

**РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени Н.И. Пирогова**

Кафедра клинической лабораторной диагностики ФДПО

Щербо Сергей Николаевич

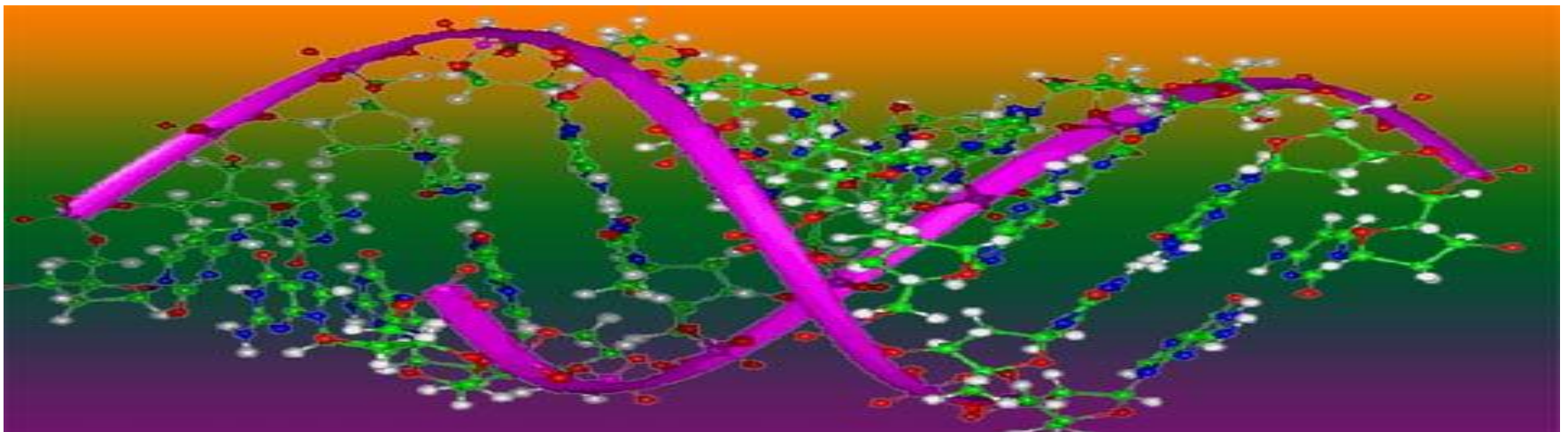
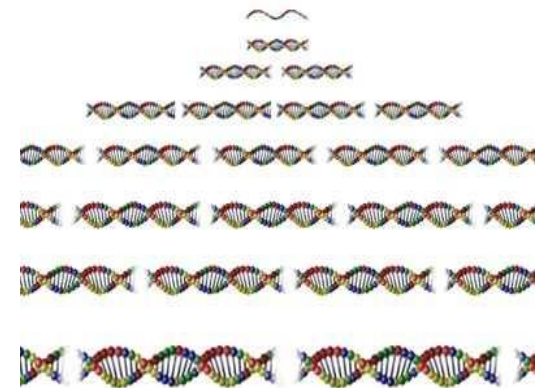
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

ДИАГНОСТИКИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ

ИНФЕКЦИЙ

МЕТОДЫ ГЕНОДИАГНОСТИКИ

- ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ нуклеиновых кислот
- АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
- СЕКВЕНИРОВАНИЕ нуклеиновых кислот



РАЗДЕЛ ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЙ РАЗЛИЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

ILLUMINA

Флуоресцентное
секвенирование
Полногеномное
секвенирование
(WGS), секвенирование
геномов de novo,
теория эволюции,
происхождение человека.

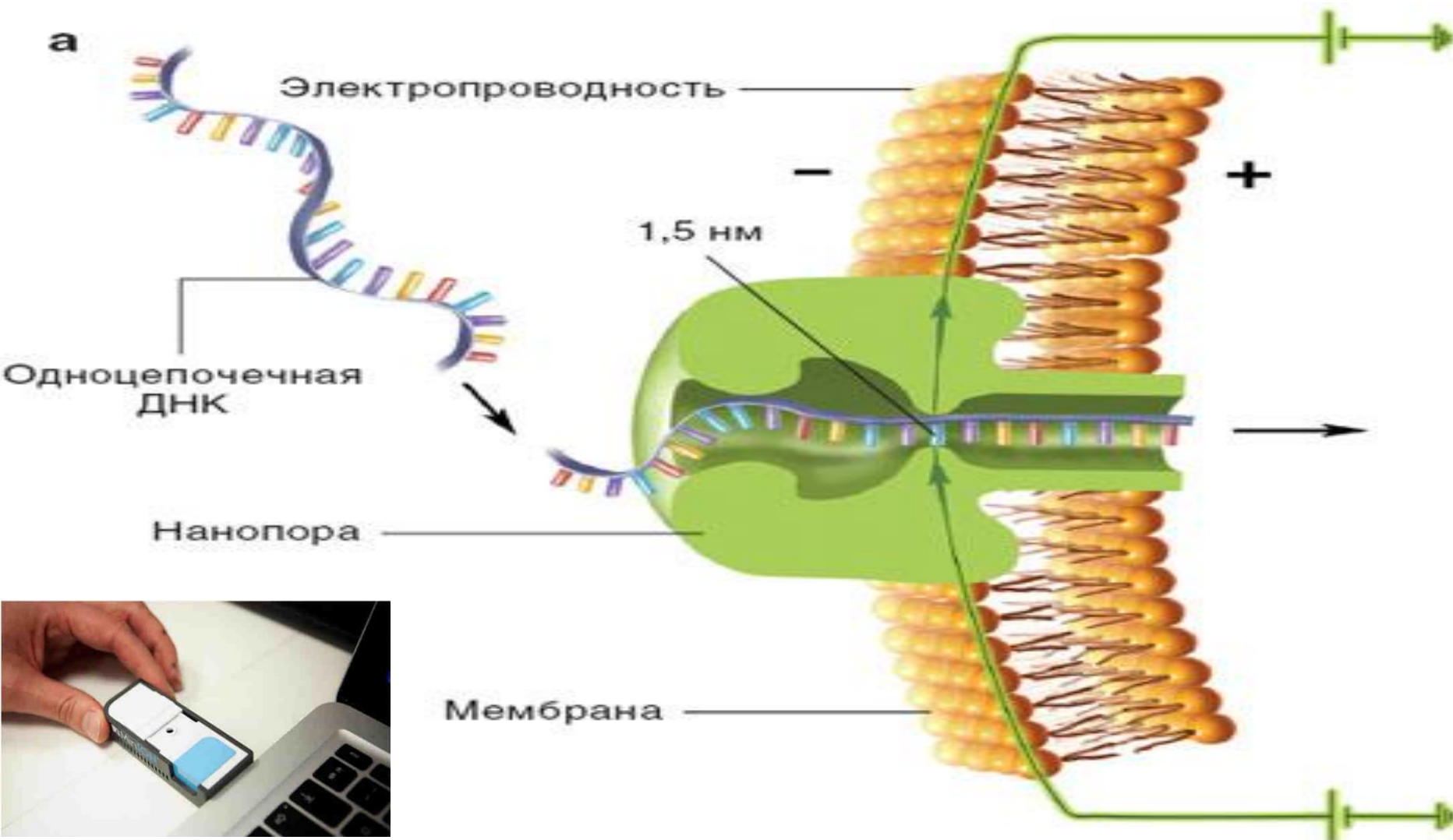
ThermoFisher
Scientific

Полупроводниковое
секвенирование
Таргетное
секвенирование
WGS бактерий и вирусов,
медицинская, фармако и
этногенетика

Oxford NANOPORE

Нанопоровое секвенирование
Генодиагностика инфекционных болезней, WGS (CNV)

СИКВЕНС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОПОР





**MinION sequencer from Oxford
Nanopore Technologies**



MinION

Вес 78 г

Мощность 1 Вт

Размеры 105x23x33 мм

Количество нанопор до 512

Стоимость ячейки от 500 до 900\$

Производительность 10...20 Гигабаз за 48 ч.

АМПЛИФИКАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ:

**ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ
(ПЦР);**

ЛИГАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ЛЦР);

ИЗОТЕРМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ.

Преимущества в использовании нуклеиновых кислот для диагностики

- **Универсальность генетического кода, а следовательно и процедуры проведения анализа (сходные наборы и операции)**
- **Быстрота в создании наборов реагентов для новых генетических полиморфизмов или инфекционных агентов (атипичная пневмония, птичий грипп)**
- **Возможность получения высокой чувствительности и специфичности анализа (амплификационные методы)**
- **Одновременная качественная или количественная детекция нескольких генетических полиморфизмов или инфекционных агентов**
- **Интенсивное развитие методов: новые технологии выделения, амплификации, детекции (оборудование, биочипы)**

Медицинские применения ПЦР

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ, ОНКОЛОГИЧЕСКИХ , ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

Клиническая лабораторная диагностика

Наследственные заболевания и предрасположенность

HLA-типирование

Инфекционные заболевания

Качественные методы:

Безопасность переливания крови

**Диагностика инфекционных
заболеваний**

Контроль излеченности

Генотипирование

Определение мутаций устойчивости к лекарственным средствам

Количественные методы:

Определение вирусных нагрузок

Оценка терапевтического эффекта и прогноз ее эффективности

УНИКАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЦР

Высокая чувствительность

Аналитическая чувствительность представляет собой то минимальное количество копий ДНК или РНК в одном миллилитре раствора образца, которое может быть определено данной тест-системой. Аналитическая чувствительность тест-систем для выявления ДНК (РНК) микроорганизмов методом ПЦР составляет **100 –1000 геном-эквивалент/мл.**

Диагностическая чувствительность оценивается в процентах и определяет количество пациентов с данным заболеванием, дающих истинно положительные результаты при использовании конкретного набора и составляет от **95 до 100%.**

Высокая специфичность

Диагностическая специфичность ПЦР тест-систем также достаточно высокая. Для ПЦР-наборов "Рош" она оценивается в **99-100%.** Пример: вирус папилломы человека (ВПЧ): удастся выделить один или все онкогенные типы 16, 18, 33 и др.

