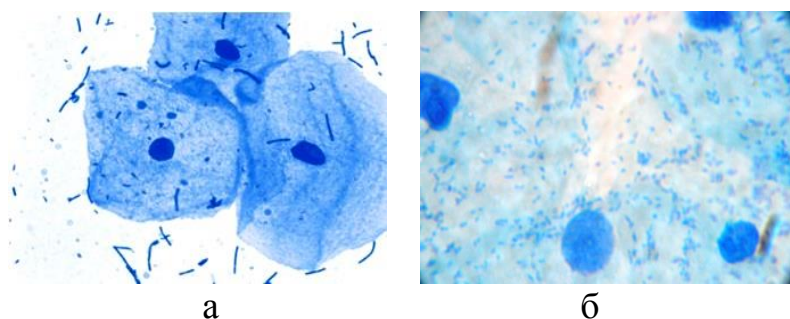


Рисунок 1

а – нормоценоз влагалища в репродуктивном возрасте: поверхностные клетки плоского эпителия, лактобациллы (вагинальные палочки) – сравнительно толстые, крупные, прямые или слегка изогнутые разной длины, как правило, с четко очерченными «обрубленными» краями, некоторые бактерии располагаются цепочками.

б – промежуточный тип, бактерий немного: кокки, палочки. Окрасивание метиленовым синим. $\times 1000$

В 138 (34.1%) случаях лабораторно констатирован вагинит, у 46 (11.4%) женщин – специфический (14 – *Tr.vaginalis*, 2 – *N.gonorrhoeae*, 30 – *Candida spp.*) и 92 (22.7%) – неспецифический. Полученные данные свидетельствуют о том, что допускаются гипердиагностические ошибки.

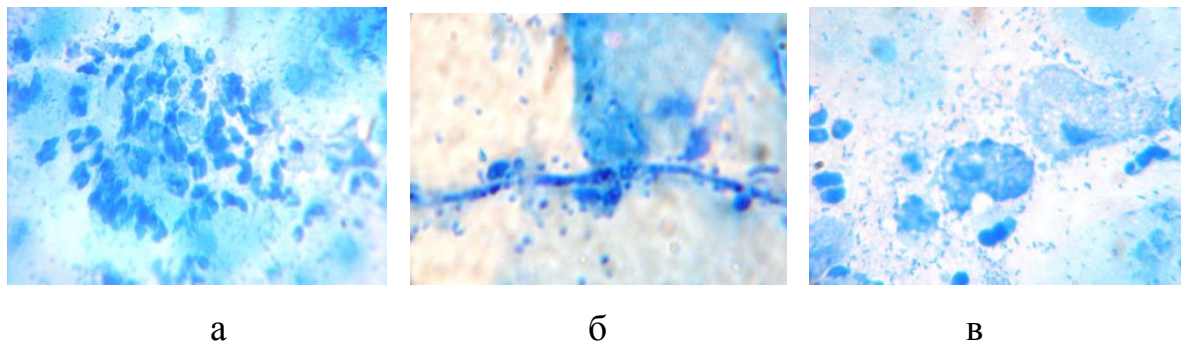


Рисунок 2

а – неспецифический вагинит: клеточный состав соответствует воспалению: много лейкоцитов, клеток плоского эпителия немного;

б – кандидозный вагинит: элементы гриба типа *Candida*: нити мицелия (псевдомицелия), почкующиеся дрожжевые клетки овальной и округлой формы;

в – трихомонадный кольпит: трихомонады – ядра вытянутые с заостренными концами (миндалевидные) или округлые, цитоплазма базофильная, более интенсивно окрашена по периферии, бактериальная флора смешанная, мелкие палочки в лейкоцитах (незавершенный фагоцитоз). Окрашивание метиленовым синим. $\times 1000$

Бактериальный вагиноз в ходе лабораторного исследования был подтвержден у 117 (28.9%) женщин, среди них в 69 (17.0%) случаях имел место дисбиоз влагалища 2 ст. (субкомпенсированный) и в 48 (11.9%) – дисбиоз влагалища 3 ст. (декомпенсированный). Таким образом, клинически констатированные дисбиотические состояния лабораторно были подтверждены только в 1 из 4 случаев.

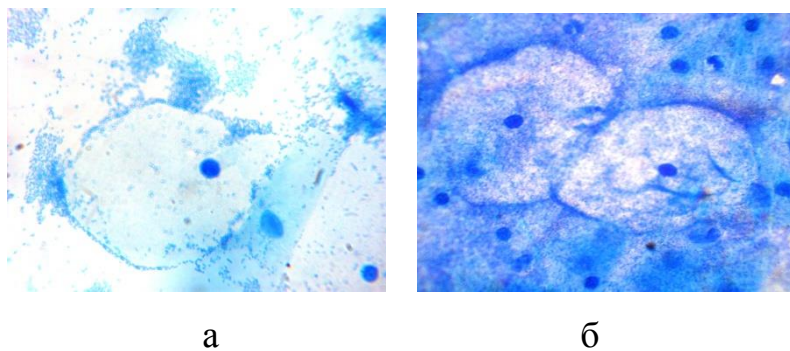


Рисунок 3

а - бактериальный вагиноз 2 степени (субкомпенсированный): «ключевая» клетка поверхностного слоя эпителия, сплошь покрытая мелкой флорой, вокруг также обильная флора;

б – бактериальный вагиноз 3 степени (декомпенсированный): «ключевые» клетки, условно-патогенные микроорганизмы сплошь в поле зрения при отсутствии *Lactobacillus spp.* Окрашивание метиленовым синим. ×1000

Клинические варианты микрофлоры влагалища.(Рисунок 4)

