

На правах рукописи

КРЫСАНОВА
Анна Александровна

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БАКТЕРИАЛЬНОГО
ВАГИНОЗА С УЧЕТОМ АССОЦИАЦИИ РАЗНЫХ ГЕНОТИПОВ
*GARDNERELLA VAGINALIS***

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Научный руководитель:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор
Савичева Алевтина Михайловна

Официальные оппоненты:

Кира Евгений Федорович – доктор медицинских наук, профессор, акционерное общество «Группа компаний «МЕДСИ», главный специалист по направлению «акушерство и гинекология»;

Ворошилина Екатерина Сергеевна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, профессор.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» июня 2022 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 4/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197375, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте <https://www.nrcerm.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук доцент

Санников Максим Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Бактериальный вагиноз (БВ) – клинический полимикробный невоспалительный синдром, возникающий в результате замены нормальной микробиоты влагалища (виды *Lactobacillus* spp., продуцирующие молочную кислоту и перекись водорода) на повышенную генерацию многочисленных видов облигатных и факультативных анаэробных микроорганизмов (*G. vaginalis* и др.) (Кира Е.Ф., 2012; Воропаева Н. М. и др., 2021). БВ - распространенное заболевание женщин репродуктивного возраста, которое может протекать как с развитием характерной симптоматики, так и бессимптомно. БВ ассоциируют с целым рядом заболеваний репродуктивного тракта и осложнениями беременности (Taylor B.D., Darville T., Haggerty C.L., 2013). По характеру клинического течения БВ подразделяют на острый, хронический (рецидивирующий) и латентный (бессимптомный).

Gardnerella vaginalis является распространенным бактериальным видом, входящим в состав микробиоты влагалища, и встречается у многих здоровых женщин. Тем не менее, этот микроорганизм обнаруживается практически у всех женщин с БВ (Fredricks D.N. et al., 2007; Shipitsyna E. et al., 2013). Считается, что *G. vaginalis* играет ключевую роль в патогенезе БВ, т.к. обладает более выраженным вирулентным потенциалом в сравнении с другими БВ-ассоциированными бактериями. Выраженность вирулентного потенциала реализуется в большей степени адгезии, более заметном цитотоксическом эффекте, а также в более высокой способности образовывать биопленки. Предположительно *G. vaginalis* инициируют колонизацию бактериями слизистой оболочки влагалища и выступают в качестве каркаса, к которому впоследствии могут присоединяться другие виды микроорганизмов (Alves P. et al., 2014; Patterson J.L. et al., 2010; Schwebke J.R., Muzny C. A. and Josey W.E., 2014).

Одним из важных факторов вирулентности *G. vaginalis* является продукция сиалидазы. Этот фермент участвует в разрушении защитных слизистых барьеров влагалища, обеспечивая бактерии питательным субстратом и позволяя уклоняться от защитных систем хозяина (Briselden A.M. et al., 1992; Lewis W.G. et al., 2013). Обнаружение сиалидазы используется в некоторых экспресс-тестах для диагностики БВ (Bradshaw C.S. et al., 2005).

Недавние разработки в области молекулярной генетики позволили определить различные генетические варианты *G. vaginalis* внутри одного вида. Между разными генотипами этого микроорганизма были определены существенные отличия в метаболическом и вирулентном потенциале (Ahmed A. et al., 2012). Были исследованы

наличие и активность гена сиалидазы у изолятов разных генотипов *G. vaginalis* (Schellenberg J.J. et al., 2016). Была обнаружена сильная ассоциация между выявлением высокой концентрации гена сиалидазы *G.vaginalis*, обнаружением биопленки и БВ (Hardy L. et al., 2017). Эти наблюдения указывают на явную клиническую и диагностическую значимость генотипов и гена сиалидазы для диагностики БВ.

Значительная медицинская и социальная проблема бактериального вагиноза – это частые рецидивы заболевания несмотря на проводимую терапию согласно всем клиническим рекомендациям и руководствам. Поиск новых методов диагностики рецидивирующих форм бактериального вагиноза, возможного прогнозирования развития рецидива заболевания у каждой конкретной пациентки является крайне актуальной проблемой современной клинической лабораторной диагностики. Разрешению этой проблемы могут способствовать исследования в области генетического анализа *G. vaginalis*, выявление определенных генотипов, видов и подвидов, а также их ассоциаций при разном клиническом течении БВ (первичном эпизоде, рецидивирующем течении, латентном течении), а также у здоровых женщин.

Все это подтверждает актуальность и необходимость дальнейших исследований по определению значимости определенных генотипов *G. vaginalis* у пациенток с различными формами БВ с целью оптимизации диагностики заболевания, возможности прогнозирования развития рецидивов, контроля эффективности проводимой терапии, что обеспечит сохранение здоровья женщины и улучшит качество ее жизни.

Степень разработанности темы исследования. С момента своего первоначального выделения из образцов отделяемого влагалища в 1953 году вид, который в конечном итоге стал известен как *Gardnerella vaginalis*, тесно связан с дисбиозом влагалища, различными заболеваниями репродуктивного тракта и осложнениями беременности (Schellenberg J.J., Patterson M.H. and Hill J.E., 2017). Этот микроорганизм наиболее часто встречается при БВ и считается ключевым патогеном в развитии БВ. *Gardnerella vaginalis* обнаруживается практически у всех женщин с симптомами БВ и у значительной части здоровых женщин репродуктивного возраста. Ведущая роль гарднерелл в развитии БВ заключается в инициации возникновения бактериальной пленки на эпителии влагалища, к которой впоследствии присоединяются другие БВ-ассоциированные бактерии. За счет образования высокоорганизованной плотной биопленки, тесно связанной с вагинальным эпителием, отмечают агрессивнo-хроническое течение БВ с развитием частых рецидивов заболевания.

Предполагают, что фермент сиалидаза играет важную роль в развитии биопленок. Основная функция сиалидазы – расщепление сиаловой кислоты, входящей в состав слизи,

которая покрывает эпителий влагалища и играет протективную роль. При разрушении защитного слоя микроорганизмы получают возможность к адгезии и образованию биопленок. Одним из важных факторов вирулентности *G. vaginalis* является продукция этого фермента. У женщин с БВ сиалидазная активность бактерий весьма выражена. На данный момент существует модель диагностики БВ, где сиалидазная активность является маркером БВ. Однако, хотя этот метод довольно прост в использовании, он не обладает достаточной чувствительностью и является качественным методом диагностики, а значит и субъективным. Более чувствительный количественный тест был бы более полезен для диагностики БВ и мониторинга эффективности терапевтических мероприятий.

Понимание роли гарднерелл в составе микробиоты влагалища было долгое время затруднено в связи с исключительным фенотипическим разнообразием этого микроорганизма, а также фактом его обнаружения, иногда в большом количестве, у женщин без каких-либо признаков или симптомов бактериального вагиноза (Schellenberg, J.J., Patterson M.H., Hill J.E., 2017).

