

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
"Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова"

Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации  
117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Учреждение Российской академии медицинских наук  
Научно–исследовательский институт акушерства и гинекологии  
им. Д.О. Отта Северо-Западного отделения РАМН  
199034, г. Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3

**«Применение метода полимеразной цепной реакции в реальном  
времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у  
женщин  
(тест Фемофлор®)»**

(медицинская технология)

Москва

2011

## **Аннотация:**

Инфекционно-воспалительные заболевания урогенитального тракта занимают ведущее место в структуре акушерско-гинекологической патологии. Метод ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволяет проводить многофакторный количественный анализ условно патогенной микрофлоры урогенитального тракта, что является принципиально новым подходом к диагностике воспалительных заболеваний и дисбиотических состояний нижних отделов мочеполовых органов женщины и может служить чувствительным инструментом для исследования микробиоценоза влагалища, микробного пейзажа цервикального канала и уретры и других биотопов.

Данная медицинская технология описывает применение метода ПЦР в реальном времени для исследования микробиоценоза урогенитального тракта у женщин (тест Фемофлор® 16) и адресована специалистам клинично-диагностической лаборатории, владеющим навыками использования молекулярно-биологических методов.

Данная медицинская технология рекомендована для широкого использования в диагностике нарушений микробиоценоза урогенитального тракта у женщин, также технология может быть применена для анализа качественного и количественного состава сложных микробных комплексов, полученных из различных биотопов человеческого организма имеющих микробный пейзаж, сходный с таковым в урогенитальном тракте женщины.

Авторы медицинской технологии:

ФГБУ «НЦАГиП им. В.И.Кулакова» Минздравсоцразвития России:

Директор, академик РАМН Сухих Г.Т., зам.директора, д.м.н., проф. Прилепская В.Н., зав.лабораторией молекулярно-генетических методов исследований, д.б.н. Трофимов Д.Ю, с.н.с. лаборатории молекулярно-генетических методов исследований, к.м.н. Донников А.Е.

НИИАГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН:

Директор, академик РАМН Айламазян Э.К., зав.лабораторией микробиологии, д.м.н., проф. Савичева А.М, с.н.с. лаборатории микробиологии, к.б.н. Шипицына Е.В.

Организации-разработчики:

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта Северо-Западного отделения РАМН

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ .....	7
ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ .....	8
МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ .....	9
ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ .....	11
ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ .....	19
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ .....	19
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	25

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в структуре акушерско-гинекологической патологии инфекционно-воспалительные урогенитальные заболевания занимают первое место. Их частота в различных популяциях колеблется от 30 до 80% [1]. Заболевания, вызываемые условно патогенной микрофлорой, могут протекать как с клиническими проявлениями, так и бессимптомно [2]. Бессимптомное течение заболевания часто приводит к позднему обращению больных к врачу и развитию вследствие этого серьезных осложнений. Установлено, что заболевания, вызываемые условно патогенными микроорганизмами, увеличивают риск возникновения инфекций, передаваемых половым путем (ИППП) (сифилис, трихомониаз, гонорея, хламидиоз) [3, 4], и ВИЧ-инфекции [5, 6]. Своевременно не диагностированные инфекции, вызываемые условно патогенной микрофлорой, могут стать причиной нарушения репродуктивной функции женщины [7], спонтанных аборт [8], преждевременных родов [9], внутриутробного инфицирования [8] и низкой массы тела плода [10], постнатальных осложнений [10], а также осложнений после хирургических вмешательств на органах малого таза [11].

В настоящее время для выявления дисбиоза влагалища используется комплекс клинических и лабораторных критериев, включающий жалобы пациентки (выделения из влагалища, зуд в области половых органов), объективные клинические проявления (выделения, гиперемия слизистой влагалища) и нарушения микробиоценоза, выявляемые микроскопическим и культуральным методами.

Клиническое обследование, как правило, не позволяет установить этиологическую природу заболевания, так как ИППП и воспалительные процессы, вызываемые условно патогенной микрофлорой, в подавляющем большинстве случаев не имеют специфических клинических симптомов. В этой связи лабораторные исследования играют ключевую роль в диагностике данных заболеваний.

В современной практике широко применяется микроскопический метод диагностики инфекционно-воспалительных урогенитальных заболеваний. Недостатками метода является то, что многие виды и роды условно патогенных микроорганизмов имеют похожие морфотипы, тогда как их патогенные свойства и чувствительность к антибиотикам могут значительно отличаться. Кроме того, микроскопическое исследование не позволяет идентифицировать ряд этиологически значимых условно патогенных бактерий. Например, бактерии *Atopobium vaginae*, которые, как известно, ассоциированы с развитием бактериального вагиноза [12], не визуализируются при микроскопическом исследовании, а могут выявляться только культуральным методом

(при соблюдении жестких требований к транспортировке и культивированию анаэробных микроорганизмов) или методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [13]. Наконец, к недостаткам метода можно отнести субъективизм и зависимость результата исследования от квалификации врача-лаборанта.

Более информативным методом выявления условно патогенных микроорганизмов является бактериологический метод, который позволяет установить видовой состав аэробных, факультативно анаэробных и некоторых облигатно анаэробных бактерий и дает представление о чувствительности выявленных микроорганизмов к антибиотикам.

Однако и бактериологический метод диагностики не лишен ряда серьезных ограничений. Условно патогенная микрофлора, являющаяся наиболее частой причиной урогенитальных заболеваний у женщин, представлена, главным образом, анаэробными микроорганизмами, а подавляющее большинство лечебных учреждений практического здравоохранения в настоящее время не имеют условий для культивирования таких микроорганизмов. Существенными недостатками культурального метода являются также длительные сроки культивирования микроорганизмов (в среднем 5 дней) и необходимость сохранения их жизнеспособности до момента поступления биоматериала в лабораторию.

Таким образом, актуальность проблемы объективной лабораторной диагностики урогенитальных инфекционно-воспалительных заболеваний, вызываемых условно патогенной микрофлорой, для репродуктивного здоровья женщин, обуславливает настоятельную потребность в разработке и внедрении в практическое здравоохранение новых диагностических методов, позволяющих своевременно выявлять такие заболевания.

Перспективным методом исследования сложных микробных ассоциаций благодаря высокой чувствительности и специфичности является полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени. На сегодняшний день метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) широко используется в российской лабораторной практике для выявления условно патогенных микроорганизмов урогенитального тракта – *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* и т.д. Однако «классическая» ПЦР с регистрацией результата по окончании реакции не предполагает количественной характеристики микробиоты и не дает представления о количественном соотношении микроорганизмов в исследуемом материале. В то же время дисбиотические процессы характеризуются нарушением количественных соотношений нормальной и условно патогенной микрофлоры. Метод ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволяет проводить многофакторный количественный анализ

условно патогенной микрофлоры урогенитального тракта, что является принципиально новым подходом к диагностике воспалительных заболеваний и дисбиотических состояний нижних отделов мочеполовых органов женщины и может служить чувствительным инструментом для исследования микробиоценоза влагалища, микробного пейзажа цервикального канала и уретры.

До настоящего времени существенным ограничением применения этого метода для описания нормального биоценоза являлось большое видовое разнообразие микрофлоры урогенитального тракта женщины. В этих условиях традиционный подход, направленный на выявление определенных видов микроорганизмов либо становится малоинформативным, либо очень затратным и трудоемким. Предлагаемый подход, заключающийся в определении широких групп микроорганизмов и использовании мультиплексной системы детекции, позволяет при сохранении высокой технологичности и умеренной стоимости исследования достичь высокой информативности, позволяя полностью количественно описывать биоценоз урогенитального тракта в 95-98% случаев, что позволяет широко использовать его для целей клинической лабораторной диагностики.

## **ПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

**Основной областью (основные показания) применения данной медицинской технологии является оценка качественного и количественного состава микроорганизмов, составляющих микробиоценоз влагалища у женщин репродуктивного возраста, в том числе при беременности, а именно:**

- определение этиологической причины дисбиотического состояния (что делает возможным осуществление направленной этиотропной терапии);
- определение степени выраженности дисбиотических нарушений (в результате чего становится возможной индивидуализация объема терапии);
- оценка эффективности проводимой терапии и результатов лечения;
- мониторинг восстановления нормальной микрофлоры влагалища.

