

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗАМ.Е. Сенина^{1*}, Ю.А. Савочкина¹, Л.В. Скворцов¹, Т.И. Попова², Л.В. Джеджева²¹ООО НПФ «Литех», 107023, Москва, ул. Малая Семеновская 3А, стр. 2; *e-mail: senina_maria@mail.ru²ООО «Лаборатория Литех», 107023, Москва, ул. Малая Семеновская 3А, стр. 2

Получение корректного представления о составе влагалищной микрофлоры играет важную роль в предотвращении возникновения у женщин как инфекций мочевыводящей системы, так и инфекций, передающихся половым путём. Дисбаланс облигатной и факультативной микрофлоры влагалища вызывает дисбактериоз, который является фактором риска при возникновении инфекции. Известно, что причиной бактериального вагиноза (БВ) является не единичный возбудитель, а нарушение общего баланса влагалищной микрофлоры, которое проявляется снижением представленности нормальной микрофлоры (*Lactobacillus* spp) и интенсивным увеличением титра условно патогенных аэробных и анаэробных бактерий. Развитие методов молекулярно-генетического анализа, в частности, подходов, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволило значительно расширить представление о разнообразии микробных биотопов, в том числе выявить ключевых и новых «игроков» в развитии БВ. Целью данной работы была оценка возможности использования метода количественной ПЦР, реализованного в формате набора реагентов «Фемоскрин» (НПФ «Литех», Россия) для комплексной диагностики влагалищного биотопа.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени; *Eggerthella*; *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2*; *Megasphaera type 1*; Фемоскрин

DOI: 10.18097/BMCRM00084

ВВЕДЕНИЕ

Микроэкосистема влагалища обладает высокой восприимчивостью к местным воздействиям и подвержена влиянию половых гормонов. Её состав зависит от фазы менструального цикла, беременности, менопаузы, сексуальной активности, гигиенических привычек, приёма антибиотиков и других факторов. При использовании противозачаточных средств, смене половых партнёров, применении антибиотиков широкого спектра действия, количество лактобацилл в микрофлоре влагалища может уменьшаться, а доля таких микроорганизмов, как *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* и анаэробов – возрастать, что приводит к формированию дисбактериоза влагалища – бактериального вагиноза (БВ).

Получение корректного представления о составе влагалищной микрофлоры важно в плане предотвращения возникновения как инфекций мочевыводящей системы у женщин, так и инфекций, передающихся половым путём. Любой дисбаланс облигатной и факультативной микрофлоры влагалища вызывает дисбактериоз, который является фактором риска при возникновении инфекции [1]. БВ - наиболее распространённое вагинальное расстройство у женщин репродуктивного возраста [2], которое чаще всего проявляется нехарактерными выделениями из влагалища и может вызывать негативные для организма женщины последствия, такие как преждевременные роды [3], инфекции околоплодных вод [4], хориоамнионит [5], воспалительные заболевания органов малого таза [6–9], цервицит [10, 11] и повышение восприимчивости организма женщины к различным инфекциям - *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *HSV-2* [12–14] и *HIV* [15].

Предполагается, что причиной БВ является не единичный возбудитель, а скорее нарушение общего баланса влагалищной микрофлоры, проявляющееся как уменьшение доли нормальной микрофлоры (*Lactobacillus* spp.) и интенсивное увеличение титра условно-патогенных аэробных и анаэробных бактерий [16].

Методами классической микробиологии выявляются следующие бактериальные виды – *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Mobiluncus* spp. и *Mycoplasma hominis* [17].

С развитием различных молекулярно-генетических подходов стало очевидно, что степень разнообразия микробных биотопов была сильно недооценена. Так, в микрофлоре влагалища были обнаружены неизвестные ранее бактерии - *Atopobium vaginae*, *Eggerthella*, *Megasphaera* spp., *Leptotrichia* spp., *Dialister* spp. и три вида - *BVAB1*, *BVAB2*, *BVAB3*, принадлежавшие к порядку *Clostridiales* [18–22].