За последние десятилетия было разработано несколько классифицирующих схем в попытке определить подгруппы *Gardnerella vaginalis*, связанные с бактериальным вагинозом. Недавно были определены четыре «подгруппы» или «генотипа» *G. vaginalis* с помощью таких исследований как секвенирование гена, кодирующего шаперон 60 кДа (cpn60) и сравнительного геномного анализа 17 клинических изолятов *G. vaginalis* (Ahmed A. et al., 2012; Links M.G., et al., 2012; Paramel Jayaprakash T., Schellenberg J.J., Hill J.E., 2012; Schellenberg J.J. et al., 2011]. Авторы сообщали о существенных различиях в метаболическом и вирулентном потенциале между генотипами микроорганизма, однако связь разных генотипов *G. vaginalis* с БВ не была установлена.

В известной нам литературе нет данных о возможности прогнозирования рецидивирующих форм БВ с использованием генотипирования ДНК *G. vaginalis* для совершенствования диагностики и терапии этого заболевания.

Генотипирование гарднерелл и обнаружение гена сиалидазы, как предшественника сиалидазной активности, послужившее основанием для данного исследования, позволит оптимизировать клинко-лабораторную диагностику бактериального вагиноза, своевременно прогнозировать развитие рецидива заболевания и скорректировать схему лечения.

Цель исследования: Определить значимость выявления ассоциаций генотипов *Gardnerella vaginalis* в клинко-лабораторной диагностике различных форм бактериального вагиноза.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту и количественное содержание *Gardnerella vaginalis* в вагинальном биотопе женщин репродуктивного возраста, проживающих в Санкт-Петербурге.
2. Провести генетический анализ клинических изолятов *Gardnerella vaginalis*, выявленных у женщин репродуктивного возраста, и изучить ассоциацию различных генотипов возбудителя с бактериальным вагинозом.
3. Сравнить диагностическую значимость гена сиалидазы и определенных генотипов *Gardnerella vaginalis* для клинико-лабораторной диагностики бактериального вагиноза.
4. Разработать прогностическую модель с использованием молекулярных методов генотипирования *Gardnerella vaginalis*, определяющую возможность развития рецидивирующего бактериального вагиноза.
5. Разработать алгоритм ведения пациенток с разными формами бактериального вагиноза в зависимости от количества генотипов *Gardnerella vaginalis* в вагинальном отделяемом.

Научная новизна. Впервые получены молекулярно-эпидемиологические данные по распространенности различных генотипов *Gardnerella vaginalis* среди женщин репродуктивного возраста Санкт-Петербурга.

Впервые установлена достоверная ассоциация генотипа 4 *Gardnerella vaginalis*, не содержащего гена сиалидазы, с бактериальным вагинозом.

Впервые проведен сравнительный анализ клинической и диагностической значимости выявления различных генотипов *Gardnerella vaginalis*.

Впервые показано, что колонизация влагалища одновременно несколькими генотипами *Gardnerella vaginalis*, наиболее часто 1, 2 и 4, в концентрации более 10^7 ГЭ/мл достоверно ассоциирована с рецидивирующим бактериальным вагинозом. Разработана прогностическая модель с использованием молекулярных методов генотипирования *Gardnerella vaginalis*, которая позволяет определить вероятность развития, рецидивирующего бактериального вагиноза у каждой конкретной пациентки. Получен патент на изобретение № 2765917.

Разработан алгоритм ведения пациенток с разными формами бактериального вагиноза в зависимости от количества генотипов и концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* в вагинальном отделяемом.

Теоретическая значимость. Представленные данные о частоте выявления и концентрации *Gardnerella vaginalis* дополняют доказательную базу этиологической значимости гарднерелл в патогенезе бактериального вагиноза.

Получены молекулярно-эпидемиологические данные о распространенности различных генотипов *Gardnerella vaginalis* и их ассоциации с рецидивирующими формами бактериального вагиноза.

Ассоциация между бактериальным вагинозом и присутствием в вагинальном биотопе *Gardnerella vaginalis* нескольких генотипов вносит вклад в развитие концепции о разнообразии бактериальных видов/вариантов в бактериальных сообществах, формирующих биопленки, при бактериальном вагинозе и существенно дополняет понимание патогенеза развития рецидивирующих форм этого заболевания.

Теоретически обоснованы принципы диагностики и терапии рецидивирующего бактериального вагиноза в зависимости от количества генотипов и концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* в вагинальном отделяемом.

Практическая значимость. Полученные результаты обосновывают необходимость использования метода ПЦР в режиме реального времени для выявления разных генотипов *Gardnerella vaginalis*, содержащихся в вагинальном биотопе, для дифференциальной диагностики разных клинических форм бактериального вагиноза (первого эпизода или рецидивирующего течения заболевания), а также возможности выявления дисперсной и корпоративной формы микроорганизма, способной формировать бактериальные пленки.

В результате исследования разработана прогностическая модель с использованием молекулярных методов генотипирования *Gardnerella vaginalis*, определяющая вероятность развития рецидивирующего бактериального вагиноза у каждой конкретной пациентки с жалобами на вагинальные выделения, что позволит изменить тактику терапии этого заболевания.

Предложен алгоритм ведения пациенток с разными формами бактериального вагиноза (первого эпизода и рецидивирующего бактериального вагиноза) на основании выявления ДНК *Gardnerella vaginalis* разных генотипов и их концентраций.

Методология и методы исследования. Для реализации цели исследования и обоснования основных положений были использованы анализ литературы, лабораторные методы и методы статистической обработки данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Суммарная количественная оценка всех генотипов *Gardnerella vaginalis* является более информативным показателем в клинико-лабораторной диагностике БВ, чем выявление гена сиалидазы.

2. Одновременное выявление высоких концентраций ДНК *Gardnerella vaginalis* 1, 2 и 4 генотипов у женщин репродуктивного возраста с использованием метода ПЦР в реальном времени имеет решающее значение для дифференциальной диагностики различных форм течения бактериального вагиноза.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Достоверность полученных результатов обеспечена теоретическим анализом проблемы, репрезентативным объёмом выборок обследованных пациентов, достаточным количеством выполненных наблюдений с использованием современных методов исследования и адекватным статистическим анализом данных.

Основные положения работы, а также содержание её отдельных этапов были представлены на XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017» (Москва, 2017); на международной конференции «Polymicrobial Infection and Biofilm» (Германия, 2018); Общероссийской научно-практической конференции «Отговские чтения» (Санкт-Петербург, 2019); II Национальном конгрессе с международным участием «Лабораторные технологии в репродуктивной медицине и неонатологии: от науки к практике» (Москва, 2020); на XIV международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2020); на всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «XXIII Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2020); на научно-практической конференции с международным участием «Инфекционный фактор и репродуктивное здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); на всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «XXIV Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2021); на 17-м международном конгрессе «Baltic Association of Dermatovenereologists» (Kaunas, 17–19 September 2021).

Результаты исследования внедрены в диагностическую работу лаборатории клинической микробиологии ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» и отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 4 в рецензируемых научных журналах и изданиях по специальности «клиническая лабораторная диагностика» и 1 патент.