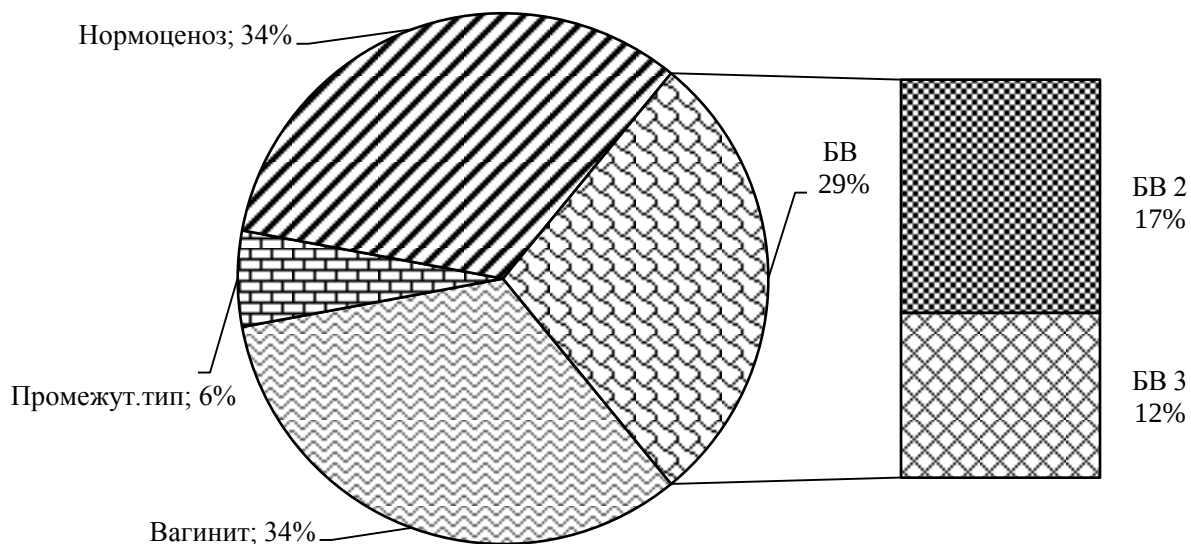


Рисунок 4

3.2. Анализ полученных результатов

С целью исследования видового и количественного состава микрофлоры влагалища при дисбиозе был выполнен ПЦР-анализ вагинального отделяемого 126 женщин, составивших группу с нормоценозом, 24 женщин с промежуточным типом биоценоза влагалища и 117 женщин основной группы с микроскопически подтвержденным БВ.

Методом ПЦР в режиме реального времени исследовали клинический материал для обнаружения двух групп микроорганизмов. Во первых, с использованием видоспецифичных пар праймеров *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* и *L. iners*, и с использованием родоспецифичной пары праймеров для *Lactobacillus spp.*, которые амплифицировали все виды лактобактерий. Во вторых, с использованием видоспецифичных пар праймеров четырех БВ-ассоциированных микроорганизмов: *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.*

ПЦР-анализ проводили в мультиплексном варианте с праймерами, представленными в таблице 6, и с детекцией продуктов амплификации в реальном времени. Значения порогового цикла C_t характеризовали исходную концентрацию ДНК определяемого микроорганизма: чем меньше C_t , тем больше концентрация.

Таблица 6

Частота встречаемости лактобактерий
и БВ-ассоциированных микроорганизмов

	Нормоценоз	Промежуточный тип	Бактериальный ваги- ноз
	126	24	117
<i>Lactobacillus spp.</i>	126 (100%)	24 (100.0%)	108 (92.3%)
<i>Lactobacillus crispatus</i> ^{a b}	103 (81.7%)	7 (29.2%)	18 (15.4%)
<i>Lactobacillus gasseri</i> ^a	42 (33.3%)	4 (16.7%)	0 (0.0%)
<i>Lactobacillus jensenii</i> ^a	37 (29.4%)	4 (16.7%)	0 (0.0%)
<i>Lactobacillus iners</i>	50 (39.7%)	12 (50.0%)	54 (46.2%)
<i>Atopobium vaginae</i> ^{a b c}	31 (24.6%)	15 (62.5%)	115 (98.3%)
<i>Leptotrichia amnionii</i> ^{a b c}	12 (9.5%)	11 (45.8%)	90 (76.9%)
<i>Sneathia sanguinegens</i> ^{a b c}	16 (12.7%)	6 (25%)	88 (75.2%)
<i>Eggerthella spp.</i> ^{a b c}	2 (0.78%)	8 (33.3%)	100 (85.5%)

Примечание:

a – статистически значимые различия ($p < 0.05$) между нормой и БВ;

b - статистически значимые различия ($p < 0.05$) между нормой и промежуточным типом;

c - статистически значимые различия ($p < 0.05$) между БВ и промежуточным типом

Частота встречаемости лактобактерий при нормоценозе, промежуточном типе и бактериальном вагинозе (Рисунок 5)

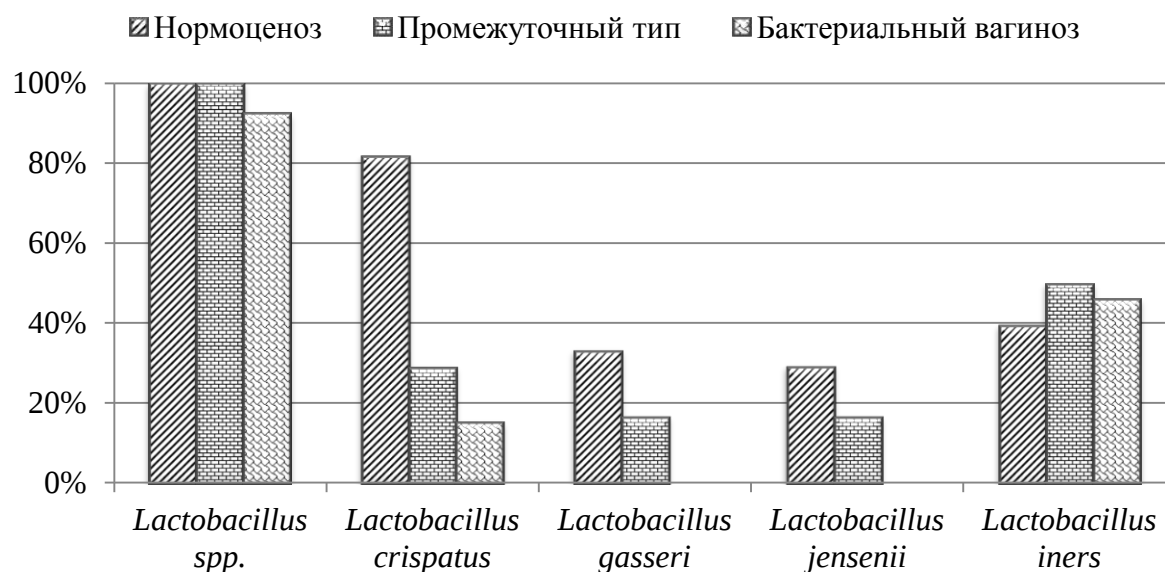


Рисунок 5

Частота встречаемости БВ-ассоциированных микроорганизмов при нормоценозе, промежуточном типе и бактериальном вагинозе. (Рисунок 6)

