

**Гродненский государственный медицинский
университет**

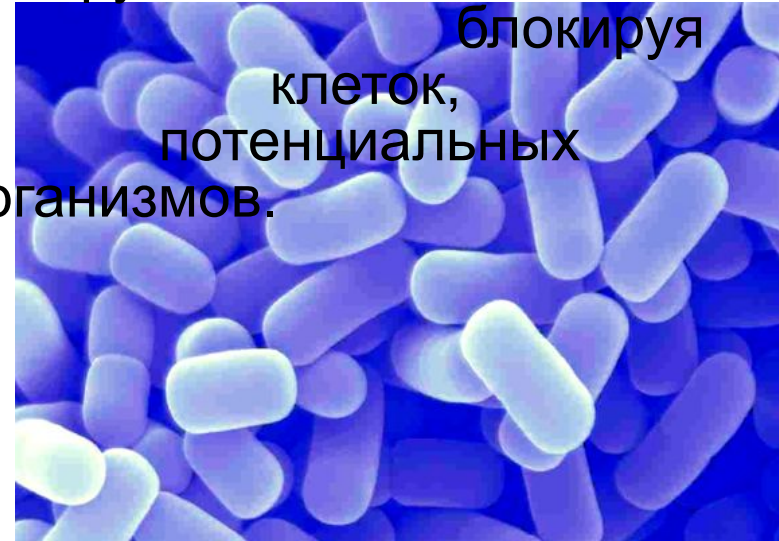
Кафедра акушерства и гинекологии

Фемофлор-скрининг

Выполнила: студентка 4 курса,
32 группы, лечебного факультета
Синчук Дарья Александровна

Биоценоз влагалища

- Влагалищный биоценоз представлен ассоциацией микроорганизмов, обеспечивающих поддержание местного иммунитета и гомеостаза организма женщины в целом.
- В норме основным компонентом вагинального биоценоза являются лактобактерии. Они участвуют в метаболизме гликогена, который вырабатывается клетками многослойного плоского эпителия, выстилающего влагалище. Лактобактерии превращают гликоген в молочную кислоту, что приводит к закислению среды влагалища до pH 3,8 – 4,5. Кислый pH в сочетании с выработкой лактобактериями бактериоцина и перекиси водорода создает защиту, препятствующую колонизации урогенитального тракта другими микроорганизмами. Лактобациллы, блокируя рецепторы эпителиальных клеток, предупреждают адгезию патогенных микроорганизмов.



- **Критерием** биоценоза влагалища является влагалищная палочка – палочка **Додерлейна**. Эта крупная, толстая, грамположительная палочка, оптимум pH среды для которой 4,0-4,7.

Оценка степени чистоты влагалища

Микроскопическая картина	I	II	III	IV
Палочки Додерлейна	+++	++	+	-
<i>Сомма variabile</i>	-	-	++	++
Гр (-) кокки и/или палочки	-	-	++	++
Анаэробы, стрептококки, колибациллы, трихомонады	-	-	+/-	+++
Лейкоциты	-	+	++	+++
Эпителиальные клетки	единичные	+	+	++

"+++" **– значительное количество (много)**

"++" **– умеренное количество**

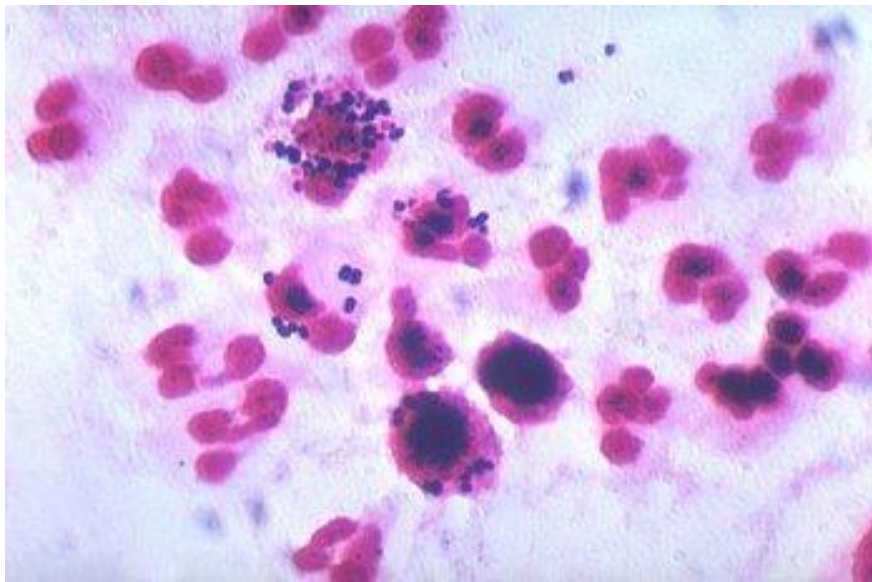
"+" **– незначительное количество (мало)**

