

Инновационный способ комплексной оценки локального
воспаления и состояния микробиоценоза методом ПЦР в
реальном времени

Актуальность

- ❖ Широкое распространение воспалительных заболеваний органов женской репродуктивной системы:
 - вагиниты составляют до **40%** случаев обращения женщин к гинекологам
 - частота распространения хронического эндометрита - **1-19%**
- ❖ Высокая частота рецидивирования процесса:
 - кандидоз – **5-15%**
 - бактериальный вагиноз – **15-25%**
- ❖ Акушерские и гинекологические осложнения:
 - бесплодие, неудачи в программах ВРТ, невынашивание беременности, осложненное течение гестационного периода и родов
- ❖ Важность оценки локальной воспалительной реакции для дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний
- ❖ Отсутствие объективного лабораторного метода оценки локальной воспалительной реакции

Основные направления исследования

Разработка комплексного подхода к характеристике воспалительных процессов органов женской репродуктивной системы на основе молекулярно-генетических маркеров, включающих количественную идентификацию инфекционных агентов, определение транскрипционного профиля генов иммунной системы и генетических особенностей организма:

- ❖ Характеристику состава микроорганизмов, способствующих развитию воспалительных заболеваний органов женской репродуктивной системы
- ❖ Анализ особенности экспрессии мРНК генов иммунного ответа (цитокины, рецепторы, транскрипционные факторы и др.) при вагинитах и хроническом эндометрите.
- ❖ Установить распределение аллельных вариантов генов иммунного ответа, ассоциированных с предрасположенностью к развитию вагинитов у женщин репродуктивного возраста.

Недостатки стандартного подхода

❖ Посев на флору

- Длительные сроки культивирования, повышенные требования к транспортировке и хранению материала
- Невозможность синхронизации роста микроорганизмов
- Ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов
- Отсутствие возможности культивирования большинства анаэробов в рутинных лабораторных условиях
- Повышенные требования к лаборатории

❖ Микроскопия мазка

- Субъективность оценки (изменчивость микроорганизмов, необходимость диагностировать более 10 морфотипов)
- Не все микроорганизмы доступны для идентификации при световой микроскоп

Как следствие:

- Невозможность сопоставить результаты
- Ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов
- Приблизительная количественная оценка

❖ ПЦР качественными методами

- Не дает представления о соотношении микроорганизмов между собой
- Ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов
- Нет количественной оценки

Вагинальная экосистема (микробиоценоз)

- ❖ У здоровых женщин вагинальная экосистема сбалансирована и стабильна.
- ❖ В 1 мл вагинальной жидкости в среднем содержится около **10⁹** КОЕ/мл бактерий.
- ❖ **Ключевой компонент нормофлоры – бактерии рода Lactobacillus**, преимущественно: **L. casei, L.gasseri, L.crispatus, L.vaginalis, L.jensenii**.
- ❖ **Обеспечивают колонизационную резистентность:**
 - метаболизм гликогена вагинального эпителия до молочной кислоты -закисление среды до **pH 3,8 – 4,5**.
 - продукция бактериоцинов и перекиси водорода – ограничение роста УПМ
 - антагонистическая активность – высокий биологический потенциал
 - конкуренция за рецепторные сайты на слизистой оболочке, типичные для грам «-» бактерий
- ❖ В норме во влагалище здоровой женщины репродуктивного возраста могут присутствовать: Staphylococci, Streptococci group B, Corynebacterium, Prevotella, Peptostreptococcus, Gardnerella, урогенитальные микоплазмы (M.hominis, U,urealyticum, U.parvum) и другие (до 300 видов УПМ), при этом существуют их устойчивые сочетания.
- ❖ **В норме количество УПМ составляет около 10⁴-10⁷ КОЕ/мл.**