С учетом того, что БВ может негативно сказываться на здоровье женщин репродуктивного возраста, существует необходимость использования быстрых и точных методов диагностики. Именно поэтому так активно развиваются молекулярно-биологические методы диагностики для изучения разнообразия бактериальной флоры, основанные на количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) [23–25], пиросеквенировании [17] и др. Мы применили набор «Фемоскрин» (см. описание в разделе «Материалы и методы») производства НПФ «Литех» (Россия), разработанный на основе ПЦР в реальном времени, для комплексной диагностики БВ, и сравнили полученные результаты с данными традиционного цитологического исследования.



Таблица 1. Система баллов Ньюджента (от 0 до 10) для диагностики бактериального вагиноза с помощью микроскопии

Балл*	Морфотипы <i>Lactobacillus</i> spp. (большие грамположительные палочки)	Морфотипы <i>Gardnerella</i> и <i>Bacteroides</i> spp. (маленькие грамвариабельные палочки)	Морфотип <i>Mobiluncus</i> spp. (изогнутые грамвариабельные палочки)
0	> 30 морфотипов	нет морфотипов	нет морфотипов
1	5–30 морфотипов	1 морфотип	1–4 морфотипа
2	1–4 морфотипа	1–4 морфотипа	> 5 морфотипов
3	1 морфотип	5–30 морфотипов	
4	нет морфотипов	> 30 морфотипов	

Примечание. * Количество баллов в диапазоне [0–3] соответствует нормальной микрофлоре (нормоценозу), [4–6] баллов – промежуточной микрофлоре, [7–10] – БВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 146 мазков слизистой влагалища, поступивших на комплексное микроскопическое исследование в «Лаборатория Литех». Мазки были собраны от женщин репродуктивного возраста – посетителей «Лаборатория Литех». Средний возраст обследуемых составил 29.8 ± 7.5 лет.

Состояние влагалищной микрофлоры оценивали по критериям Ньюджента. Для этого мазок слизистой окрашивали по Граму и подсчитывали количество выявленных морфотипов бактерий под иммерсионным микроскопом (Табл. 1).

Результаты цитологического исследования были приняты за истинные при сравнении с результатами ПЦР-анализа.

