



Комплексный тест Флороценоз – современная лабораторная технология диагностики урогенитальных инфекций у женщин репродуктивного возраста

Рыжих П.Г., к.м.н.

Комплексное решение Флороценоз+NCMT



Chlamydia trachomatis

Mycoplasma genitalium

- Основной путь передачи – половой
- Одинаковые факторы риска
- Сходные жалобы
- Сходная клиническая картина
- Одинаковые осложнения
- риска передачи ВИЧ

Neisseria gonorrhoeae

Trichomonas vaginalis

Терапия ИППП

Возбудитель	Фармакологическая группа
<i>C.trachomatis</i>	Макролиды Тетрациклины
<i>N.gonorrhoeae</i>	Цефалоспорины Аминогликозиды
<i>M.genitalium</i>	2х Макролиды Фторхинолоны (моксифлоксацин)
<i>T.vaginalis</i>	5`-нитроимидазолы

В России:

- В государственных ЛПУ диагностика ИППП проводится с использованием преимущественно низкочувствительных тестов;
- Диагностика *C.trachomatis* не совершенна
- МАНК не регламентированы для *N.gonorrhoeae*, *T.vaginalis*;
- *M.genitalium* – не входит в алгоритм обследования на ИППП;

В странах Западной Европы и Америки

- *N.gonorrhoeae*
- *C.trachomatis*
- *T.vaginalis*
- *M.genitalium*

МАНК

Международные рекомендации диагностики инфекций

Возбудитель	Источник	Рекомендации	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	IUSTI	Only NAATs detecting all known genotypes and variants should be employed for the diagnosis of <i>C. trachomatis</i> infections.	Только МАНК
	CDC		МАНК – тест выбора
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	IUSTI/WHO	Nucleic acid amplification tests are the preferred diagnostic tests	МАНК более чувствительны, чем посев
		Nucleic acid amplification tests (NAATs) are generally more sensitive ($\geq 90\%$) than culture. ^{9,10} They can be used on urine	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Guidelines for the laboratory diagnosis of Mycoplasma genitalium infection in East European countries, 2010		Только МАНК
		screening programmes. Diagnosis of <i>M. genitalium</i> infection is performed exclusively using nucleic acid amplification tests (NAATs), owing to the poor and slow growth	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	IUSTI	Nucleic acid amplification tests (NAATs) have been developed and sensitivities and specificities approaching 100% have been reported.	Чувствительность МАНК ~100%

Клинические рекомендации «Федерации лабораторной медицины»



Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
"ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ"

127083, Россия, г. Москва, ул. 8 Марта, д.1, стр.12; info@fedlab.ru, www.fedlab.ru

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**Молекулярно-биологическое исследование для выявления ДНК и/или
РНК возбудителей инфекций, передаваемых половым путем
(*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*,
Mycoplasma genitalium, *Trichomonas vaginalis*)**

Тип клинических рекомендаций:
Правила проведения клинических лабораторных исследований

Разработчики:

¹Гуштин А.Е., ¹Рыжик П.Г., ¹Анисимова Н.С., ¹Творогова М.Г., ¹Шипулин Г.А., ²Иванов А.М.,
²Криворучко А.Б., ³Шипицына Е.В., ³Савичева А.М.

¹ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва

²Военно-медицинская академия им С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург,

³ФБУН НИИАГ им. Д.О.Отта СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург

Ключевые слова: молекулярно-биологические методы, методы амплификации нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция, НАСБА, NASBA, ДНК, РНК, инфекции, передаваемые половым путем.

Настоящие клинические рекомендации устанавливают единые требования выполнению лабораторного исследования по выявлению нуклеиновых кислот (ДНК и/или РНК) *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* в биологическом материале методами амплификации нуклеиновых кислот ПЦР и реакции НАСБА (NASBA) в клинико-диагностических лабораториях медицинских организаций.

Одобрены на XVII форуме «Национальные дни Лабораторной медицины России» Общероссийской научно-практической Конференции «Эффективная лабораторная медицина: методы и средства анализа, способы организации и стандарты практики» в г. Москве 02 октября 2013 года.

Утверждены Профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 15 февраля 2014 года. Представлены от Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины».

Рекомендации РОДВиК



Российское общество
дерматовенерологов
и косметологов

ВЕДЕНИЕ БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯМИ,
ПЕРЕДАВАЕМЫМИ ПОЛОВЫМ ПУТЕМ,
И УРОГЕНИТАЛЬНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Москва
2012

молекулярно-биологических методов исследования, направленных на обнаружение специфических фрагментов ДНК и/или РНК *N. gonorrhoeae*, с использованием тест-систем, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации.

молекулярно-биологических, направленных на обнаружение специфических фрагментов ДНК и/или РНК *C. trachomatis*, с использованием тест-систем, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации. Чувствительность методов составляет 98–100%, специфичность – 100%. На чувствительность исследования могут влиять различные

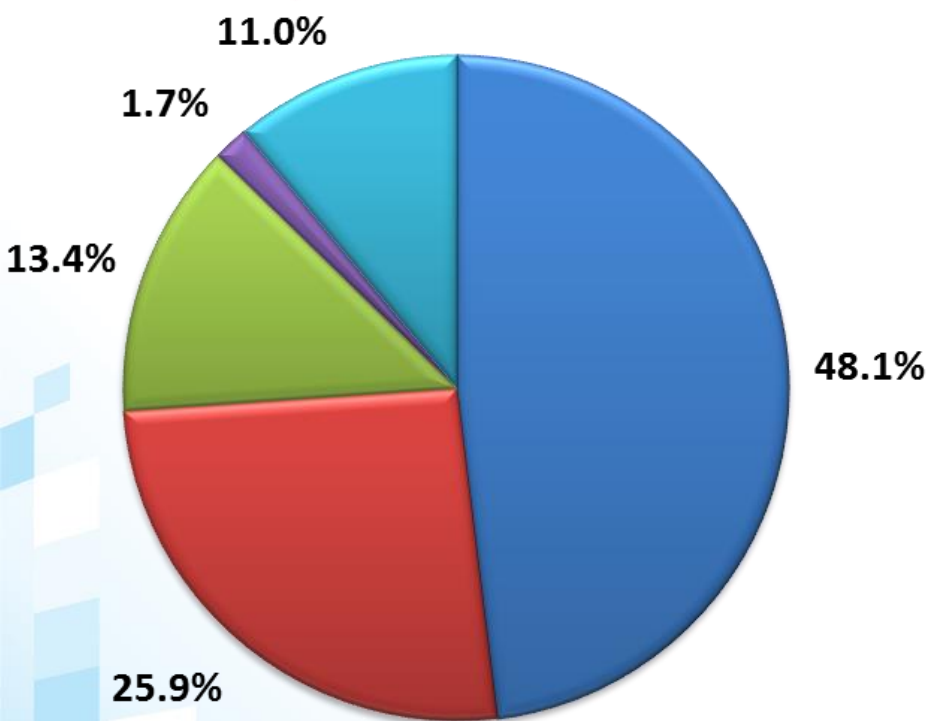
Верификация диагноза заболеваний, вызванных *M. genitalium*, осуществляется с помощью молекулярно-биологических методов, направленных на обнаружение специфических фрагментов ДНК и/или РНК *M. genitalium*, с использованием тест-систем, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации.