**Данная медицинская технология также может применяться в следующих случаях (дополнительные показания):**

- оценка качественного и количественного состава микрофлоры любого происхождения в случае, если предполагаемый видовой состав соответствует перечню микроорганизмов, определяемых с помощью данной технологии.
- косвенная оценка чувствительности микрофлоры к применяемому антибактериальному препарату.

**При использовании технологии по дополнительным показаниям клиническая интерпретация результатов определяется конкретной клинической ситуацией, видом и источником биологического материала, в котором производится исследование и рядом других факторов. В этих случаях оценка результатов производится лечащим врачом индивидуально в каждом случае.**

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

**Клинические ситуации, при которых применение данной медицинской технологии по основным показаниям невозможно:**

- Ранее, чем через 24-48 часа после кольпоскопии.
- Ранее, чем через 24 часа после УЗ-исследования с помощью влагалищного датчика.
- Ранее, чем через 2 недели после применения лекарственных препаратов (пробиотики, эубиотики), содержащих микроорганизмы.

**Клинические ситуации, при которых применение данной медицинской технологии по основным показаниям ограничено:**

- На фоне менструального кровотечения.
- Ранее, чем через 10 дней после применения антибактериальных препаратов или местных антисептических средств.
- На фоне применения гонадотропин-рилизинг-гормонов
- Хирургическая кастрация.
- Лактационная аменорея.

**Клинические ситуации, при которых применение данной медицинской технологии по дополнительным показаниям невозможно:**

- Если клинически значимые количества микроорганизмов в исследуемом биоматериале менее уровня отрицательного контроля для соответствующего микроорганизма, в том числе исследование нормально стерильных сред и биотопов.
- В случае попадания в исследуемый образец лекарственных препаратов, влияющих на возможность или эффективность выделения нуклеиновых кислот из биологического образца и/или прохождение реакции амплификации (ультразвуковой контактный гель, гепарин и т.п.).



## **МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

### **Необходимые реактивы и расходные материалы:**

1. Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований *in vitro* (№ ФСЗ 2009/05024, Axugen Scientific Inc., США от 10.09.2009, срок действия: не ограничен):
2. Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК /ПРОБА-НК-ПЛЮС) (№ ФСР 2010/08867, ООО «НПО ДНК-Технология», Москва, Россия, от 21 сентября 2010 года, срок действия: не ограничен)
3. Комплект реагентов для выделения ДНК по ТУ 9398-037-46482062-2009 в следующих формах комплектации: ПРОБА-ГС , ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА) (№ФСР 2010/08696, ООО «НПО ДНК-Технология», Москва, Россия от 19 августа 2010 года, срок действия: не ограничен)
4. Набор реагентов для исследования биоценоза урогенитального тракта у женщин методом ПЦР в режиме реального времени (ФЕМОФЛОР) (№ ФСР 2009/04663 ООО «НПО ДНК-Технология», Москва, Россия, от 26 апреля 2010 года, срок действия: не ограничен).
5. Зеркало гинекологическое по Куско (ФСЗ №2007/00493, ЗАО «Медицинское предприятие «Симуг», Республика Беларусь от 15.10.2007 года, срок действия: не ограничен).
6. Зонд «Юнона» (ФСЗ №2009/04877, ЗАО «Медицинское предприятие Симуг», Республика Беларусь, от 03.08.2009, срок действия: не ограничен)
7. Перчатки латексные хирургические опудренные и неопудренные, стерильные и нестерильные Vogt Medical, размеры: 5.5; 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0 (ФС №2006/1846 от 22.11.2006 г., действителен до 22.11.2011 г., Vogt Medical Vertrieb GmbH, ФРГ)
8. Емкости-контейнеры одноразовые (желтого и красного цвета) по ТУ 9398-002-13026403-2009 следующих исполнений: -ЕК-01-«КМ-Проект» (для сбора острого инструментария класса Б,В); - ЕК-02-«КМ-Проект» (для сбора органических отходов класса Б,В) (ФСР 2009/06094 от 13.11.2009 г., срок действия не ограничен, ООО НВП «КМ-проект», Россия).
9. Наконечники универсальные пластиковые в штативах и без штативов для лабораторных дозаторов и роботизированных систем (№ ФСЗ 2009/05025 от 10.09.2009 г., срок действия не ограничен, Axugen Scientific Inc., США).

10. Натрия хлорид (РУ PN003832/01 от 29.10.2009 г., срок действия не ограничен, ООО «Гематек», Россия)
11. Средство дезинфицирующее «Жавель Солид» (№77.99.18.380.P.000124.04.03 от 09.04.2003 г., срок действия не ограничен, Jасol S.A., Франция)

**Необходимое оборудование:**

1. Бокс абактериальной воздушной среды для защиты оператора при работе с патогенными агентами и микроорганизмами, передающимися воздушно-капельным путем: БАВп-01-«Ламинар-С»-0,9; БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2; БАВп-01-«Ламинар-С»-1,5; БАВп-01-«Ламинар-С»-1,8 (№ ФС 02262004/0542-04, ЗАО «Ламинарные системы», Россия от 13.09.2004 г., действителен до 13.09.2014 г.).
2. Термостат твердотельный программируемый малогабаритный ТТ-1-«ДНК-Техн.» (№ ФС 022а4004/5199-06, НПО ДНК-Технология, Россия от 28.12.2006 г., действителен до 23.04.2012 г.).
3. Центрифуга «Фуга/вортекс Микро-Спин FV-2400» (№ ФС 2005/518 от 05.04.2005 г., действительно до 05.04.2015 г., SIA «BIOSAN», Республика Латвия).
4. Дозаторы многофункциональные 1-4-8-12 канальные механические (0,1 мкл -100мл) (ФС №2005/450 от 24.03.2005 г, действителен до 24.03.2015 г., Biohit Oyj, Финляндия).
5. Холодильники фармацевтические по ТУ 9452-168-07503307-2004 в следующих исполнениях: ХФ-250 «ПОЗИС», ХФ-250-1 «ПОЗИС», ХФ-400 «ПОЗИС», ХФ-400-1 «ПОЗИС» (№ФСР 2009/05705 от 24.09.2009 г., срок действия не ограничен, ФГУП «ПОЗиС», Россия).
6. Морозильник микропроцессорный со звуковой и световой сигнализацией и температурным табло для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов ММ-180/20/35-«ПОЗИС» (№20/01070803/5608-03 от 10.10.2003 г., действителен до 21.08.2013 г., ФГУП «Производственное объединение «Завод имени Серго», Россия).
7. Центрифуга типа MiniSpin, модели MiniSpin, MiniSpin plus, MiniSpin plus SPACE (РУ МЗ РФ № 2002/637 от 9.08.2002 г, срок действия до 9.08.2012 г., Eppendorf AG, Германия)
8. Центрифуги для медицинских и биохимических лабораторий Heraeus Pico и Heraeus Fresco (ФЗС №2007/00317, от 18.09.2007 г, срок действия не ограничен, Thermo Electron LED GmbH, Германия).
9. Отсасыватель медицинский ОМ-1 ФСР №2010/08928 от 30.09.2010 г., срок действия не ограничен, ОАО «Утес», Россия).