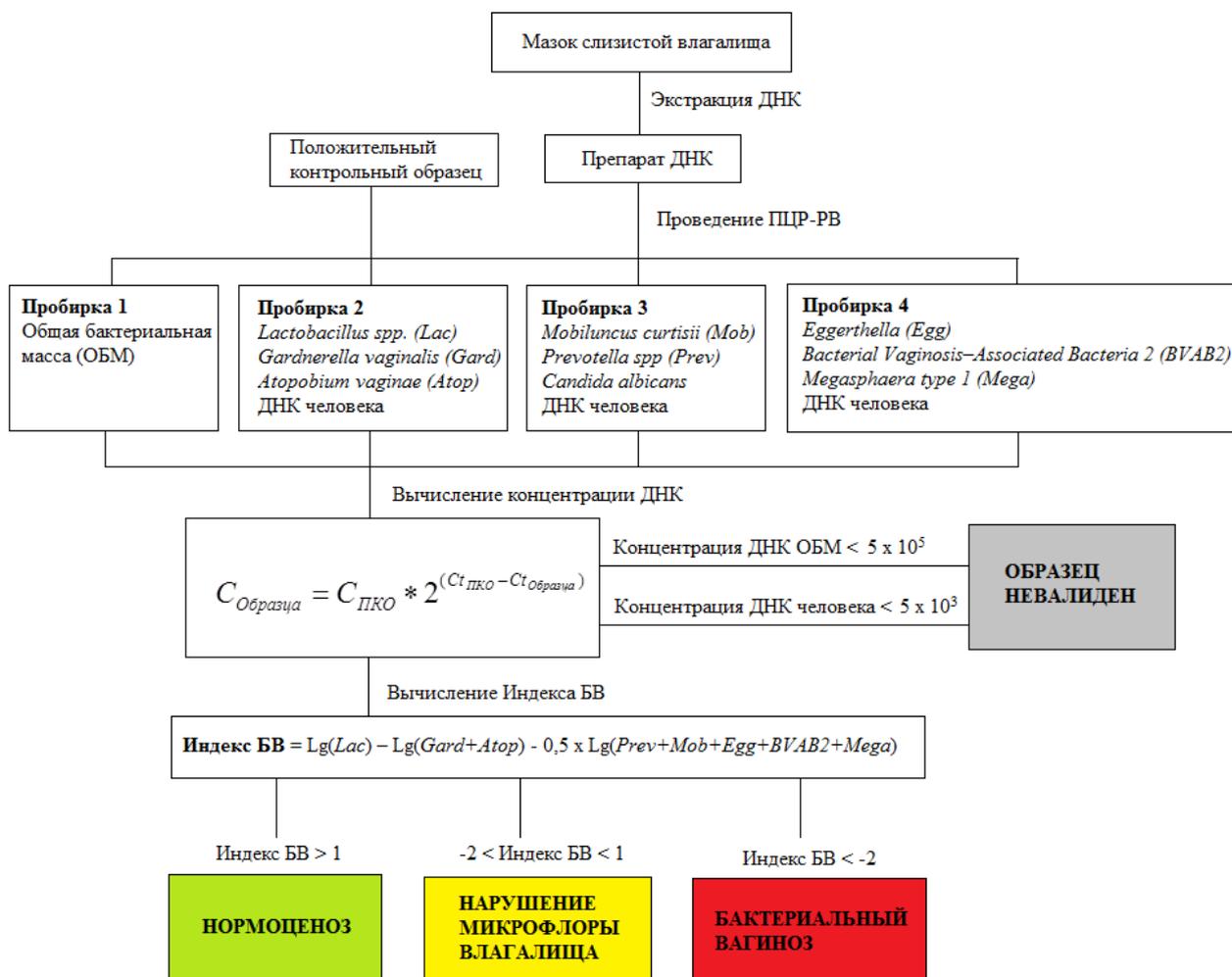


Рисунок 1. Схема анализа образца с помощью набора реагентов «Фемоскрин».

Экстракцию ДНК для ПЦР-анализа проводили с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» (НПФ «Литех») в соответствии с инструкцией производителя.

Выделенные образцы ДНК анализировали с использованием набора реагентов «Фемоскрин» в соответствии с инструкцией производителя. Набор реагентов «Фемоскрин» предназначен для выявления и количественного определения бактерий, ассоциированных с БВ, методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. В результате анализа для каждого образца было дано три типа заключения: «нормоценоз», «нарушение микрофлоры влагалища», «бактериальный вагиноз». Общая схема работы с набором представлена на рисунке 1.

При анализе с помощью набора реагентов «Фемоскрин» один образец ДНК вносят в четыре пробирки, в которых проходит дифференцированное определение следующих микроорганизмов (показателей):

Пробирка 1 - Общая бактериальная масса;

Пробирка 2 - *Lactobacillus* spp. + *Gardnerella vaginalis* + *Atopobium vaginae* + контроль взятия материала (ДНК человека);

Пробирка 3 - *Mobiluncus curtisii* + *Prevotella* spp. + *Candida albicans* + контроль взятия материала (ДНК человека);

Пробирка 4 - *Eggerthella* + *Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria 2* + *Megasphaera type 1* + контроль взятия материала (ДНК человека).