молекулярно-биологических методов исследования, направленных на обнаружение специфических фрагментов ДНК и/или РНК *T. vaginalis*, с использованием тест-систем, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации;

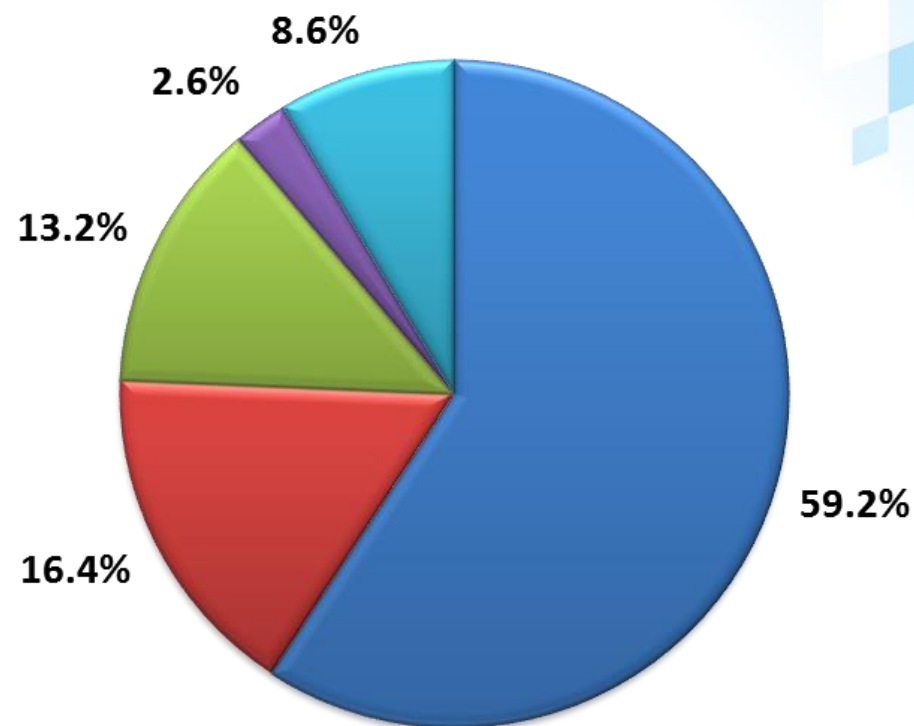
Распределение инфекций у пациентов с положительным результатом в % (n=616)



(n=464)



(n=152)



■ CT ■ MG ■ TV ■ NG ■ Микст

■ CT ■ MG ■ NG ■ TV ■ Микст

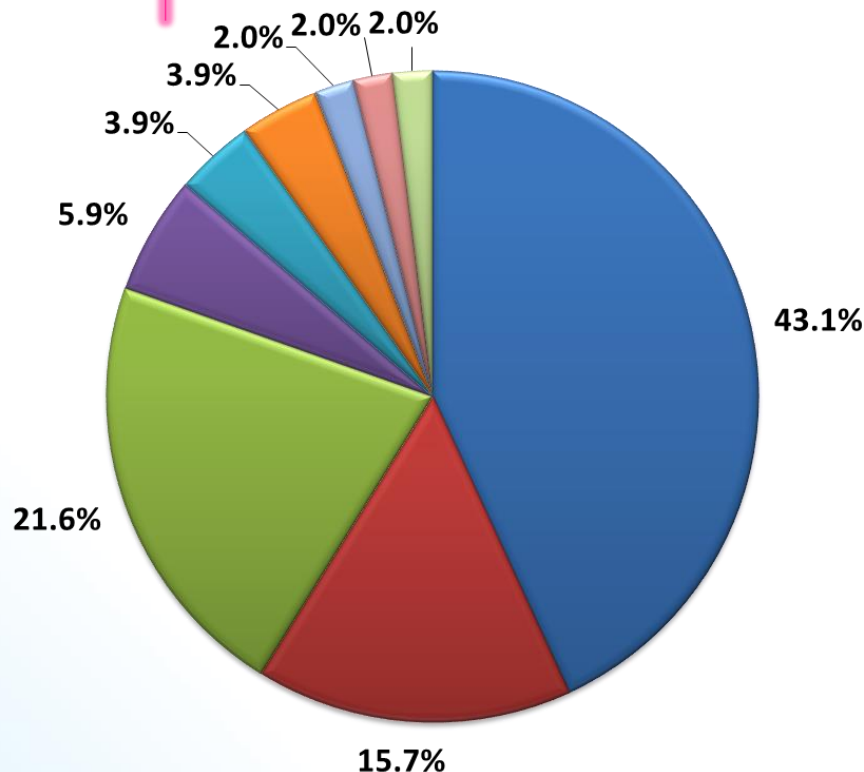
Распределение микст-инфекций в % (n=64)