Полимеразная цепная реакция

- ПЦР сопряженная с обратной транскрипцией
- Гнездовая ПЦР
- ПЦР in situ
- Количественная ПЦР
- Мультипраймерная ПЦР
- ИммуноПЦР
- Аллель-специфическая ПЦР
- Цифровой ПЦР
- Ассиметричная ПЦР
- ПЦР с «горячим стартом»
- Амплификация больших фрагментов ДНК с высокой точностью
- ПЦР, чувствительная к метилированию матрицы

Мультиплексная ПЦР

Принцип метода:

Присутствие в реакционной смеси нескольких пар праймеров:

- анализ разных генетических локусов,**
- анализ нескольких различных инфекционных агентов, их видов, типов.**



МУЛЬТИПРАЙМЕРНЫЕ НАБОРЫ НПФ «ГЕНТЕХ»

2 ПАРЫ

Хламидия трахоматис, 316
Уреаплазма уреалитикум, 466

Микоплазма гениталиум, 281
Микоплазма гоминис, 374

Трихомонас вагиналис, 320
Гонококк, 591

ВПГ 1 и 2, 220
ЦМВ, 340

Кандида альбиканс, 372
Гарднерелла вагиналис, 820

ВПЧ 18, 300
ВПЧ 16, 538

3 ПАРЫ

ВПГ 1 и 2, 220
ЦМВ, 340
ЭБВ, 610

Хламидия трахоматис, 200
Микоплазма гоминис, 374
Уреаплазма уреалитикум, 466

4 ПАРЫ

Хламидия трахоматис, 200
Микоплазма гениталиум, 281
Микоплазма гоминис, 374
Уреаплазма уреалитикум, 466

5 ПАР

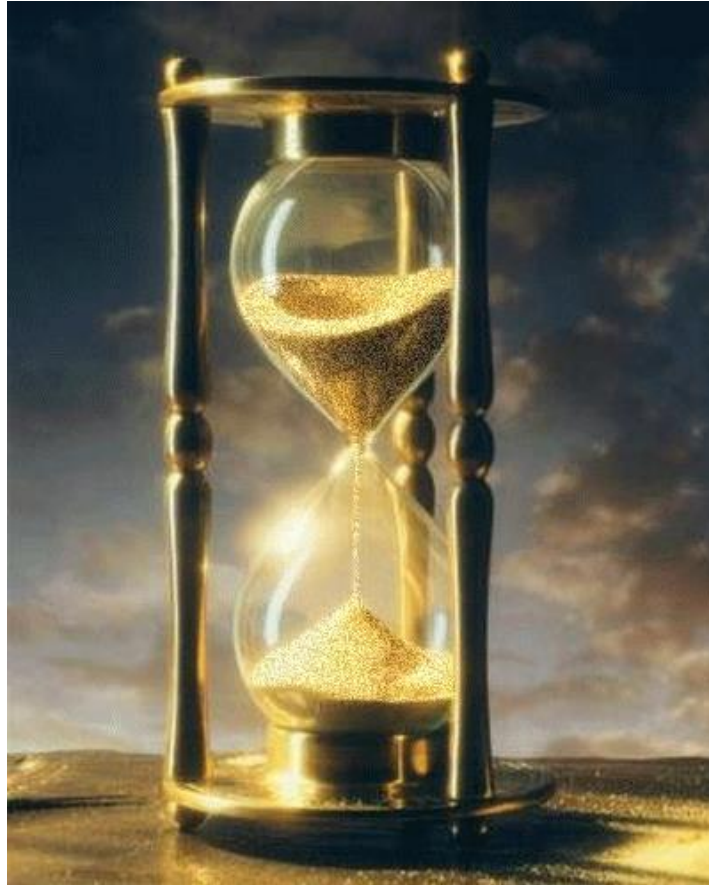
Стоматология

Хламидия трахоматис, 200
Микоплазма гениталиум, 281
Микоплазма гоминис, 374
Уреаплазма уреалитикум, 466
Уреаплазма Т 960

БЫСТРЫЙ ПЦР

Компания Roche представила в 2014 г. простой, компактный автоматический анализатор cobas Liat System предназначенный для молекулярной экспресс диагностики **(20 минут)** методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени в кабинетах врачей, аптеках и экспресс лабораториях больниц. Меню тестов для анализатора включает в себя наборы для диагностики гриппа cobas Influenza A/B и стрептококка A cobas Strep A.

ПЦР с детекцией в режиме реального времени.



ТИПЫ ИЗМЕРЕНИЙ ПЦР РВ

Качественный или количественный анализ

Абсолютное число копий матрицы

- диагностика инфекционных возбудителей

Относительное число копий матрицы

- хромосомные нарушения
- моногенные заболевания
- генетическая предрасположенность
- анализ экспрессии генов
- профиль метилирования

ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ (ИППП):

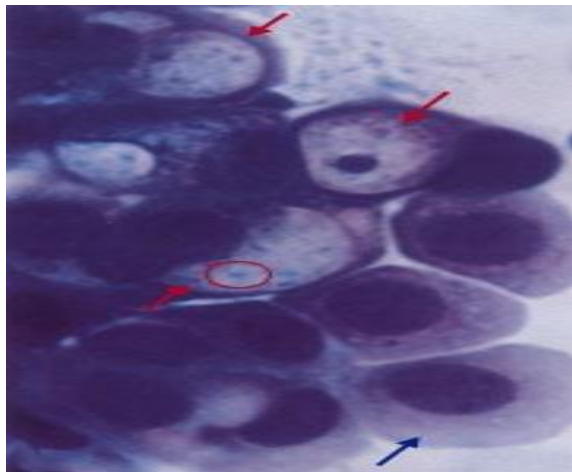
В соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра, к ИППП относятся сифилис, гоноккоковая, хламидийная (урогенитальная), трихомонадная инфекции, паховая гранулема (донованоз), шанкроид (мягкий шанкр), хламидийная (венерическая) лимфогранулема, аногенитальный герпес, аногенитальные бородавки.

ХЛАМИДИЯ ТРАХОМАТИС (CHLAMYDIA TRACHOMATIS)

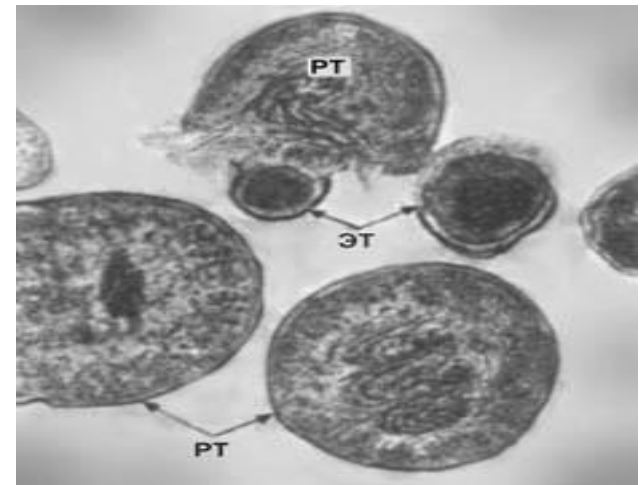
Хламидии имеют вид мелких кокков. Это внутриклеточные паразиты с уникальным циклом развития, включающие две различные по строению и биологическим свойствам формы существования, которые обозначены как элементарные (ЭТ) и ретикулярные тельца (РТ)

Коварство хламидийной инфекции состоит в том, что у 3 из 4 женщин она протекает БЕССИМПТОМНО (стёрто или вовсе незаметно). Вдвойне это опасно тем, что при беременности хламидии повреждают многие системы формирующегося плода, а при инфицировании в родах резко повышают угрозу пневмонии и конъюнктивита у новорождённых.

Здоровая клетка

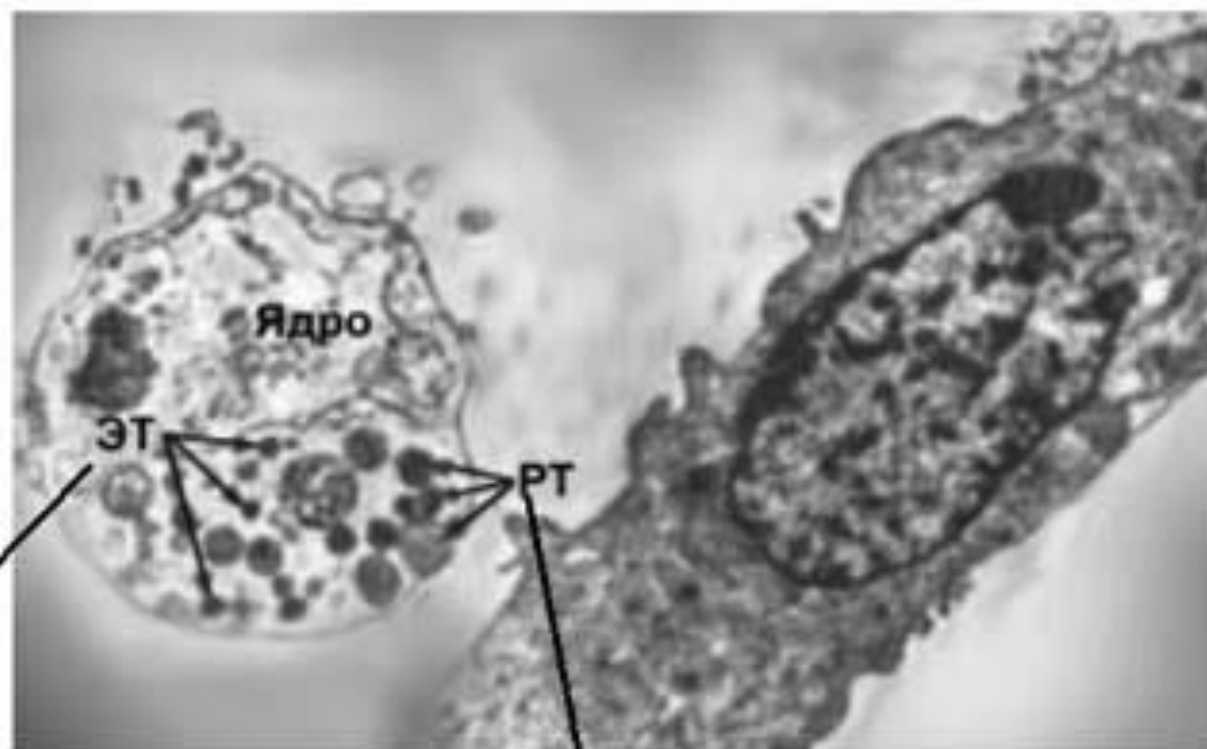


Клетка, пораженная хламидией



Chlamidia trachomatis

хламидия - внутриклеточный паразит.



ЭТ - Инфекционные
элементарные тельца,
размер 0.2-0.3 мкм

Ретикулярные тельца (0.5 - 0.7 мкм) -
внутриклеточная форма
существования хламидии

БИОВАРЫ *Chlamydia trachomatis*

Хламидии (*Chlamydia trachomatis*) как этиологический агент вызывают значительную заболеваемость: в 2008 г., по оценкам ВОЗ, зарегистрировано 106 млн. новых случаев урогенитального хламидиоза. *Chlamydia trachomatis* составляет три биовара, каждый из которых содержит несколько сероваров, или генотипов. Подразделение на биовары зависит от типа и локализации инфекции и вирулентности заболевания.