10. Амплификатор детектирующий «ДТлайт» по ТУ 9443-003-96301278-2010 в следующих модификациях: 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2, 4L1, 5L1, 6L1 (№ ФСР 2011/10228 от 03 марта 2011 года, срок действия не ограничен, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)
11. Амплификатор детектирующий «ДТпрайм» по ТУ 9443-004-96301278-2010 в следующих модификациях: 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6, 4X1, 5X1, 6X1 (№ ФСР 2011/10229 от 03 марта 2011 года, срок действия не ограничен, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)
12. Амплификатор детектирующий ДТ-96 по ТУ 9443-002-96301278-2007 (№ ФСР 2007/01250 от 04 мая 2010 года, срок действия не ограничен, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия)
13. Бокс лабораторный с УФ лампой для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-бокс) БЛ-ПЦР-«ДНК-Техн» (№ ФС 02265379/5194-06 от 28.12.2006 г., действителен до 27.12.2013 г., ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

## **ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ**

### **Получение и хранение образцов**

#### **Общие требования**

- Для получения корректных результатов большое значение имеет качество взятия образца биоматериала для исследования, его хранение, транспортировка и предварительная обработка.
- Исследование урогенитального микробиоценоза методом ПЦР относится к прямым методам лабораторного исследования, то есть образец биоматериала анализируется на наличие и количество ДНК условно патогенных микроорганизмов.
- Основная масса микроорганизмов, обитающих в организме человека и участвующая в создании соответствующего биоценоза, локализована на поверхности эпителия и составляет т.н. «биопленку». В связи с этим, при взятии биоматериала на анализ необходимо собирать микробную пленку вместе с поверхностными слоями эпителия, а не забирать содержимое просвета полого органа. При взятии биоматериала из урогенитального тракта критерием правильности процедуры взятия является наличие в образце достаточного количества эпителиальных клеток.
- При проведении анализа реагентами серии Фемофлор® анализируется качество взятия биоматериала врачом-клиницистом по количеству эпителиальных клеток человека,

попавших в транспортную пробирку. Количество эпителиальных клеток оценивается путем измерения количества геномной ДНК человека в анализируемой пробе.

### **Материал для исследований**

- Клиническим материалом для исследования по основным показаниям служит отделяемое заднего свода или боковых сводов влагалища, однако, при использовании технологии по дополнительным показаниям, по усмотрению врача, это может быть отделяемое цервикального канала и/или уретры.
- Поскольку ПЦР является прямым методом лабораторной диагностики, в целях уменьшения рисков получения ложноотрицательных результатов рекомендуется брать материал из места предполагаемой локализации инфекционного процесса.
- Решение о необходимости исследовать ту или иную локализацию (влагалище, уретра, цервикальный канал) для анализа урогенитальной микробиоты принимает лечащий врач на основании совокупности жалоб пациентки и клинической картины заболевания.
- В день обследования женщины не должны проводить туалет половых органов и спринцевание влагалища.
- Для получения объективного результата необходимо, чтобы исследуемый клинический материал содержал возможно большее количество эпителиальных клеток и минимальное количество слизи и примеси крови. Неправильное взятие биоматериала может привести к невозможности получения достоверного результата и, вследствие этого, необходимости повторного взятия биоматериала.
- Клинический материал берут в пробирку объемом 1,5 мл, содержащую в качестве транспортной среды 0,5 мл стерильного физиологического раствора (раствор натрия хлорида).

### **Порядок взятия клинического материала в пробирку с транспортной средой**

1. Открыть крышку пробирки
2. С помощью одноразового стерильного зонда получить отделяемое соответствующего биотопа (влагалище, уретра, цервикальный канал). Перенести зонд с клиническим материалом в пробирку с транспортной средой, зонд тщательно прополоскать в транспортной среде, затем извлечь и выбросить (при необходимости получения клинического материала из нескольких биотопов повторить процедуру, каждый раз забирая клинический материал новым зондом в новую пробирку).

3. Пробирку плотно закрыть крышкой, промаркировать.

#### **Особенности взятия клинического материала из влагалища**

- Клинический материал из влагалища получают с заднего или боковых сводов с помощью вагинального или уретрального зонда (Рис.1а) путем соскоба с поверхности эпителия.
- Клинический материал должен быть получен ДО проведения мануального исследования.
- Перед манипуляцией гинекологическое зеркало можно смочить теплой водой, применение антисептиков для обработки зеркала противопоказано.
- У девочек (virgo) клинический материал получают со слизистой оболочки преддверия влагалища без использования гинекологического зеркала.
- Полученный клинический материал помещается в пробирку с транспортной средой (см. выше)

#### **Особенности взятия клинического материала из уретры**

- Клинический материал из уретры получают с помощью уретрального зонда.
- Перед взятием клинического материала пациентке рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение 1,5-2 часов.
- При наличии свободных уретральных выделений наружное отверстие уретры следует очистить с помощью ватного тампона.
- При отсутствии свободных выделений может быть проведен легкий массаж уретры.
- После введения инструмента в уретру на глубину 1 см необходимо продвигать его к наружному отверстию, слегка нажимая на заднюю и боковые стенки уретры (вращательные движения болезненны).
- Полученный клинический материал помещается в пробирку с транспортной средой (см. выше)

#### **Особенности взятия клинического материала из цервикального канала**

- Клинический материал цервикального канала получают после введения во влагалище гинекологического зеркала с помощью уретрального зонда.
- Перед взятием клинического материала необходимо тщательно обработать отверстие цервикального канала с помощью стерильного марлевого тампона и затем обработать шейку матки стерильным физиологическим раствором.

- После введения тампона (зонда) в шейный канал на 1,5 см его вращают несколько раз и извлекают (Рис.1б). При извлечении тампона (зонда) необходимо полностью исключить его касание стенок влагалища.
- Полученный клинический материал помещается в пробирку с транспортной средой (см. выше)

#### **Условия хранения и доставки материала**

- Пробирки с полученным клиническим материалом должны быть промаркированы. В сопроводительном документе-направлении необходимо указать: фамилию, имя, отчество, возраст пациентки, клинический материал, предполагаемый диагноз, показания к обследованию, дату и время взятия пробы, наименование учреждения (подразделения), направляющего клинический материал (Приказ МЗ СССР №1030 от 04.10.80). Кроме того, следует указать день менструального цикла или причину отсутствия менструации (менопауза, аменорея и т.п.)
- Клинический материал доставляется в лабораторию лицами, получившими специальный инструктаж, с учетом правил транспортировки.
- Если время транспортировки клинического материала от момента взятия до момента его доставки в лабораторию не более суток, то пробирку с клиническим материалом необходимо хранить и доставлять в лабораторию при температуре бытового холодильника (+ 4–10°C), не замораживая.
- В случае невозможности доставки клинического образца в лабораторию в течение суток, допускается однократное замораживание и хранение образца клинического материала при -20°C до одного месяца.

### **Проведение анализа**

#### **Этап 1. Выделение нуклеиновых кислот из проб**

**(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала)**

- Все этапы проводятся строго в соответствии с инструкцией производителя комплекта реагентов.

#### **Этап 2. Проведение реакции амплификации и детекции в режиме**

**«реального времени» (проводится в зоне 2 - помещении для проведения амплификации)**

- Все этапы анализа проводятся строго в соответствии с инструкцией производителя теста.

## **Трактовка полученных результатов при использовании технологии по основным показаниям**

На рисунке 2 приведено схематическое изображение алгоритма формирования лабораторного заключения. Приведенный алгоритм может быть применен только для женщин репродуктивного возраста при анализе отделяемого влагалища.

Лабораторное заключение начинается с анализа показателя КВМ (контроля взятия материала). Этот показатель отражает количество ДНК клеток человека, попавших в пробирку с биологическим материалом. Для получения адекватных результатов исследования величина КВМ должна быть больше  $10^4$  ГЭ/образец, в этом случае можно переходить к дальнейшему анализу. Если КВМ меньше  $10^4$  ГЭ/образец, то лаборатории рекомендуется связаться с врачом для повторного взятия биологического материала.

Следующий показатель, который необходимо оценить — ОБМ (общая бактериальная масса как показатель общей бактериальной обсемененности биотопа). Величина ОБМ должна находиться в пределах от  $10^6$  до  $10^9$  ГЭ/образец. Если ОБМ меньше  $10^6$  ГЭ/образец, то соотношения различных микроорганизмов могут определяться с большой погрешностью. Чаще всего низкое значение общей бактериальной массы у женщин репродуктивного возраста является следствием применения антибактериальных препаратов. В этом случае рекомендуется повторить исследование не ранее чем через неделю после окончания курса терапии.