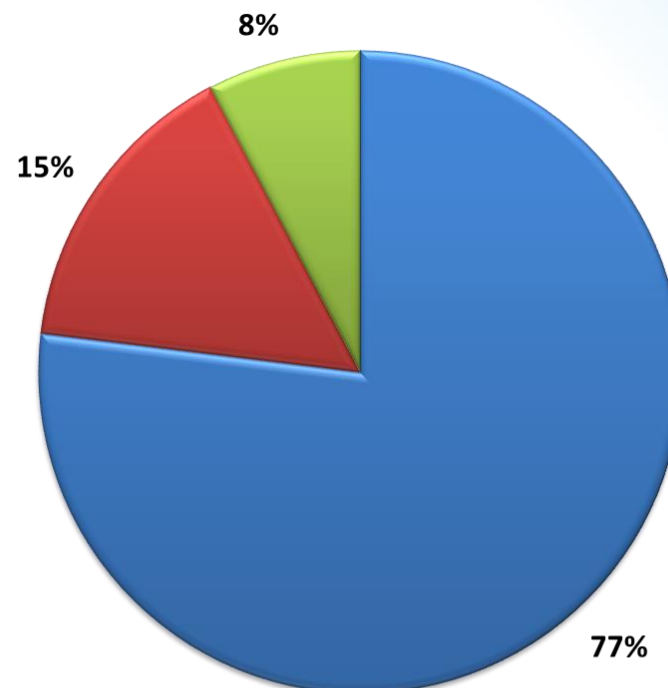
(n=51)



(n=13)

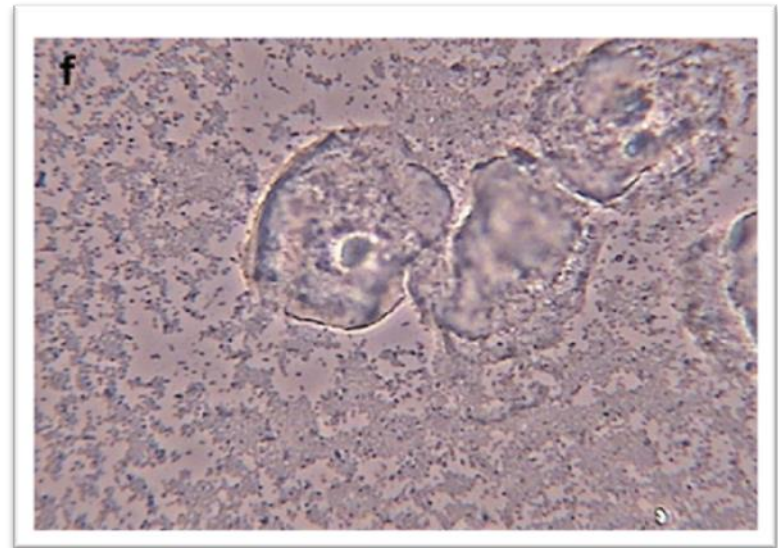
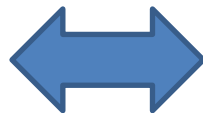
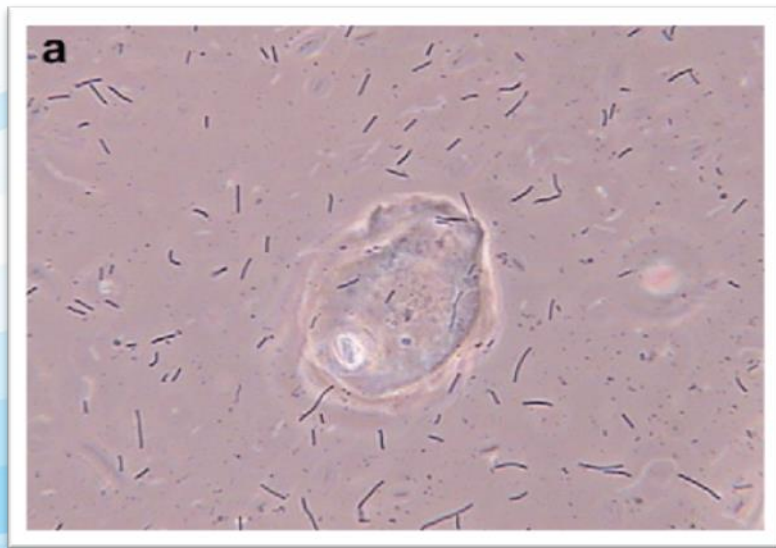


CT+MG CT+NG CT+TV
 NG+MG MG+TV CT+NG+MG
 NG+TV CT+MG+MG NG+MG+TV



CT+MG CT+NG NG+MG

Бактериальный вагиноз – инфекционный невоспалительный синдром *полимикробной* этиологии, который характеризуется количественным снижением или полным исчезновением лактобактерий, особенно H_2O_2 -продуцирующих, и резким увеличением облигатно- и факультативно анаэробных условно-патогенных микроорганизмов



Бактериальный вагиноз

- у 1/3 гинекологических пациенток
 - у 1/5 беременных женщин
 - невоспалительный синдром
 - бессимптомное течение в 40-60% случаев
- } = нестрашно?

Проявления БВ:

- Обильные выделения из влагалища
- Неприятный запах выделений
- Рецидивирующее течение
- Снижение качества жизни пациенток

и только?

Клиническое значение БВ

- Увеличение риска инфицирования ИППП (ВИЧ, ВПЧ, СТ, NG, TV, HSV и др.) в 2-4 раза
- Увеличение частоты возникновения ВЗОМТ в 3-6 раз
- Увеличения частоты возникновения цервицита (в 2 раза)
- Увеличение частоты ПРПО (на 40%)
- Увеличение частоты выкидышей (в 5 раз)
- и др.

Нормальная микрофлора VS БВ

Нормальная
микрофлора

- H_2O_2
- $\text{pH} \leq 4,5$
- ↓ активации Т-лимфоцитов
- слюнная слизь

БВ

- ↓ H_2O_2
- $\text{pH} > 4,5$
- муциназы, сиалидазы и др.

Nardis, 2013

Диагностика в России: рекомендации РОДВиК+РОАГ



- Критерии Амселя
- Баллы Ньюджента
- Культуральное исследование.