Личное участие автора. Диссертант лично участвовала в планировании и организации работы, проведении большей части лабораторных исследований, обработке, анализе, обобщении и представлении полученных данных.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 109 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 15 таблицами. Список литературы включает 148 публикаций, из них 24 – отечественных авторов и 124 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обследуемая группа пациентов и дизайн исследования

В исследовании приняли участие 318 женщин репродуктивного возраста, обратившихся в поликлинические отделения ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д.О. Отта» в период с сентября 2016 по декабрь 2018 с жалобами на зуд, жжение, диспареунию и выделения из половых путей с неприятным запахом.

Большинство пациенток было в возрасте 18-35 лет, средний возраст составил $31,9 \pm 9,1$ года. Критериями исключения из исследования были беременность и период лактации; менопауза; наличие инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) – хламидиоз, гонорея, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), сифилис, трихомониаз, остроконечные кондиломы, генитальный герпес (с манифестными проявлениями); использование любых форм контрацептивов, применение антибактериальных препаратов местно и/или перорально в течение последних 4 недель. В дополнение к этому, из исследования были исключены женщины с тяжелыми соматическими заболеваниями в фазе декомпенсации и злокачественными заболеваниями любой локализации.

Исследование было выполнено в три этапа. На первом этапе была оценена частота выявления и концентрация ДНК *G. vaginalis* во всех группах женщин (n=318). По результатам микроскопического исследования клинических материалов по Нудженту все женщины были разделены на три группы: I группа – 86 пациенток с установленным диагнозом бактериального вагиноза, II группа – 58 женщин с промежуточным типом микробиоценоза влагалища и III группа – 174 женщины с физиологическим микробиоценозом влагалища.

На втором этапе в каждой группе женщин были выявлены различные генотипы (1, 2, 3 и 4) и ген сиалидазы *Gardnerella vaginalis* методом количественной ПЦР в реальном времени и определены их ассоциация с БВ (n=299): I группа – 79 женщин, II группа – 58 и III группа - 162.

На третьем этапе оценили значимость ассоциации различных генотипов *Gardnerella vaginalis* и их концентрацию в диагностике рецидивирующего бактериального вагиноза (n=241). На основании клинико-anamnestических данных была выделена группа женщин с рецидивирующим БВ, у которых случаи БВ были зарегистрированы 3 и более раз за год. Согласно этим данным, I группа женщин была подразделена на 2 подгруппы. В подгруппу IA вошли 50 женщин с рецидивирующим БВ, в подгруппу IB - 29 женщин с первым эпизодом БВ на момент обследования. В качестве группы сравнения мы оставили III группу – 162 женщины с физиологическим (нормальным) микробиоценозом влагалища, исключив II группу – с промежуточным типом микробиоценоза влагалища.

Материалы и методы исследования

Клиническим материалом для исследования служило отделяемое боковых сводов влагалища.

Микроскопическое исследование препаратов отделяемого влагалища (критерии Нуджента). Диагностику БВ проводили путем исследования отделяемого влагалища с применением метода Нуджента. Для этого в препаратах определяли следующие бактериальные морфотипы: крупные грамположительные палочки (морфотип лактобациллы), небольшие грамотрицательные или грамвариабельные кокки и коккобациллы (морфотип *Gardnerella* и *Bacteroides*) и грамотрицательные или грамвариабельные изогнутые палочки (морфотип *Mobiluncus*). При обнаружении данных морфотипов по каждой позиции присваивались баллы, которые затем суммировались. В зависимости от суммы баллов образцы расценивали как физиологический микробиоценоз (0 - 3 балла), промежуточный тип микробиоценоза (4 - 6 баллов) и БВ (7-10 баллов).

Количественная ПЦР в реальном времени для выявления ДНК *Gardnerella vaginalis*. ПЦР-амплификацию и анализ продуктов ПЦР осуществляли с использованием набора реагентов ГАРД-ГЕН (ДНК - технология, Москва) согласно инструкции производителя.

Количественная ПЦР в реальном времени для определения генотипов и выявления гена сиалидазы *Gardnerella vaginalis*. Обнаружение четырех генотипов *G. vaginalis* было выполнено с использованием мультиплексного ПЦР-анализа в реальном времени с ранее описанными праймерами и зондами (Ahmed A. et al., 2012, Balashov S. et al., 2014). ПЦР-анализ в реальном времени для выявления гена сиалидазы *G. vaginalis* был выполнен с использованием прямого праймера GVSI (5'-GACGACGGCGAATGGCACGA-3'), разработанного Santiago G.L. с соавт. (Santiago G.L. et al., 2011), и недавно полученного обратного праймера GvSia1R2 (5'-GCTGTATCCGTCTACGTAAATG-3') и TaqMan зонда GvSia1Z2r (5'-R6G-CTCCGCGATTTGCGCGAATAATC-BHQ1-3').

Конструкция новых олигонуклеотидов была основана на совпадении последовательности генов сиалидазы и эталонного штамма *G. vaginalis* ATCC 14019. (NCBI An: NC_014644.1 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_014644.1]), используемые Santiago G.L. с соавт. (Santiago G.L. et al., 2011), и соответствующие последовательности других штаммов *G. vaginalis* (принадлежащих к разным генотипам), описанные в исследовании Ahmed A. с соавт. (Ahmed A. et al., 2012). В этом совпадении последовательностей ранее использованный обратный праймер GVSI имел два несоответствия на 3'-конце у некоторых штаммов, что могло снизить чувствительность обнаружения некоторых штаммов *G. vaginalis*. Был разработан новый гибридизационный зонд TaqMan, специфичный для консервативной части выбранного фрагмента, для обеспечения более точного, чувствительного и специфического обнаружения. Специфичность вновь разработанного праймера и зонда была подтверждена с использованием программного обеспечения Standard Nucleotide BLAST (NCBI).

Для количественного определения амплифицированных ПЦР-фрагментов, были сконструированы стандартные количественные образцы путем клонирования фрагментов ПЦР-генов-мишеней pGEM-T Vector Systems (Promega, Madison, USA). Концентрацию ДНК в плазмидных препаратах тестировали с использованием количественной ПЦР с теми же специфическими праймерами и зондами в цифровой системе ПЦР QX100 Droplet (BioRad, США). Стандартные кривые были получены путем тестирования количественных стандартных образцов (в двух повторениях) в концентрациях 10^3 , 10^5 , 10^7 и 10^9 геномных эквивалентов (ГЭ/мл) для всех мишеней. Концентрации экстракта ДНК в клинических образцах выражали в ГЭ/мл.

Статистический анализ данных. Статистический анализ результатов осуществляли с использованием статистического пакета NCSS 11 (NCSS, LCC). Для анализа различий в распределении категориальных переменных использовали критерий χ^2 -квадрат, количественных – U-тест Манна-Уитни. Клинически значимые концентрации ДНК *G. vaginalis* определяли путем ROC-анализа (ROC – receiver operating characteristic) по максимальной пропорции правильно классифицированных образцов. Статистический анализ проводился с использованием статистических пакетов GraphPad Prism версии 7.04 для Windows и Analyze-It для Microsoft Excel 5.11. Все тесты на значимость были двусторонними, и статистически значимые различия предполагались при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота обнаружения *G. vaginalis* в вагинальных образцах женщин репродуктивного возраста. По результатам микроскопического исследования

бактериальный вагиноз был установлен у 86 женщин из 318. Распространенность БВ в данной популяции женщин составила 27%.