Далее проводится оценка состояния нормофлоры: количества *Lactobacillus spp.* относительно ОБМ. В зависимости от этого показателя различают:

1. *Lactobacillus spp.* больше 80% - состояние НОРМОЦЕНОЗА (физиологического микробиоценоза влагалища) характеризующегося доминированием нормофлоры.
2. *Lactobacillus spp.* от 20% до 80% - УМЕРЕННЫЙ ДИСБИОЗ ВЛАГАЛИЩА
3. *Lactobacillus spp.* меньше 20% - ВЫРАЖЕННЫЙ ДИСБИОЗ ВЛАГАЛИЩА

В случае, если *Lactobacillus spp.* составляют более 80% ОБМ (состояние нормоценоза), рекомендуется оценить наличие и количество генитальных микоплазм, уреоплазм и дрожжеподобных грибов:

- если эти микроорганизмы в отделяемом влагалища отсутствуют или их концентрация менее  $10^4$  ГЭ/образец, то данное состояние влагалища можно расценивать как АБСОЛЮТНЫЙ НОРМОЦЕНОЗ.
- если в отделяемом влагалища присутствуют генитальный микоплазмы или уреоплазмы или дрожжеподобные грибы в количестве более  $10^4$  ГЭ/образец,

то результат нужно оценить как Условный нормоценоз - УСЛОВНО НОРМАЛЬНЫЙ МИКРОБИОЦЕНОЗ (следует подчеркнуть, что наличие *Mycoplasma genitalium* говорит о наличии возбудителя и требует назначения антибактериальных препаратов). Условно-нормальный микробиоценоз может выявляться как у клинически здоровых женщин, так и при инфекционно-воспалительных заболеваниях, не связанных с дисбиотическими нарушениями (например вульвовагинальный кандидоз).

В случае выявления дисбиоза влагалища (умеренного или выраженного) необходимо сделать заключение о количественных соотношениях условно патогенных аэробных и анаэробных микроорганизмов.

- содержание аэробных микроорганизмов в количествах больше 10% свидетельствует об АЭРОБНОМ дисбиозе влагалища
- содержание анаэробных микроорганизмов в количестве больше 10% говорит об АНАЭРОБНОМ дисбиозе,
- содержание и обеих групп микроорганизмов в количестве больше 10% свидетельствует о СМЕШАННОМ дисбиозе.

Полученное лабораторное заключение можно внести в отчет по оценке микробиоценоза для пациентки, в раздел «лабораторное заключение по результатам анализа».

**Лабораторное заключение не заменяет собой выставление диагноза согласно МКБ-10.**

### **Контроль качества**

- Все постановки реакций амплификации должны сопровождаться необходимыми контролями. В результатах анализа необходимо учитывать значения контроля взятия материала (КВМ) и внутреннего контроля (ВК). Значение КВМ меньше 4 следует интерпретировать как непригодные для клинической интерпретации.
- В положительных контрольных образцах количество микроорганизмов должно быть больше указанного в разделе «Контрольные образцы» и инструкции производителя. При получении значений ниже указанных, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае требуется повторная постановка амплификации всей партии образцов.



- В отрицательных контрольных образцах количество микроорганизмов не должны превышать значений, указанных в указанного в разделе «Контрольные образцы» и инструкции производителя. При получении значений превышающих вышеуказанных значения, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации, согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».

#### **Контрольные образцы:**

- В положительных контрольных образцах количество микроорганизмов и значение КВМ должны быть больше  $10^4$  ГЭ/образец.
- В отрицательных контрольных образцах количество микроорганизмов не должны превышать значений, указанных ниже. При получении значений превышающих значения, указанные ниже, результаты всей постановочной серии считают недостоверными.

- 1 Общая бактериальная масса, не более  $10^{3,5}$
- 2 *Lactobacillus* spp., не более  $10^{2,5}$
- 3 *Enterobacteriaceae* spp., не более  $10^{2,5}$
- 4 *Streptococcus* spp., не более  $10^{2,5}$
- 5 *Staphylococcus* spp., не более  $10^{2,5}$
- 6 *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas* spp., не более  $10^{2,5}$
- 7 *Eubacterium* spp., не более  $10^{2,5}$
- 8 *Sneathia* spp./*Leptotrihia* spp./ *Fusobacterium* spp., не более  $10^{2,5}$
- 9 *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp., не более  $10^{2,5}$
- 10 *Lachnobacterium* spp./*Clostridium* spp., не более  $10^{2,5}$
- 11 *Mobiluncus* spp./*Corynebacterium* spp., не более  $10^{2,5}$
- 12 *Peptostreptococcus* spp., не более  $10^{2,5}$
- 13 *Atopobium vaginae*, отсутствует
- 14 *Mycoplasma (hominis/genitalium)*, отсутствует/отсутствует
- 15 *Ureaplasma (urealyticum + parvum)*, отсутствует
- 16 *Candida* spp., не более  $10^{3,0}$
- 17 Контроль взятия материала, отсутствует

#### **Меры предосторожности**

- Потенциальный риск применения набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

- Мерами предосторожности при работе с набором реагентов Фемофлор является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).
- Анализ проводится в два этапа в двух отдельных помещениях (зонах), согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
- Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- Работу с набором реагентов и анализируемыми образцами следует проводить в одноразовых медицинских перчатках без талька.
- Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов клинических материалов.
- Выделение ДНК и приготовление реакционной смеси следует проводить в ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком или ПЦР-боксах.
- Для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК и ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.
- Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
- Поверхности рабочих столов, а также рабочих помещений, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

## ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Описание проблемы	Способы устранения
Значение КВМ меньше $10^4$ ГЭ/образец	Требуется повторное взятие клинического материала
Значение ВК (внутренний контроль) $<10^{3.5}$	Повторная постановка реакции амплификации. При повторении ситуации обратиться к производителю реактивов.
При постановке реакции амплификации выдается сообщение о неправильной установке стрипов в приборе.	Разрешить автоматическое определение ориентации стрипа. Скорректированные данные сохраняются в новом файле.

- При возникновении вопросов и проблем с постановкой реакции необходимо обратиться к производителю наборов реагентов.

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Оценка эффективности использования данной медицинской технологии для исследования генитального микробиоценоза у женщин была проведена в НИИАГ им. Д.О. Отта СЗО РАМН и описана в работе Шипицыной Е.А. с соавт. [14].

В исследовании участвовали сотрудницы медицинского учреждения – 99 небеременных женщин в возрасте от 19 до 73 лет (средний возраст 39 лет). Клиническим материалом для исследования служило отделяемое влагалища, помещенное в транспортную среду Amies (HiMedia, Индия) для бактериологического исследования и в физиологический раствор – для исследования методом ПЦР (с использованием реагентов Фемофлор®). Кроме того, клинический материал помещали на два предметных стекла для исследования микроскопическим методом.

Для бактериологического исследования клинический материал наносили на поверхность плотной питательной среды, содержащей 5% дефибринированной крови человека, и в жидкие питательные среды (тиогликолевый бульон и сусло-бульон).

Для микроскопического исследования препараты окрашивали 1% раствором метиленового синего и по Граму и оценивали количество лейкоцитов и морфотип бактерий (увеличение  $\times 1000$ ). Нарушение микробиоценоза влагалища регистрировали, если 1) обнаруживали преобладание других микроорганизмов над *Lactobacillus spp.* и

выявляли «ключевые клетки» (бактериальный вагиноз), 2) выявляли дрожжевые клетки и/или псевдомицелий дрожжеподобных грибов при одновременном преобладании лейкоцитов над эпителиальными клетками (вульвовагинальный кандидоз), 3) наблюдали преобладание лейкоцитов над эпителиальными клетками (неспецифический вагинит).

ДНК выделяли из 100 мкл пробы с использованием набора реагентов Проба-ГС-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) согласно инструкции производителя.

Набор реагентов Фемофлор включает: смесь для ПЦР амплификации, специфичную для всех бактерий (для определения общей бактериальной массы), смесь, специфичную для нормофлоры (*Lactobacillus* spp.) и смеси, специфичные для условно-патогенных микроорганизмов (Таблица 1 Приложения).