Рутинное культуральное исследование для верификации диагноза БВ не используется, однако может применяться для определения видового и количественного состава микробиоты влагалища



- Молекулярно-биологические методы
с использованием тест-систем, разрешенных к медицинскому применению в Российской Федерации, используются для выявления лактобацилл, *A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*

Правильная
диагностика БВ –
критерии Амсея,
баллы Ньюджента



В России эти
методы не
применяются



Необходим метод,
который послужит
адекватной
заменой

Вагинальный биотоп

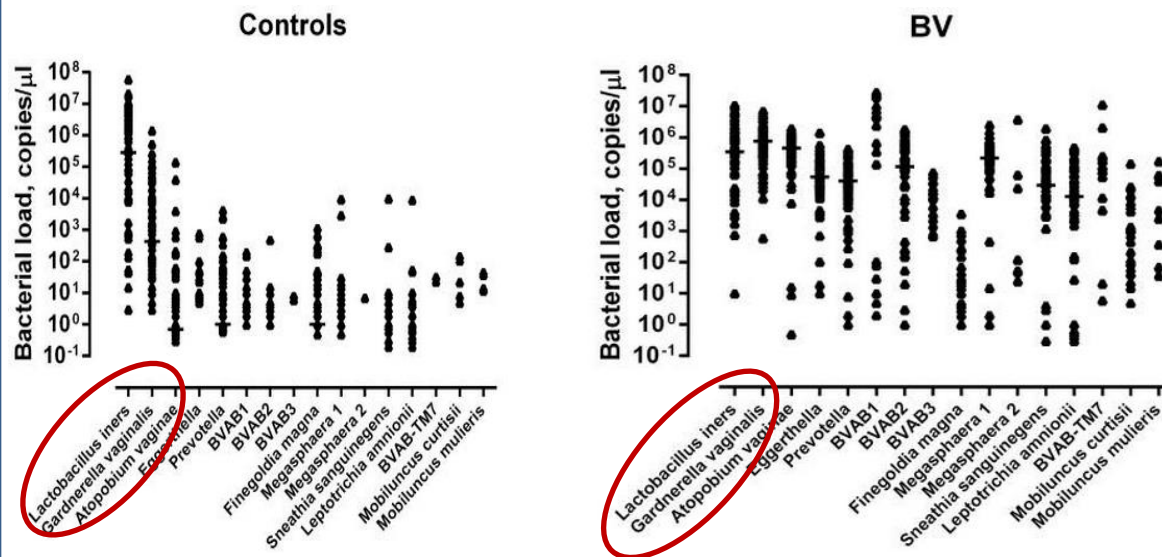
Gardnerella vaginalis, *Prevotella bivia*, *Porphyromonas* spp., *Eubacterium* spp., *Sneathia* spp., *Leptotrichia* spp., *Fusobacterium* spp., *Megasphaera* spp., *Veillonella* spp., *Diliaster* spp., *Lachnobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Mobiluncus* spp., *Corinebacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Atopobium vaginae*, *Bacteroides* spp., *Peptococcus* spp., *Mycoplasma* spp., BVAB-1,2,3, *Peptoniphilus* spp, *Eggerthella* spp., *Peptoniphilus lacrimalis*, *Arcanobacterium* spp., *Cryptobacterium* spp., *Tessaracoccus* spp., *Couchioplanes* spp., *Propioniferax* spp., *Hallella* spp., *Kaistella* spp., *Fluviivola* spp., *Crocinitomix* spp., *Flectobacillus* spp., *Persicivirga* spp., *Cloacibacterium*, *Papillibacter* spp., *Aerococcus* spp., *Pseudobutyribivibrio*, *Alloiococcus* spp., *Anaerococcus* spp., *Subdoligranulum* spp., *Fastidiosipila* spp., *Abitrophia* spp., *Pediococcus* spp., *Bulleidia* spp., *Butyrivibrio* spp., *Lactovum* spp., *Pelospora* spp., *Paucisalibacillus* spp., *Sporobacter* spp., *Acidaminococcus* spp., *Finegoldia* spp., *Caloranaerobacter* spp., *Desulfonispora* spp., *Isobaculum* spp., *Anaerobacter* spp., *Brevibacillus* spp., *Atopostipes* spp., *Ignavigranum* spp., *Staphylococcus* spp., *Ureibacillus* spp., *Cetobacterium* spp., *Acinetobacter* spp., *Caldilinea*, *Haemophilus* spp., *Sphingomonas* spp., *Olsenella* spp., *Slackia* spp., etc

**Всего более 300 видов
микроорганизмов!...**

**КАКИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НУЖНО
ВЫЯВЛЯТЬ, ЧТОБЫ ПОСТАВИТЬ ДИАГНОЗ?**

Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age – Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible?

Elena Shipitsyna¹, Annika Roos², Raluca Datcu³, Anders Hallén⁴, Hans Fredlund⁵, Jørgen S. Jensen³, Lars Engstrand², Magnus Unemo^{5*}



«Снижение Lacto + высокая концентрация *G.vaginalis/A.vaginae* = точная диагностика БВ»

Флороценоз-Бактериальный вагиноз

- Набор реагентов в формате ПЦР в реальном времени с количественной оценкой
- *Bacteria*
- *Lactobacillus spp*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Atopobium vaginae*

Выбор пороговых значений для теста

274 первичные пациентки ФГБУ "НИИАГ им.Д.О.Отта" СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Обследование:

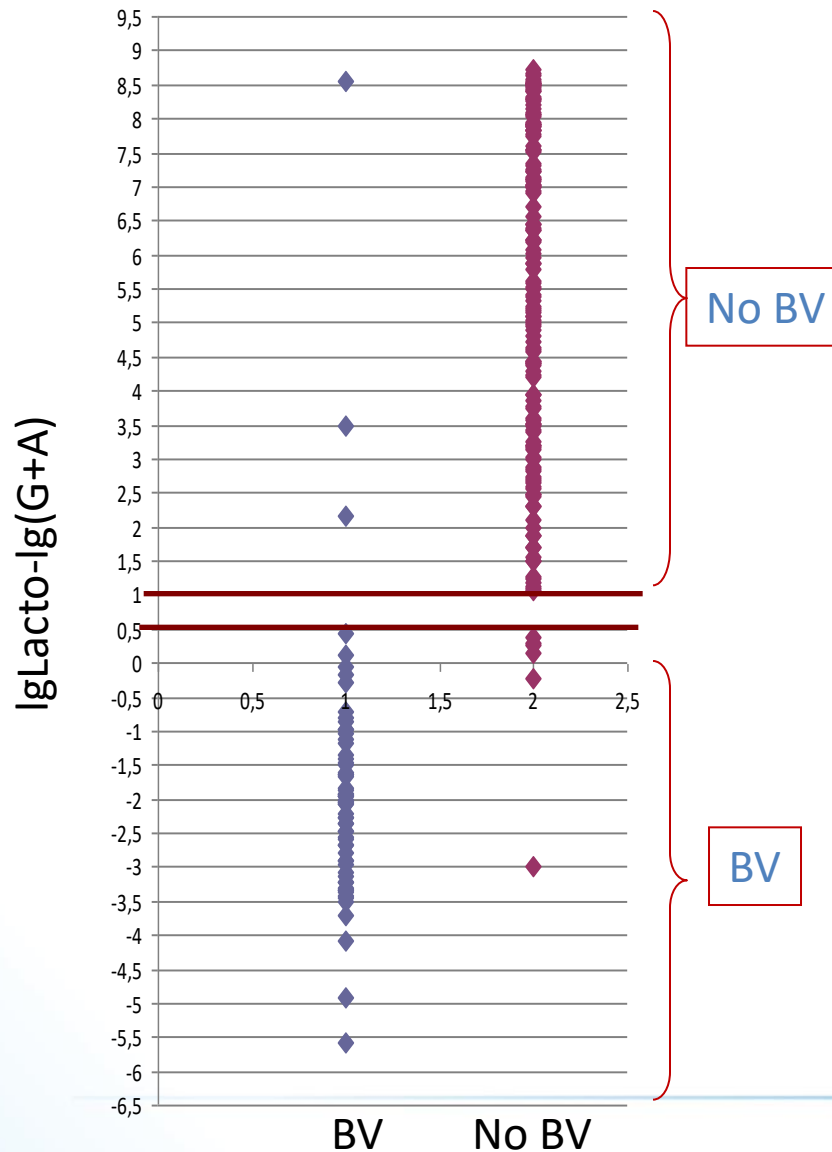
- анамнез,
- осмотр,
- критерии Амсель,
- микроскопия с оценкой по Ньюдженту,
- ФЛОРОЦЕНОЗ-БВ

Совпадение результатов «классических» методов диагностики

N=274

Критерии Амсель	Критерии Ньюджента	Количество пациенток
БВ	БВ	66 (24%)
Отсутствие БВ	Отсутствие БВ	156 (57%)
БВ	Промежуточный тип	14 (5%)
Отсутствие БВ	Промежуточный тип	38 (14%)

Отношение лактобактерий и Gv+Av



КС 1 – коэффициент, отражающий патогенетические основы БВ

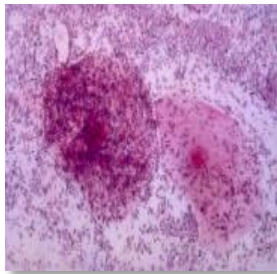
IgLacto-Ig(Gv+Av) Заключение	
<0.5	Полученные параметры соответствуют <u>Бактериальному вагинозу</u>
>1	На основании полученных параметров <u>Бактериальный вагиноз не выявлен</u>
0.5-1	Полученные параметры соответствуют <u>Промежуточному типу микрофлоры</u>

Валидация теста Флороценоз- Бактериальный вагиноз

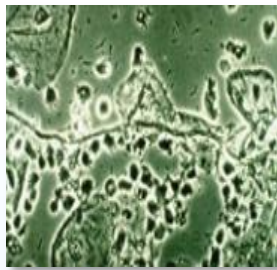
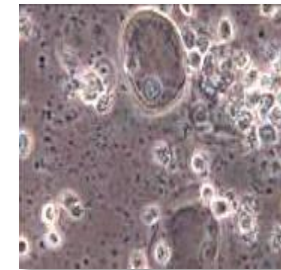
Референсна методика	ДЧ	ДС	Источник
Амсель+Ньюджент	98,5%	96,8%	Шалепо и соавт., 2014
Ньюджент+Нативный препарат (LBG)	92.8%	85.7%	Rumyantseva et al., 2015
NGS	98%	91%	Rumyantseva et al., 2016
Амсель	100%	91%	

Вагинальные инфекции в гинекологической практике

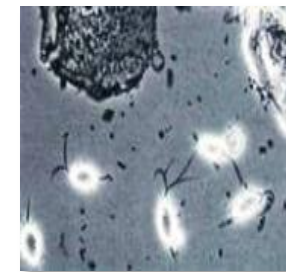
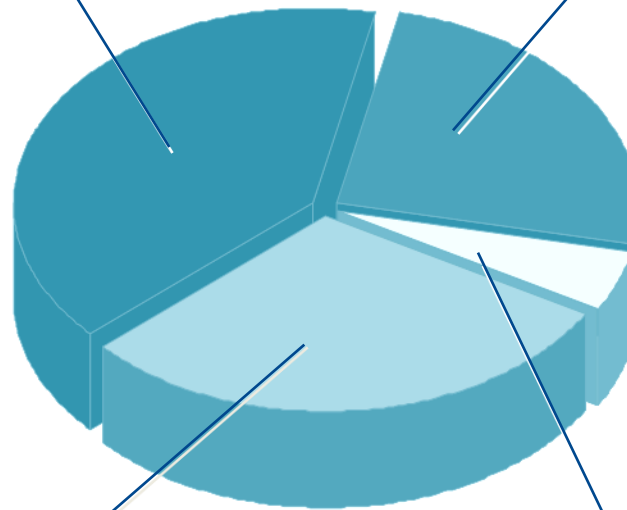
**БАКТЕРИАЛЬНЫЙ
ВАГИНОЗ (БВ) 30–40 %**