При проведении регистрации продуктов амплификации в процессе реакции («в реальном времени») измерения проводят в каждом цикле амплификации. С использованием специально подобранных настроек анализирующая программа автоматически рассчитывает циклы пересечения кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (Ct). Значение Ct обратно пропорционально концентрации ДНК в образце. Для количественной оценки значение Ct (цикл пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией) исследуемого образца сравнивают со значением Ct ПКО (положительного контрольного образца) с известной концентрацией ДНК (Рис. 2). Концентрация ДНК в исследуемом образце вычисляют по формуле:

$$C_{\text{образца}} = C_{\text{ПКО}} * 2^{(Ct_{\text{ПКО}} - Ct_{\text{образца}})} \quad (1),$$

где $C_{\text{образца}}$ – концентрация ДНК возбудителя (или человека) в исследуемом образце, выраженная в геном-эквивалентах/мл (ГЭ/мл), $C_{\text{ПКО}}$ – концентрация плазмиды, несущей специфический фрагмент ДНК соответствующего возбудителя (или человека), в ПКО, выраженная в геном-эквивалентах/мл (представлена во вкладыше к набору), $Ct_{\text{образца}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции исследуемого образца с пороговой линией; $Ct_{\text{ПКО}}$ – цикл пересечения кривой флуоресценции положительного контрольного образца с пороговой линией.

Образцы, содержащие недостаточное количество ДНК человека (менее 5×10^3 ГЭ/мл), а также общей бактериальной массы (менее 5×10^5 ГЭ/мл), исключают из анализа как невалидные. Для остальных образцов производят расчет индекса БВ:

$$\text{Индекс БВ} = \text{Lg}(\text{Lac}) - \text{Lg}(\text{Gard} + \text{Atop}) - 0.5 \times \text{Lg}(\text{Prev} + \text{Mob} + \text{Egg} + \text{BVAB2} + \text{Mega}) \quad (2).$$

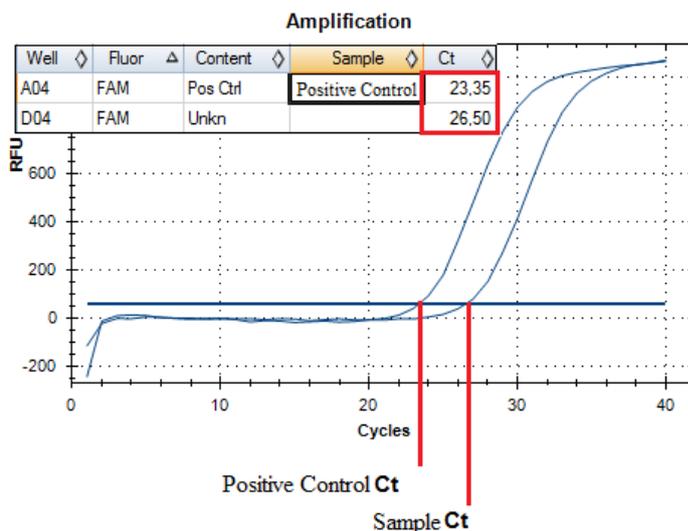


Рисунок 2. Кривые амплификации и определение значения Ct.

Сокращения обозначают рассчитанную концентрацию ДНК соответствующего микроорганизма в исследуемом образце (в ГЭ/мл): Lac – *Lactobacillus* spp, Gard – *Gardnerella vaginalis*, Atop – *Atopobium vaginae*, Prev – *Prevotella* spp., Mob – *Mobiluncus curtisii*; Egg – *Eggerthella*, BVAB2 – *Bacterial Vaginosis – Associated Bacteria 2*; Mega – *Megasphaera type 1*.

Если индекс БВ больше 1, то образец относится к группе «Нормоценоз», если меньше 1, но больше -2, то в группу «нарушения микрофлоры влагалища»; если индекс БВ менее -2, то образец относится к группе «Бактериальный вагиноз».

Возможна автоматическая интерпретация результатов анализа с помощью вспомогательной программы. Примеры представлены на рисунке 3.

Цветные столбцы отражают графическое представление десятичного логарифма концентрации ДНК соответствующего микроорганизма на 100000 клеток человека. Желтый цвет столбцов относится к показателю «Общая бактериальная масса», зеленый – к показателям «ДНК человека» и *Lactobacillus* spp. Красный цвет столбцов для условно-патогенных возбудителей означает превышение содержания ДНК возбудителя над установленным производителем набора реагентов пороговым уровнем, серый – содержание ДНК возбудителя не превышает порогового уровня.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании данных цитологического исследования была сформирована выборка, содержащая 146 образцов, в которую вошли образцы от пациенток с диагнозом «бактериальный вагиноз» (10/146, 6.8%), с нарушением микрофлоры влагалища (промежуточная микрофлора, 73/146, 50.0%) и с нормоценозом (63/146, 43.2%).