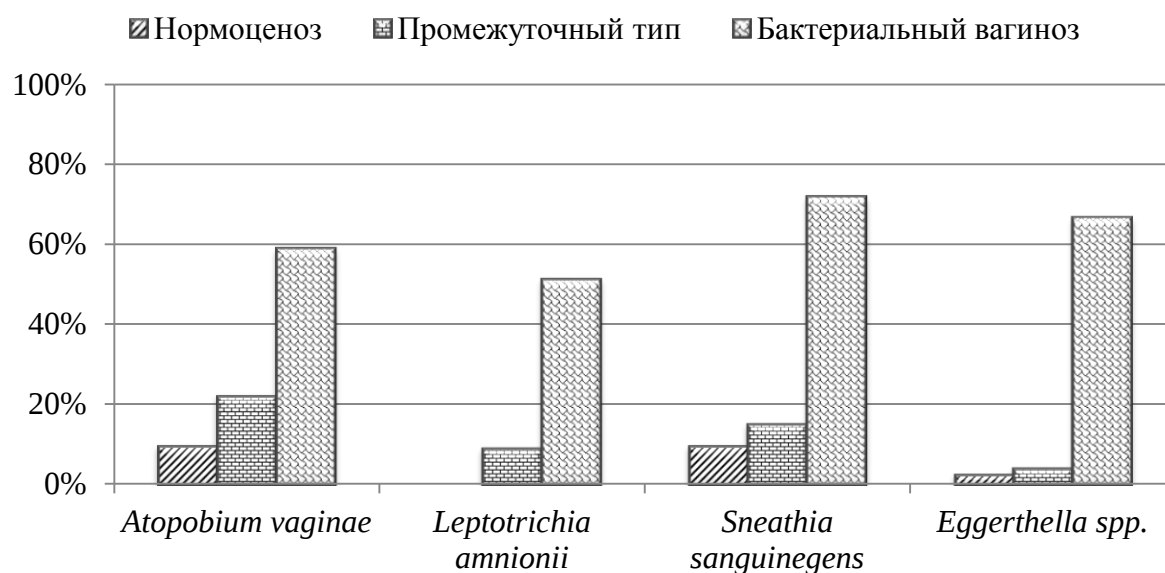


Рисунок 6

Таблица 7

Распространенность различных бактерий в зависимости от наличия или отсутствия *Lactobacillus iners*

	<i>Lactobacillus iners</i>		Р
	Пол 116	отр 151	
<i>Lactobacillus spp.</i>	116 (100,0%)	147 (97,4%)	0.510
<i>Lactobacillus crispatus</i>	53 (45,7%)	84 (55,6%)	0.290
<i>Lactobacillus gasseri</i>	32 (27,6%)	53 (35,1%)	0.449
<i>Lactobacillus jensenii</i>	27 (23,3%)	40 (26,5%)	0.840
<i>Atopobium vaginae</i>	45 (38,8%)	23 (15,2%)	0.004
<i>Leptotrichia amnionii</i>	40 (34,5%)	14 (9,3%)	< 0.001
<i>Sneathia sanguinegens</i>	23 (19,8%)	2 (1,3%)	< 0.001
<i>Eggerthella spp.</i>	32 (27,6%)	12 (7,9%)	0.004

Концентрация (КОЕ/мл) лактобактерий при нормоценозе, промежуточном типе и бактериальном вагинозе. (Рисунок 7)

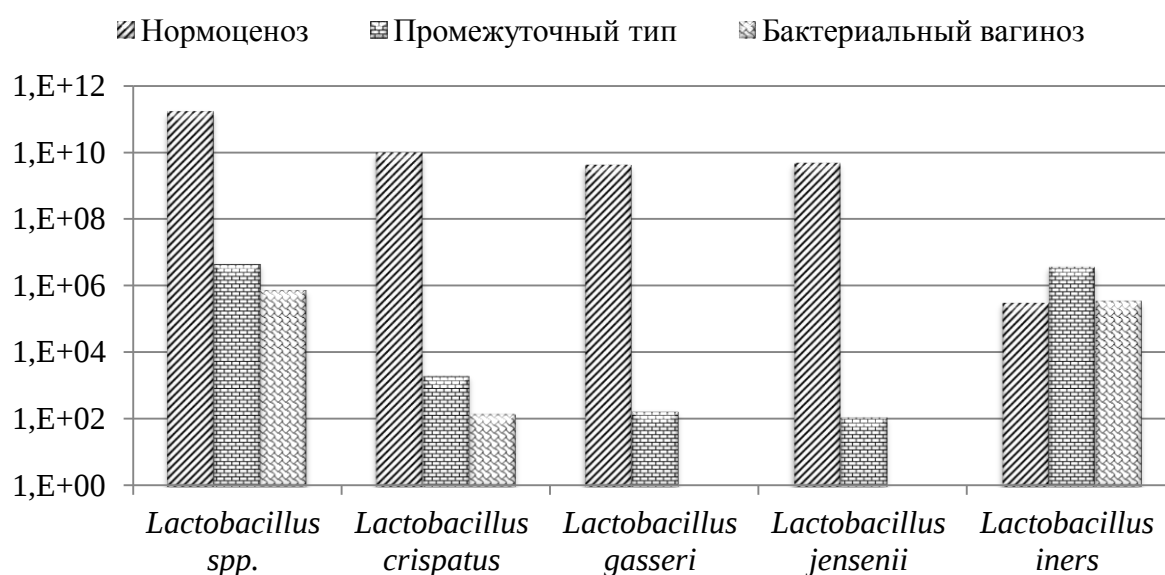


Рисунок 7

Концентрация (КОЕ/мл) БВ-ассоциированных микроорганизмов при нормоценозе, промежуточном типе и бактериальном вагинозе.