**АЭРОБНЫЙ ВАГИНИТ (АВ)
СМЕШАННЫЕ ИНФЕКЦИИ
20–30 %**



**ВУЛЬОВОГИНАЛЬНЫЙ
КАНДИДОЗ (ВВК)
20 – 30 %**



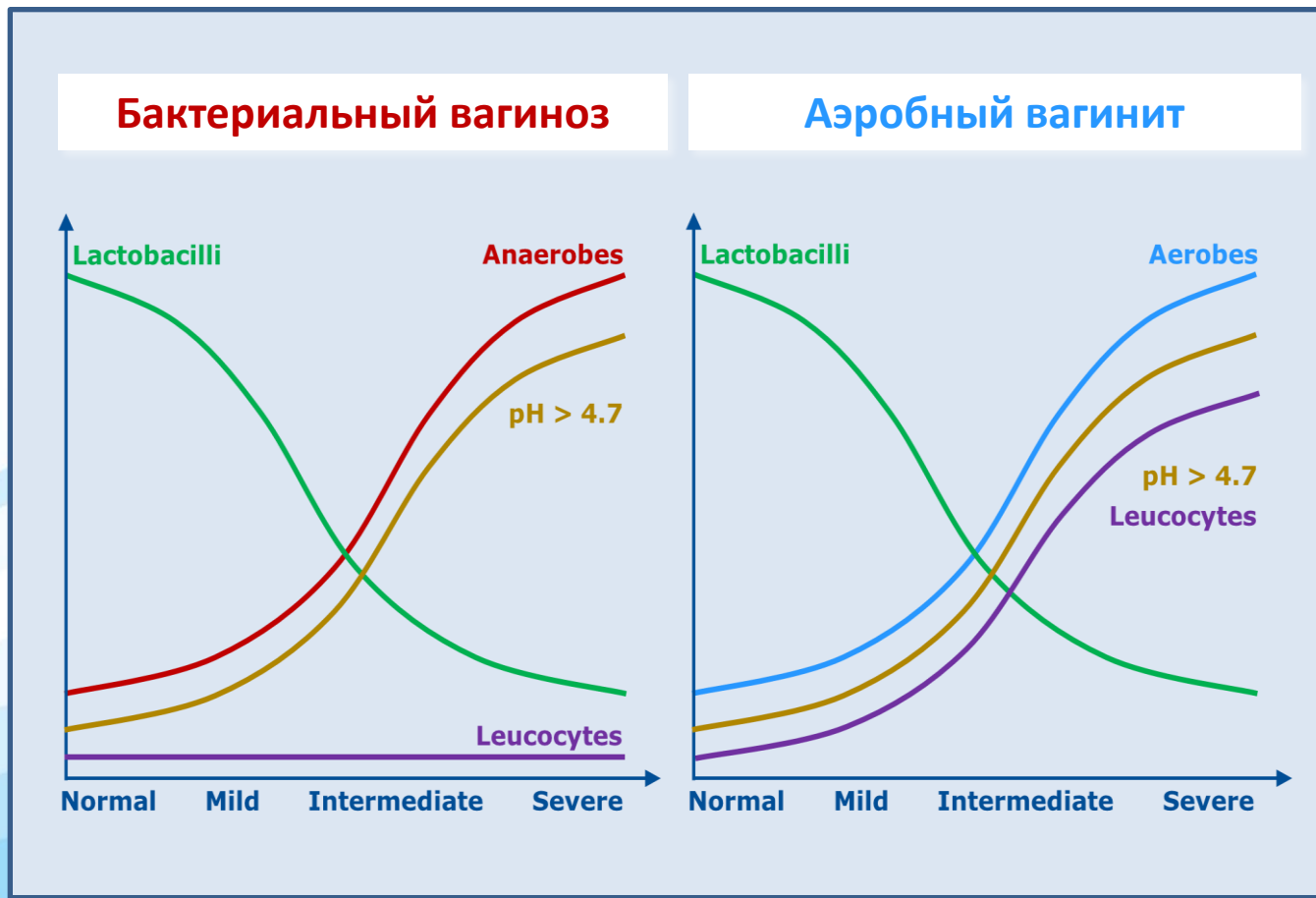
ИППП 5 – 10 %

Проблема смешанных инфекций

Диагноз	N пациентов	%
БВ (моно)	239	36.38
ВВК (моно)	151	22.98
АВ (моно)	72	10.96
TV (моно)	12	1.83
БВ+ВВК	62	9.44
ВВК+АВ	32	4.87
БВ+АВ	31	4.72
АВ+TV	21	3.20
БВ+TV	18	2.74
ВВК+TV	1	0.15
БВ+ВВК+АВ	4	0.61
БВ+ВВК+TV	1	0.15
Не идентиф.	13	1.98
Всего:	657	100