ДНК *G. vaginalis* была обнаружена у 301 (94%) из 318 обследованных женщин: в 100% образцов женщин I и II групп и в 90% у женщин III группы.

Концентрация ДНК *G. vaginalis* была достоверно выше ($p < 0,0001$) в образцах вагинальных выделений, полученных у женщин с БВ (I группа), чем у женщин с промежуточным микробиоценозом влагалища (II группа) и здоровых женщин (III группа). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Концентрация ДНК *G. vaginalis* в исследуемых образцах

Группы обследованных женщин	Концентрация ДНК <i>G. vaginalis</i> , ГЭ/мл Медиана (диапазон)	Общая бактериальная масса, ГЭ/мл Медиана (диапазон)	Значимость различий
I группа	$4 \times 10^7 (1 \times 10^1 - 4 \times 10^9)$	$3 \times 10^8 (2 \times 10^6 - 8 \times 10^9)$	I-II $p < 0,0001$
II группа	$4 \times 10^4 (0 - 3 \times 10^8)$	$5 \times 10^7 (4 \times 10^4 - 10^9)$	II-III $p < 0,0001$
III группа	$10^3 (0 - 8 \times 10^7)$	$3 \times 10^7 (2 \times 10^4 - 2 \times 10^9)$	I-III $p < 0,0001$

Определение клинически значимых концентраций ДНК *G. vaginalis*, позволяющих с максимальной точностью дифференцировать образцы вагинальных выделений у женщин с физиологическим микробиоценозом и БВ, было проведено с использованием ROC-анализа. Клинически значимая концентрация ДНК *G. vaginalis* в образцах, при которой чувствительность и специфичность метода диагностики показывает максимальное значение, составила $\geq 3 \times 10^6$ копий ДНК/мл. При определении такой концентрации ДНК *G. vaginalis* в образцах пациенток, БВ был правильно классифицирован у 88% женщин.

Генотипы *Gardnerella vaginalis* и их ассоциация с бактериальным вагинозом

Для исследования ассоциации генотипов *Gardnerella vaginalis* и гена сиалидазы с бактериальным вагинозом было проведено генотипирование ДНК *G. vaginalis* 299 образцов клинического материала отделяемого влагалища женщин.

ДНК *G. vaginalis* была обнаружена в 288 исследованных образцах из 299 (96%): в 100% образцов женщин I и II групп и в 93% -у женщин III группы.

Чаще всего в клинических образцах был выявлен 4 генотип *G. vaginalis* (94%). Причем этот генотип одинаково часто выявлялся в вагинальном биотопе всех групп женщин ($p < 0,01$). Следующим по частоте выявления был 1 генотип *G. vaginalis* (56%) и генотип 2 (40%). При этом в I группе женщин эти генотипы обнаруживались достоверно

чаще, чем во II и в III группах ($p=0,03$). Реже выявлялся 3 генотип *G. vaginalis*, в 20% случаев (табл.2).

Таблица 2. Частота обнаружения генотипов *Gardnerella vaginalis* и гена сиалидазы в вагинальном биотопе женщин обследуемых групп

Генотипы	Частота (% [95% ДИ])			
	Все женщины <i>n</i> =299	I группа <i>n</i> =79	II группа <i>n</i> =58	III группа <i>n</i> =162
Генотип 1	169 (56 [51-62])	64 (81 [71-88])	35 (60 [48-72])	70 (43 [36-51])
Генотип 2	119 (40 [34-45])	53 (67 [56-76])	20 (34 [24-47])	46 (28 [22-36])
Генотип 3	59 (20 [16-25])	13 (16 [10-26])	12 (21 [12-33])	34 (21 [15-28])
Генотип 4	282 (94 [91-96])	79 (100 [95-100])	58 (100 [94-100])	145 (90 [84-93])
Все генотипы	288 (96 [94-98])	79 (100 [95-100])	58 (100 [94-100])	151 (93 [88-96])
Ген сиалидазы	208 (70 [64-75])	71 (90 [81-95])	41 (71 [58-81])	96 (59 [52-67])

Ген сиалидазы *G. vaginalis* был обнаружен в 70% клинических материалов. В I группе женщин этот ген был выявлен в 90% образцов, во II группе – в 71%, в III группе – в 59%. Достоверные различия в частоте обнаружения гена сиалидазы *G. vaginalis* были между I и II группами и между I и III группой женщин, $p=0,0065$ и $p<0,0001$, соответственно.

Для дифференциальной диагностики БВ важно определить не только наличие того или иного генотипа *G. vaginalis*, но и определить концентрацию каждого из них, а также концентрацию гена сиалидазы *G. vaginalis* (таблица 3). В I группе женщин с бактериальным вагинозом наибольшая концентрация ДНК *G. vaginalis* была обнаружена при исследовании образцов, содержащих все генотипы одновременно, и составила 1.1×10^8 ГЭ/мл (медианное значение). Концентрация ДНК *G. vaginalis* в образцах, содержащих 1 и 4 генотипы, составила $1,1 \times 10^7$ ГЭ/мл и 5.7×10^7 ГЭ/мл, соответственно. В образцах, содержащих 2 генотип в группе женщин с БВ концентрация ДНК *G. vaginalis* составила 6.1×10^5 ГЭ/мл, 3 генотип - 2.0×10^3 ГЭ/мл, ген сиалидазы - 3.0×10^7 ГЭ/мл. Во II и III группах женщин концентрация ДНК *G. vaginalis* в образцах, содержащих все генотипы вместе и по отдельности, а также гена сиалидазы была значительно ниже.

При попарном сравнении групп было обнаружено, что концентрация ДНК *G. vaginalis* в образцах, содержащих генотипы 1, 2 и 4, также как и все генотипы и ген сиалидазы, была значительно выше в I группе женщин (с БВ) по сравнению с образцами, полученными у женщин II и III исследуемых групп. Для образцов, содержащих 3 генотип

G. vaginalis, не было обнаружено различий между концентрацией ДНК этого микроорганизма во всех трех группах ($p < 0,0001$).

Таблица 3. Концентрация ДНК *Gardnerella vaginalis* в образцах, содержащих тот или иной генотип и ген сиалидазы у женщин исследуемых групп

Генотипы	Медиана концентрации <i>G.vaginalis</i> , ГЭ/мл		
	I группа	II группа	III группа
Генотип 1	$1,1 \times 10^7$	$2,1 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$
Генотип 2	$6,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$
Генотип 3	$2,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$
Генотип 4	$5,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$
Все генотипы	$1,1 \times 10^8$	$4,7 \times 10^5$	$8,9 \times 10^3$
Ген сиалидазы	$3,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$

Из 288 исследованных образцов, в которых была обнаружена ДНК *G. vaginalis*, в 89 был выявлен только один генотип, что составило 31%. В 69% случаев (199 / 288) в образцах, содержащих ДНК *G. vaginalis*, было обнаружено одновременно несколько генотипов (два или более). Два и более генотипа чаще обнаруживались в I группе женщин (90%), один генотип в этой группе был выявлен лишь в 10% случаев. Во II группе более 2 генотипов были обнаружены в 67% клинических материалов, в III группе более 2 генотипов обнаружены лишь в 59% случаев (рис.1).