Глазной биовар (трахома, конъюнктивиты) состоит из сероваров (А-С, В может выделяться и из половых путей).

Преобладающий биовар состоит из сероваров D-K, которые передаются половым путем, вызывая уретрит у мужчин и цервицит и уретрит у женщин. Бессимптомное течение УГИ наблюдается у 50% мужчин и 90% женщин. У новорожденных может развиваться хламидийная пневмония.

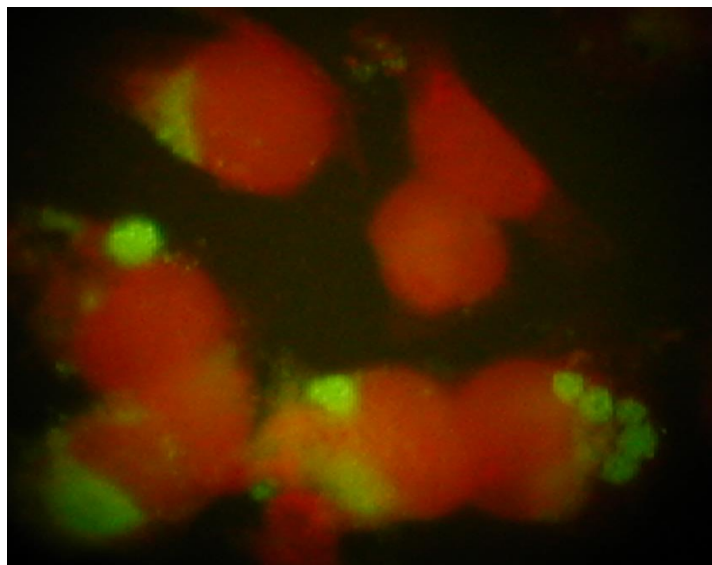
LGV-биовар, состоящий из сероваров L1-L3 тропен к лимфоидным тканям и вызывает более агрессивное течение и системное течение заболевания.(венерическая лимфогранулема).

Диагностика

Культуральный метод

Преимущества метода

- высокая специфичность
- диагностическая значимость



Недостатки метода

- низкая чувствительность от 40 до 85 %
- требует условий специализированной лаборатории
- срок выполнения 4-7 дней
- строгие условия транспортировки и хранения
- контаминация посторонней флорой

Культуральный метод

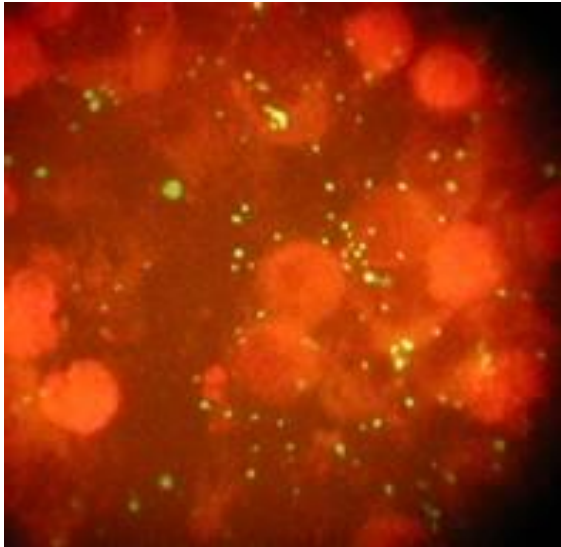
Для выделения хламидий могут использоваться различные культуры клеток (L-929, McCoy, HeLa-229), обработанные циклогексимидом.

При окрашивании по Романомскому-Гимзе ЭТ хламидий имеют розовый цвет, РТ – синий.

Длительное время считался «золотым стандартом», пока в 2000 г. Третье Европейское совещание по хламидиям не пересмотрело данную позицию по причине появления положительных результатов ПИФ и ИФА при отрицательных результатах культурального метода.

В настоящее время применение метода не рекомендовано в рутинных исследованиях.

Метод прямой иммунофлуоресценции



Окраска
флуоресцирующими
моноклональными
антителами

Преимущества

- Метод обладает хорошей чувствительностью
- Простота постановки метода и быстрота получения результатов
- Непосредственное определение возбудителя в исследуемом образце.

Недостатки

- Ложноотрицательные результаты часто связаны с малым количеством клеток в пробе.
- Ложноположительные результаты возможны при наличии в образце бактерий, имеющих перекрестно-реагирующие антигены с антигенами хламидий, однако специфичность тестирования во многом определяется квалификацией персонала.

Метод прямой иммунофлуоресценции (ПИФ)

Метод ПИФ предусматривает использование моноклональных антител против липополисахаридного или белкового антигенов хламидий. ПИФ позволяет идентифицировать ЭТ возбудителя, его чувствительность к РТ ниже. Существуют риски гипер- и гиподиагностики, обусловленные субъективным характером оценки результатов.

В соответствии с Клиническими рекомендациями РОДВК 2012 г., применение ПИФ для диагностики хламидийной инфекции недопустимо.

Иммуноферментный метод для выявления антигена хламидий

- **Чувствительность – 20-85% в зависимости от тест-системы**
- **Преимущества: возможность тестирования большого числа образцов, быстрота, автоматизация, низкая стоимость**
- **Недостатки: высокая специфичность только при подтверждении положительных результатов, может использоваться только с инвазивными образцами**
- **Иммунологический ответ слабый, часто у больных иммунодефициты, поэтому Ig определяются в больших титрах**

Выбор метода исследования для различных клинических образцов (согласно рекомендациям ВОЗ)

Эндоцервикальные соскобы и уретральные соскобы

(у мужчин)

Показания

- Скрининговые исследования
- Эндоцервициты
- Уретриты (у мужчин)
- Воспалительные заболевания брюшины
- Бартолиниты
- Эпидидимит
- Перигепатит
- Проктит
- Реактивный артрит
- Конъюнктивит

Метод исследования

1. Амплификационные тесты (АТ)
 - обеспечивают высокую чувствительность
2. Выявление антигена
 - при отсутствии амплификационных тестов или из-за их высокой стоимости
3. Подтверждающий тест
 - рекомендован после получения положительного результата при скрининговом исследовании в группах с низким уровнем инфицированности или у больных с противопоказаниями к лечению

Выбор метода исследования для различных клинических образцов (согласно рекомендациям ВОЗ)

Образцы мочи

Показания

Женщины: скриниговые исследования и обследование

Мужчины: скрининговые исследования

Метод исследования

Амплификационные тесты

- обеспечивает высокую чувствительность
- другие тесты не пригодны из-за низкой чувствительности или присутствия ингибиторов при культивировании
- рекомендован подтверждающий тест
 - после получения положительного результата при скрининговом исследовании в группах с низким уровнем инфицированности или у больных с противопоказаниями к лечению

ПЦР ДИАГНОСТИКА CHLAMYDIA TRACHOMATIS

- В качестве мишени для создания праймеров можно использовать нуклеотидные последовательности генов MOMP и 16S рРНК, а также криптической плазмиды хламидий, причем каждая из них обладает своими особенностями, преимуществами и недостатками
- Оптимальным представляется комплексный подход к диагностике хламидиоза: с учетом чувствительности и специфичности наиболее целесообразно применять по крайней мере два метода, например метода прямой иммунофлуоресценции с ПЦР (методические рекомендации ЦНИКВИ, 2003 г.)
- Первое контрольное исследование методом ПЦР рекомендовано проводить от 30 до 45 дней после окончания лечения.

ГЕНОДИАГНОСТИКА CHLAMYDIA TRACHOMATIS

- **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА NASBA:**
КОНТРОЛЬ ИЗЛЕЧЕННОСТИ РНК ИСЧЕЗАЕТ
БЫСТРЕЕ, чем ДНК (ЧЕРЕЗ 14 ДНЕЙ)
Чувствительность выше, так как хромосома ДНК
1 копия, плазмидной ДНК 5 – 20 копий,
РНК 1000 копий на элементарное тельце.
Острая и хроническая форма, более 10000 копий
связывают с патологией.
- **Mandell, Douglas, Bennetts 2006 год: ПИФ**
чувствительность 50-80%, предел 50-1000 ЭТ, НГА
чувствительность 50-90%, предел 10-100 ЭТ,
амплификационные методы: чувст. 81-100%
(моча 80-96% мужчины и 90-96% женщины),
предел 1-10 ЭТ.

**Применение молекулярно-генетических методов
диагностики CHLAMYDIA TRACHOMATIS
рекомендовано:**

2010 г.

**Центрами по контролю и профилактики заболеваний
(CDC) США**

2012 г.

РОДВК

Гильдией специалистов по ИППП (IUSTI)

**Британской Ассоциацией сексуального здоровья и ВИЧ
(BASHH).**

2014 г.

Российским обществом акушеров-гинекологов (РОАГ)

УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ ХЛАМИДИОЗ

Приоритетным методом в лабораторной диагностике **урогенитального хламидиоза** являются методы амплификации нуклеиновых кислот в США, в Европе (наряду с прямой иммунофлюоресценцией и ИФА) и России (наряду с культуральным исследованием, а ПИФ исключен из российского стандарта).