"+/-" **– единичные или отсутствуют в препарате**

"-" **– полное отсутствие**

Типы биоценозов:

- 1. **Нормоценоз**, характеризующийся доминированием лактобактерий, отсутствием грамотрицательной микрофлоры, спор, мицелия, псевдогифов, наличием единичных лейкоцитов и «чистых» эпителиальных клеток соответственно фазе менструального цикла. Подобная картина отражает типичное состояние нормального биотопа влагалища.
- 2. **Промежуточный тип** биоценоза влагалища, характеризующийся умеренным или незначительным количеством лактобактерий, наличием грамположительных кокков, грамотрицательных палочек; обнаруживаются лейкоциты, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки. Является пограничным типом, часто наблюдается у здоровых женщин, редко сопровождается субъективными жалобами и клиническими проявлениями.



Типы биоценозов:

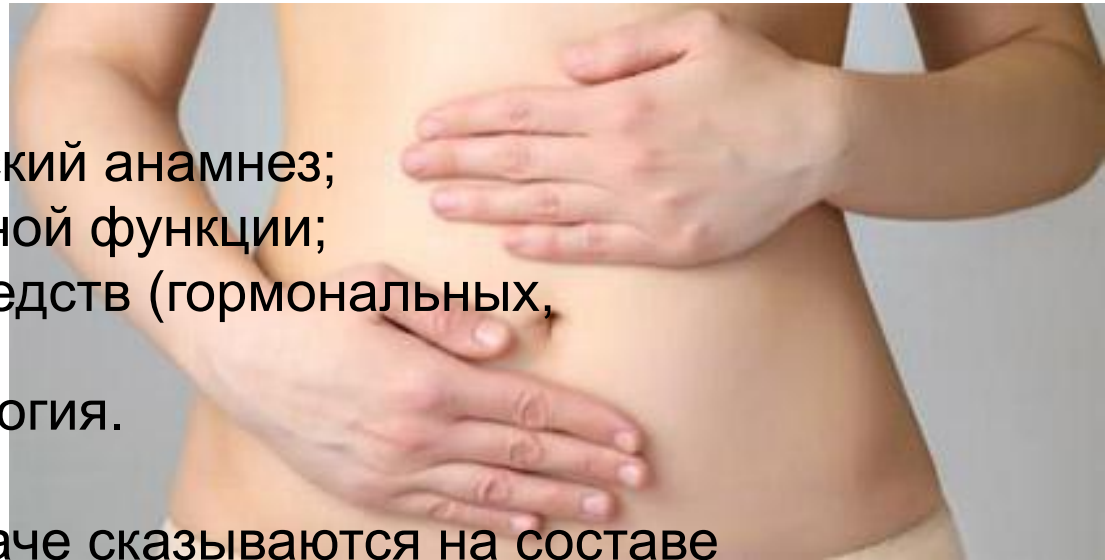
- **3. Дисбиоз** влагалища, выражающийся в значительном уменьшении или полном отсутствии лактобацилл, обильной полиморфной грамотрицательной и грамположительной палочковой и кокковой микрофлорой, наличием ключевых клеток, переменным количеством лейкоцитов, отсутствием или незавершенностью фагоцитоза. Соответствует микробиологической картине бактериального вагиноза.
- **4. Вагинит** - полимикробная картина мазка, большое количество лейкоцитов, макрофагов, эпителиальных клеток, наличие выраженного фагоцитоза, морфологический пейзаж воспалительного процесса. Соответствует неспецифическому вагиниту. При обнаружении гонококков, трихомонад, мицелия, псевдогифов, спор выставляется соответствующий этиологический диагноз.