Рис. 1. Доля образцов клинических материалов, содержащих один или несколько генотипов *G.vaginalis* одновременно у обследованных женщин.

При статистическом сравнении групп женщин выявлены достоверные различия по частоте выявления двух и более генотипов *G. vaginalis*: I и II групп (ОШ 0,234, $p = 0,0019$), I и III групп (ОШ 0,163, $p < 0,0001$). Существенных различий между II и III группами женщин выявлено не было (ОШ 0,701, $p = 0,3416$).

Только один генотип *G.vaginalis* был обнаружен в 89 клинических образцах из 288, что составило 31%. Среди подавляющего большинства (84 из 89; 94%) клинических образцов, содержащих ДНК *G. vaginalis* только одного генотипа, он был представлен 4 генотипом. Из них 8 образцов (10%) были получены от женщин I группы, 19 образцов (22%) от женщин II группы, 57 из 84 (68%) образцов от женщин III группы. Распределение образцов по содержанию только одного генотипа среди оставшихся пяти из 89 выглядит следующим образом: содержащих генотип 1 *G. vaginalis* - 3 образца, 2 и 3 генотипы были выявлены в единичных образцах, причем все они были получены от группы здоровых женщин.

У 199 женщин из 288 в вагинальных образцах выявлялись одновременно несколько генотипов *G. vaginalis*, что составило 69%. Наиболее часто обнаруживались одновременно 1, 2 и 4 генотипы *G.vaginalis* (61 из 199/31%). Следующим по частоте выявления было сочетание 1 и 4 генотипов (44 из 199/22%). Также было выявлено одновременное сочетание 1, 2, 3 и 4 генотипов *G. vaginalis* у 31 женщины из 199 (15,6%), 2 и 4 генотипов – у 21 женщины (10,6%). Сочетание 1,2 и 1,3,4 генотипов было выявлено у 15 женщин (7,5%). Реже всего выявлялось сочетание 3,4 (2,5%) и 2,3,4 (2,0%) генотипов *G. vaginalis*.

Ген сиалидазы *G. vaginalis* присутствовал в вагинальном биотопе всех женщин, содержащих только 1, 2 и 3 генотипы по отдельности. Этот ген практически отсутствовал у женщин, в составе микрофлоры которых был обнаружен только 4 генотип *G. vaginalis*. В I группе женщин, у которых был выявлен только 4 генотип *G. vaginalis* (8 женщин), ген сиалидазы не был выявлен. Мы обнаружили, что ген сиалидазы присутствовал во всех образцах, содержащих более двух генотипов *G. vaginalis*, с разной частотой: 89,6% случаев в I группе, в 70,6% - во II группе и в 63,3% - в III группе. Наиболее часто ген сиалидазы был обнаружен в образцах, содержащих одновременно 1, 2 и 4 генотип *G. vaginalis* (49,3%), в I группе женщин, чем во II (15,5%) и в III группе – 8,6%.

Сравнение диагностической значимости различных генотипов *Gardnerella vaginalis*. Для определения возможности использования выявления ДНК определенных генотипов *G. vaginalis* и гена сиалидазы в диагностике бактериального вагиноза был применен ROC-анализ и построены ROC-кривые, чтобы оценить диагностическую значимость каждого генотипа *G. vaginalis* по отдельности и вместе, а также гена сиалидазы для диагностики БВ (рис.2)

Самая большая площадь под ROC-кривой с превосходной диагностической способностью была для показателя концентрации ДНК *G.vaginalis* всех генотипов

одновременно (0,933). Чуть меньшая площадь под кривой, что также является отличной диагностической величиной, была для гена сиалидазы (0,881).

Значения площади под кривой для 4 генотипа (ППК 0,857), 1 генотипа (ППК 0,827) и 2 генотипа (ППК 0,767) были чуть ниже, но также обладали хорошей диагностической способностью. Определение 3 генотипа ожидаемо не выявило способности диагностировать БВ, ППК для этого показателя составил 0,517.

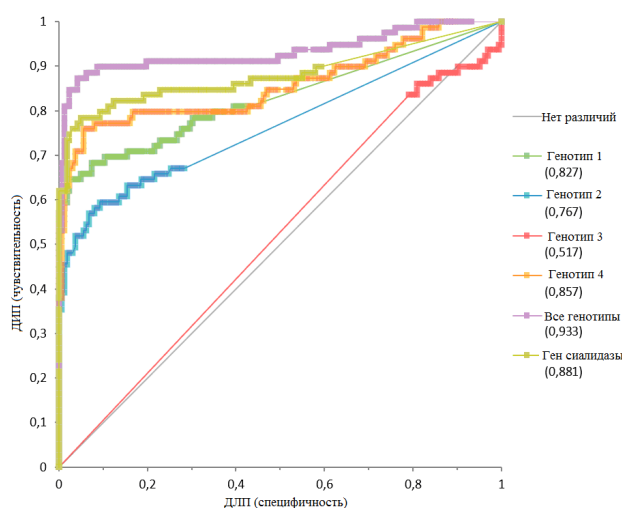


Рис. 2. Площади под ROC-кривыми (значения приведены в скобках) для различных генотипов *Gardnerella vaginalis* и гена сиалидазы. ДИП, доля истинно положительных образцов; ДЛП, доля ложно положительных образцов.

Для определения прогностической значимости генотипов *G. vaginalis* по отдельности и вместе, а также гена сиалидазы с целью диагностики БВ с использованием статистических программ были установлены значения оптимальных порогов концентрации этих показателей. Данные представлены в таблице 4.

Для определения диагностических возможностей гена сиалидазы в диагностике БВ было проведено попарное сравнение показателей концентрации ДНК разных генотипов *G. vaginalis* и выявления гена сиалидазы. Для показателей значений концентрации ДНК *G. vaginalis* 1, 2 и 4 генотипов и всех генотипов одновременно были построены ROC-кривые с достаточно значимыми ППК, то есть эти параметры обладали отличными диагностическими способностями. Но при попарном сравнении с содержанием гена сиалидазы определенной концентрации статистически значимые различия были зарегистрированы не для всех показателей.

Не установлены статистически значимые показатели для концентрации ДНК *G. vaginalis* 4 генотипа и гена сиалидазы ($p = 0,5031$). Для генотипа 3 сравнение не проводилось из-за отсутствия диагностической способности для этого показателя.

Статистически значимое различие было определено при сравнении концентрации ДНК *G. vaginalis* 2 генотипа с концентрацией гена сиалидазы ($p < 0,0001$), а также для показателей концентрации ДНК *G. vaginalis* всех генотипов и 1 генотипа и гена сиалидазы, $p = 0,0306$ и $0,0216$, соответственно.