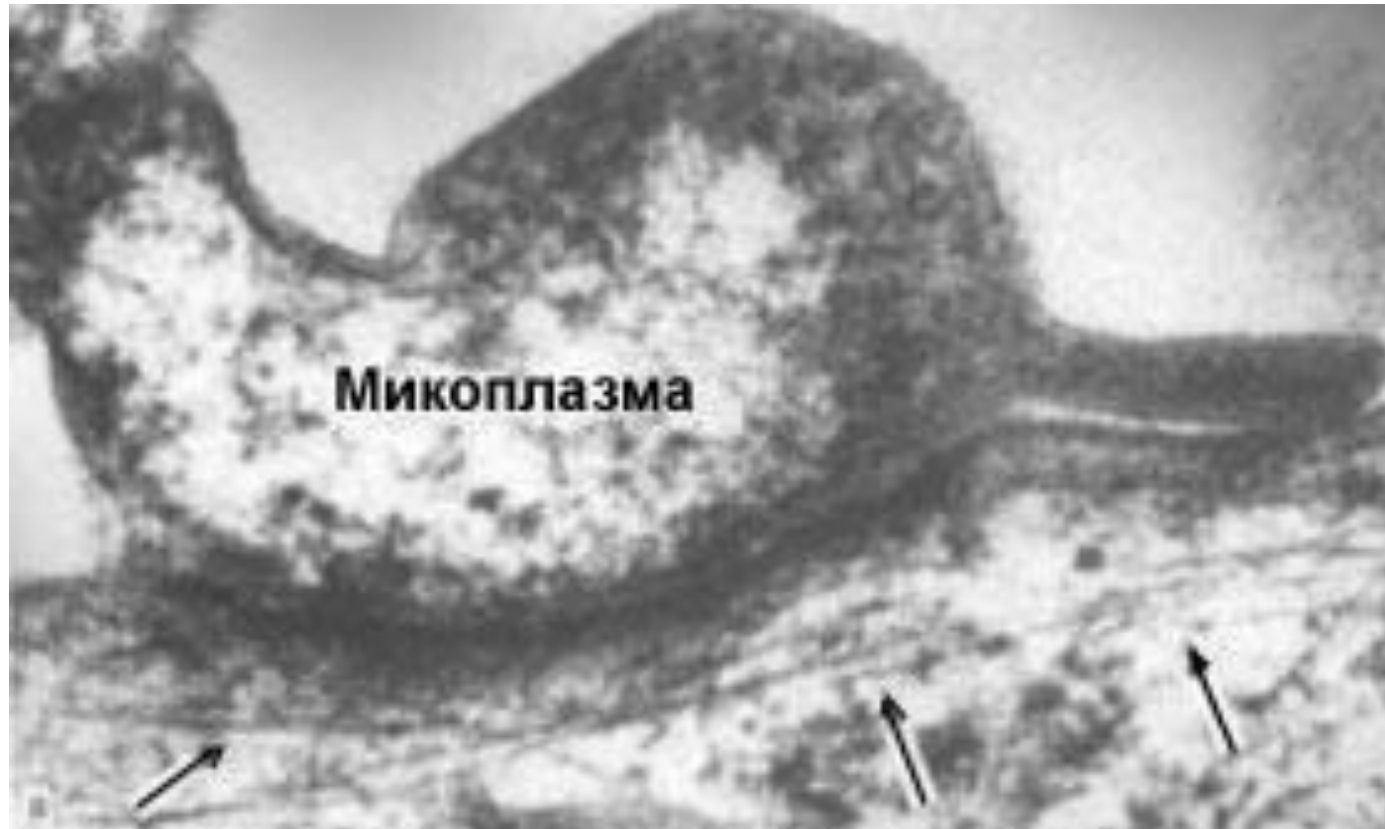
МЕТОД ПЦР

Метод ПЦР регламентирован для диагностики хламидийной инфекции, дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний вульвы и влагалища; использование метода согласуется с Приказом 572н от 01.11.2012 и Клиническими рекомендациями по ведению больных с ИППП и урогенитальными инфекциями (РОДВК, 2012).

МИКОПЛАЗМЫ (mycos-гриб, plasma-форма) класс Mollicutes (molis-мягкий, cutes-кожа)

**ЧЕЛОВЕК ЯВЛЯЕТСЯ ХОЗЯИНОМ 15 ВИДОВ
МИКОПЛАЗМ (4 ВИДА: M.genitalium, M. hominis,
Ureaplasma urealiticum, Ureaplasma parvum
ТРОПНЫ К ЭПИТЕЛИЮ УРОГЕНИТАЛЬНОГО
ТРАКТА – 3 ИЗ НИХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ, НЕ ИМЕЮТ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ,
НЕ СИНТЕЗИРУЮТ ЭКЗО - И ЭНДОТОКСИНЫ И
ПРИКРЕПЛЯЮТСЯ К МЕМБРАНАМ
ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК) .**

**МИКОПЛАЗМЫ (mucos-гриб, plasma-форма)
класс Mollicutes (molis-мягкий, cutes-кожа)**



Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum

СПОСОБНЫ ВЫЗЫВАТЬ:

УРЕТРИТ

ЦЕРВИЦИТ

ВАГИНИТ

ВЗОМТ

МУЖСКОЕ И ЖЕНСКОЕ БЕСПЛОДИЕ

**СПОНТАННЫЕ АБОРТЫ, ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫЕ
РОДЫ, ПОСЛЕРОДОВЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ**

РОЖДЕНИЕ ДЕТЕЙ С НИЗКОЙ МАССОЙ ТЕЛА

МИКОПЛАЗМЫ (mycos-гриб, plasma-форма) класс Mollicutes (molis-мягкий, cutes-кожа)

**ЧЕЛОВЕК ЯВЛЯЕТСЯ ХОЗЯИНОМ 15 ВИДОВ
МИКОПЛАЗМ (4 ВИДА: M.genitalium, M. hominis,
Ureaplasma urealiticum, Ureaplasma parvum
ТРОПНЫ К ЭПИТЕЛИЮ УРОГЕНИТАЛЬНОГО
ТРАКТА – 3 ИЗ НИХ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ, НЕ ИМЕЮТ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ,
НЕ СИНТЕЗИРУЮТ ЭКЗО - И ЭНДОТОКСИНЫ И
ПРИКРЕПЛЯЮТСЯ К МЕМБРАНАМ
ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК) .**

Лабораторная диагностики микоплазма гениталиум (*M. genitalium*)

Культуральный метод. Несмотря на развитие в последние годы техники культивирования, выделение указанного микроорганизма трудоемко и занимает длительное время: от нескольких недель до месяцев.

Серологический метод. Антигенная общность *M. genitalium* и *M. pneumoniae* затрудняет серологическую диагностику и в настоящее время ни один из серологических тестов определения *M. genitalium* не стал рутинным.

Лабораторная диагностики микоплазма гениталиум (*M. genitalium*)

ПЦР-диагностика. В 2002 г. опубликовано первое исследование по диагностике *M. genitalium* методом ПЦР РВ. В качестве мишеней для ПЦР-диагностики используются консервативные регионы гена адгезина *M. genitalium* MgPa и 16S рРНК. В качестве альтернативы ПЦР предложен метод транскрипционно-опосредованной амплификации (ТМА), мишенью в котором является рибосомальная РНК. Высокая чувствительность указанного подхода обусловлена наличием тысяч копий рРНК на одну клетку. В представительном исследовании показано, что тестирование проб мочи у мужчин методом ПЦР выявляет больше инфицированных лиц (98%), чем в соскобах из уретры (82%), а у женщин в моче (71%) и при совместном анализе мочи и уретрального соскоба в 96% образцов.

С 2000 г. :

В связи с введением в РФ МКБ-10 инфекции ассоциированные с *U. urealyticum* и *M. hominis*, были исключены из списка ИППП и выделены в отдельный пункт: «Инфекция, вызванная микоплазмой, неуточненная» (A49.3). Существует принципиальное отличие диагностики инфекций, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, от инфекций, вызванных облигатными патогенами. При выявлении их без клинических проявлений, лечение не проводится (РОДВК, 2012 г.).

РОДВК, 2012 г.

В клинических рекомендациях по ведению больных с ИППП и урогенитальным инфекциям, указано что выявление *M. hominis* и/или *Ureaplasma spp.* в количестве более 10^4 геном-экв/мл и при отсутствии клинических и/или лабораторных признаков воспалительного процесса мочеполовой системы лечение не проводится.

Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Ureaplasma urealyticum

Mycoplasma hominis часто встречается в соскобах при бактериальном вагинозе.

14 серотипов U. urealyticum образуют два биовара T960 (серотипы 2,4,5,7-13) и Parvo (1,3,6 и 14), которые объединяют в себе штаммы с одинаковыми признаками: электрофоретической подвижностью клеточных белков, размером генома (биовар Parvo 760 т.п.о. и биовар T960 840-1140 т.п.о.), отличием в гене 16S рРНК, спектром рестриктазных фрагментов и рядом других.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ОБСЕМЕНЕННОСТИ

Количественное измерение *Ureaplasma urealyticum* методами конкурентной и мультипраймерной ПЦР показало, что среднее число клеток уреаплазм, приходящихся на одну эпителиальную клетку цервикального канала женщин варьируется от 0,05 до 10.

**УВЛИЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
НАГРУЗКИ И ПЛОТНОСТИ
ОБСЕМЕНЕННОСТИ МОЖЕТ
РАССМАТРИВАТЬСЯ КАК ОДИН ИЗ
ВАЖНЕЙШИХ ФАКТОРОВ УСИЛИВАЮЩИХ
ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ.**

Лабораторная диагностики микоплазма гениталиум (*M. genitalium*)

Культуральный метод. Несмотря на развитие в последние годы техники культивирования, выделение указанного микроорганизма трудоемко и занимает длительное время: от нескольких недель до месяцев.

Серологический метод. Антигенная общность *M. genitalium* и *M. pneumoniae* затрудняет серологическую диагностику и в настоящее время ни один из серологических тестов определения *M. genitalium* не стал рутинным.

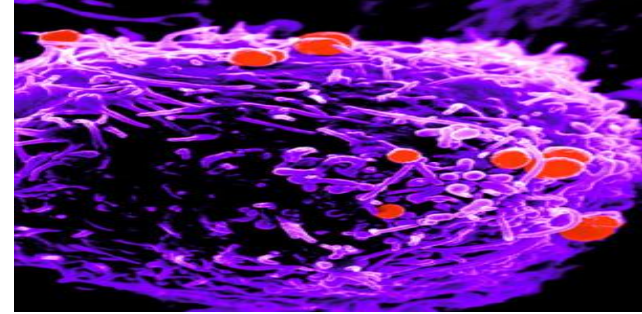
Лабораторная диагностики микоплазма гениталиум (M. genitalium)

ПЦР-диагностика. В 2002 г. опубликовано первое исследование по диагностике M. genitalium методом ПЦР РВ. В качестве мишеней для ПЦР-диагностики используются консервативные регионы гена адгезина M. genitalium MgPa и 16S рРНК. В представительном исследовании показано, что тестирование проб мочи у мужчин методом ПЦР выявляет больше инфицированных лиц (98%), чем в соскобах из уретры (82%), а у женщин в моче (71%) и при совместном анализе мочи и уретрального соскоба в 96% образцов.

ГОНОКОКК .

Neisseria gonorrhoeae

на поверхности лимфоцитов



По данным ВОЗ 78 миллионов человек в мире ежегодно заражаются гонореей. Гонококк — облигатный паразит человека: он может жить только в человеческом организме, и в ходе эволюции очень хорошо адаптировался к условиям. Главным врагом гонококка являются не лекарства, а наша иммунная система. Гонококк может подавлять размножение и активность лимфоцитов, прикрепляясь к определенным белкам на их поверхности и способен быстро менять структуру своих поверхностных белков по которым клетки иммунной системы его распознают.

Neisseria gonorrhoeae

Методы амплификации НК рекомендованы для диагностики гонореи всеми странами, однако в Европейских рекомендациях указана необходимость подтверждения культуральным методом или использовать дополнительно другой генетический участок.