Биоценоз влагалища

К изменениям биоценоза влагалища приводят такие факторы:

- Гормональный статус женщины;
- Возраст;
- Образ жизни, характер питания;
- Половое поведение и смена полового партнера;
- Способ предохранения;
- Иммунный статус;
- Акушерско-гинекологический анамнез;
- Реализация репродуктивной функции;
- Прием лекарственных средств (гормональных, антибактериальных);
- Экстрагенитальная патология.



Все эти факторы так или иначе сказываются на составе влагалищной флоры женщины, при нарушении ее баланса возможно развитие гинекологических заболеваний.

Самым информативным анализом является исследование состава влагалищной флоры, как качественного, так и количественного.

Один из рутинных и самых недорогих методов – это микроскопия мазка. Но он имеет ряд недостатков:

- Человеческий фактор. Оценка мазка осуществляется лаборантом, поэтому результат мазка на флору зависит от опытности и квалификации персонала лаборатории.
- Не всегда есть гарантия правильности забора мазка, иногда не получается захватить достаточное количество патогенной флоры.
- При микроскопии обнаруживаются не все инфекционные агенты (например, при простой микроскопии не видны уреоплазмы, микоплазмы, хламидии). Для их обнаружения необходимы дополнительные исследования, что затягивает постановку диагноза.

В настоящее время разработана специальная система для оценки влагалищной флоры методом ПЦР– тест-система «Фемофлор». Этот метод широко используется в амбулаторных условиях.

Когорта пациенток		Методы исследования отделяемого влагалища		
		«Фемофлор»	Культуральный метод	Микроскопия
Первичный прием		Рекомендован	По усмотрению врача	Рекомендован
Вторичный прием	Контроль терапии при отсутствии жалоб и клинических проявлений	Рекомендован	По усмотрению врача	Рекомендован
	Бактериальный вагиноз	Рекомендован	Нецелесообразно	Рекомендован
	Вульвовагинальный кандидоз	Рекомендован	Рекомендован	Рекомендован
	Неспецифический вагинит	Рекомендован	Рекомендован	Рекомендован

Что такое Фемофлор?

Фемофлор - это тест-система для определения количественного и качественного состава влагалищной флоры методом обнаружения ДНК бактерий, увеличения их количества и идентификации в пределах реального времени.

Фемофлор позволяет:

- Определить общую бактериальную массу.
- Дать количественную оценку нормофлоры.
- Дать количественную оценку факультативной флоры, ее корреляцию с общим составом бактерий.
- Выполнить контроль забора материала для исследования.



История возникновения

- Система Фемофлор разработана и апробирована в 2008-2009 годах компанией «ДНК-Технологии» в России. Главная ее задача – исследование состава микрофлоры урогенитального тракта женщин.
- В 2014 году данная разработка признана победителем премии «Призвание».



Биохимические основы

В основе проведения анализа с помощью набора реагентов «Фемофлор» лежит полимеразная цепная реакция (ПЦР) с амплификацией (увеличение количества копий) ДНК.

Любая элементарная ПЦР состоит из следующих этапов:

- Расплетение нитей ДНК.
- Отжиг – то есть присоединение коротких нитей ДНК-затравок (праймеров), которые необходимы для дальнейшего образования нуклеиновых кислот.
- Комплементарное достраивание новых нитей – образование новой цепи ДНК.

Для успешного проведения ПЦР-диагностики необходимы следующие материалы:

- ДНК-матрица, то есть участок, подлежащий амплификации;
- Два комплементарных праймера (затравки);
- ДНК-полимераза термостабильная – фермент, необходимый для катализа реакции полимеризации;
- Дезоксирибонуклеофосфаты – строительный материал;
- Соли магния – для работы ДНК-полимеразы;
- Буферный раствор.

Наборы реагентов

Набор реагентов «Фемофлор» состоит из:

- Комплекс для обнаружения общего количества бактерий;
- Комплекс для обнаружения состава и количества нормофлоры (*Lactobacillus* spp.);
- Комплекс для обнаружения состава и количества факультативной флоры (состав зависит от комплектации Фемофлор-16 (17), Фемофлор-8 (9), Фемофлор-4, Фемофлор Скрин).

С помощью набора «Фемофлор» можно проконтролировать правильность течения процесса с помощью контрольной пробирки, а также правильность забора материала с помощью пробирки с комплексом для обнаружения генома человеческой ДНК.