Факторы нарушения вагинального биоценоза

- ❖ **Изменения и нарушения гормонального фона:**
 - нерегулярная половая жизнь;
 - беременность;
 - роды;
 - аборты;
 - любые виды нарушений цикла;
 - половое созревание;
 - пременопауза и менопауза.
- ❖ **Инфекции передающиеся половым путем**
- ❖ **Любые инфекционно-воспалительные заболевания органов малого таза**
- ❖ **Лечение антибиотиками**, особенно продолжительное или многократное
- ❖ **Беспорядочная половая жизнь, частая смена половых партнеров, пренебрежение средствами контрацепции**
- ❖ **Переохлаждение организма** (однократное сильное переохлаждение/постоянное замерзание)
- ❖ **Заболевания кишечника, хронические проблемы со стулом, дисбактериоз кишечника**
- ❖ **Смена климата**
- ❖ **Гиповитаминозы, истощение**
- ❖ **Иммунная недостаточность**

Показания к проведению исследования

- ❖ Клинические и/или лабораторные признаки воспалительного процесса уrogenитального тракта
- ❖ Предстоящие оперативные манипуляции на органах малого таза с высоким риском развития инфекционных осложнений
- ❖ Наличие отягощенного акушерского или гинекологического анамнеза (невынашивание беременности, перинатальные потери, бесплодие)
- ❖ Выявление инфекций, передаваемых половым путем
- ❖ Предгравидарная подготовка
- ❖ Беременность (во всех триместрах)
- ❖ В случае несовпадения данных клинических и лабораторных обследований
- ❖ Кольпит атрофический (сенильный), исследование женщин в постменопаузе
- ❖ Анализ после стрессовых воздействий
- ❖ Исследование состояния биоценоза здоровых женщин

Фемофлор®

(количественное исследование условно-патогенных и патогенных микроорганизмов-возбудителей бактериального вагиноза и дисбиотических нарушений)