ПЦР в реальном времени проводили согласно инструкции производителя в амплификаторе с детекцией результатов в режиме реального времени ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»). После амплификации автоматически рассчитывалось общее количество бактериальной массы, *Lactobacillus* spp. и каждого из условно патогенных микроорганизмов, и по их соотношению определялось состояние микробиоценоза влагалища (Рис. 1 и 2 Приложения). При использовании теста Фемофлор® основным критерием дисбиотических нарушений являлось соотношение количества *Lactobacillus* spp. и каждого из условно патогенных микроорганизмов, автоматически рассчитываемое программным обеспечением к тесту.

Для статистической обработки результатов тестов использовали построение таблиц сопряженности и расчёт меры согласия к Кохена с помощью статистического пакета SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA). Меру согласия результатов прямой микроскопии и теста Фемофлор® (к) интерпретировали с использованием методики Лэндиса-Коха [15]. Для описания клинических групп оценивали медиану абсолютного количества микроорганизмов в геномных эквивалентах (ГЭ) и долю исследуемого микроорганизма в общей бактериальной массе. В качестве меры дисперсии использовали верхний и нижний квартили.

Для оценки микробиоценоза влагалища пациенток разделили на две группы. Первую группу составили женщины репродуктивного возраста, вторую – женщины, находящиеся в менопаузе. В первую группу были включены 66 женщин в возрасте от 19 до 49 лет (средний возраст 32 года), во вторую – 33 женщины в возрасте от 41 года до 73 лет (средний возраст 53,3 года). Основу оценки нового теста Фемофлор® составило сравнение его результатов с результатами микроскопического метода.

В группе женщин репродуктивного возраста конкордантные результаты были получены для 54 образцов, что составило 81,8%. В 22 образцах результаты прямой

микроскопии и теста Фемофлор® были интерпретированы как дисбиоз влагалища, в 32 – как физиологический микробиоценоз. В 12 случаях (19,2%) были получены дискордантные результаты (Таблица 2 Приложения).

В 22 образцах, в которых результаты обоих методов были интерпретированы как нарушение микробиоценоза влагалища, микроскопическая картина вагинальных мазков выглядела следующим образом: в 20 образцах условно патогенные микроорганизмы преобладали над *Lactobacillus* spp., в одном образце микроорганизмы отсутствовали, ещё в одном – *Lactobacillus* spp. преобладали, но присутствовал другой маркер нарушения микробиоценоза влагалища, а именно отношение лейкоцитов к эпителиальным клеткам было более, чем 1:1. В 12 из этих 22 проб присутствовали “ключевые клетки”. Методом ПЦР общая бактериальная масса в этих образцах определялась в пределах от  $10^{5,7}$  до  $10^{7,6}$  ГЭ, при этом медиана составила  $10^{7,21}$  ( $10^{6,62}$ - $10^{7,55}$ ), что достоверно выше, чем у здоровых женщин ( $p=0,0008$ ). Также в данной группе было обнаружено широко варьирующее количество *Lactobacillus* spp. (от  $10^0$  до  $10^7$  ГЭ, медиана  $10^{4,28}$ , квартили  $10^{2,01}$ - $10^{6,58}$ ), медиана доли *Lactobacillus* spp. составляла 0,8% (0-37,6%), что ниже, чем у здоровых женщин (хотя различия были статистически не значимы). При культуральном исследовании этих проб рост *Lactobacillus* spp. не наблюдался. Клинические проявления нарушения микробиоценоза влагалища (выделения, гиперемия слизистой) наблюдались у 9 из этих 22 пациенток (таблица 2).

Доля микроорганизмов *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp. в этой группе составила 15,8% (9,0-29,9%) и была достоверно выше ( $p=0,000049$ ), чем у здоровых женщин репродуктивного возраста (0,1% (0-6,3%). Кроме того, в этой группе были выявлены достоверные различия со здоровыми женщинами по доле следующих микроорганизмов: *Eubacterium* spp. ( $p=0,000091$ ), *Megasphaera* spp./*Veillonella* spp./*Dialister* spp. ( $p=0,000018$ ), *Peptostreptococcus* spp. ( $p=0,0008$ ), *Atopobium vaginae* ( $p=0,003$ ). На основании полученных данных можно сделать вывод, что в этой группе женщин увеличение общей бактериальной массы является неблагоприятным фактором и сопровождается увеличением доли анаэробных микроорганизмов и снижением доли *Lactobacillus* spp. в составе микробиоценоза влагалища.

Образцы от женщин репродуктивного возраста с физиологическим микробиоценозом влагалища ( $n=32$ ), установленным с использованием обоих тестов, могут быть охарактеризованы следующим образом. Микроскопическая картина вагинального отделяемого в 22 (69%) случаях представляла наличие только *Lactobacillus* spp., в остальных случаях лактофлора преобладала над другими микроорганизмами, при этом все маркеры дисбиоза влагалища отсутствовали. С помощью диагностикума

Фемофлор® эту группу можно описать следующим образом: общая бактериальная масса –  $10^{6,5}$  ( $10^{5,7}$ - $10^{6,8}$ ), количество *Lactobacillus* spp. –  $10^{6,1}$  ( $10^{5,4}$ - $10^{6,6}$ ). Доля *Lactobacillus* в группе здоровых женщин репродуктивного возраста составляла 78% (50-79%). Кроме *Lactobacillus* spp. в незначительных количествах были обнаружены как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы. При этом в 30 из 32 (94%) образцов данной группы количество определённых Фемофлором представителей условно патогенной микрофлоры не превышало 2,4% от общей бактериальной массы. По данным бактериологического исследования, рост *Lactobacillus* spp. присутствовал в 20 из 32 (59%) образцов.

В 12 случаях отмечено несовпадение результатов микроскопического исследования и теста Фемофлор®. В 6 образцах по результатам прямой микроскопии были выявлены нарушения микробиоценоза влагалища, в то время как при использовании теста Фемофлор® микробиоценоз влагалища был оценен как физиологический (таблица 2). В 5 из этих 6 случаев прямая микроскопия мазков свидетельствовала о местной воспалительной реакции разной степени выраженности (отношение лейкоцитов к эпителиальным клеткам находилось в пределах от 2:1 до 20:1). Ещё один случай такого несоответствия представляла женщина, образец отделяемого которой при микроскопии показал наличие в нём “ключевых клеток”, при этом тест Фемофлор® свидетельствовал о нормальном соотношении бактериальной массы и *Lactobacillus* spp.. Шесть образцов дали противоположные результаты: при использовании теста Фемофлор® отмечено нарушение микробиоценоза влагалища, при использовании микроскопического метода отмечен физиологический микробиоценоз. Анализ этих случаев показал, что причиной таких результатов ПЦР являлось значительное превышение порога как аэробными, так и анаэробными микроорганизмами. Ни в одном из образцов роста *Gardnerella vaginalis* в культуре обнаружено не было. Стоит отметить, что в одном образце тест Фемофлор выявил превышение порога *Candida* spp, при этом в культуре присутствовал умеренный рост *Candida* spp., но ни клиническая картина, ни данные микроскопии не подтверждали наличие у женщины вульвовагинального кандидоза.

При сравнении результатов, полученных с применением микроскопического метода и теста Фемофлор® в группе женщин, находящихся в менопаузе (n=33), конкордантные результаты были получены для 27 (82%) образцов. Из них 18 (67%) случаев были расценены обоими методами как нарушение микробиоценоза влагалища, 9 (33%) – как нормоценоз. Для 6 (18%) образцов получены дискордантные результаты (таблица 3).