Амплификационные методы рекомендованы в США в качестве основного метода диагностики гонореи, за исключением исследования биологического материала, получаемого из глотки, прямой кишки или конъюнктивы глаз.

ТРИХОМОНИАЗ

По оценкам ВОЗ в 2005 г. в мире было зарегистрировано около **250 млн.** случаев трихомониаза, причем 24,5 млн. в странах Европы.

У женщин инфекция вызываемая *T. vaginalis* часто протекает бессимптомно и ассоциируется с повышенным риском возникновения разрыва плодных оболочек во время беременности и эндометрита. Классическая картина трихомониаза у женщин характеризуется обильными слизистогнойными, пенистыми выделениями

Инфекцию, вызванную *T. vaginalis*, часто выявляют **у мужчин** с негемококковым уретритом, у которых лечение тетрациклином и макролидами оказалось неэффективным.

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТРИХОМОНИАЗА

В настоящее время существуют три основных метода для лабораторного выявления *Trichomonas vaginalis*: микроскопия нативного или окрашенного препаратов, культуральное исследование и **выявление нуклеиновых кислот *T. Vaginalis* с помощью амплификации на основе методов ПЦР и НАСБА в реальном времени.**

В европейских странах, США и России рекомендации по диагностике трихомониаза практически идентичны и предпочтение отдается методу влажного мазка (не может применяться в качестве единственного, так как является субъективным), культурального исследования и ПЦР.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

- **Микроскопическое исследование нативного или окрашенного мазка отделяемого половых органов.**
- **Культуральное исследование**
- **Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК)**
- **Иммунологические методы, направленные на обнаружение трихомонадного антигена, включая иммунохроматографический стрип-тест**
- **Определение антител (например, методом иммуноферментного анализа –ИФА)**

Методы лабораторной диагностики трихомонадной инфекции

Регламентированные

- Микроскопия окрашенных препаратов
- Культуральное исследование

Нерегламентированные

- Темнопольная микроскопия
- ПЦР
- ИФА
- ДНК-гибридизация

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ТРИХОМОНАД

Культивирование *T. vaginalis* в жидкой среде является золотым стандартом диагностики трихомониаза. Порог чувствительности метода составляет 10 трихомонад/мл., время инкубации от 2 до 7 дней.

Разработаны современные тест-системы InPouch TV (США) и Vagicut – селективная обогащенная среда.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Микроскопическое исследование нативного препарата. Чувствительность теста варьируется от 38 до 82% и зависит от количества возбудителя в образце (менее 10^4 паразитов/мл не обнаруживается).

Микроскопическое исследование окрашенных (по Грамму, Гимзе и метиленовым синим) препаратов. Методы менее чувствительны, более трудоемки, требуют наличия опытного специалиста.

РЕЗЮМЕ

- 1. При наличии соответствующих клинических проявлений для выявления трихомонад предпочтительнее проводить исследование нативного препарата.
- 2. МАНК или культуральное исследование можно использовать при подозрении на трихомониаз в случае отрицательных результатов микроскопического исследования нативного препарата.
- 3. Культуральный метод по сравнению с микроскопическим исследованием нативного препарата обладает более высокой чувствительностью, однако более дорогостоящий.
- 4. Применение МАНК целесообразно при скрининге образцов, полученных неинвазивным способом или при исследовании большого количества образцов.

APTIMA(®) *Trichomonas vaginalis* (фирма Gen-Probe Inc.)

**Недавно разработан APTIMA(®)
Trichomonas vaginalis (фирма Gen-Probe Inc.)
анализ основанный на амплификационных
технологиях и гибридизации с
хемилюминесцентной пробой для
качественной детекции рибосомальной РНК *T.*
Vaginalis который прошел одобрение US FDA в
2011 году.**

РЕКОМЕНДОВАННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

ИНФЕКЦИИ	РОДВиК	IUSTI	CDC
ХЛАМИДИЙНАЯ ИНФЕКЦИЯ	МАНК (ПЦР И НАСБА)	МАНК	МАНК
ГОНОККОКОВА Я ИНФЕКЦИЯ	МАНК ПОСЕВ МИКРОСКОПИЯ	МАНК ПОСЕВ МИКРОСКОПИЯ - только у симптоматичных пациенток	МАНК ПОСЕВ
МИКОПЛАЗМА ГЕНИТАЛИУМ	МАНК (ПЦР И НАСБА)	МАНК	МАНК
ТРИХОМАНИАЗ	МАНК (ПЦР И НАСБА) ПОСЕВ МИКРОСКОПИЯ нативного препарата	МАНК ПОСЕВ МИКРОСКОПИЯ	МАНК ПОСЕВ МИКРОСКОПИЯ – только если нет возможности делать МАНК

УРОГЕНИТАЛЬНЫЙ КАНДИДОЗ

Шифр по Международной классификации болезней МКБ-10

B37.

Урогенитальный кандидоз — воспалительное заболевание, обусловленное дрожжеподобными грибами рода Candida.

Урогенитальный кандидоз является широко распространенным заболеванием, может возникать у лиц обоего пола и наиболее часто наблюдается у женщин репродуктивного возраста. Частота регистрации кандидозного вульвовагинита за последние 10 лет почти удвоилась и составляет 30–45% в структуре инфекционных поражений вульвы и влагалища.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

■ микроскопическое исследование нативных препаратов с добавлением 10% раствора КОН и препаратов, окрашенных по Граму;

■ культурального исследования (рост колоний грибов *Candida* в количестве более 10^3 КОЕ/мл). Культуральное исследование показано при отрицательном результате микроскопического исследования и наличии клинических проявлений;

■ для видовой идентификации грибов рода *Candida* могут быть использованы молекулярно-генетические методы. Необходимость видовой идентификации возбудителя в практическом отношении обусловлена устойчивостью некоторых видов *Candida* к антимикотическим препаратам.

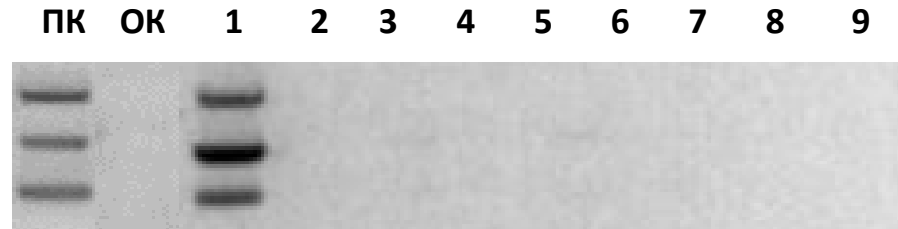
МУЛЬТИПРАЙМЕРНЫЙ НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

Выявляемость анаэробных бактерий (*Fusobacterium* spp., *Mobiluncus curtisii*, *Prevotella bivia*) в образцах группы «норма» составила 8%. В группе «бактериальный вагиноз» во всех образцах выявлялись от одного до трех видов анаэробных бактерий в количестве более 10^4 копий/мл, при этом в 46,2% случаев в пробе обнаруживались все три вида бактерий. Частота встречаемости каждого из видов составляла 53,8% для *Prevotella bivia*, 46,2% для *Mobiluncus curtisii* и 69,2% для *Fusobacterium* spp.

Выявление методом ПЦР : *Fusobacterium* spp., *Mobiluncus curtisii*, *Prevotella bivia*.

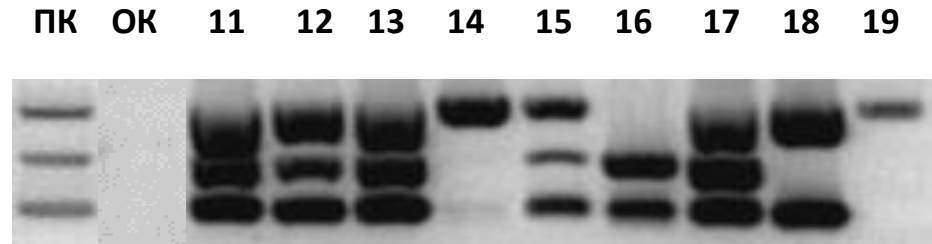
«Н»

Prevotella bivia (454 п.н.)
Mobiluncus curtisii (323 п.н.)
Fusobacterium spp.(230 п.н.)



«БВ»

Prevotella bivia (454 п.н.)
Mobiluncus curtisii (323 п.н.)
Fusobacterium spp.(230 п.н.)



Электрофореграммы результатов выявления анаэробных бактерий

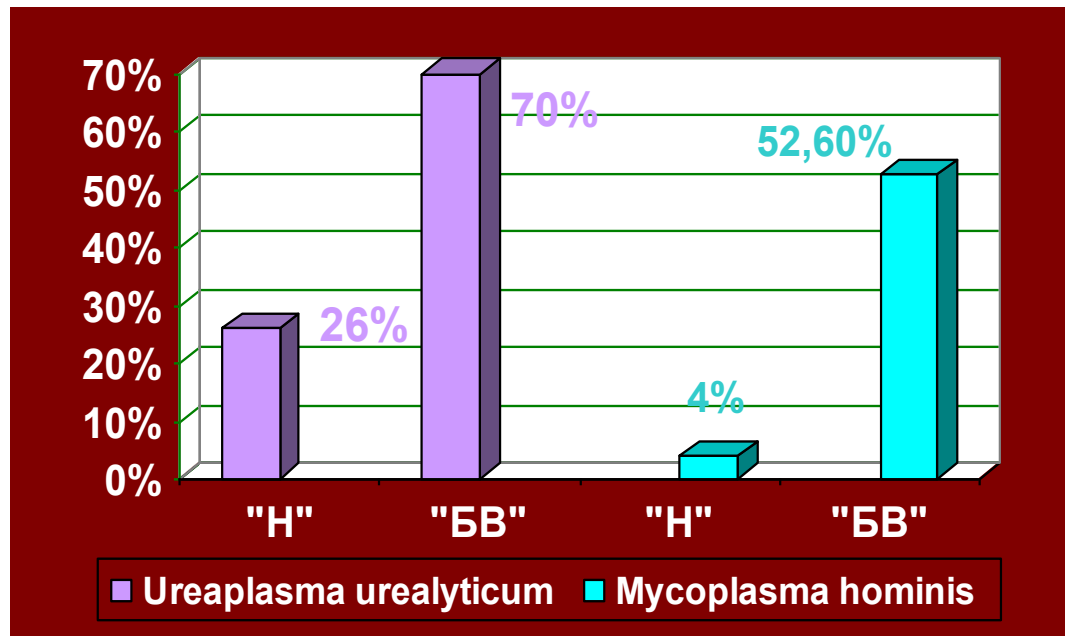
ПК - положительный контроль

ОК – отрицательный контроль.