Таблица 4. **Диагностические параметры генотипов *Gardnerella vaginalis* и гена сиалидазы для диагностики БВ в сравнении с методом Нуджента.**

Генотипы <i>Gardnerella vaginalis</i>	Площадь под ROC-кривой [95% ДИ]	Оптимальный порог, ГЭ / мл	Чувствительность при оптимальном пороге (%)	Специфичность при оптимальном пороге (%)	Значение p (тест Делонга на отличие от площади под ROC-кривой для гена сиалидазы А)
Генотип 1	0,827 [0,764-0,891]	$3,4 \times 10^5$	65	97,5	0,0216
Генотип 2	0,767 [0,700-0,833]	$6,7 \times 10^4$	48	98,1	<0,0001
Генотип 3	0,517 [0,463-0,570]	НД	НД	НД	НД
Генотип 4	0,857 [0,797-0,917]	$7,2 \times 10^5$	75,9	74,4	0,5031
Все генотипы	0,933 [0,890-0,976]	$3,4 \times 10^6$	84,8	97,5	0,0306
Ген сиалидазы	0,881 [0,824-0,938]	$2,1 \times 10^6$	73,4	98,1	-

Примечание: ДИ, доверительный интервал; НД, не определено (из-за того, что у маркера отсутствует дискриминационная способность относительно вагинальной микробиоты, характерной для бактериального вагиноза).

Значимость ассоциации различных генотипов *Gardnerella vaginalis* для диагностики рецидивирующего бактериального вагиноза. Частота выявления ДНК определенных генотипов *G.vaginalis* в группах женщин с физиологическим микробиоценозом влагалища (Норма), первым эпизодом БВ и рецидивирующим БВ представлена на рисунке 3.

Следует отметить, что 4 генотип *G.vaginalis* был самым распространенным и выявлялся во всех группах женщин, как здоровых, так и с разными формами БВ. 1 и 2 генотипы *G.vaginalis* были обнаружены у всех женщин с рецидивирующим БВ и лишь у части женщин с первым эпизодом и здоровых женщин. 3 генотип *G.vaginalis* во всех группах женщин выявлялся редко.

Среди этих групп женщин одновременно были обнаружены от одного до четырех генотипов *Gardnerella vaginalis*.

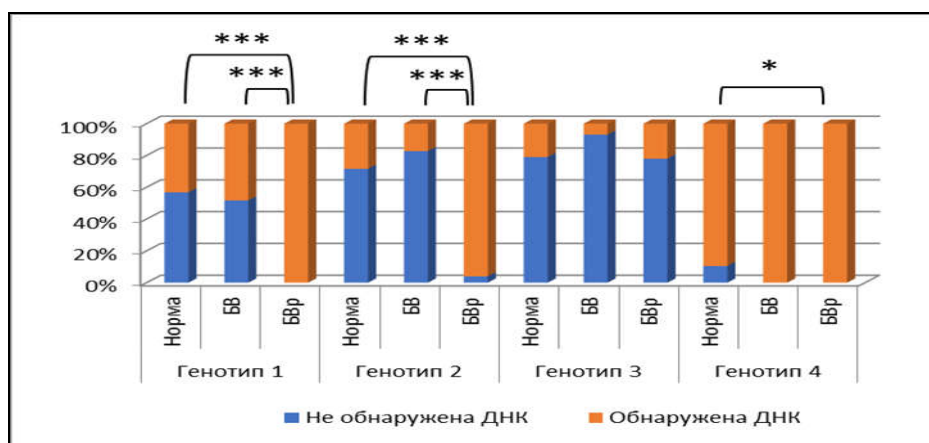


Рис.3. Частота выявления ДНК определенных генотипов *G.vaginalis* в группах женщин с физиологическим микробиоценозом влагалища (Норма), первым эпизодом БВ и рецидивирующим БВ.

Только один генотип *G.vaginalis* в 38% случаев был обнаружен в вагинальном биотопе женщин III группы, наиболее часто это был 4 генотип, а концентрация ДНК *G.vaginalis* была достаточно низкой - $10^2 - 10^3$ ГЭ/мл. Существенно реже один генотип *G.vaginalis* выявлялся в подгруппе IB ($p < 0,05$) и ни в одном случае в подгруппе женщин IA. Два генотипа *G.vaginalis*, тем более три или четыре генотипа одновременно существенно реже были обнаружены у здоровых женщин по сравнению с пациентками подгрупп IA и IB ($p < 0,001$). Также значительно ниже была и концентрация этих генотипов в группе здоровых женщин и не превышала 10^4 ГЭ/мл.

При первом эпизоде БВ (группа IB) превалировал 4 генотип *G.vaginalis*, как в качестве единственного генотипа, так и в сочетании с 1, 2 или 3 генотипами. При рецидивирующем течении БВ (группа IA) выявлялись исключительно сразу три-четыре генотипа *G.vaginalis*, причем в 78% случаев имело место сочетание 1, 2 и 4 генотипов, а концентрация ДНК составляла $10^7 - 10^8$ ГЭ/мл.

Для того, чтобы можно было с максимальной точностью диагностировать случаи рецидивирующего БВ на основании выявления генотипов *G.vaginalis*, все 299 женщин, участвующих в исследовании условно были разделены на 2 группы. В первую группу вошли пациентки с рецидивирующим БВ (50 женщин), а во вторую – группу сравнения – здоровые и женщины из группы с промежуточной микрофлорой влагалища (249).

При попарном сравнении значения концентраций ДНК различных генотипов *G.vaginalis* были получены достоверные различия ($p < 0,0001$) (рис. 4)



Рис.4. Сопоставление концентраций ДНК различных генотипов *G.vaginalis* у женщин с рецидивирующим БВ и группы сравнения.

В результате анализа была составлена математическая модель возможности развития рецидивирующего бактериального вагиноза путем подстановки значений концентраций ДНК различных генотипов *Gardnerella vaginalis* в следующие формулы:

$$Z = -12,58 + 0,49 \times X_1 + 1,04 \times X_2 + 0,95 \times X_3 + 0,78 \times X_4,$$

$$Y = -3,32 - 0,26 \times X_1 - 0,04 \times X_2 + 0,03 \times X_3 + 1,46 \times X_4,$$

Где Z - вероятность развития рецидивирующего бактериального вагиноза; Y - рецидивирующий бактериальный вагиноз не разовьется; X_1 - десятичный логарифм концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* генотипа 1; X_2 - десятичный логарифм концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* генотипа 2; X_3 - десятичный логарифм концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* генотипа 4; X_4 - десятичный логарифм простой суммы концентрации ДНК всех генотипов *Gardnerella vaginalis*.

При показателе $Z > Y$ прогноз развития рецидивирующего БВ можно ожидать с вероятностью 84%. При значении $Z < Y$, с вероятностью 95% рецидивирующий БВ не разовьется.

Таким образом, использование в разработанной нами формуле выявленных в вагинальном биотопе женщин высоких концентраций 1, 2 и 4 генотипов *Gardnerella vaginalis* позволяет рассчитать возможность развития рецидива бактериального вагиноза с 84% вероятностью, а его отсутствие - в 95% случаев.