Наборы реагентов

- В каждую реакционную смесь системы Фемофлор введены специальные ДНК-зонды, несущие в себе флуоресцентную составляющую (метку) в сочетании с гасителем флуоресценции.
- Действие гасителя прекращается при наличии специфических продуктов разрушения ДНК-зонда, после чего возникает флуоресценция. Чем больше этих специфических ампликонов, тем ярче будет свечение (флуоресценция).
- Чтобы увеличить специфичность и чувствительность реакции, применяют метод «горячего» старта. При этом реакционная смесь разделена на 2 прослойки с помощью парафина. Слои смешиваются и превращаются в реакционную смесь только при плавлении парафина в детекторе, исключая неспецифический отжиг праймеров.

Состав комплектов реагентов

Группа	Выявляемые показатели		Фемофлор 4	Фемофлор 8	Фемофлор 16
Диагностика нормоценоза	1	Общая бактериальная масса	•	•	•
	2	Lactobacillus spp. / ВК	•	•	•
Аэробные микроорганизмы	3	Сем. Enterobacteriaceae		•	•
	4	Streptococcus spp.		•	•
	5	Staphylococcus spp.			•
Анаэробные микроорганизмы	6	Gardnerella vaginalis/Prevotella bivia/ Porphyromonas spp.	•	•	•
	7	Eubacterium spp.		•	•
	8	Sneathia spp./Leptotrichia spp./Fusobacterium spp.			•
	9	Megasphaera spp./Veilonella spp./Dialister spp.			•
	10	Lachnobacterium spp./Clostridium spp.			•
	11	Mobiluncus spp./Corynebacterium spp.			•
	12	Peptostreptococcus spp.			•
	13	Atopobium vaginae			•
Группа Микоплазм	14	Mycoplasma (hominis +genitalium)		•	•
	15	Ureaplasma (urealyticum + parvum)			•
Грибы	16	Candida spp /контроль взятия материала	•		•

Преимущества и недостатки метода

Чувствительность метода при оценке дисбиотических нарушений составляет 88%, а специфичность – 89%. При диагностике бактериального вагиноза чувствительность Фемофлора выше и достигает порядка 95%.

К преимуществам можно отнести:

- Быстроту и простоту исполнения;
- Минимальную зависимость от человеческого фактора, имеющийся контроль правильности взятия мазка;
- Возможность оценки количества и качества факультативной и нормальной флоры, возможность оценки соотношения между разными видами микроорганизмов;
- Одновременное обнаружение различных возбудителей (бактерий, простейших, вирусов, грибов);
- Отсутствие противопоказаний к назначению данного метода.

Недостатки метода:

- Стоимость метода.
- Перед сдачей анализа появляется необходимость в соблюдении ряда условий (например, необходимо исключить незащищенные половые контакты за 48-72 часа до сдачи анализа).

Показания к проведению анализа

В целом ограничений к назначению исследования влагалищного мазка нет.

Но чаще всего Фемофлор назначают для:

- Идентификации возбудителя при инфекционном процессе (появление патологических белей, их неприятный запах) и назначения адекватной этиотропной терапии.
- Изучения состава влагалищной флоры, ее качественной и количественной составляющих.
- Постановки диагноза при расхождении клинических и лабораторных данных.
- Скрининга при беременности (во всех триместрах).
- В качестве дополнения к микроскопическому исследованию для оценки состояния биоценоза здоровых женщин.
- Подтверждения диагноза «бактериальный вагиноз» с определением факультативной флоры с патологическим характером роста.
- Контроля эффективности терапии.
- Мониторинга восстановления нормальной флоры.

Показания к проведению анализа

Наличие у женщины жалоб со стороны урогенитального тракта:

- зуд и жжение во влагалище или в уретре;
- патологические выделения из влагалища;
- неприятный запах из влагалища;
- боль внизу живота;
- болезненные менструации;
- отек и высыпания на половых губах;
- дизурия.

Абсолютных противопоказаний для этого исследования нет. Единственным условием является правильное выполнение забора и транспортировки исследуемого материала.

Материалы для исследования

Материалом для исследования у женщин является:

- соскоб из влагалища,
- цервикального канала,
- уретры.