(Рисунок 8)

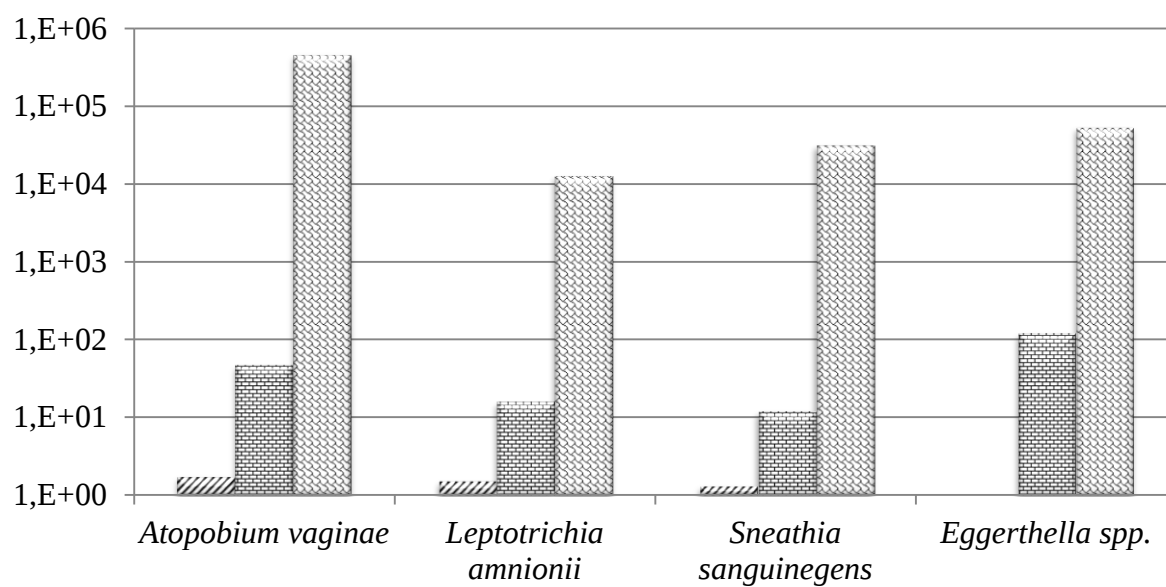


Рисунок 8

Таблица 8

Концентрация (КОЕ/мл) лактобактерий и БВ-ассоциированных микроорганизмов

	Нормоценоз			Промежуточный тип			Бактериальный вагиноз		
	Минимальное и максимальное значения	Стандартное отклонение	Среднее значение	Минимальное и максимальное значения	Стандартное отклонение	Среднее значение	Минимальное и максимальное значения	Стандартное отклонение	Среднее значение
<i>Lactobacillus spp.</i>	$0-3.4 \times 10^{11}$	1.7×10^{11}	5.6×10^{10}	$0-1.9 \times 10^7$	4.5×10^6	2.1×10^6	$0-6.7 \times 10^7$	5.2×10^6	7.2×10^5
<i>Lactobacillus crispatus</i> ^{a b c}	$0-1.4 \times 10^{10}$	9.8×10^9	7.3×10^9	$0-4.1 \times 10^3$	2.1×10^3	0.5	$0-8.7 \times 10^2$	1.5×10^2	0
<i>Lactobacillus gasseri</i> ^{a b}	$0-8.7 \times 10^9$	4.3×10^9	3.2×10^9	$0-4.6 \times 10^4$	1.8×10^2	0	0	0	0
<i>Lactobacillus jensenii</i> ^{a b}	$0-7.1 \times 10^{10}$	4.9×10^9	3.1×10^9	$0-7.6 \times 10^3$	1.2×10^2	0	0	0	0
<i>Lactobacillus iners</i>	$0-6.4 \times 10^7$	3.3×10^5	2.8×10^5	$0-1.1 \times 10^7$	2.5×10^6	1.7×10^6	$0-1.1 \times 10^7$	1.5×10^6	3.5×10^5
<i>Atopobium vaginae</i> ^{a b c}	$0-1.4 \times 10^5$	2.4×10^3	0.7	$0-1.3 \times 10^5$	2.4×10^4	47	$0-2.1 \times 10^6$	5.5×10^5	4.6×10^5
<i>Leptotrichia amnionii</i> ^{a b c}	$0-9.0 \times 10^3$	1.2×10^2	0	$0-6.2 \times 10^4$	5.7×10^3	16	$0-4.8 \times 10^5$	7.4×10^4	1.3×10^4
<i>Sneathia sanguinegens</i> ^{a b c}	$0-1.2 \times 10^4$	1.3×10^2	0	$0-3.0 \times 10^3$	5.1×10^2	12	$0-1.9 \times 10^6$	1.3×10^5	3.2×10^4
<i>Eggerthella spp.</i> ^{a b c}	$0-7.5 \times 10^2$	22	0	$0-1.5 \times 10^4$	3.1×10^3	1.2×10^2	$0-1.4 \times 10^6$	1.1×10^5	5.4×10^4

Примечание:

1. а – статистически значимые различия ($p < 0.05$) между нормой и БВ;
 б - статистически значимые различия ($p < 0.05$) между нормой и промежуточным типом;
 с - статистически значимые различия ($p < 0.05$) между БВ и промежуточным типом.
2. Стандартное отклонение, или предел среднего, или доверительный интервал для среднего – доверительные интервалы для среднего задают область вокуруг среднего, в которой с заданным уровнем доверия содержится «истинное» среднее популяции

Lactobacillus spp. были обнаружены у почти всех женщин, независимо от диагноза: при нормоценозе – 100.0%, при промежуточном состоянии – 100.0%, при БВ – 92.3%.

Частота встречаемости при нормоценозе *L. crispatus* (81.7%), *L. jensenii* (29.4%) и *L. gasseri* (33.3%) была значительно выше ($p < 0.05$), чем при БВ (15.4%, 0% и 0% соответственно). В группе с промежуточным типом частота встречаемости составляла – 29.2%, 16.7% и 16.7%.

Концентрация в норме лактобактерий *Lactobacillus spp.* (5.6×10^{10} КОЕ/мл) и отдельных видов *L. crispatus* (7.3×10^9 КОЕ/мл), *L. jensenii* (3.1×10^9 КОЕ/мл) и *L. gasseri* (3.2×10^9 КОЕ/мл) существенно не отличалась, значит данные представители лактобактерий доминируют во влагалище здоровой женщины.