Fan A. et al., 2012

Аэробы

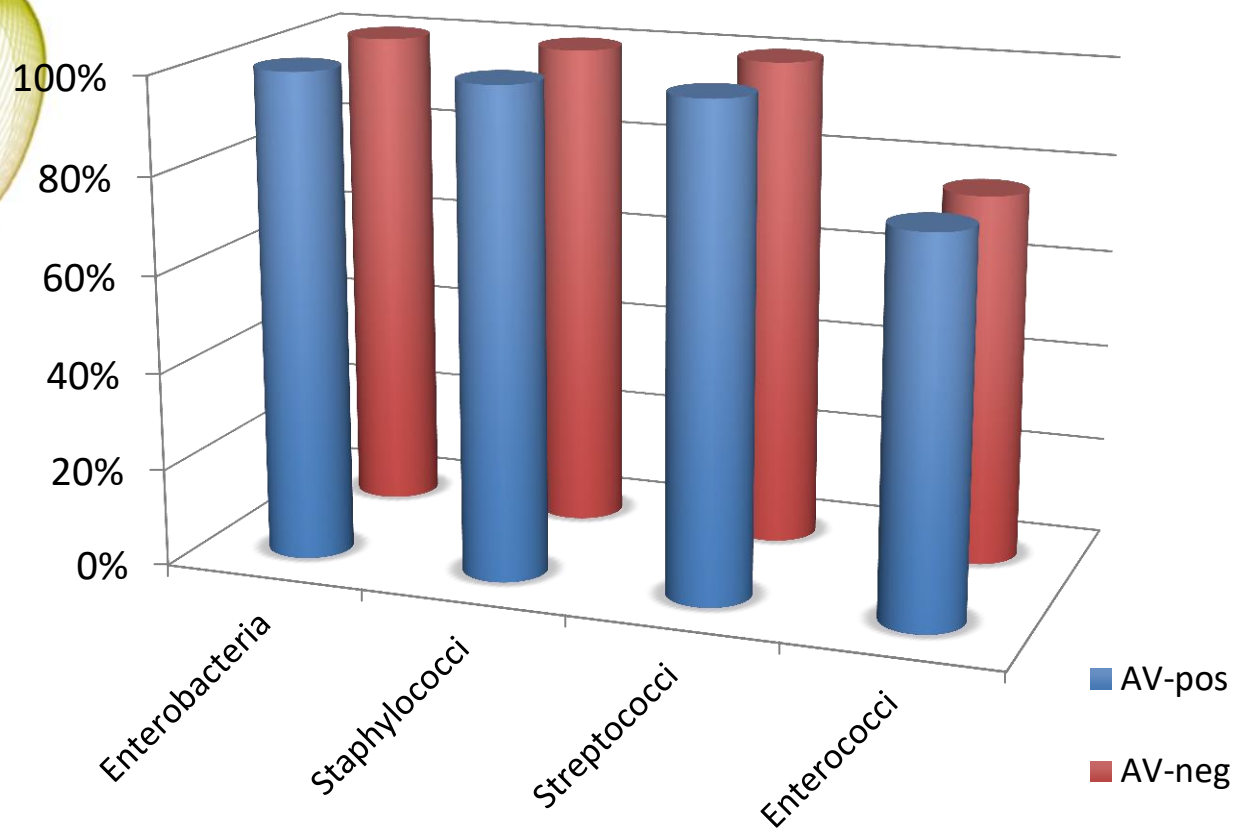


- Выделения из влагалища
- Симптомы воспаления
- pH > 4.5

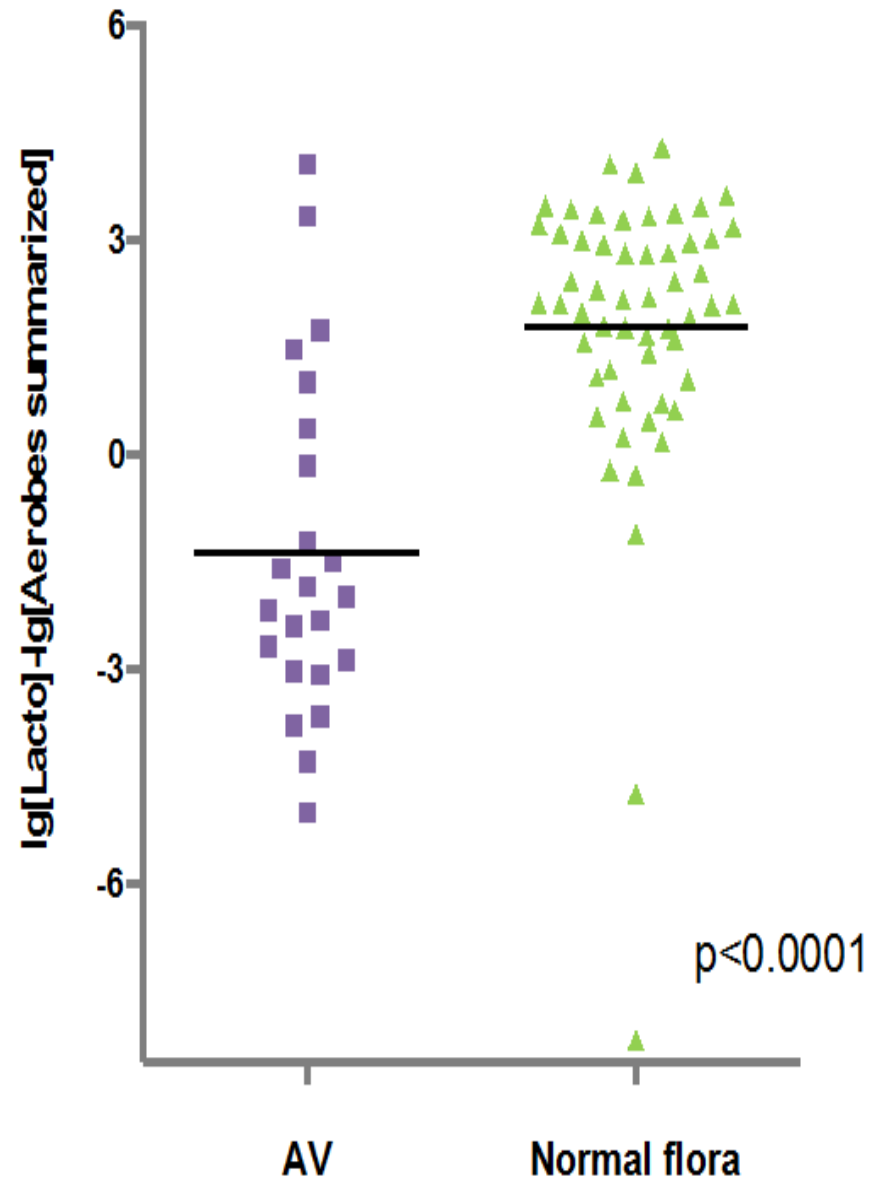
Флороценоз-Аэробы

- Набор реагентов в формате ПЦР в реальном времени с количественной оценкой
- Enterobacteriaceae spp.
- Staphylococcus spp
- Streptococcus spp

Качественное выявление микроорганизмов



Роль лактобактерий



Флороценоз-АВ: международная валидация

Arch Gynecol Obstet. 2016 Jul;294(1):109-14. doi: 10.1007/s00404-015-4007-4. Epub 2016 Jan 18.

Diagnosis of aerobic vaginitis by quantitative real-time PCR.

Rumyantseva TA¹, Bellen G², Savochkina YA¹, Guschin AE¹, Donders GG^{3,4}.

⊕ Author information

Abstract

PURPOSE: To evaluate a real-time PCR-based technique to quantify bacteria associated with aerobic vaginitis (AV) as a potential test.

METHODS: Vaginal samples from 100 women were tested by wet-mount microscopy, gram stain and quantitative real-time PCR targeting Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Enterococcus spp., Escherichia coli, Streptococcus agalactiae, S. aureus; Lactobacillus spp. AV diagnosis obtained by wet-mount microscopy was used as reference.