Для мужчин материалом для исследования служат:

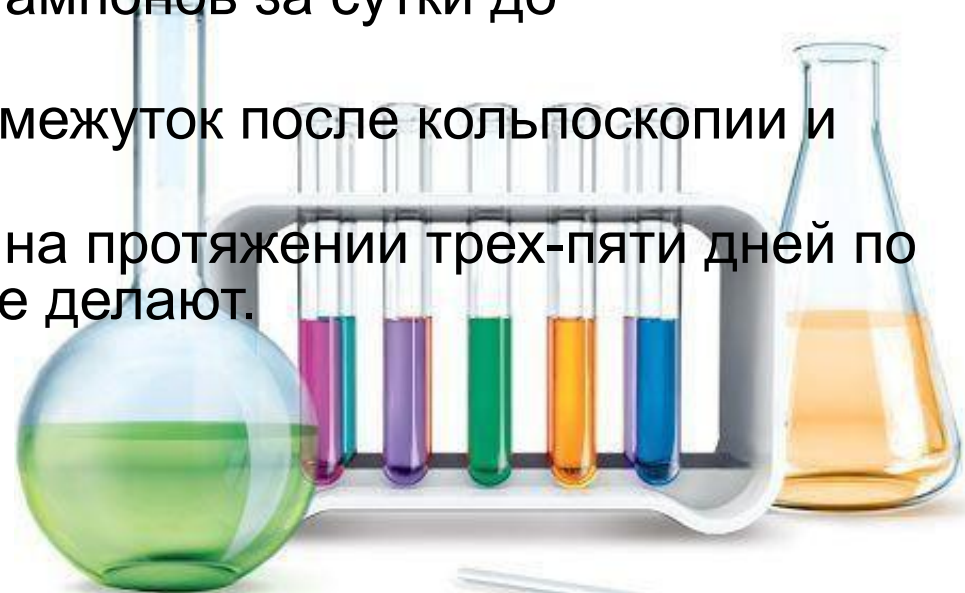
- первая порция мочи,
- соскоб из уретры,
- эякулят.



Правила забора и транспортировки материала

Подготовка к исследованию:

- Необходимо закончить курс терапии антибактериальными препаратами, эубиотиками и пробиотиками за 14 дней до исследования;
- Исключить защищенные половые контакты непосредственно перед исследованием, незащищенные – за 48 часов до взятия соскоба;
- Исключить применение тампонов за сутки до забора материала;
- Выждать 48-часовой промежуток после кольпоскопии и трансвагинального УЗИ.
- В период менструаций и на протяжении трех-пяти дней по их окончанию скрининг не делают.



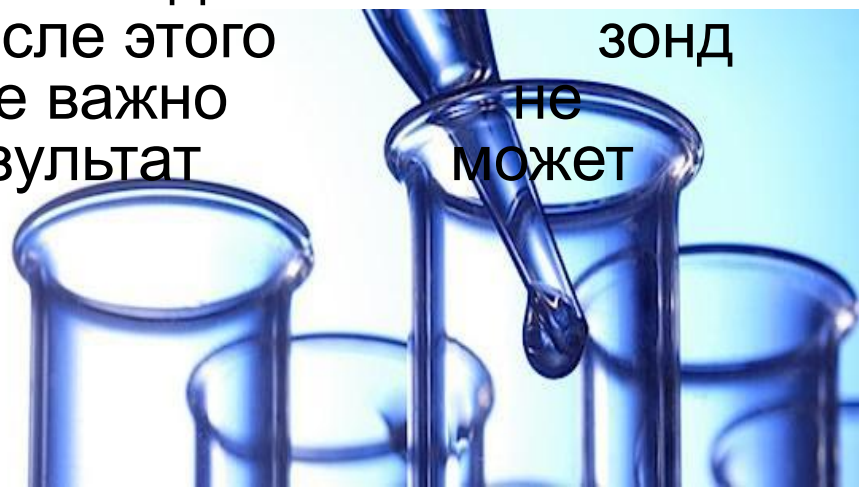
Забор из заднебокового свода

- Производится во время осмотра влагалища в зеркалах, строго ДО мануального исследования. Важным условием является отсутствие патологической слизи, крови из места забора, при необходимости – их механическое удаление стерильным ватным тампоном. При неправильном взятии соскоба и результат анализа будет недостоверным.
- Соскоб берут специальным одноразовым зондом, который затем помещают в пробирку с питательной средой (1,5 мл «Эппендорф» с питательной средой), тщательно его прополаскивают в среде, затем зонд утилизируют.
- Пробирку обязательно маркируют и плотно закрывают крышкой.