По результатам тестирования образцов с использованием набора реагентов «Фемоскрин» 81 образец был отнесен к категории «нормоценоз», 53 – к категории «нарушение микрофлоры влагалища» и 12 – к категории «бактериальный вагиноз».

В группе пациенток с нормоценозом (n = 63), по результатам тестирования набором «Фемоскрин», к категории «нормоценоз» было отнесено 59 образцов (59/63, 93.7%).

Образец	Показатель	ГЭ на 10 ⁵ клеток человека	Lg ГЭ на 10 ⁵ клеток человека	Состояние: Нормоценоз	
A	GR258	Общая бактериальная масса**	3.62E+7	7,56	
		ДНК человека**	1.49E+5	5,17	
		<i>Lactobacillus spp.</i>	2.18E+7	7,34	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Atopobium vaginae</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Mobiluncus curtisii</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Prevotella spp.</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Eggerthella</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Bacterial Vaginosis–Associated Bacteria 2</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Megasphaera type 1</i>	7.88E+1	1,9	
<i>Candida albicans</i>	Не выявлено	Не выявлено			
Образец	Показатель	ГЭ на 10 ⁵ клеток человека	Lg ГЭ на 10 ⁵ клеток человека	Состояние: Дисбиоз обусловлен отсутствием <i>Lactobacillus spp.</i> , но может быть оценен как нормоценоз при наличии бифидобактерий, относящихся к лактоморфотипу	
B	WQ72	Общая бактериальная масса**	2.46E+6	6,39	
		ДНК человека**	7.20E+3	3,86	
		<i>Lactobacillus spp.</i>	4.10E+5	5,61	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>	5.68E+2	2,75	
		<i>Atopobium vaginae</i>	2.52E+4	4,4	
		<i>Mobiluncus curtisii</i>	Не выявлено	Не выявлено	
		<i>Prevotella spp.</i>	6.96E+2	2,84	
		<i>Eggerthella</i>	1.19E+3	3,07	
		<i>Bacterial Vaginosis–Associated Bacteria 2</i>	4.48E+2	2,65	
		<i>Megasphaera type 1</i>	3.79E+4	4,58	
<i>Candida albicans</i>	Не выявлено	Не выявлено			
Образец	Показатель	ГЭ на 10 ⁵ клеток человека	Lg ГЭ на 10 ⁵ клеток человека	Состояние: Баквагиноз	
C	WQ103	Общая бактериальная масса**	6.02E+9	9,78	
		ДНК человека**	3.76E+4	4,58	
		<i>Lactobacillus spp.</i>	5.85E+4	4,77	
		<i>Gardnerella vaginalis</i>	1.84E+6	6,26	
		<i>Atopobium vaginae</i>	8.28E+6	6,92	
		<i>Mobiluncus curtisii</i>	4.66E+5	5,67	
		<i>Prevotella spp.</i>	1.08E+5	5,03	
		<i>Eggerthella</i>	1.47E+6	6,17	
		<i>Bacterial Vaginosis–Associated Bacteria 2</i>	1.30E+8	8,11	
		<i>Megasphaera type 1</i>	2.24E+7	7,35	
<i>Candida albicans</i>	Не выявлено	Не выявлено			

Рисунок 3. Примеры интерпретации результатов для образцов, отнесенных к группе «нормоценоз» (А), «нарушение микрофлоры влагалища» (В) и «бактериальный вагиноз» (С).

В группе пациенток с нарушением микрофлоры влагалища ($n = 73$), по данным набора «Фемоскрин», к категории «нарушение микрофлоры влагалища» было отнесено 48 образцов (48/73; 65.8 %).