На основании результатов проведенного исследования, а также на основании изученных данных литературы был разработан алгоритм ведения пациенток с выявленной ДНК *Gardnerella vaginalis* и разными формами бактериального вагиноза. Данные представлены на рисунке 5.

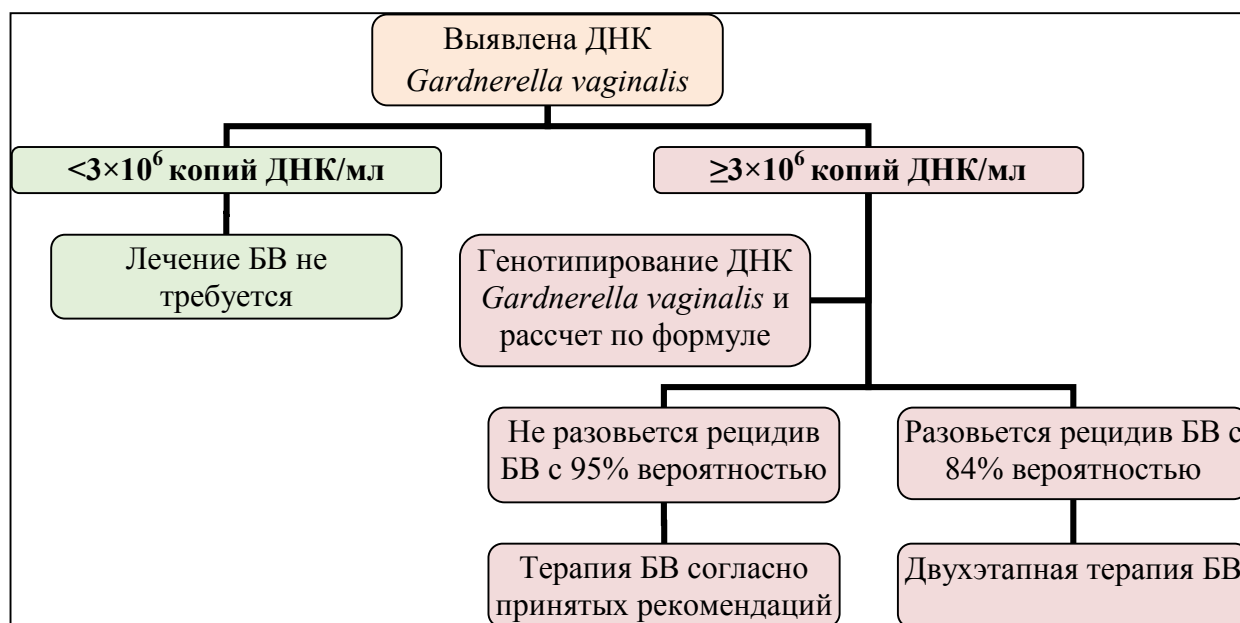


Рис.5. Алгоритм ведения пациенток с выявленной ДНК *Gardnerella vaginalis*

При выявлении ДНК *Gardnerella vaginalis* в отделяемом влагалища у женщин репродуктивного возраста методом ПЦР в реальном времени с использованием любой тест-системы важно определить концентрацию выявленной ДНК. При количестве *Gardnerella vaginalis* менее 3×10^6 копий ДНК/мл и отсутствии жалоб диагноз БВ не устанавливается и лечение БВ не рекомендуется. Обнаружение концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* $\geq 3 \times 10^6$ копий ДНК/мл следует рассматривать в качестве клинико-лабораторного маркера бактериального вагиноза. При прогнозе развития рецидивирующего БВ рекомендуется изменение тактики лечения с включением препаратов, разрушающих биопленки, антибиотиков и пробиотиков для восстановления физиологического микробиоценоза влагалища, т.е. использование трехэтапной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Частота выявления ДНК *Gardnerella vaginalis* в обследованной популяции составила 94%: у 100% женщин с БВ и промежуточным типом микробиоценоза и у 90% женщин с физиологическим микробиоценозом влагалища. Концентрация ДНК *Gardnerella vaginalis* у женщин с бактериальным вагинозом достоверно выше, чем у здоровых женщин ($p < 0,0001$), что является определяющим для постановки диагноза.

2. У 69% обследованных женщин выявляются одновременно более двух генотипов *Gardnerella vaginalis*. У женщин с бактериальным вагинозом достоверно чаще ($p < 0,005$) определяются более 2 генотипов *Gardnerella vaginalis* (90%) по сравнению со здоровыми женщинами (59%). Наиболее часто одновременно при БВ выявляются 1, 2 и 4 генотипы ($p < 0,005$).

3. Определение суммарного количества всех генотипов *Gardnerella vaginalis* обладает достоверно ($p < 0,05$) более высокой диагностической значимостью для выявления бактериального вагиноза, чем количественная оценка гена сиалидазы (площади под кривыми ROC 0,933 и 0,881, соответственно).

4. Разработана прогностическая модель с использованием молекулярных методов генотипирования *Gardnerella vaginalis*, позволяющая с вероятностью 84% определять возможность развития рецидивирующего бактериального вагиноза.

5. Разработан алгоритм ведения пациенток с разными формами бактериального вагиноза в зависимости от количества и концентрации генотипов *Gardnerella vaginalis* в вагинальном отделяемом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При скрининговом обследовании женщин репродуктивного возраста рекомендуется определять количественное содержание ДНК *Gardnerella vaginalis* в составе вагинального микробиоценоза.

2. При концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* $\leq 10^6$ копий ДНК/мл в вагинальном биотопе диагноз БВ не устанавливается и лечение БВ не проводится; при концентрации ДНК $\geq 3 \times 10^6$ копий ДНК/мл рекомендуется проводить генотипирование ДНК *Gardnerella vaginalis* для верификации клинического течения бактериального вагиноза.

3. Для проведения персонифицированной оценки возможности развития рецидивирующего бактериального вагиноза следует использовать следующие формулы расчета:

$$Z = -12,58 + 0,49 \times X_1 + 1,04 \times X_2 + 0,95 \times X_3 + 0,78 \times X_4,$$

$$Y = -3,32 - 0,26 \times X_1 - 0,04 \times X_2 + 0,03 \times X_3 + 1,46 \times X_4,$$

Где Z - вероятность развития рецидивирующего бактериального вагиноза; Y - рецидивирующий бактериальный вагиноз не разовьется; X_1 - десятичный логарифм концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* генотипа 1; X_2 - десятичный логарифм концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* генотипа 2; X_3 - десятичный логарифм концентрации ДНК *Gardnerella vaginalis* генотипа 4; X_4 - десятичный логарифм простой суммы концентрации ДНК всех генотипов *Gardnerella vaginalis*.

При показателе $Z > Y$ прогноз развития рецидивирующего БВ можно ожидать с вероятностью 84%. При значении $Z < Y$, с вероятностью 95% рецидивирующий БВ не разовьется.