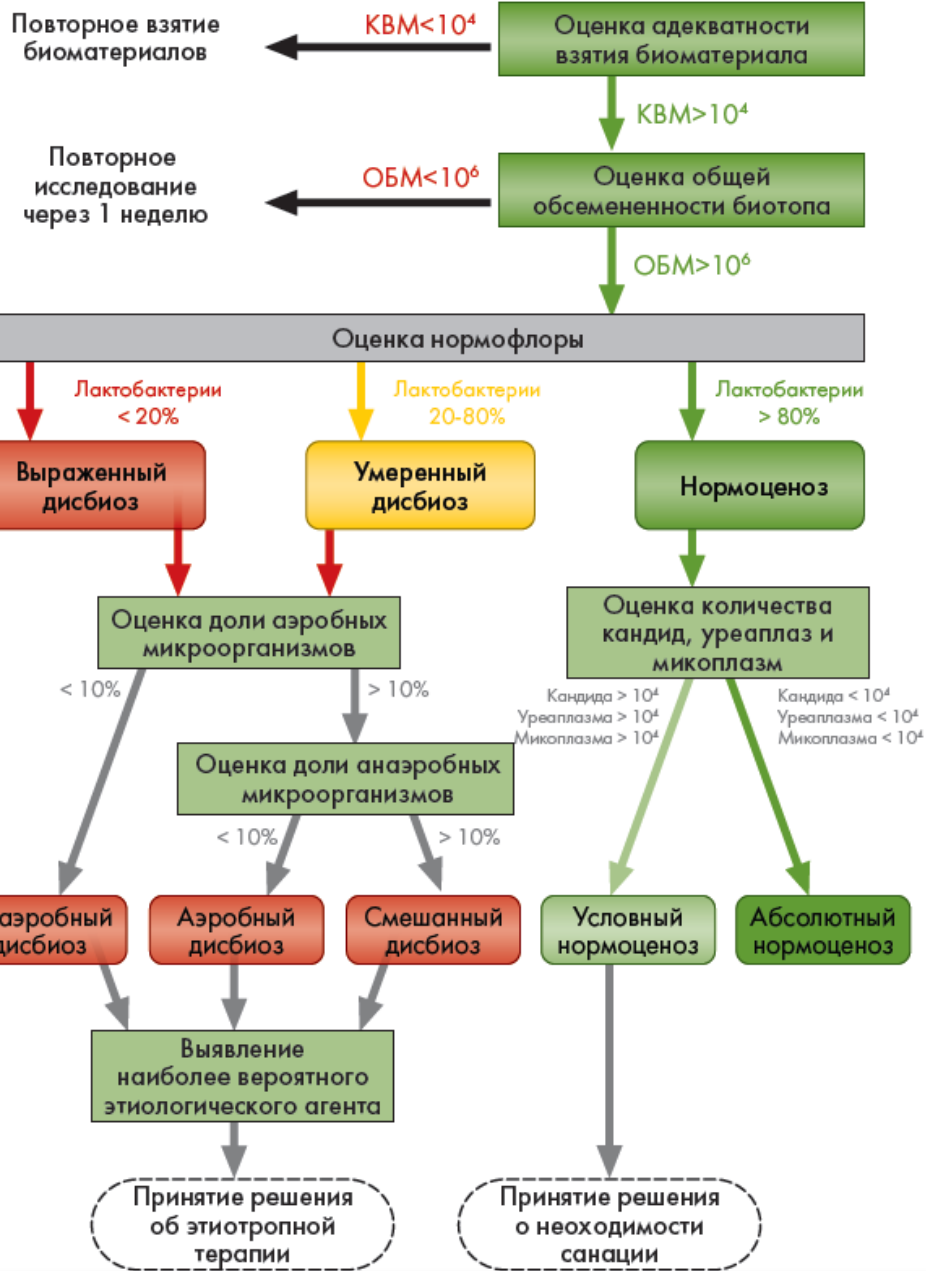
РУ 2009/04663

Возможности метода:

- ❖ Количественная оценка общей бактериальной массы
- ❖ Количественное определение доли урогенитальной нормофлоры (лактобактерии, типичные для урогенитального тракта женщин)
- ❖ Количественный анализ комплекса аэробных и анаэробных микроорганизмов, микоплазм, грибов рода *Candida*, участвующих в развитии дисбиотических процессов в урогенитальном микробиоценозе
- ❖ Определение этиологии инфекционного процесса (*аэробный, анаэробный, смешанный дисбиоз*)
- ❖ Дифференцированный анализ степени выраженности дисбиотических нарушений (*нормоценоз, условный нормоценоз, умеренный или выраженный дисбиоз*)
- ❖ Возможность определения объема назначаемой терапии, индивидуальный подбор схемы лечения
- ❖ Возможность проведения динамических наблюдений
- ❖ Исключение ошибок преаналитического этапа (контроль взятия материала)

Коллектив авторов технологии Фемофлор® в 2014 г стал обладателем премии лучшим врачам России «Призвание» в номинации «За создание нового метода диагностики»

Алгоритм интерпретации результатов



Выдача лабораторного заключения осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения

№	Наименование исследования	Результаты		% от БМ
		Количественный	Относительный Lg (X/БМ)	
	Контроль взятия материала	$10^{5.1}$	<input checked="" type="checkbox"/>	
1	Общая бактериальная масса	$10^{7.0}$	<input type="checkbox"/>	
НОРМОФЛОРА				
2	Lactobacillus spp.	$10^{7.1}$	0,0 (85-100%) <input checked="" type="checkbox"/>	
ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ				
3	сем. Enterobacteriaceae	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
4	Staphylococcus spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
5	Streptococcus spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
6	Enterococcus spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
7	Streptococcus agalactia	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
ОБЛИГАТНО-АНАЭРОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ				
8	Prevotella bivia + Porphyromonas spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
9	Gardnerella vaginalis	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
10	Eubacterium spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
11	Sneathia spp. + Leptotrichia spp. + Fusobacterium spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
12	Megasphaera spp. + Veillonella spp. + Dialister spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
13	Lachnobacterium spp. + Clostridium spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
14	Mobiluncus spp. + Corynebacterium spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
15	Peptostreptococcus spp.	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
16	Atopobium vaginae	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ				
17	Candida spp.*	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
МИКРОПЛАЗМЫ				
18	Mycoplasma hominis*	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
19	Mycoplasma genitalium**	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
20	Ureaplasma urealyticum*	не выявлено	<input type="checkbox"/>	
21	Ureaplasma parvum*	не выявлено	<input type="checkbox"/>	