Выявляемость

Ureaplasma urealyticum и Mycoplasma hominis .

Группы	«Н»	«БВ»
Ureaplasma urealyticum	26%	70%
Mycoplasma hominis	4%	52,6%



Фемофлор

Разработана несколько вариантов технологии оценки состояния микрофлоры урогенитального тракта и дифференциальной диагностики дисбиотических нарушений на основе ПЦР РВ. Позволяет сравнивать количество лактобактерий с общим количеством бактерий и определять: нормоценоз, условный нормоциноз умеренный и выраженный дисбиоз, и различать аэробный, анаэробный и смешанный дисбиоз. Для мужчин – Андрофлор.

ВИРУСЫ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА: ИНФИЦИРОВАННОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ

ТИП ВГЧ	ВСТРЕЧАЕМОСТЬ СРЕДИ ВЗРОСЛЫХ
ВПГ 1	60-90%
ВПГ 2	15-20%
ВГЧ 3 (VZV)	Более 90%
ВГЧ 5 (ЦМВ)	50-80%
ВГЧ 6 ТИПА	80-90%
ВГЧ 7 ТИПА	80-90%
ВГЧ 4 ТИПА (ВЭБ)	90%

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДСЕМЕЙСТВ ГЕРПЕСВИРУСОВ

ВИРУС	ОСОБЕННОСТИ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА
ВПГ – 1,2 ВЗВ	Короткий цикл, цитологический эффект. Размножение в нервных и эпителиальных клетках. Латентная стадия в нейронах.
ЦМВ ВГЧ-6 ВГЧ-7	Медленный цикл. Размножение преимущественно в клетках лимфоидного ряда, но возможно и других органах и тканях. Латентная стадия в клетках слюнных желез, лимфоцитах.
ВЭБ ВГЧ-8	Медленный цикл, склонность к хронизации, лимфопролиферативный эффект. Размножение и латентная стадия преимущественно в В – (ВЭБ) и Т- (ВГЧ-8) лимфоцитах.

БИОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕРПЕСВИРУСОВ

УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ СОСКОБЫ: АНАЛИЗ АКТУАЛЕН ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГГ, ОСЛОЖНЕНИЙ ЦМВ-ИНФЕКЦИИ, А ТАКЖЕ ВЫЯВЛЕНИЯ РИСКА ПЕРЕДАЧИ ВПГ 1, ВПГ 2, ВЗВ, ЦМВ, ВЭБ И ВГЧ 6 ОТ БЕРЕМЕННОЙ МАТЕРИ РЕБЕНКУ ВО ВРЕМЯ РОДОВ.

СЛЮНА: ПРИ ОСТРОЙ ИНФЕКЦИИ В ПРОЦЕССЕ РАЗМНОЖЕНИЯ ВСЕХ ГЕРПЕСВИРУСОВ УЧАСТВУЮТ ТКАНИ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ. МЕТОД ПЦР НАИБОЛЕЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНО ПРИМЕНЯТЬ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ПЕРВИЧНОЙ ГВИ У ДЕТЕЙ В РАННЕМ ВОЗРАСТЕ.

МОЧА: ПЦР ОБЛАДАЕТ ВЫСОКОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ПРИ ОСТРОЙ ФАЗЕ ПЕРВИЧНОЙ ИНФЕКЦИИ ЦМВ, ВЗА, ВГЧ-6.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ БИОМАТЕРИАЛА

	ВПГ 1	ВПГ 2	ВЗВ	ЦМВ	ВГЧ 6	ВЭБ	ВГЧ 8
СЛЮНА	+	+	+	+	+	+	+
МОЧА			+	+	+		
УРОГЕНИТ АЛЬНЫЙ СОСКОБ	+	+	+	+	+	+	
ПЛАЗМА КРОВИ	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
СМЖ	+	+	+	+	+	+	+
ЛЕЙКОЦ ФРАКЦИЯ				+	+	+	+

Вирус папилломы человека (ВПЧ, Human papillomavirus, HPV)

- ДНК-содержащие вирусы семейства *Papillomaviridae*
- Передача только от человека к человеку
- Известно около 400 типов (более 40 могут вызывать поражения аногенитального тракта)
- Пути передачи: половой, трансплацентарный, перинатальный, контактно-бытовой
- Инфицирование является онкогенным фактором

Харальд Цур Хаузен – Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2008 г.



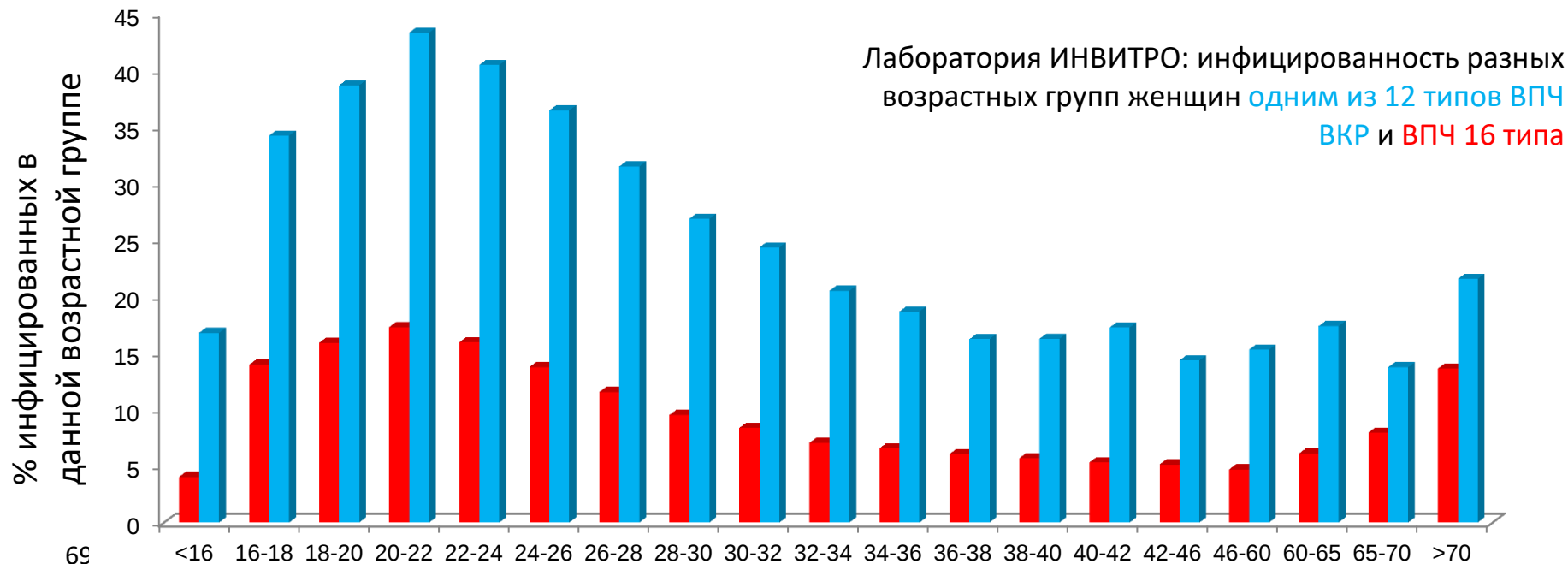
ВПЧ: инфицированность населения

- Риск передачи при однократном незащищённом контакте – **60-80%**
- В течение первых 4-6 лет половой жизни инфицируется около **80%** женщин
- До 80% людей, живущих в мире, контактировали с ВПЧ в своей жизни как минимум раз
- Молодые женщины до 30 лет высоко инфицированы онкогенными типами ВПЧ
- Инфицированность в позднем возрасте сильно различается в различных странах, но в целом снижена по сравнению с молодым возрастом

ВПЧ-инфекция – одна из самых распространенных инфекций, передающихся половым путем

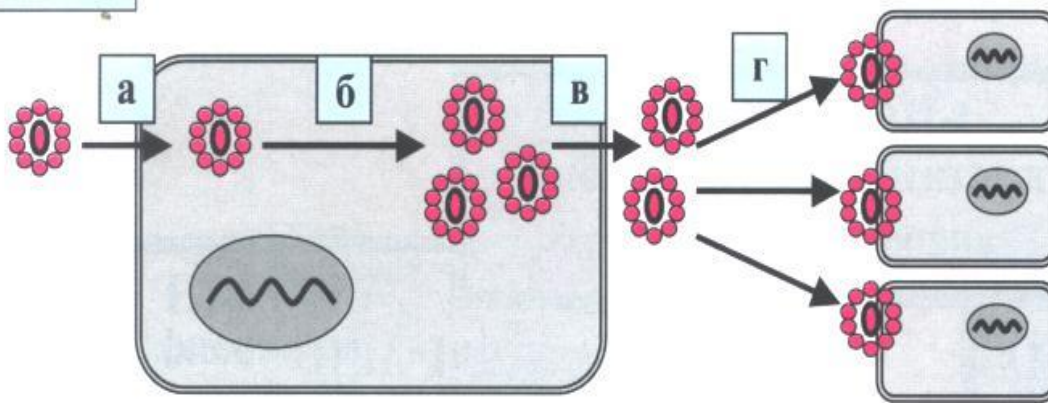
Вероятность инфицирования при однократном незащищенном контакте – до 60%

- В первые 4–6 лет половой жизни ~80% женщин инфицируется ВПЧ ВКР, **однако у 90% в течение 9-15 месяцев происходит спонтанная элиминация вируса**
- Молодые женщины (до 26-30) лет наиболее высоко инфицированы ВПЧ ВКР, **но именно у них предраковые поражения шейки матки обнаруживаются редко**
- Инфицированность в позднем возрасте сильно различается в разных странах, однако в целом снижена по сравнению с молодым возрастом



ВАРИАНТЫ РАЗВИТИЯ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

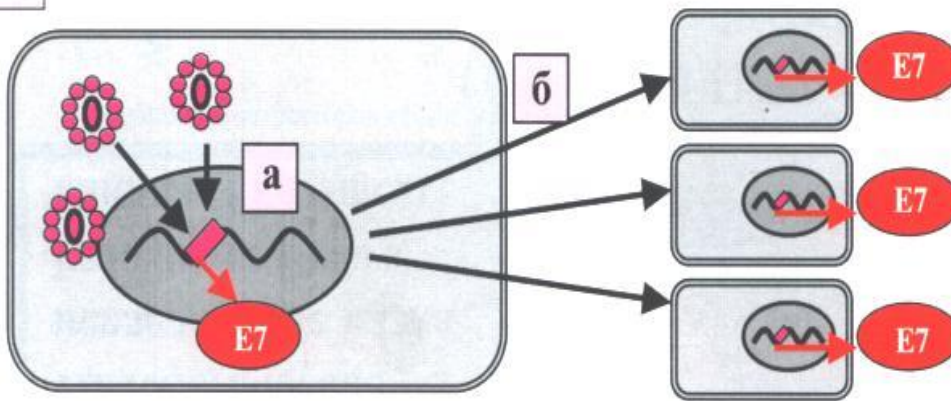
I вариант



I. Репродуктивная инфекция, активное размножение вируса

а — проникновение вируса в клетку,
б — внутриклеточное размножение вируса,
в — выход новых вирусных частиц из клетки,
г — инфицирование окружающих тканей