В настоящем исследовании мы подтвердили, что *L. crispatus*, *L. jensenii* и *L. gasseri* являются широко распространенными видами у здоровых женщин с нормальной микрофлорой влагалища с помощью ПЦР с использованием видоспецифичных 16s рРНК пар праймеров. Эти три вида лактобактерий были менее распространены у женщин с БВ.

L. iners также является одним из наиболее распространенных видов влагалищной микробиоты и обнаружена с помощью ПЦР в 116 из 267 (43.45%) образцах, частота встречаемости не отличалась между тремя группами (39.7%, 50.0% и 46.2% соответственно).

Наличие *L. iners* положительно коррелировало с обнаружением БВ-ассоциированных бактерий. Наличие *L. iners* может быть соотнесено с колонизацией вагиналища БВ-ассоциированными бактериями. В то время как, между наличием или отсутствием *L. iners* и частотой выявления каких-либо других лактобактерий связей не выявлено.

Концентрация *Lactobacillus iners* также не отличалась между тремя группами, при нормоценозе - 2.8×10^5 КОЕ/мл, при промежуточном типе - 1.7×10^6 КОЕ/мл, при БВ - 3.5×10^5 КОЕ/мл.

При промежуточном состоянии биоценоза влагалища концентрация *Lactobacillus spp.* составляла 2.1×10^6 КОЕ/мл, значит при данном состоянии из представителей лактобактерий доминируют *L. iners*. При этом концентрация лактобактерий, продуцирующих перекись водорода и молочную кислоту, остается на низком уровне, а основную массу представляют *Lactobacillus iners*, которые продуцируют перекись водорода и молочную кислоту лишь в 9 %. Таким образом, во влагалище не создаются благоприятные условия для размножения лактобактерий и антагонистические условия для препятствования роста условно-патогенных микроорганизмов, что собственно и приводит к развитию БВ.

Высокая концентрация *L. iners* во всех группах приводит к выводу, что даже если при микроскопии мазка влагалищного отделяемого после противомикробной терапии при бактериальном вагинозе (равно как при любой другой вагинальной инфекции) регистрируют доминирование лактофлоры, не уточняя ее видовой состав, то далеко не всегда следует считать пациентку выздоровевшей. Только значимое количество представителей видов, продуцирующих перекись водорода, — прежде всего *L. crispatus* — способно предотвратить рецидив заболевания. Поэтому в диагностике бактериального вагиноза (а также в прогнозировании его риска) будет полезным количественное определение видового состава микробиоты влагалища, включая различные штаммы лактобактерий. Преобладание *L. crispatus* можно расценивать как благоприятный признак «абсолютного» нормоценоза, а *L. iners* — как «переходный» или «относительный» нормоценоз, готовый в любой момент сместиться в сторону бактериального вагиноза.

Все четыре БВ-ассоциированные бактерии, *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnion*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.*, были обнаружены с высокой частотой встречаемости у женщин с БВ. Частота выделения при нормоценозе *Atopobium vaginae* (24.6%), *Leptotrichia amnion* (9.5%), *Sneathia sanguinegens* (12.7%) и *Eggerthella spp.* (0.78%) была значительно ниже ($p < 0.05$), чем при БВ (98.3%, 76.9%, 75.2% и 85.5% соответственно).

Концентрация БВ-ассоциированных бактерий у пациенток с БВ была значительно выше по сравнению со здоровыми женщинами из контрольной группы и с промежуточным состоянием.

У пациенток с БВ самые высокие концентрации в среднем были представлены *A. vaginae* (4.6×10^5 КОЕ / мл), затем *L. iners*, *Eggerthella spp.*, *Sneathia sanguinegens* и *Leptotrichia amnionii* (3.5×10^5 , 5.4×10^4 , 3.2×10^4 и 1.3×10^4 КОЕ/мл, соответственно).

У 53.9% женщин с БВ были обнаружены все четыре микроорганизма одновременно, у 94.9%—хотя бы один из них. У 19% пациенток с нормоценозом удалось выявить минимум один микроорганизм. Таким образом, указанные бактерии являются маркерами БВ и обнаруживаются у 1/2 женщин, не подозревающих об этом, что может спровоцировать патологические изменения микрофлоры и усугубить воспалительный процесс. Целесообразно исключить наличие в микрофлоре БВ-ассоциированных микроорганизмов, т.к. они образуют на эпителии влагалища женщины биопленку, устойчивую к действию антибиотиков, тем самым делают традиционное лечение невозможным.

Таким образом, обнаружение методом ПЦР БВ-ассоциированных микроорганизмов, а именно, *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella hongkongensis*, отличается высокой диагностической эффективностью, что позволяет рассматривать их в качестве экспресс-маркеров тяжести бактериального вагиноза, а значит их можно использовать для уверенной диагностики бактериального вагиноза.

Вычислены определенные критерии, по которым можно диагностировать состояние микрофлоры вагиалища (нормоценоз или бактериальный вагиноз) с использованием разработанной тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени.

Таблица 9
Нормоценоз

Микроскопическая характеристика		
Доминирование лактобацилл, отсутствие грамотрицательной микрофлоры, спор, мицелия, псевдогифов, лейкоцитов, единичные «чистые» эпителиальные клетки (рис 1, а)		
ПЦР		
Микроорганизмы	Частота выделения (%)	Концентрация (КОЕ/мл)
<i>Lactobacillus spp.</i>	100.0	$10^{10} - 10^{11}$
<i>Lactobacillus crispatus</i>	81.7	$10^9 - 10^{10}$
<i>Lactobacillus gasseri</i>	33.3	10^9
<i>Lactobacillus jensenii</i>	29.4	$10^9 - 10^{10}$
<i>Lactobacillus iners</i>	39.7	$10^5 - 10^7$
<i>Atopobium vaginae</i>	24.6	до 10^3
<i>Leptotrichia amnionii</i>	9.5	до 10^2
<i>Sneathia sanguinegens</i>	12.7	до 10^2
<i>Eggerthella spp.</i>	0.78	до 10^1