В группе пациенток с бактериальным вагинозом ($n = 10$), установленным по данным цитологического исследования, диагноз был подтвержден для 9 пациенток (9/10, 90.0%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Методы молекулярной диагностики, основанные на ПЦР, становятся все более распространенными благодаря ряду преимуществ, среди которых все большее значение приобретают простота работы, возможность автоматизации и меньший субъективизм при интерпретации результата. Активно разрабатываются наборы реагентов на основе количественной ПЦР в «реальном времени» для изучения разнообразия бактериальной флоры [23–25]. Мы применили набор «Фемоскрин» для комплексной диагностики

бактериального вагиноза, и сравнили полученные результаты с данными традиционного цитологического исследования.

В группе образцов с установленным диагнозом «бактериальный вагиноз» существенных расхождений между результатами генетического и цитологического исследования обнаружено не было. Наблюдаемые небольшие расхождения в группах «нормоценоз» и «нарушение микрофлоры влагалища», вероятно, связаны с тем, что начальные патологические изменения (пограничные состояния) не всегда могут быть однозначно интерпретированы в сторону одного или другого состояния. Подобные результаты, когда не может быть выявлена четкая разница между нормоценозом и начинающимся нарушением микрофлоры влагалища – достаточно распространенное явление, которое описано в других подобных исследованиях [26].

Сопоставление данных, полученных с помощью набора «Фемоскрин», с результатами цитологического исследования позволили оценить диагностическую

Таблица 2. Полученные значения диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов «Фемоскрин»

		Результаты цитологического исследования		Диагностические характеристики (с доверительной вероятностью 95%)
		Положительные (всего 10)	Отрицательные (всего 136)	
Результаты набора реагентов «Фемоскрин»	Положительные	9	3	Диагностическая чувствительность * 90,0 % (55.5 – 99.8%)
	Отрицательные	1	133	Диагностическая специфичность ** 97,8 % (93.7- 99.5%)

Примечание. * – диагностическая чувствительность посчитана по отношению к пациенткам с бактериальным вагинозом по Ньюдженту и без бактериального вагиноза по Ньюдженту (в эту группу входят пациентки с промежуточной микрофлорой и с нормоценозом); ** – диагностическая специфичность посчитана по отношению к пациенткам с бактериальным вагинозом по Ньюдженту и без бактериального вагиноза по Ньюдженту (в эту группу входят пациентки с промежуточной микрофлорой и с нормоценозом).

чувствительность и специфичность по отношению к диагнозу «бактериальный вагиноз». Диагностическая чувствительность набора рассчитывалась как отношение числа истинно положительных результатов нового теста к сумме истинно положительных и ложноотрицательных образцов нового теста:

$$\text{Диагностическая чувствительность} = \text{ИП}/(\text{ИП} + \text{ЛО}) \times 100\% \quad (3),$$

где *ИП* – число истинно положительных образцов, *ЛО* – число ложно отрицательных образцов, полученных с использованием нового теста.

Диагностическая чувствительность набора реагентов «Фемоскрин» составила 90.0% (55.5 – 99.8%) для БВ.

Диагностическая специфичность рассчитывалась как отношение истинно отрицательных результатов нового теста к сумме истинно отрицательных и ложноположительных результатов нового теста:

$$\text{Диагностическая специфичность} = \text{ИО}/(\text{ИО} + \text{ЛП}) \times 100\% \quad (4),$$

где *ИО* – число истинно отрицательных образцов, *ЛП* – число ложно положительных образцов, полученных с использованием нового теста.

Диагностическая специфичность набора реагентов «Фемоскрин» составила 97.8 % (93.7-99.5%) для БВ.

Доверительные интервалы были посчитаны с помощью онлайн сервиса https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. Данные суммированы в таблице 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

По результатам проведенного анализа можно сделать вывод о том, что набор реагентов «Фемоскрин» может служить дополнительным инструментом тестирования при микроскопическом (цитологическом) исследовании влагалищной микрофлоры, т.к. он показал высокую эффективность и минимальное количество невалидных результатов.