* Абсолютный анализ Lg(X)
** Качественный анализ

логарифмическая шкала

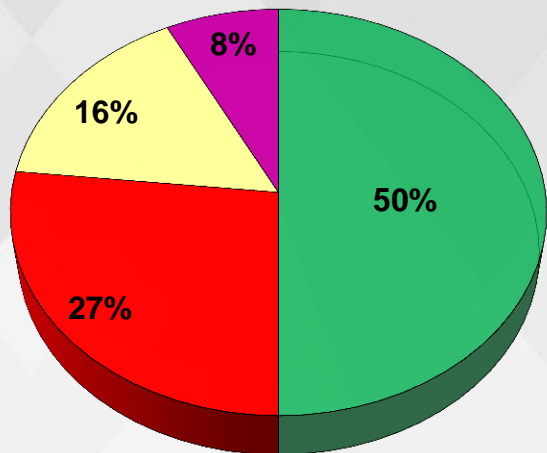
Заключение:
Абсолютный нормоценоз

Нормативная база

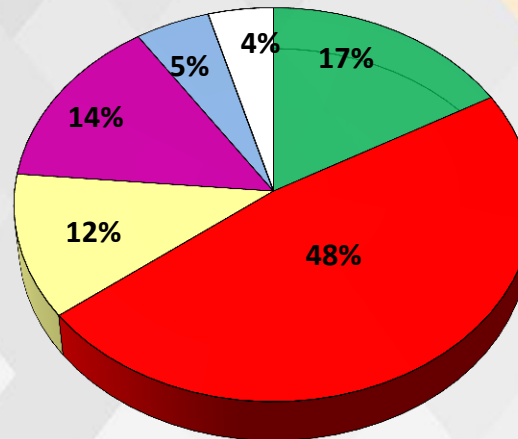
- ❖ Приказами Министерства здравоохранения и социального развития РФ, начиная с 28 декабря 2011 г. № 1690н по настоящий момент (**Приказ МЗ РФ № 916н от 10 декабря 2013 г) «О перечне видов высокотехнологичной медицинской помощи»** тест «Фемофлор®» отнесен к высокотехнологичным методам медицинской помощи в области «Акушерство и гинекология»
- ❖ Спектр представленных в Фемофлоре анаэробов обнаруживается в перитонеальной жидкости и маточных трубах у женщин с воспалительными заболеваниями матки и придатков. Выявление данной группы микроорганизмов регламентировано в соответствии с **Приказом МЗ РФ от 21.02.2000г № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»** в разделе 9.1.2.1.3. *Условно-патогенные облигатные анаэробные микроорганизмы-возбудители гнойно-септических и оппортунистических заболеваний.*

Типирование лактобактерий

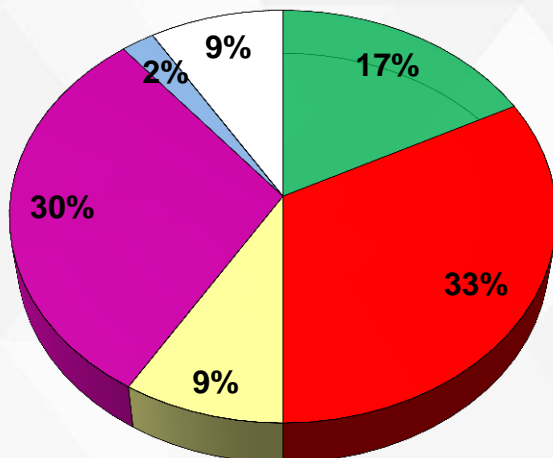
Группа сравнения



Группа с вагинитом



Группа с бактериальным вагинозом



- L.crispatus
- L.iners
- L.jensenii
- L.gasseri
- другие виды
- Lactobacillus spp. не выявлено

При доминировании в составе нормофлоры *L.crispatus* состояние системы наиболее стабильно
С доминированием *L.iners* и *L.gasseri* связаны риски развития дисбиотических процессов во влагалище

Анализ экспрессии генов цитокинов при ВЗОМТ

❖ Наиболее информативные маркеры воспалительного процесса

при вагините :

- фактор некроза опухолей (ФНО)
- ИЛ 18
- TLR4
- фактор транскрипции Th2-лимфоцитов - GATA3