RESULTS: Some level of AV was diagnosed in 23 (23.7 %) cases. Various concentrations of Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp., Streptococcus spp. were detected in all patients. Enterococcus spp. were detected in 76 (78.3 %) cases. Summarized concentrations of aerobes were tenfold higher in AV-positive compared to AV-negative cases [7.30lg vs 6.06lg ($p = 0.02$)]. Concentrations of aerobes in severe, moderate and light AV cases did not vary significantly ($p = 0.14$). Concentration of lactobacilli was 1000-fold lower in AV-positive cases compared to normal cases (5.3lg vs 8.3lg, $p < 0.0001$). Streptococcus spp. dominated in the majority of AV-positive cases [19/22 (86.4 %) samples]. The relation of high loads of aerobes to the low numbers of Lactobacilli are a reliable marker for the presence of AV and could substitute microscopy as a test.

CONCLUSIONS: PCR may be a good standardized substitution for AV diagnosis in settings where well-trained microscopists are lacking.

Кандиды

Вид	%
C.glabrata	15-35%
C.krusei	1-26%
C.tropicalis	5-27%
C.parapsilosis	1-14%

Вид	Флуконазол	Итраконазол
C.albicans	Ч	Ч
C.glabrata	ДЗ	ДЗ
C.krusei	Р	ДЗ
C.tropicalis	Ч	Ч
C.parapsilosis	Ч	Ч

Флороценоз-Кандиды

- Набор реагентов в формате ПЦР в реальном времени с количественной оценкой
- *Candida albicans*
- *Candida glabrata*
- *Candida krusei*
- *Candida parapsilosis/tropicalis*

Микоплазмы

Species	Disease associations ^a						
	Urethritis	Cervicitis	Bacterial vaginosis	Endometritis and/or PID	Preterm birth	Infertility (Women)	HIV transmission
<i>M. genitalium</i>	++++	+++	-	+++	+/-	+	+
<i>M. hominis</i>	-	-	++++	+/-	+/-	-	ND
Ureaplasmas (undifferentiated)	+/-	-	+++	ND	+	+/-	ND
<i>U. urealyticum</i>	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>U. parvum</i>	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Флороценоз-Микоплазмы

- Набор реагентов в формате ПЦР в реальном времени с количественной оценкой
- *M.hominis*
- *U.parvum*
- *U.urealyticum*

C. albicans
C. glabrata
C. krusei
C. parapsilosis/tropicalis



Bacteria
Lactobacillus spp.
G.vaginalis
A.vaginae

U. parvum
U. urealyticum
M. hominis

Enterobacteriaceae
Streptococcus spp.
Staphylococcus spp.

		Параметр	Результат	Референсные значения	Единицы измерения
Диагностика бактериального вагиноза		количество клеток в образце (параметр используется для клинической интерпретации)	более 50000		ГЭ/мл
		ДНК Bacteria	4*10 ⁸	Не менее 10 ⁶	ГЭ/мл
		ДНК Lactobacillus spp.	5*10 ⁴	Не менее 1*10 ⁸	ГЭ/мл
		ДНК Gardnerella vaginalis	2*10 ⁸	Не более 5*10 ⁴	ГЭ/мл
Диагностика аэробного вагинита		ДНК Atopobium vaginae	1*10 ⁶	Не более 5*10 ⁴	ГЭ/мл
		ДНК Enterobacteriaceae	4*10 ²	Не более 5*10 ⁴	ГЭ/мл
		ДНК Staphylococcus spp.	не обнаружено	Не более 5*10 ⁴	ГЭ/мл
Диагностика инфекций, ассоциированных с условно-патогенными микоплазмами		ДНК Streptococcus spp.	1*10 ³	Не более 5*10 ⁴	ГЭ/мл
		ДНК Ureaplasma parvum	2*10 ⁴	Не более 1*10 ⁵	ГЭ/мл
		ДНК Ureaplasma urealyticum	не обнаружено	Не более 1*10 ⁵	ГЭ/мл
Диагностика кандидозного вульвовагинита		ДНК Mycoplasma hominis	3*10 ⁶	Не более 1*10 ⁵	ГЭ/мл
		ДНК Candida albicans	3*10 ⁴	Не более 1*10 ²	ГЭ/мл
		ДНК Candida glabrata	не обнаружено	Не более 1*10 ²	ГЭ/мл
		ДНК Candida krusei	не обнаружено	Не более 1*10 ²	ГЭ/мл
NCMT - диагностика инфекций, передаваемых половым путём (ИППП)		ДНК Candida parapsilosis / tropicalis	не обнаружено	Не более 1*10 ²	ГЭ/мл
		Заключение: соотношение концентраций ДНК микроорганизмов соответствует бактериальному вагинозу. Концентрация Mycoplasma hominis превышает 10 ⁵ ГЭ/мл. Концентрация Candida albicans превышает 10 ² ГЭ/мл. 			
		ДНК Neisseria gonorrhoeae	не обнаружено	не обнаружено	
		ДНК Chlamydia trachomatis	обнаружено	не обнаружено	
		ДНК Mycoplasma genitalium	не обнаружено	не обнаружено	
		ДНК Trichomonas vaginalis	не обнаружено	не обнаружено	

Чувствительность и специфичность теста Флороценоз

Компонент теста	Метод сравнения		Диагностическая чувствительность	Диагностическая специфичность
ФЦ-БВ	Амсель, Ньюджент		98,5	96,8
	Амсель		100%	91%
	Пиросеквенирование		98%	91%
ФЦ-Кандиды	Посев, Candiselect		98,1	95,6
ФЦ-Микоплазмы	Mycoplasma Duo, Микоплазмы - Микротест	Ure	100	97,5
		Mh	96	99,5
ФЦ-Аэробы	Wet mount		100	-

Преимущества теста Флороценоз

- Диагностика заболеваний влагалища, а не расшифровка состава микрофлоры
- Определение спектра микроорганизмов, необходимого для постановки диагноза
- Определение 5 видов *Candida* (построение тактики терапии)
- Постановка диагноза БВ в соответствии с «золотым стандартом»
- Возможность диагностики АВ
- **Выдача заключений, позволяющих поставить конкретный диагноз (МКБ-10)**
- Неоднократная международная валидация
- Высокие показатели ДЧ и ДС в выявлении заболеваний, а не отдельных микроорганизмов

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!