В 11 из 18 образцов (61%), в которых оба теста выявили нарушение микробиоценоза влагалища, микроскопическая картина представляла собой

превалирование условно патогенных микроорганизмов над *Lactobacillus* spp.. Кроме этого в одном из данных образцов были выявлены дрожжеподобные грибы, а отношение лейкоцитов к эпителиальным клеткам было 4:1. Еще в одном образце это отношение равнялось 5:1, в трех случаях были выявлены ключевые “клетки”. В этих 11 образцах методом ПЦР было выявлено варьирование количества *Lactobacillus* spp. в широких пределах (от  $10^0$  до  $10^7$  ГЭ/образец) и значительное количество других групп микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas* spp, *Eubacterium* spp, *Megasphaera* spp/*Veillonella* spp/*Dialister* spp, *Mobiluncus* spp/*Corynebacterium* spp, *Atopobium vaginae* (до  $10^7$  ГЭ/образец). В оставшихся 7 образцах при микроскопическом исследовании констатировали отсутствие микроорганизмов, при этом в одном случае отношение лейкоцитов к эпителиальным клеткам было 3:1. При исследовании вагинального отделяемого методом ПЦР было выявлено сравнительно невысокое количество общей бактериальной массы, лишь в 3 случаях превышающее уровень  $10^5$  ГЭ/образец, и низкое количество *Lactobacillus* spp. ( $10^0$  –  $10^5$  ГЭ/образец). В двух из этих 7 образцов *Lactobacillus* spp. отсутствовали. Тест Фемофлор позволил выявить клинически значимые количества представителей условно патогенной микрофлоры. Клинические проявления дисбиоза влагалища зарегистрированы у двух женщин данной подгруппы (Таблица 3 Приложения).

Среди 9 случаев, когда результаты обоих тестов были интерпретированы как нормоценоз, при микроскопическом исследовании было выявлено преобладание *Lactobacillus* spp.. С помощью диагностикума Фемофлор помимо *Lactobacillus* spp., которые составляли основную массу биоценоза и находились в пределах от  $10^5$  до  $10^9$  ГЭ/образец, было обнаружено незначительное количество (до  $10^4$  ГЭ/образец) как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов. При бактериологическом исследовании рост *Lactobacillus* spp. отмечен в 5 из 9 клинических проб. Клинических признаков нарушения микробиоценоза влагалища выявлено не было.

В 6 случаях результаты двух методов трактовались по-разному (Таблица 3 Приложения). Четыре образца были интерпретированы как физиологический микробиоценоз при микроскопическом исследовании, как дисбиоз – с использованием теста Фемофлор. Анализ этих случаев показал, что причиной дисбиоза согласно Фемофлору явилось выявление значительного количества условно патогенной микрофлоры, при этом в одном из образцов *Lactobacillus* spp. не выявлялись. Культуральным методом также был обнаружен рост других микроорганизмов. Клинические проявления дисбиоза влагалища не наблюдались. В двух случаях, когда результаты микроскопии свидетельствовали о дисбиозе, а Фемофлора – о нормоценозе, микроскопически была выявлена воспалительная

реакция. Метод ПЦР не выявил превышение порога условно патогенными микроорганизмами, а *Lactobacillus spp.* составляли основную бактериальную массу. Культуральный метод других микроорганизмов также не выявил. Клинических признаков нарушения микробиоценоза влагалища не наблюдалось.

Сравнительный анализ результатов микроскопического и ПЦР исследований в группах женщин репродуктивного возраста и женщин, находящихся в менопаузе показал, что между этими двумя методами существует значительное согласие – значения  $\kappa$  составили 0,64 и 0,61, соответственно. Новый метод исследования микробиоценоза влагалища у женщин (ПЦР в реальном времени Фемофлор) является быстрым и высокотехнологичным и позволяет выявлять широкий спектр микроорганизмов, в том числе трудно культивируемых, однако, к недостаткам метода следует отнести невозможность определить антибиотикочувствительность микроорганизмов, а также невозможность оценить наличие и степень местной воспалительной реакции.

Клинический алгоритм был предложен и апробирован в работах Ворошилиной Е.С. и соавт. [16-18].



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кира Е.Ф. Клиника и диагностика бактериального вагиноза / Кира Е.Ф // Акушерство и гинекология -1994 -№ 2 - С. 32-35.
2. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis // Klebanoff M.A., Schwebke J.R., Zhang J. [et al.] // Obstet. Gynecol. -2004. –Vol.104. -P.267-272.
3. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection / Wiesenfeld H.C., Hillier S.L., Krohn M.A. [et al.] // Clin. Infect. Dis. -2003. -Vol. 36(5). -P.663–666.
4. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics / Brotman R.M, Erbeling E.J., Jamshidi R.M. [et al.] // J Pediatr Adolesc Gynecol. -2007. –Vol.20(4). -P.225-231.
5. Hashemi F.B. Activation of human immunodeficiency virus type 1 expression by *Gardnerella vaginalis* / Hashemi F.B., Ghassemi M., Roebuck K.A., Spear G.T. // J. Infect. Dis. -1999. –Vol.179(4). -P.924-930.
6. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis / Sewankambo N, Gray R.H., Wawer M.J. [et al.] // Lancet. -1997. –Vol.350(9077). -P.546-550.
7. Hager W.D., Treatment of serious obstetric and gynecologic infections with cefoxitin. / Hager W.D., McDaniel P.S. // J. Reprod. Med. -1983. –Vol.28(5). –P.337-340.
8. Gestational bleeding, bacterial vaginosis, and common reproductive tract infections: risk for preterm birth and benefit of treatment / French J.I., McGregor J.A., Draper D. [et al.] // Obstet. Gynecol. -1999. –Vol.93(5 Pt 1). -P.715-24.
9. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis / Leitich H, Bodner-Adler B., Brunbauer M. [et al.] // Am. J. Obstet. Gynecol. - 2003. – Vol.189(1). -P.139-47.
10. Paneth N.S. The problem of low birth weight. / Paneth N.S. // Future Child. -1995. – Vol.5(1). -P.19-34.
11. Larsson P.G. Does pre- and postoperative metronidazole treatment lower vaginal cuff infection rate after abdominal hysterectomy among women with bacterial vaginosis? / Larsson PG, Carlsson B. // Infect. Dis. Obstet. Gynecol. -2002. –Vol.10(3) -P.133-40.
12. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis / Ferris M.J., Masztal A, Aldridge K.E. [et al.] // BMC Infect. Dis. - 2004. –Vol.13. -P.4-5.
13. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis* / Sha B.E., Zariffard M.R., Wang Q.J. [et al.] // J Infect Dis. -2005. –Vol.191(1). -P.25-32.
14. Применение теста Фемофлор для оценки микробиоценоза влагалища / Шипицына Е.В., Мартикайнен З.М., Воробьева Н.Е. [и др.] // Журнал акушерства и женских болезней. - 2009. –Т.LVIII. -№3. -С.44-50.
15. Landis, J. R. The measurement of observer agreement for categorical data / Landis, J. R. and Koch, G. G. - Biometrics 33, 1977. -P.159–174.
16. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: что есть норма? / Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., [и др.] // «Акушерство и гинекология» №1 2011 г, С.57-65
17. Особенности биоценоза влагалища у женщин с нормальным и промежуточным типом мазка по результатам полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / Тумбинская Л.В., Ворошилина Е.С., Донников А.Е., [и др.] // «Акушерство и гинекология» №1 2011 г С. 66-70
18. Биоценоз влагалища с точки зрения количественной ПЦР: состояние во время беременности / Ворошилина Е.С., Тумбинская Л.В., Донников А.Е., [и др.] // Уральский медицинский журнал №03 (68), 2010. С. 103-107