Результаты, полученные с помощью набора реагентов «Фемоскрин», хорошо коррелирует с данными цитологии. Набор сочетает в себе функционал близких аналогов - с одной стороны, позволяет проанализировать состав микробиоты урогенитального тракта аналогично серии наборов

реагентов «Фемофлор» (НПФ «ДНК-технологии», Россия), с другой стороны, позволяет диагностировать бактериальный вагиноз аналогично набору реагентов «Флороценоз-БВ» («Интерлабсервис», Россия).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие на использование их биоматериала.

ЛИТЕРАТУРА

- Martin, D.H., Zozaya, M., Lillis, R., Miller, J., Ferris. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *MJ.Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2012; **123**:242-56.
- Morris, M., Nicoll, A., Simms, I., Wilson, J., Catchpole, M. Bacterial vaginosis: a public health review. *Br J Obstet Gynaecol.* 2001; **108**:439-450. DOI:10.1111/j.1471-0528.2001.00124-X.
- Hillier, S.L., Nugent, R.P., Eschenbach, D.A., Krohn, M.A., Gibbs, R.S., et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med.* 1995; **333**:1737-1742. DOI:10.1056/NEJM199512283332604.
- Silver, H.M., Sperling, R.S., St Clair, P.J., Gibbs, R.S. Evidence relating bacterial vaginosis to intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* N Engl J Med. 1989; **161**:808-812. DOI:10.1016/0002-9378(89)90406-7.
- Hillier, S.L., Martius, J., Krohn, M., Kiviat, N., Holmes, K.K., et al. A case-control study of chorioamnion infection and histologic chorioamnionitis in prematurity. *N Engl J Med.* 1988; **319**:972-978. DOI:10.1056/NEJM198810133191503.
- Sweet, R.L. Role of bacterial vaginosis in pelvic inflammatory disease. *Clin Infect Dis.* 1995; **20**:S271-S275. DOI:10.1093/clinids/20.Supplement_2.S271.
- Hillier, S.L., Kiviat, N.B., Hawes, S.E., Hasselquist, M.B., Hanssen, P.W., et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; **175**:435-441. DOI:10.1016/S0002-9378(96)70158-8.
- Wiesenfeld, H., Hillier, S., Krohn, M., Amortegui, A.J., Heine, R.P., et al. Lower genital tract infection and endometritis: insight into subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol.* 2002; **100**:456-463. DOI:10.1371/journal.pone.0070716.
- Haggerty, C.L., Hillier, S.L., Bass, D.C., Ness, R.B. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis. *Clin Infect Dis.* 2004; **39**:990-995. DOI:10.1086/423963.
- Schwebke, J.R., Schullien, M.B., Zajackowski, M. Pilot study to evaluate the appropriate management of patients with coexistent bacterial vaginosis and cervicitis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1995; **3**:119-122. DOI:10.1155/S1064744995000445.
- Schwebke, J.R., Weiss, H.L. Interrelationships of bacterial vaginosis and cervical inflammation. *Sex Transm Dis.* 2002; **29**:59-64. DOI:10.1097/00007435-200201000-00010.
- Wiesenfeld, H.C., Hillier, S.L., Krohn, M.A., Landers, D.V., Sweet, R.L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection. *Clin Infect Dis.* 2003; **36**:663-668. DOI:10.1086/367658.
- Allsworth, J.E., Peipert, J.F. Severity of bacterial vaginosis and the risk of sexually transmitted infection. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; **205**:113.e1-113.e6. DOI:10.1016/j.ajog.2011.02.060.