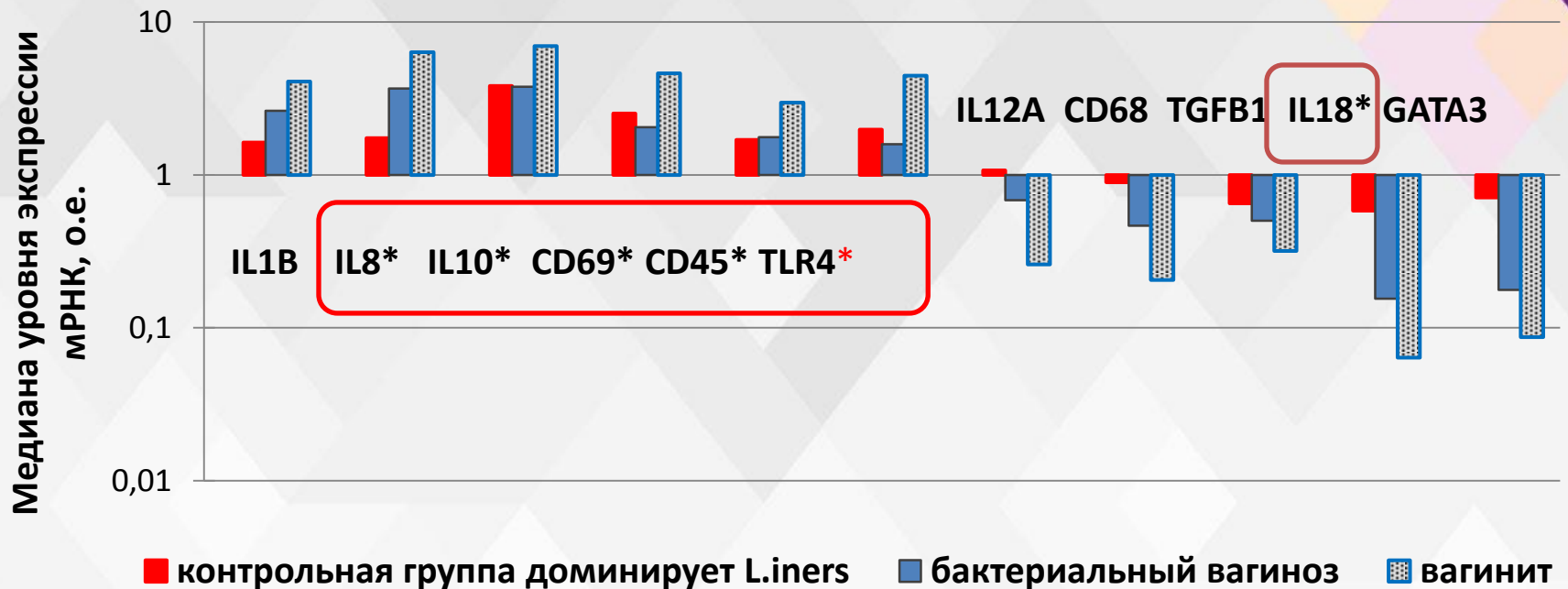
при хроническом эндометрите:

- ИЛ1В
- ИЛ2
- ИЛ10
- транскрипционный фактор развития и функционирования регуляторных Т-клеток Foxp3
- TLR9
- ИЛ2Ra.

❖ Воспалительные процессы слизистой влагалища сопровождаются изменением транскрипционного профиля иммунокомпетентных клеток:

- *повышается* экспрессия мРНК генов ИЛ1В, ИЛ8, ИЛ10, CD45, CD69, TLR2, TLR4, ФНО
- *снижается* экспрессия мРНК генов GATA3, антигенпрезентирующих иммуноцитов CD68, ИЛ12А, ИЛ18, ТФРВ1, транскрипционного фактора RORC.