Таблица 10
Промежуточный тип

Микроскопическая характеристика		
Умеренное или незначительное количество лактобацилл, наличие грамположительных кокков, грамотрицательных палочек. Обнаруживаются лейкоциты, макрофаги, эпителиальные клетки (рис 1, б)		
ПЦР		
Микроорганизмы	Частота выделения (%)	Концентрация (КОЕ/мл)
<i>Lactobacillus spp.</i>	100.0	$10^6 - 10^7$
<i>Lactobacillus crispatus</i>	29.2	до 10^3
<i>Lactobacillus gasseri</i>	16.7	до 10^2
<i>Lactobacillus jensenii</i>	16.7	до 10^2
<i>Lactobacillus iners</i>	50.0	$10^6 - 10^7$
<i>Atopobium vaginae</i>	62.5	до 10^4
<i>Leptotrichia amnionii</i>	45.8	до 10^3
<i>Sneathia sanguinegens</i>	25	до 10^2
<i>Eggerthella spp.</i>	33.3	до $10^2 - 10^3$

Бактериальный вагиноз

<i>Микроскопическая характеристика</i>		
Незначительное количество, но чаще полное отсутствие лактобацилл, обильная, полиморфная грамотрицательная и грамположительная палочковая и кокковая микрофлора. Наличие «ключевых клеток», количество лейкоцитов варьибельно, отсутствие или незавершенность фагоцитоза. Полимикробная картина мазка. * БВ 2 степень (субкомпенсированный) – сопоставимое снижение количества лактобациллярной микробиоты, увеличение количества грамвариабельной полиморфной бактериальной флоры, единичные «ключевые клетки» (рис 3, а); * БВ 3 степень (декомпенсированный) – лактобациллярная микробиота не обнаруживается, грамвариабельная полиморфная бактериальная флора и «ключевые клетки» - сплошь в поле зрения (рис 3, б)		
<i>ПЦР</i>		
Микроорганизмы	Частота выделения (%)	Концентрация (КОЕ/мл)
<i>Lactobacillus spp.</i>	92.3	$10^5 - 10^6$
<i>Lactobacillus crispatus</i>	15.4	до 10^2
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0.0	0
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0.0	0
<i>Lactobacillus iners</i>	46.2	$10^5 - 10^6$
<i>Atopobium vaginae</i>	98.3	$10^5 - 10^6$
<i>Leptotrichia amnionii</i>	76.9	$10^4 - 10^5$
<i>Sneathia sanguinegens</i>	75.2	$10^4 - 10^5$
<i>Eggerthella spp.</i>	85.5	$10^4 - 10^6$

ВЫВОДЫ

- 1) Создана молекулярно-генетическая мультиплексная тест-система, обеспечивающая мультиплексную детекцию *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens*, *Eggerthella spp.*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* и *L. iners* в клиническом материале.
- 2) Установлено, что преобладание в клиническом материале *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* соответствует нормоценозу влагалища.
- 3) Показано, что преобладание *L. iners* соответствует промежуточному типу микробиоценоза влагалища, описываемому как «*Lactobacillus* ниже нормы» и требует проведения профилактики БВ.
- 4) Выявлено, что *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.* характеризуются высокой частотой обнаружения при бактериальном вагинозе (75-98%). Это свидетельствует о диагностическом значении их выявления. Единичные случаи обнаружения БВ-ассоциированных микроорганизмов при нормоценозе и промежуточном типе могут указывать на развитие рецидива БВ.
- 5) Подтверждено, что доминирование *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Sneathia sanguinegens* и *Eggerthella spp.* в клиническом материале соответствует состоянию бактериальный вагиноз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Айламазян Э.К., Рябцева И.Т. Неотложная помощь при экспериментальных состояниях в гинекологии. –СПб: Гиппократ. – 1992. –С.176.
- 2) Баранов А.Н. // Журн. акушерства и женских болезней. – Спец.выпуск. – 1995. –С. 14.
- 3) Ефимов Б.А., Тютюнник В.Л. Бактериальный вагиноз: современный взгляд на проблему. Мать и дитя. Акушерство и гинекология. – 2008. - №1, с. 18
- 4) Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство». 2012. 472 с.
- 5) Ленцер А.А., Ленцер Х. П. Актуальные проблемы микроэкологии человека // В кн.: Аутофлора человека в норме и патологии и ее коррекция. Горький, 1988.-С. 10-14.
- 6) Мавзютов А.Р., Габидуллин З.Г., Ахунов Э.Д., Туйгунов М.М. Бактериальный вагиноз — принципиальные вопросы этиологии, диагностики и лечения: метод, рекомендации — Уфа, - 2001. 16 с.
- 7) Мавзютов А.Р., Туйгунов М.М., Габидуллин З.Г., Гашимова Д.Т., Булгаков А.К., Абдрахманов А.М., Хомякова Т.Р., Хасанова С.Г. Способ дифференцирования грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших рода *Trichomonas*. Патент РФ №2179580 от 20.02.02.
- 8) Муравьева В. В. Микробиологическая диагностика бактериального вагиноза у женщин репродуктивного возраста // Дисс. Канд. мед. наук., Москва, - 1997.
- 9) Никонов А.П., Анкирская А.С., Нисилевич В.Ф. //Акушерство и гинекология. –1993. - №3. – С.20-

- 10) Патрушев Л.И. Искусственные генетические системы. В 2-х томах. Том 1. Генная и белковая инженерия. - «Наука» Москва. 2004. 530с.
- 11) Тютюнник В.Л. Патогенез, диагностика и методы лечения бактериального вагиноза. Фарматека.–2005.– № 2 (98). – С.20–24.
- 12) Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия: Учеб.-справ. Пособие. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск, 2004. 496 с.
- 13) Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.S. et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic association. – Am J Med. 1983, 74. p.14–22.
- 14) Bartlet J. G., Polk B. F. Bacterial flora of the vagina: quantitative study // Rev. Infect. Dis. 1984, 6, S67-S72.
- 15) Boom R. et al. Rapid and simple for purification of nucleic acids. – J Clin Microbiol. 1990. Vol.28. p.495-503.
- 16) Brown W. J. Variations in the vaginal bacterial flora: a preliminary report // Ann. Intern. Med. 1982, 96:6:2, 931-934.
- 17) Burton J.P., Devillard E., Cadieux P.A., Hammond J.A., Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. J Clin Microbiol. 2004. 42: 1829–1831.
- 18) 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. J Infect Dis. 2002. 186: 1770–1780.
- 19) Collins M.D., Hoyles L., Tornqvist E., von Essen R., Falsen E. Characterization of some strains from human clinical sources which resemble *Leptotrichia sanguinegens*: description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. Syst Appl Microbiol. 2001 Nov. 24(3):358-61.
- 20) Collins M.D., Wallbanks S. Comparative sequence analysis of the 16s rRNA genes of *Lactobacillus minutus*, *Lactobacillus rimae* and *Streptococcus*

tococcus parvulus: proposal for the creation of a new genus Atopobium. FEMS Microbiol Lett 1992. 74: 235-40.