14. Chernes, T.L., Meyn, L.A., Krohn, M.A., Lurie, J.G., Hillier, S.L. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis.* 2003; **37**:319–325. DOI:10.1086/375819.
15. Myer, L., Kuhn, L., Stein, Z.A., Wright, T.C. Jr, Denny, L. Intravaginal practices, bacterial vaginosis, and women's susceptibility to HIV infection: epidemiological evidence and biological mechanisms. *Lancet Infect Dis.* 2005; **5**:786–794. DOI:10.1016/S1473-3099(05)70298-X.
16. Eschenbach, D.A. Bacterial vaginosis and anaerobes in obstetric-gynecologic infection. *Clin Infect Dis.* 1993; **16**:S282–S287.
17. Spiegel, C.A. Bacterial vaginosis. *Rev Med Microbiol.* 2002; **13**:43–51. DOI:10.1128/CMR.4.4.485
18. Wang, K.D., Su, J.R. Quantification of *Atopobium vaginae* loads may be a new method for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Clin Lab.* 2014; **60**(9):1501-8.
19. Shipitsyna, E., Roos, A., Datcu, R., et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age - sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One.* 2013; **8**:e06070. DOI:10.1371/journal.pone.0060670.
20. 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. DOI:10.1056/NEJMoa043802.
21. 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. DOI:10.1016/j.ajog.2004.04.013.
22. Zozaya-Hinchliffe, M., Martin, D.H., Ferris, M.J. Prevalence and abundance of uncultivated *Megasphaera*-like bacteria in the human vaginal environment. *Appl Environ Microbiol.* 2008; **74**:1656–1659. DOI:10.1128/AEM.02127-07.
23. Zariffard, M.R., Saifuddin, M., Sha, B.E., Spear, G.T. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; **34**:277–281. DOI:10.1111/j.1574-695X.2002.tb00634.x.
24. Sha, B.E., Chen, H.Y., Wang, Q.J., Zariffard, M.R., Cohen, M.H., et al. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol.* 2005; **43**:4607–4612. DOI:10.1128/JCM.43.9.4607-4612.2005.
25. Cartwright, C.P., Lembke, B.D., Ramachandran, K., Body, B.A., Nye, M.B., et al. Development and validation of a semi-quantitative, multi-target, PCR assay for the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2012; **50**:2321–2329. DOI:10.1128/JCM.00506-12.
26. Lipova, E.V., Boldyreva, M.N., Vitvitskaya, Yu.G. New highly sensitive method for diagnosing imbalances of normal and conditionally pathogenic biota in women at early stages. *Consilium-medicum.* 2009; **11**. No. 6.:47-51.

Поступила: 09.10.2018

После доработки: 11.03.2019

Принята к публикации: 03.04.2019

THE qPCR ANALYSIS OF VAGINAL MICROFLORA FOR THE DIAGNOSIS OF BACTERIAL VAGINOSIS

M.E. Senina^{1*}, Y.A. Savochkina¹, L.V. Skvortsov¹, T.I. Popova², L.V. Dzhezheia²

¹«Lytech» Ltd, 3A/2 Malaya Semyonovskaya str., Moscow, 107023 Russia; *e-mail: senina_maria@mail.ru

²«Lytech Laboratory» Ltd, 3A/2 Malaya Semyonovskaya str., Moscow, 107023 Russia

The correct information about of the vaginal microflora plays an important role in preventing the occurrence of urinary tract infections and sexually transmitted infections among women. Disbalance of obligate and facultative microflora causes disbacteriosis, a risk factor for emergence of infectious diseases. It is known that the cause of bacterial vaginosis (BV) is not a single pathogen but a impairments in of the general balance of the vaginal microflora, which manifests a decrease of the normal microflora (*Lactobacillus* spp) and intense increase of pathogenic aerobic and anaerobic bacteria. The development of molecular genetic analysis methods, in particular, approaches based on the use of polymerase chain reaction (PCR), significantly expanded understanding of the diversity of microbial biotopes, including identification of the key and new «players» in the development of BV. The aim of our study was to evaluate the performance of real-time PCR kit «Femoscreen» («Lytech», Russia) for comprehensive BV diagnosis.

Key words: real-time PCR; *Eggerthella*; *Bacterial Vaginosis–Associated Bacteria*; *Megasphaera type I*; Femoscreen

Received: 09.10.2018, revised: 11.03.2019, accepted: 03.04.2019