Транскрипционный профиль при доминировании *L.iners*

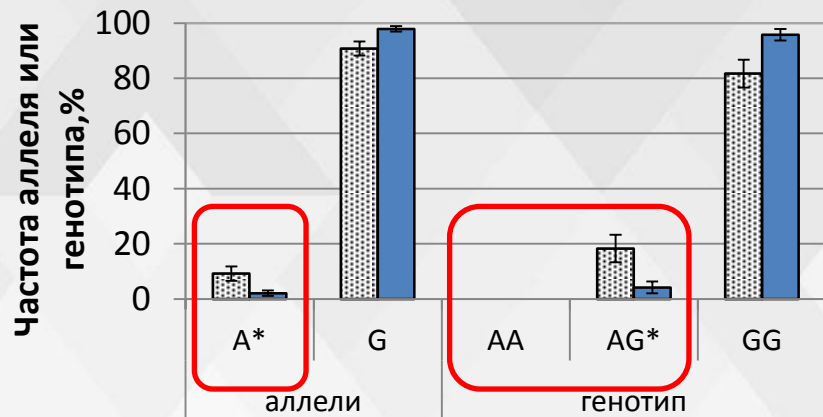


*достоверные различия по группе сравнения с доминированием *L.iners* по сравнению с доминированием *L.crispatus*

Доминирование в составе нормофлоры *Lactobacillus iners* – первый шаг к нарушению баланса микробиоты

Генетические факторы предрасположенности к вагинитам

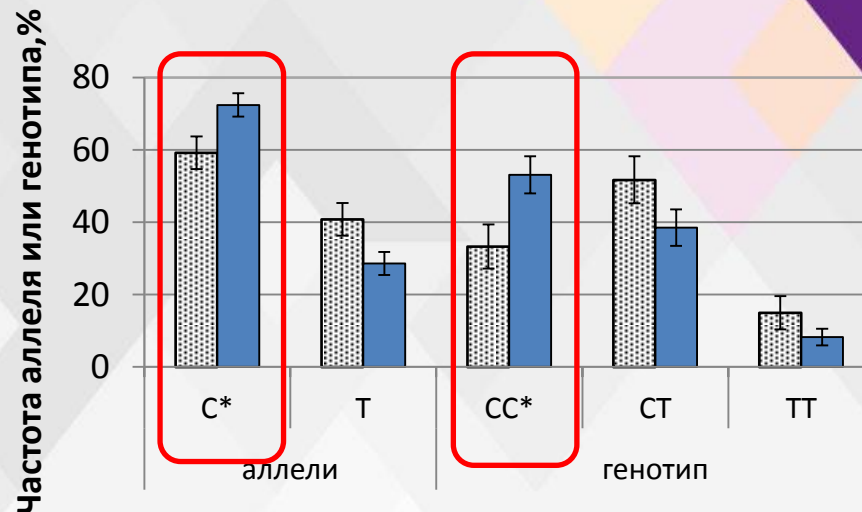
TNF(G-238A) rs361525



■ группа сравнения ■ пациентки с вагинитами

Аллельный вариант А является протективным по аутомно-доминантному типу и встречается реже в группе женщин с вагинитами, $p=0,004$

TGFB1(C-509T) rs1800469



■ группа сравнения ■ пациентки с вагинитами

Аллельный вариант С является фактором риска развития вагинита, $p=0,015$ по аутомно-рецессивному типу

Генетически обусловленная предрасположенность к пониженной экспрессии TNF- α и TGF- β 1 является фактором риска развития вагинита. Выявленные аллельные варианты являются более частотными в популяции, что возможно, и обуславливает широкое распространение данной гинекологической патологии

Практическая значимость



Регистрационное удостоверение
№ 3756 от 7.02.2014 г.

Набор реагентов для оценки локальной воспалительной реакции влагалища методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

(Экспрессия генов. Воспаление влагалища)
по ТУ производства ООО «Научно-производственное объединение ДНК-Технология».

❖ Пат. 2510855 Российская Федерация, МПК C12Q1/68, G01N33/50. **Способ диагностики вагинитов у беременных женщин по уровню экспрессии мРНК генов интерлейкинов во влагалищных мазках**

❖ Пат. Российская Федерация, МПК C12Q1/68, G01N33/50. **Способ определения локальной воспалительной реакции у женщин репродуктивного возраста по уровню экспрессии мРНК генов цитокинов во влагалищных мазках.**

Спасибо за внимание!