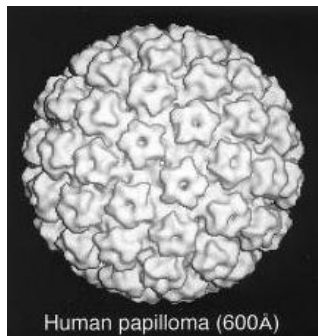
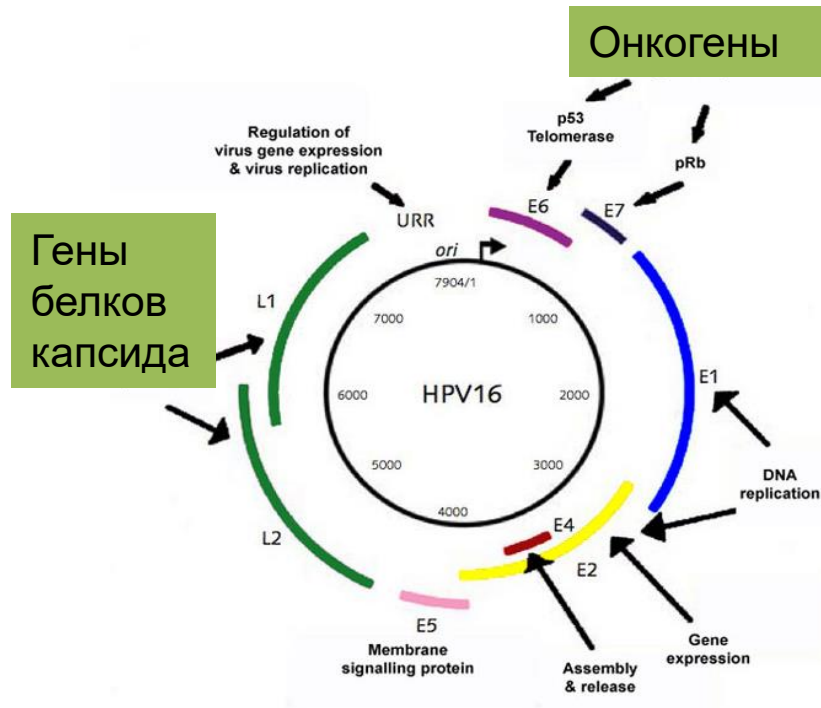
II вариант



II. Встраивание ДНК вируса в хромосому инфицированной клетки, синтез E7

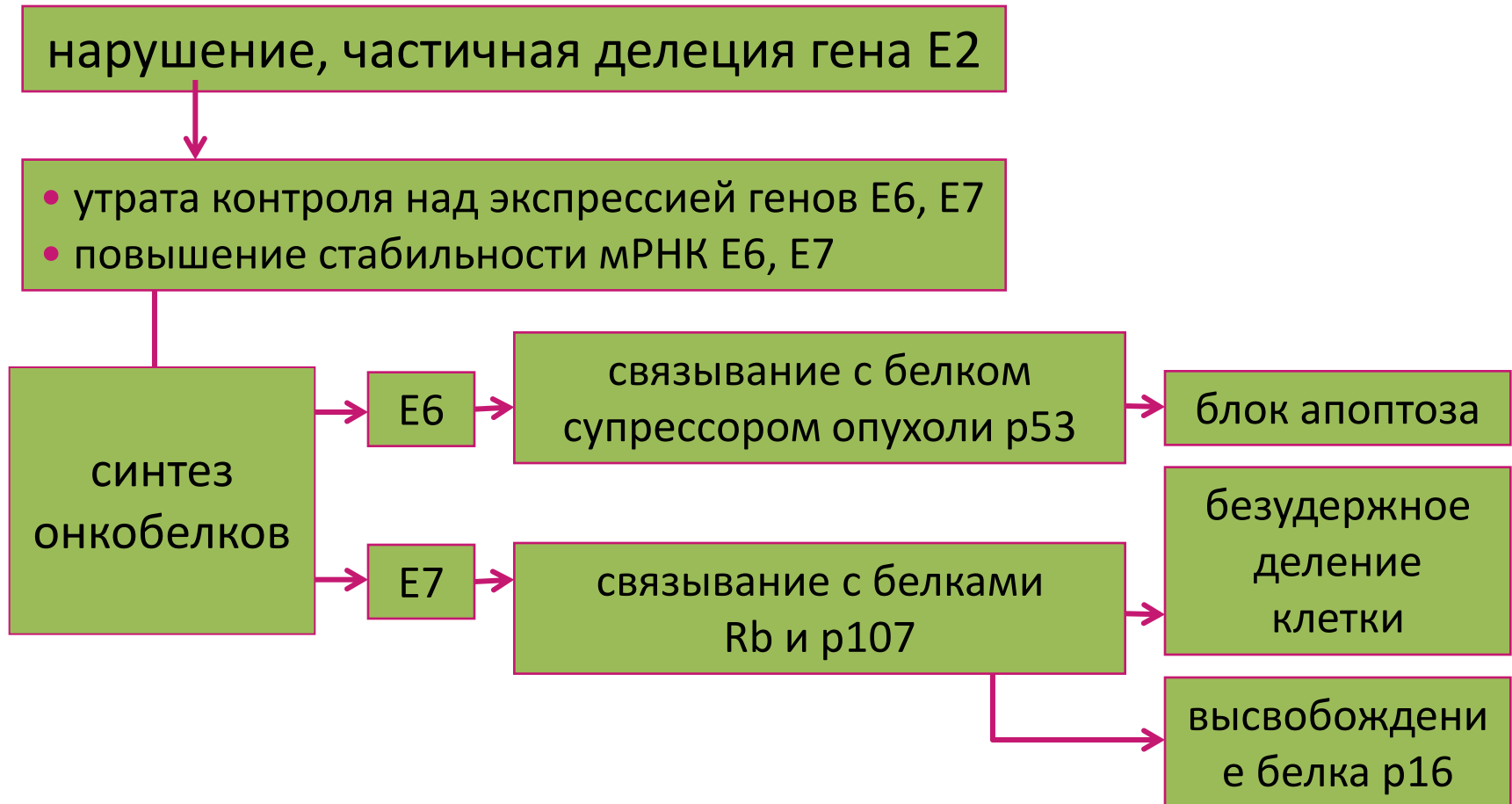
а — встраивание ДНК ВПЧ в хромосому инфицированной клетки
б — активное деление клетки с интегрированной копией вирусной ДНК, формирование клона опухолевых клеток, которое сопровождается синтезом онкобелка E7

ВПЧ: организация генома



- Двухцепочечная кольцевая ДНК.
- Кодировывает 8 генов: «ранние» (E) и «поздние» (L) в зависимости от времени экспрессии.
- Ранние белки (E) регулируют жизненный цикл вируса. Белки E6 и E7 отвечают за онкогенные свойства, их избыток оказывает трансформирующее воздействие. Белок E2 контролирует репликацию ДНК и наработку белков E6 и E7.
- Поздние гены L1 и L2 кодируют структурные белки капсида.

ВПЧ: интеграция ДНК в геном клетки-хозяина



Развитие ВПЧ-инфекции

Инфицирование ВПЧ



80%

Доброкачественные
изменения плоского
эпителия

2-5 лет

Дисплазия легкой
степени (CIN I)

4-5 лет

Умеренная
дисплазия (CIN II)

9-15 лет

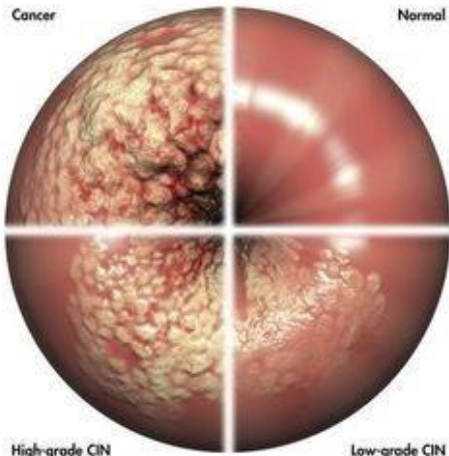
Тяжелая дисплазия
(CIN III)

Инвазивный
рак

Смерть

60-90%
Клиническая
регрессия

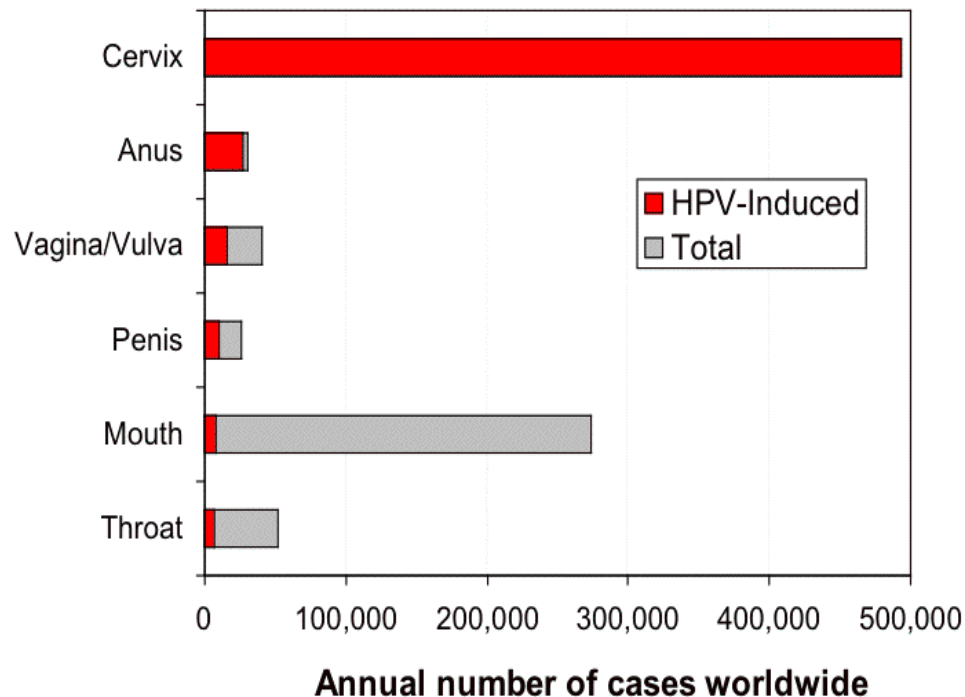
10%



ВПЧ: онкогенный потенциал

Дисплазии различных степеней; раковые заболевания

- **Рак шейки матки: 90-100%**
- **Рак аногенитальных обл. : 90%**
- **Рак влагалища и вульвы – 40%**
- **Рак полового члена – 40%**
- **Рак ротовой полости и горла – 3-12%**