В результате вероятности развития рецидива бактериального вагиноза рекомендуется изменение тактики лечения с включением препаратов, разрушающих биопленки, антибиотиков и пробиотиков для восстановления физиологического

микробиоценоза влагалища: использование двухэтапной терапии – после применения местных антибиотиков/антисептиков назначение локальных пробиотиков, содержащих лактобациллы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Необходимо дальнейшее исследование гарднерелл в свете предложенной принципиально новой таксономической классификации, устанавливающей, что род *Gardnerella* включает как минимум 13 отдельных генетических видов (Vanechoutte M. et al., 2019) Персонализированный подход к диагностике и терапии БВ на основании генотипирования ДНК *Gardnerella vaginalis* повысит эффективность лечения БВ, улучшит качество жизни женщин, снизит нагрузку на амбулаторные учреждения здравоохранения и улучшит демографическую ситуацию в стране вследствие снижения частоты осложнений в случае развития восходящей инфекции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертационных работ по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

1. **Крысанова А.А.**, Гущин А.Е., Савичева А.М. Значение определения генотипов *Gardnerella vaginalis* в диагностике рецидивирующего бактериального вагиноза. Медицинский алфавит. 2021; (30): 48–52. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2021-30-48-5>.

2. Будиловская О.В., **Крысанова А.А.**, Шипицына Е.В., Переверзева Н.А., Воробьева Н.Е., Герасимова Е.Н., Григорьев А.Н., Савичева А.М. Диагностика вагинальных инфекций с учетом профилей лактобациллярной микрофлоры и локального иммунного ответа слизистой влагалища // Молекулярная медицина. -2020.-№3(18).-с. 56-64.

3. Шипицына Е.В., Хуснутдинова Т.А., Рыжкова О.С., **Крысанова А.А.**, Будиловская О.В., Рыбина Е.В., Воробьева Н.Е., Савичева А.М. Микробиологические, поведенческие и клиничко-анамнестические предикторные факторы бактериального вагиноза у женщин с выделениями из влагалища // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016, том LXV, N3, С.32-42.

4. Шипицына Е.В., Хуснутдинова Т.А., Рыжкова О.С., **Крысанова А.А.**, Будиловская О.В., Рыбина Е.В., Воробьева Н.Е., Савичева А.М., Гущин А.Е. Сравнение эффективности диагностики бактериального вагиноза по клиническим признакам с результатами лабораторных исследований // Журнал акушерства и женских болезней. 2016, том LXV. №4 с. 76–82.

-патент

5. **Крысанова А.А.**, Будиловская О.В., Хуснутдинова Т.А., Савичева А.М., Тапильская Н.И., Милютин Ю.П. Патент 2765917 Российская Федерация, МПК G01N 33/569 (2021.08); G01N 33/582 (2021.08); C12Q 1/6806 (2021.08); C12Q 1/6844 (2021.08); C12Q 1/6883 (2021.08); C12Q 1/689 (2021.08) «Способ прогнозирования рецидивов бактериального вагиноза» - № 2021116883, заявл. от 09.06.2021; опубл. 04.02.2022. Электрон. версия печ. публ. Бюл. изобр. № 4. – Доступ с сайта ФГУ ФИПС.

Статьи в научных журналах, тезисы докладов в материалах конференций

6. **Крысанова А.А.** *Gardnerella vaginalis*: генотипическое и фенотипическое разнообразие, факторы вирулентности и роль в патогенезе бактериального вагиноза // *Журнал акушерства и женских болезней*. — 2019. — Т. 68. — № 1. — С. 59–68.

7. **Крысанова А.А.**, Шалепо К.В., Хайруллина Г.А., Шипицына Е.В., Гушин А.Е., Савичева А.М. Связь генотипов *Gardnerella vaginalis* с бактериальным вагинозом // Сб. трудов IX Всерос науч-пр конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» Москва, 18-20 апреля 2017, М., 2017, том 1, с. 348-349.

8. **Крысанова А.А.** Диагностическая и клиническая значимость выявления генотипов *Gardnerella vaginalis*. // Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии XXIII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, Проблемы медицинской микологии. 2020. т. 22, №3, с.93.

9. Савичева А.М., Шалепо К.В., Спасибова Е.В., Будилова О.В., **Крысанова А.А.**, Хуснутдинова Т.А., Шипицына Е.В. Микробиота урогенитального тракта женщин. Значение в репродукции // Проблемы медицинской микологии. 2020. Т. 22. № 3. С. 123.

10. **Крысанова А.А.**, Гушин А.Е., Савичева А.М. Значение генотипов *Gardnerella vaginalis* в диагностике рецидивирующего бактериального вагиноза // Проблемы медицинской микологии. 2021. Т. 23. №2. С. 98.

Прочие публикации

11. Савичева А.М., Шипицына Е.В., Хуснутдинова Т.А., **Крысанова А.А.**, Будилова О.В., Рыбина Е.В., Воробьева Н.Е. Преступный дуэт. Частота выявления *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* у женщин с выделениями из влагалища и их связь с бактериальным вагинозом // *StatusPraesens*. 2016, №3 [32], с. 122-128.

12. Shipitsyna E., **Krysanova A.**, Khayrullina G., Shalepo K., Savicheva A., Guschin A., Unemo M. Quantitation of all four *Gardnerella vaginalis* clades detects abnormal vaginal microflora characteristic of bacterial vaginosis more accurately than putative *G. vaginalis* sialidase A gene count // *Molecular Diagnosis and Therapy*. 2019; 23(1):139-147.

13. Савичева А.М., **Крысанова А.А.**, Лищук О.В. Единственная в своем роде? Современные данные о *Gardnerella vaginalis* и ее роли в развитии бактериального вагиноза // *StatusPraesens*. Гинекология, акушерство, бесплодный брак. - 2019.- №5 [61]. - с. 32-40.

14. Shipitsyna E., Khusnutdinova T., Budilovskaya O., **Krysanova A.**, Shalepo K., Savicheva A., Unemo M. Bacterial vaginosis microflora is an age-independent risk factor for *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* infections in a case-control study among low-risk women in St. Petersburg, Russia // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020; 39(7):1221-1230.

15. Савичева А.М., Тапильская Н.И., **Крысанова А.А.**, Будилова О.В., Хуснутдинова Т.А., Шалепо К.В. Отдаленные результаты двухэтапного лечения бактериального вагиноза с применением антисептиков и пробиотиков // *Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение*. 2021. Т. 9, № 4. С. 19–28.

16. Тапильская Н.И., Будилова О.В., **Крысанова А.А.**, Толибова Г.Х., Копылова А.А., Цыпурдеева Н.Д., Гзгзян А.М., Савичева А.М., Коган И.Ю. Микробиота эндометрия женщин с хроническим эндометритом и идиопатическим бесплодием // *Акушерство и гинекология*. 2020. № 4. С. 72-81.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БВ – бактериальный вагиноз

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДНК – дезоксирибонуклиновая кислота

ИППП – инфекции, передаваемые половым путем

ЛПС – липополисахарид

МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот

ПЦР – полимеразная цепная реакция

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

СМБ – сердечно-мозговой бульон

ARDRA - рестрикционный анализ амплифицированной рибосомальной ДНК

CPN60 – шаперонин 60 кДа

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

VLY - вагинолизин