## ПРИЛОЖЕНИЯ

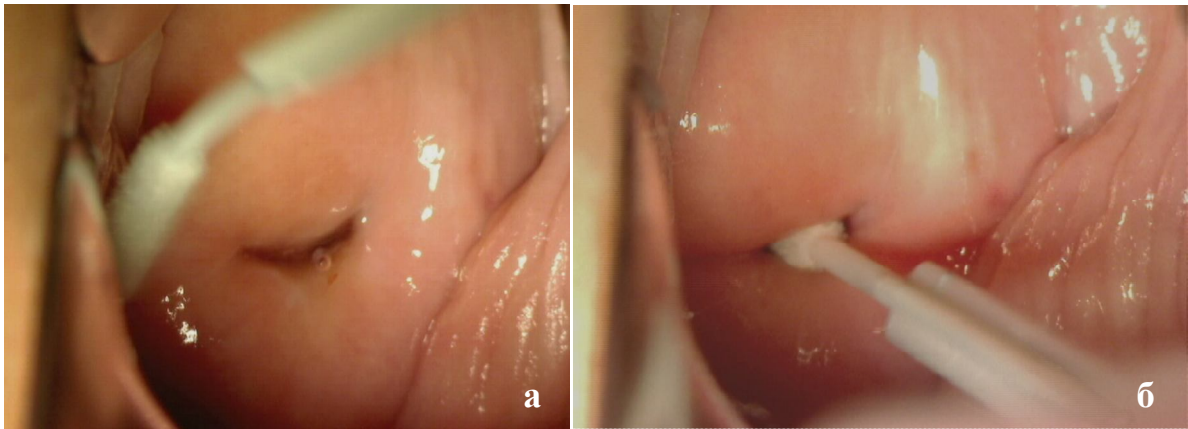


Рисунок 1. Взятие биоматериала с заднебоковых сводов влагалища (а) и цервикального канала (б).

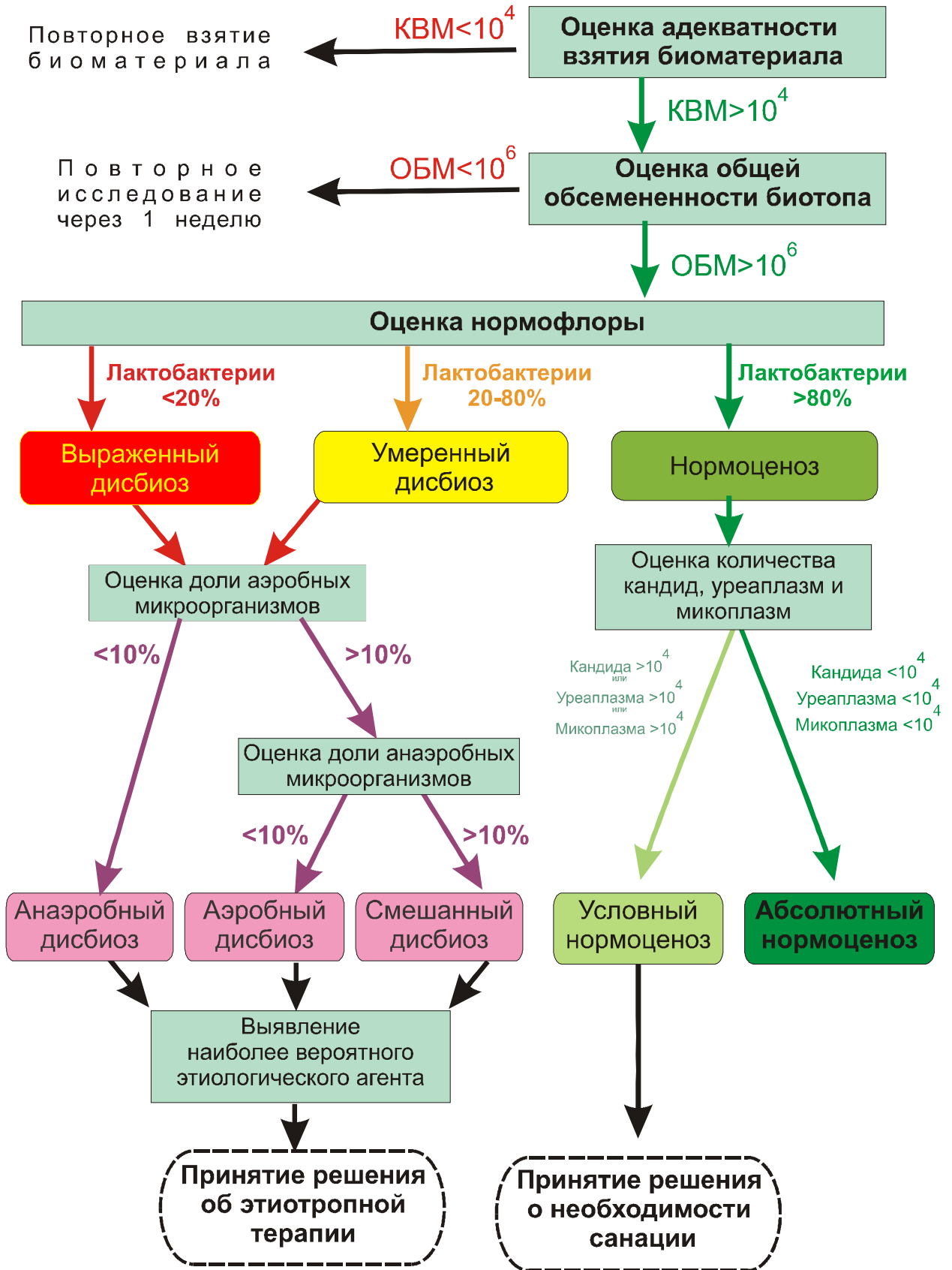


Рисунок 2. Алгоритм формирования лабораторного заключения

Таблица 1. Состав комплекта реагентов Фемофлор 16

Группа	Определяемые показатели
Контроли	Контроль взятия материала
	Положительный контроль
	Внутренний контрольный образец
Диагностика нормоценоза	Общая бактериальная масса
	<i>Lactobacillus</i> spp. *
Аэробные микробы	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Streptococcus</i> spp.
	<i>Staphylococcus</i> spp.
Анаэробные микробы	<i>Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/Porphyromonas</i> spp.
	<i>Eubacterium</i> spp.
	<i>Sneathia</i> spp./ <i>Leptotrichia</i> spp./ <i>Fusobacterium</i> spp.
	<i>Megasphaera</i> spp./ <i>Veillonella</i> spp./ <i>Dialister</i> spp.
	<i>Lachnobacterium</i> spp./ <i>Clostridium</i> spp.
	<i>Mobiluncus</i> spp./ <i>Corynebacterium</i> spp.
	<i>Peptostreptococcus</i> spp.
	<i>Atopobium vaginae</i>
Микоплазмы	<i>Mycoplasma (hominis+genitalium)</i>
	<i>Ureaplasma</i> spp.
Дрожжеподобные грибы	<i>Candida</i> spp.

\* под spp. подразумевается широкая группа микроорганизмов, значимая для оценки микробиоценоза влагалища, которая относится к данному роду, но может не соответствовать полностью роду в его систематическом понимании

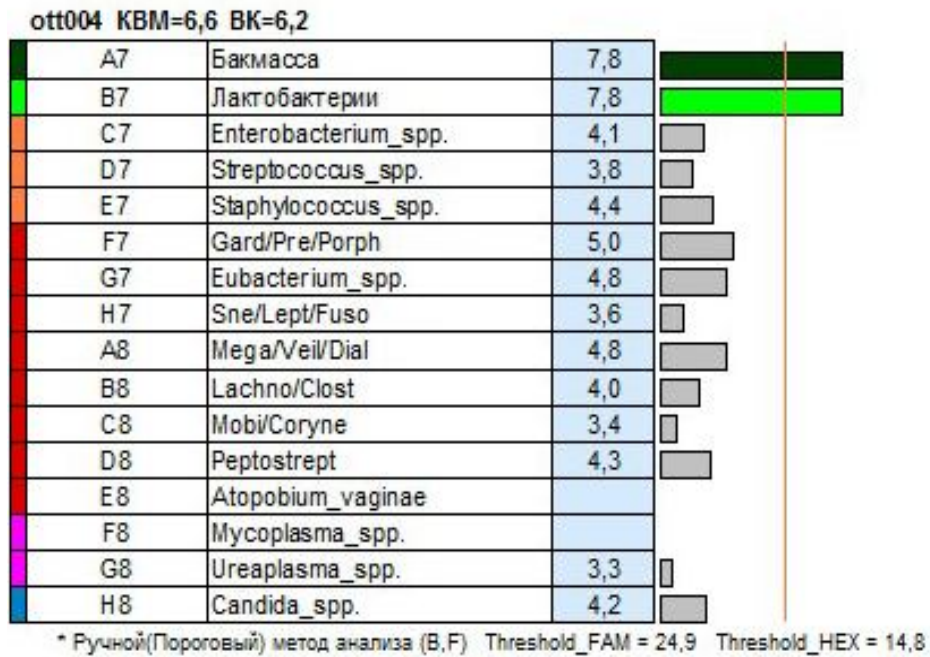


Рисунок 3. Интерпретация результата тестирования вагинального отделяемого, полученного от пациентки 41 года с нормальным микробиоценозом влагалища