- 21) Corbach S. L., Menda K. B., Thadepalli H., Keith L. Anaerobic microflora of the cervix in healthy women // Am. J. Obstet. Gynecol. 1973, 117, 1053-1055.
- 22) Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. Dan Med J. 2014. Apr; 61(4):B4830.
- 23) De Backer E., Dubreuil L., Brauman M., Acar J., Vaneechoutte M. In vitro activity of secnidazole against Atopobium vaginae, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis. Clin Microbiol Infect 2010.16:470–2.
- 24) De Martino S.J., Mahoudeau I., Brettes J.P., Piemont Y., Monteil H., Jaulhac B. Peripartum bacteremias due to Leptotrichia amnionii and Sneathia sanguinegens, rare causes of fever during and after delivery. J Clin Microbiol. 2004 Dec. 42(12):5940-3.
- 25) Devillard E., Burton J.P., Hammond J.A., Lam D., Reid G. Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCRdenaturing gradient gel electrophoresis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004. 117: 76–81.
- 26) DiGiulio D.B., Romero R., Kusanovic J.P., Gomez R., Kim C.J., Seok K.S., et al. Prevalence and diversity of microbes in the amniotic fluid, the fetal inflammatory response, and pregnancy outcome in women with preterm pre-labor rupture of membranes. Am J Reprod Immunol 2010. 64:38–57.
- 27) Downes J., Munson M.A., Spratt D.A., Kononen E., Tarkka E., Jousimies Somer H., Wade W. G. Characterisation of Eubacterium-like strains isolated from oral infections. J. Med. Microbiol. 2001. 50:947–951.

- 28) Eckert L.O. Acute vulvovaginitis. N. Engl. J. Med. 2006. 355:1244 – 1252.
- 29) Eshenbach D.A., Davick P.R., Williams B.L. et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis // J. Clin. Microbiol. 1989. 27, 251-257.
- 30) Ferris M.J., Masztal A., Aldridge K.E., Fortenberry J.D., Fidel P.L. Jr, Martin D.H. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis. 2004. 4: 5.
- 31) Ferris M.J., Norori J., Zozaya-Hinchliffe M., Martin D.H. Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment. J. Clin. Microbiol. 2007. 45:1016 –1018.
- 32) Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N. Engl. J. Med. 2005. 353:1899–1911.
- 33) Geidorfer W., Bohmer C., Pelz K., Schoerner C., Frobenius W., and Bogdan C. Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. J. Clin. Microbiol. 2003. 41:2788–2790.
- 34) Gundi V.A., Desbriere R., La S.B. *Leptotrichia amnionii* and the female reproductive tract. Emerg Infect Dis 2004. 10:2056–7.
- 35) Han Y.W., Shen T., Chung P., Buhimschi I.A., Buhimschi C.S. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. J Clin Microbiol. 2009 Jan. 47(1):38-47.
- 36) Hanff P.A., Rosol-Donoghue J.A., Spiegel C.A., Wilson K.H., Moore L.H. *Leptotrichia sanguinegens* sp. nov., a new agent of postpartum and neonatal bacteremia. Clin Infect Dis. 1995 Jun. 20 Suppl 2():S237-9.

- 37) Hebb J.K., Cohen C.R., Astete S.G., Bukusi E.A., Totten P.A. Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 2004. 190: 2109–2120.
- 38) Hillier S.L. The complexity of microbial diversity in bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 2005. 353:1886 –1887.
- 39) Hillier S.L., Kiviat N.B., Hawes S.E., et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am J Obstet Gynecol* 1996. 175:435-41.
- 40) Hillier S.L., Krohn M.A., Cassen E., Easterling T.R., Rabe L.K., Eschenbach D.A. The role of bacterial vaginosis and vaginal bacteria in amniotic fluid infection in women in preterm labor with intact fetal membranes. *Clin Infect Dis.* 1995. 20: Suppl 2: p.276-S278.
- 41) Kageyama A., Benno Y., Nakase T. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999. 49(Pt 4):1725–1732.
- 42) Lau S.K., et al. *Eggerthella hongkongensis* sp. nov. and *Eggerthella sinensis* sp. nov., two novel *Eggerthella* species, account for half of the cases of *Eggerthella* bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004. 49:255–263.
- 43) Leitich H., Bodner-Adler B., Brunbauer M., Kaider A., Egarter C., Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003. 189:139-47.
- 44) Liderot K., Larsson M., Borang S., Ozenci V. Polymicrobial bloodstream infection with *Eggerthella lenta* and *Desulfovibrio desulfuricans*. *J.Clin. Microbiol.* 2010. 48:3810 –3812.
- 45) Livengood C.H. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol.* 2009. 2:28–37.
- 46) Mehta A., Talwalkar J., Shetty C. V. et al. Microbial flora of the vagina // *Microecology and Therapy.* 1995, 23, 1-7.