А также: рак груди, легких, толстой кишки, прямой кишки, предстательной железы и пищевода

Факторы риска развития и профилактика РШМ

Инфицирование ВПЧ

- Генотип ВПЧ
- Длительность персистенции ВПЧ
- Активность вирусных онкогенов

Отказ от незащищенных половых контактов

Один (проверенный) партнер

Вакцинация (Церварикс, Гардасил)

Выявление активной ВПЧ-инфекции

Возраст женщины

- Уровень эстрогенов
- Состояние иммунной системы
- Возраст при рождении первого ребенка и количество детей

Систематическое наблюдение
возрастных групп риска

Иные факторы

- Сопутствующие заболевания
- Курение

Образование, снижение факторов
риска

Легкая степень дисплазии ШМ

Выявление клинических признаков
дисплазии и лечение

ПВИ: методы диагностики

- Клинико-визуальный метод
- Цитологический метод
- Кольпоскопический метод
- Гистологический метод
- Серологический метод
- Молекулярно-биологические методы



Выявление реакции
организма на вирус:
морфологические
изменения
серологический
ответ

ПЦР-диагностика ПВИ: применение

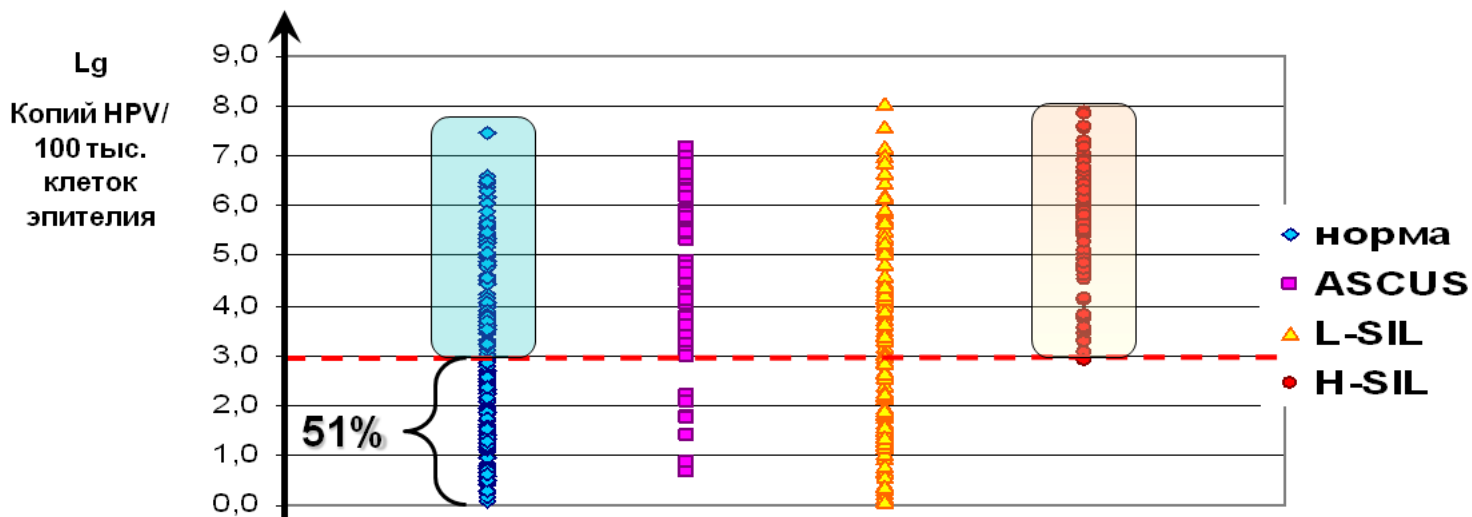
- Скрининг (метод выбора в рамках национальных программ контроля РШМ), профилактические осмотры
- Контроль эффективности терапии
- Контроль эффективности вакцинопрофилактики (выявление генотипов ВПЧ, против которых направлены вакцины)
- Ранняя диагностика ПВИ
- Генотипирование
- Выявление дополнительных признаков онкогенности (наличие интеграции, выявление РНК вирусных онкогенов)
- Эпидемиологический надзор
- Подтверждение и уточнение результатов, полученных другими методами (неясные данные цитологии)

РШМ

РШМ – практически единственное онкологическое заболевание полностью удовлетворяющее всем рекомендованным ВОЗ условиям для проведения популяционного скрининга.

Использование ПЦР при скрининге выявляет больше женщин с признаками неопластической трансформации (меньше вероятность «пропустить» рак), но количество ложноположительных результатов будет выше, чем при использовании цитологического метода.

Количественное определение ДНК ВПЧ



Вирусная нагрузка ниже определенного значения практически не встречается в образцах тяжелой дисплазии и рака (“клинически незначимое инфицирование”). Нагрузка выше данного порога считается клинически значимой. В разных работах этот порог оценивается как 10^3 - 10^4 геномов ВПЧ на 100 тыс. клеток человека

** результаты Центра Молекулярной Диагностики (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) по Донникову А.Е., 2012*

Стадия ВПЧ-инфекции и состояние вируса

Латентное течение (от 2 месяцев до 10 лет и более)

- Персистенция вируса в базальном слое эпителия. Вирус в episomal форме, нет активной репликации. Онкогены неактивны

Продуктивная инфекция

- Вирус в episomal форме, реплицируется в инфицированных клетках базального слоя, стимулируя их размножение. Сборка вирусных частиц и их выход на поверхность кожи

Стадия интеграции (1)

- Вирус интегрируется в геном клетки, теряя часть генома и способность к репликации. Экспрессия онкогенов E6 и E7. Нагрузка определяется episomal формой

Стадия интеграции (2)

- Значительная доля вирусных частиц интегрирована в геном клетки (до 8 копий на геном). Активная экспрессия онкогенов E6 и E7

Клинические проявления

Отсутствуют

Доброкачественные новообразования (папилломы, кондиломы)

Изменения в структуре эпителиальных клеток (койлоцитоз). Дисплазия (неоплазия)

Малигнизация клетки. Карцинома (инвазивный рак)

Молекулярные маркеры

- ДНК ВПЧ, генотип ВПЧ
- Вирусная нагрузка (может быть любой)

- ДНК ВПЧ, генотип ВПЧ
- Вирусная нагрузка (может быть высокой)

- ДНК ВПЧ, генотип ВПЧ
- Вирусная нагрузка (может быть низкой, но чаще высокая)
- Экспрессия E6 и E7
- Интегрированная форма
- микроРНК

- ДНК ВПЧ, генотип ВПЧ
- Вирусная нагрузка (часто низкая)
- Экспрессия E6 и E7
- Интегрированная форма
- микроРНК
- Активность клеточных генов (p16, теломераза)

Существующие вакцины

- **Церварикс** – бивалентная вакцина, содержащая очищенные капсидные белки L1 ВПЧ 16 и 18 типов, адсорбированных на адъювантной системе ASC4, содержащей гидроксид алюминия и 3-О-дезацил-4-монофосфолипида А
- **Гардасил** – четырехвалентная вакцина, содержащая очищенные капсидные белки L1 ВПЧ 6, 11, 16 и 18 типов, аморфный гидроксифосфат алюминия в качестве адъюванта

Начинать вакцинацию можно с 9 лет, оптимальный возраст для прививки — 11-12 лет. Вакцина от ВПЧ нужна и мальчикам, и девочкам. Желательно сделать прививку до того, как человек станет сексуально активным, но в целом вакцина показана женщинам до 26 лет и мужчинам до 21 года (а производитель вакцины «Гардасил» рекомендует ее женщинам до 45 лет).

Прививка от ВПЧ, сделанная вовремя, эффективна — она дает почти стопроцентную защиту от предраковых состояний (и, соответственно, рака шейки матки), а также от генитальных бородавок. Все существующие вакцины безопасны — перед тем как выпустить их на рынок, производители проводили многолетние испытания, в которых приняли участие 75 тысяч человек.

Позиции ВОЗ относительно вакцины против папилломавирусной инфекции человека (октябрь 2014)

- Серологический ответ на вакцинацию в 1-4 раза выше, чем ответ на естественную инфекцию
- Сывороточные антитела остаются стабильными в течение не менее 5 лет после вакцинации
- *ВОЗ рекомендует включение вакцинации против ВПЧ-инфекции в национальные программы иммунизации*
- ВОЗ для девушек 15 лет и младше рекомендует двухдозовый календарь с шестимесечным интервалом между дозами; и трехдозовый календарь (0; 1-2; 6 мес) для женщин старше 15 лет
- Внедрение ВПЧ-вакцины не должно нарушать или отвлекать денежные средства от эффективных программ по скринингу по поводу РШМ
- Внедрение ВПЧ-вакцины не должно подменять скрининг по поводу РШМ (30% РШМ вызываются другими типами ВПЧ, чем 16 и 18)

Результаты исследования канадских ученых (Canadian Medical Association Journal, 2018) не показали повышенного риска развития аутоиммунных нарушений у девочек-подростков, прошедших иммунизацию четырехвалентной вакциной против вируса папилломы человека (ВПЧ).

Четырехвалентная вакцина против ВПЧ эффективно защищает от 90% штаммов, вызывающих рак шейки матки и анального канала. Однако, несмотря на доказательства эффективности вакцинации, высказывались опасения относительно возможной связи вакцины с развитием аутоиммунных расстройств.

Связано ли применение четырехвалентной вакцины против ВПЧ с развитием аутоиммунных нарушений, таких как волчанка, ревматоидный артрит, диабет 1-го типа и рассеянный склероз, исследователи изучили данные 290 939 девочек от 12 до 17 лет, допущенных к вакцинации против ВПЧ с 2007 по 2013 год. Из 180 819 подростков, получивших четырехвалентную вакцину против ВПЧ, у 681 были диагностированы аутоиммунные нарушения в период от одной недели до двух месяцев после вакцинации. Этот показатель соответствует общему показателю диагностированных случаев в данной возрастной группе.

Благодарю за внимание!
С Новым Годом!