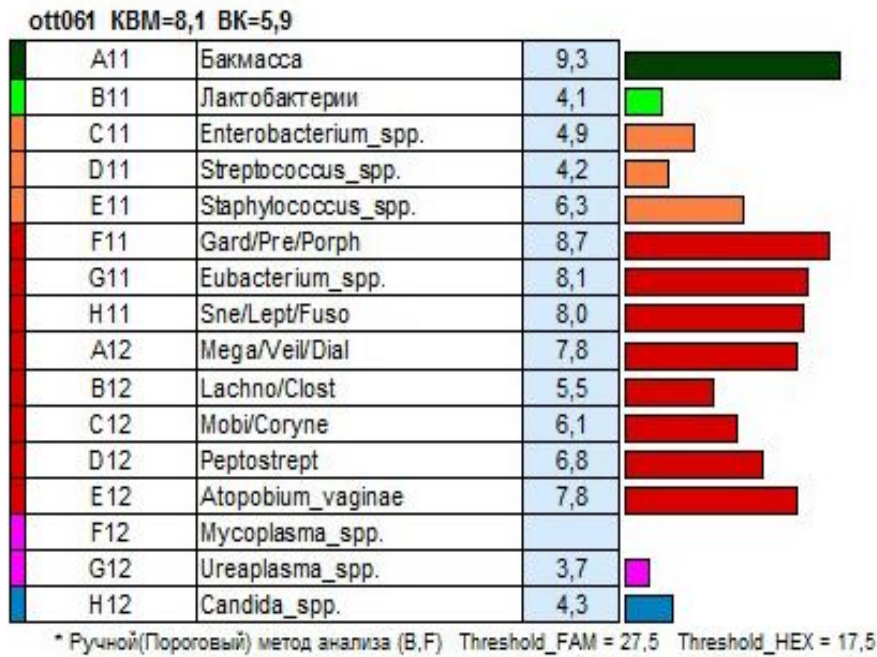


Рисунок 4. Интерпретация результата тестирования вагинального отделяемого, полученного от пациентки 27 лет с бактериальным вагинозом

Таблица 2. Сравнение результатов, полученных с использованием метода прямой микроскопии и нового теста Фемофлор 16 при исследовании микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного возраста\*

		Микроскопия	
		Нарушенный микробиоценоз	Физиологический микробиоценоз
Фемофлор	Нарушенный микробиоценоз	22 (9)	6 (0)
	Физиологический микробиоценоз	6 (1)	32 (2)

\* в скобках указано число женщин с клиническими проявлениями дисбиоза влагалища (выделения, гиперемия)

Таблица 3. Сравнение результатов, полученных с использованием метода прямой микроскопии и теста Фемофлор 16 при исследовании микробиоценоза влагалища у женщин в менопаузе\*

		Микроскопия	
		Нарушенный микробиоценоз	Физиологический микробиоценоз
Фемофлор	Нарушенный микробиоценоз	18 (2)	4 (0)
	Физиологический микробиоценоз	2 (0)	9 (0)

\* в скобках указано число женщин с клиническими проявлениями дисбиоза влагалища (выделения, гиперемия)



Таблица 4. Схема трактовки результатов исследования

Лабораторные показатели			Состояние нормофлоры	Примечания	Лабораторное заключение
Контроль взятия материала (КВМ)	больше или равен 4 Ig	результат пригоден для анализа			
	меньше 4 Ig	результат не пригоден для анализа	<b>далее анализ не проводится</b>		
Общая бактериальная масса (ОБМ)	от 6 до 9 Ig	нормальный уровень ОБМ		для клинических образцов, полученных из влагалища	
	менее 6 Ig	сниженный уровень ОБМ			
	более 9 Ig	повышенный уровень ОБМ			
Lactobacillus (относительно ОБМ) %	80-100%	Уреаплазмы, микоплазмы, дрожжеподобные грибы в количествах менее 4 Ig	<b>Нормоценоз</b>		<b>Абсолютный нормоценоз (физиологический микриобиоценоз)</b>
		Уреаплазмы, микоплазмы, дрожжеподобные грибы в количествах более 4 Ig			<b>Условный нормоценоз</b>
	20-80%	Вне зависимости от количества микоплазм и дрожжеподобных грибов	<b>Умеренный дисбиоз влагалища</b>	преобладают анаэробные микроорганизмы	<b>Умеренный анаэробный дисбиоз</b>
				преобладают аэробные микроорганизмы	<b>Умеренный аэробный дисбиоз</b>
				Присутствуют и те и другие	<b>Умеренный анаэробно-аэробный дисбиоз</b>
	менее 20%	Вне зависимости от количества микоплазм и дрожжеподобных грибов	<b>Выраженный дисбиоз влагалища</b>	преобладают анаэробные микроорганизмы	<b>Выраженный анаэробный дисбиоз</b>
				преобладают аэробные микроорганизмы	<b>Выраженный аэробный дисбиоз</b>
Присутствуют и те и другие				<b>Выраженный анаэробно-аэробный дисбиоз</b>	

Серия АА 0000982  
 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ  
 ЗАРОВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

**РАЗРЕШЕНИЕ**

НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

ФС № 2011/575 от « 22 » ноября 2011 г.

**«Применение метода полимеризационной цепной реакции в реальном времени для оценки микробиоценоза урогенитального тракта у женщин (тест Фемофлор)»**

**Разрешение выдано на имя:**  
 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (117997, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4).

Учреждение Российской академии медицинских наук. Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта Северо-Западного отделения РАМН (199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3).

**Показания к использованию медицинской технологии:**

- Оценка качественного и количественного состава микробиоценозов, составляющих микробиоценоз влагалища у женщин репродуктивного возраста, в том числе при беременности:

— определение	этиологической причины	дисбиотического состояния;	степени	выраженности	дисбиотических нарушений;
— оценка	эффективности	проводимой	терапии	и	результатов
— мониторинг	восстановления	нормальной	микробиоты		влагалища.

Серия АБ 0005602  
 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ  
 ЗАРОВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Продолжение

Диск 2 из 2

ФС № 2011/ 375 от « 22 » ноября 2011 г.

- Оценка качественного и количественного состава микрофлоры любого происхождения.
- Косвенная оценка чувствительности микрофлоры к применяемому антибактериальному препарату.

**Противопоказания к использованию медицинской технологии:**

- Менее 24-х часов после проведения кольпоскопии.
- Менее 24-х часов после ультразвукового исследования с использованием вагинального датчика.
- Менее 2-х недель после применения лекарственных препаратов, содержащих микроорганизмы (пробиотики, эубиотики).
- Менструальное кровотечение.
- Менее 1-го дня после применения антибактериальных препаратов или местных антисептических средств.
- Применение гонадотропин-рилизинг-гормонов.
- Хирургическая кастрация.
- Латентная аменорея.
- Исследование нормально стерильных сред и биопатов.
- Попадание в исследуемый образец лекарственных препаратов, повлиявших на возможность или эффективность выделения нуклеиновых кислот из биологического образца в/или прохождения реакции амплификации (ультразвуковой контактный гель, гетарин и т.п.)

**Возможные осложнения при использовании медицинской технологии и способы их устранения:**  
 Отсутствуют.

**Врио руководителя** \_\_\_\_\_  
 (подпись, печать)

**Е.А.Темнова**