- 47) Meng-Rui Lee, Yu-Tsung Huang, Chun-Hsing Liao, Tzu-Yi Chuang, Wei-Jie Wang, Shih-Wei Lee, Li-Na Lee, and Po-Ren Hsueh. Clinical and Microbiological Characteristics of Bacteremia Caused by *Eggerthella*, *Paraeggerthella*, and *Eubacterium* Species at a University Hospital in Taiwan from 2001 to 2010. *Journal of Clinical Microbiology*. June 2012. Volume 50. Number 6. p. 2053–2055.
- 48) Olsen I., Johnson J.L., Moore L.V., Moore W.E. *Lactobacillus uli* sp. nov. and *Lactobacillus rimae* sp. nov. from the human gingival crevice and emended descriptions of *Lactobacillus minutus* and *Streptococcus parvulus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991. 41:261–266.
- 49) Peipert J.F., Ness R.B., Blume J., et al. Clinical predictors of endometritis in women with symptoms and signs of pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184:856-63.
- 50) Ravel J., et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. 108:4680–4687.
- 51) Rodriguez J.M., Collins M.D., Sjoden B., Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. – *Int J Syst Bacteriol.* 1999. 49:1573–1576.
- 52) Shukla S.K., Meier P.R., Mitchell P.D., Frank D.N., Reed K.D. *Leptotrichia amnionii* sp. nov., a novel bacterium isolated from the amniotic fluid of a woman after intrauterine fetal demise. *J Clin Microbiol* 2002. 40:3346–9.
- 53) Skarin A., Sylwan J. Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis // *Acta. Pathol. Microbiol. Immun.* 1987, 94, 399-403.
- 54) Sobel J. D. What's new in bacterial vaginosis and trichomoniasis? *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2005. 19:387–406.
- 55) Verhelst R., Vestraelen H., Claeys G., Verschraegen G., Delanghe J., Van Simaey L., De Ganck C., Temmerman M., Vanechoutte 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 Microbiol* 2004. 4: 16.
- 56) Verstraelen H., Verhelst R., Claeys G., Temmerman M., Vanechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora. The unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2004. 191: 1130–1132.
- 57) Wurdemann D., et al. *Gordonibacter pamelaee* gen. nov., sp. nov., a new member of the Coriobacteriaceae isolated from a patient with Crohn's disease, and reclassification of *Eggerthella hongkongensis* Lau et al. 2006 as *Paraeggerthella hongkongensis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2009. 59:1405–1415.
- 58) Zhou X., Bent S.J., Schneider M.G., Davis C.C., Islam M.R., Forney L.J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 2004. 150: 2565–2573.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Уважаемый пользователь!

Обращаем ваше внимание, что система Антиплагиат отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение. Также важно отметить, что система находит источник заимствования, но не определяет, является ли он первоисточником.

Информация о документе:

Имя исходного файла: Шаяхметова диплом 8.docx
Имя компании: Башкирский государственный медицинский университет
Тип документа: Прочее
Имя документа: ШАЯХМЕТОВА А.К.
Дата проверки: 27.06.2016 14:34

Модули поиска: Интернет (Антиплагиат), Кольцо вузов, Диссертации и авторефераты РГБ, Модуль поиска ЭБС "Лань", Башкирский государственный медицинский университет

Текстовые статистики:

Индекс читаемости: сложный
Неизвестные слова: в пределах нормы
Макс. длина слова: в пределах нормы
Большие слова: в пределах нормы

Оригинальные блоки: 74.53%
Заимствованные блоки: 25.47%
Заимствование из "белых" источников: 0%
Итоговая оценка оригинальности: **74.53%**



Отзыв научного руководителя
о прохождении дипломной практики
студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Шаяхметовой Альфии Камилевны по теме:
«РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ
РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ».

Студентка Шаяхметова А.К. проходила дипломную практику на кафедре фундаментальной и прикладной микробиологии Башкирского государственного медицинского университета. Во время практики проявила ответственность и исполнительность, изучила источники литературы отечественных и зарубежных авторов, показала высокий уровень владения теоретическими положениями по выбранной теме исследования. Студентка показала хорошую практическую подготовку, овладела микробиологическими и молекулярно-генетическими методами исследования. Шаяхметова А.К. показала отличную способность формулировать собственную точку зрения по рассматриваемой проблеме. Итогом стал грамотный вывод, говорящий о способности студентки выделять главное, акцентировать внимание на основных деталях.

Результат дипломной практики Шаяхметовой А.К. заслуживает отличной оценки.

Научный руководитель:
д.б.н., профессор
кафедры фундаментальной
и прикладной микробиологии



Т.В. Маркушева

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Шаяхметовой Альфии Камилевны

Дипломная работа студентки 4 курса обучения медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России Шаяхметовой Альфии Камилевны на тему «Разработка тест-системы для диагностики бактериального вагиноза методом пцр в режиме реального времени» и затронутые в ней научные проблемы имеют существенное значение для теоретической и практической микробиологии.

Содержание дипломной работы состоит из введения, трех глав, выводы, а также списка литературы и приложения.

В работе есть логичность изложения анализа, текст в исследовании полностью соответствует названиям разделов.

Автор продемонстрировал отличный уровень владения теоретическими понятиями, а также сформулировал собственную точку зрения по проблеме, опираясь на мнения различных ученых в этой области.

Представленные в работе выводы достаточно обоснованы и могут быть использованы в практической деятельности.

Дипломная работа Шаяхметовой А.К. выполнена в соответствии с рекомендациями и требованиями, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

к.б.н., доцент кафедры фундаментальной и
прикладной микробиологии



Б.Р. Кулуев

РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу студентки 4 курса обучения
медико-профилактического факультета с отделением микробиологии
ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России
Шаяхметовой Альфии Камилевны

Дипломная работа студентки 4 курса обучения медико-профилактического факультета с отделением микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России Шаяхметовой Альфии Камилевны на тему «Разработка тест-системы для диагностики бактериального вагиноза методом пцр в режиме реального времени» направлена на решение актуальной проблемы генетической детекции бактерий при бактериальном вагинозе и интерпретации полученных данных.

Рецензируемая работа построена по традиционной схеме, включает такие разделы, как введение, литературный обзор, описание объектов и методов исследований, представление собственных данных и их обсуждения, заключение, выводы, список цитируемой литературы, приложения. В обзоре литературы показана актуальность и научная новизна. Подробно изложены методы, используемые для выполнения работы, и основные результаты и выводы.

Работа Шаяхметовой А.К. удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к дипломным работам, может быть допущена к защите и заслуживает отличной оценки.

Старший научный сотрудник
группы генетики микроорганизмов

Уфимского Института биологии РАН, к.б.н.



Н.В. Жарикова

Подпись: *Шаяхметова*
Заверено: *Е. К. Жарикова*
Инспектор по кадрам: *Г. С. Жарикова*