Забор из цервикального канала

- Обычно проводится при подозрении на патологию шейки матки (цервицит). Если патологический процесс виден в зеркалах, то рекомендуется брать материал именно из этого участка.
- Важным условием забора является отсутствие посторонних примесей и слизи, которые можно ликвидировать простерилизованным ватным тампоном, после чего шейка обрабатывается стерильным раствором 0,9% натрия хлорида.
- В цервикальный канал вводят специальный зонд на глубину не более 1,5 см, круговым движением очерчивается полный круг, после этого извлекается. На данном этапе важно не задеть стенки влагалища (результат может быть недостоверным).



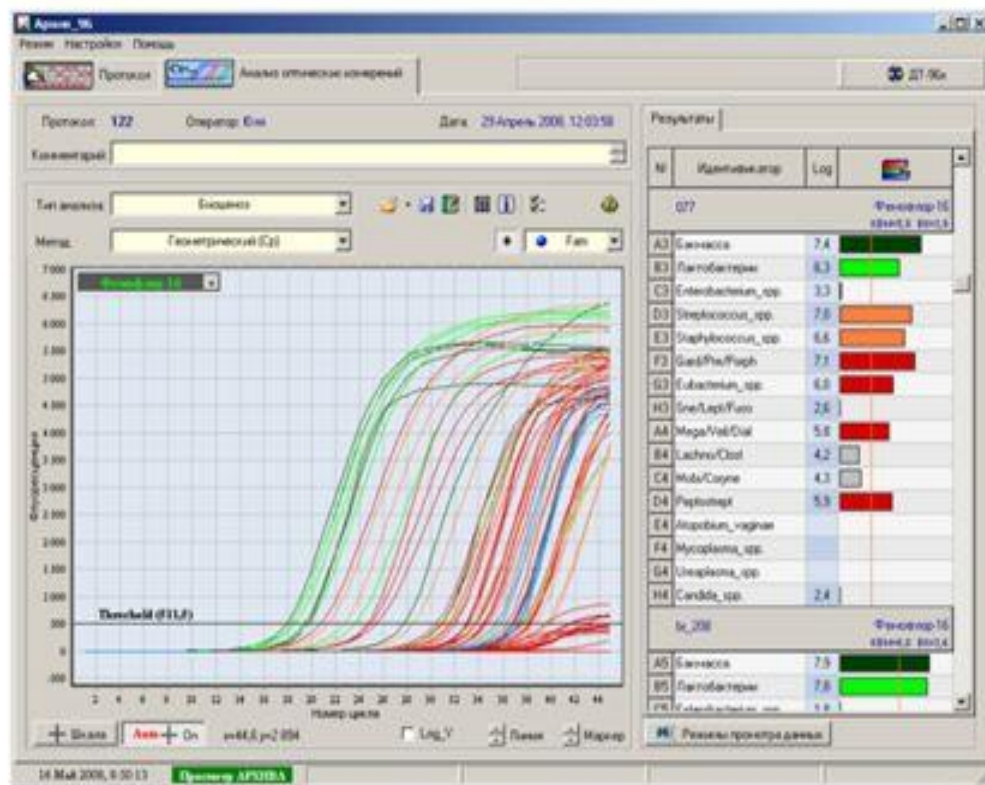
зонд

не
может

Забор отделяемого мочеиспускательного канала

- Перед взятием мазка из уретры пациентке рекомендуют выждать 1,5-2 часовой перерыв после последнего мочеиспускания.
- Если у пациентки имеются обильные специфические (гнойные или слизистые) выделения, двухчасовой интервал между последним мочеиспусканием и временем забора материала можно не соблюдать.
- Наружное отверстие уретры предварительно смачивают стерильным раствором 0,9% раствором натрия хлорида, после этого можно производить забор материала.
- Зонд вводится на глубину 1-1,5 см одним движением, а затем извлекается без каких-либо дополнительных манипуляций.
- После забора материала для исследования пробирка маркируется, к ней прикрепляется направление, в котором указывается предварительный диагноз, дату последней менструации или причину ее отсутствия (менопауза, аменорея).
- Транспортировка осуществляется специально обученным лаборантом. Допускается замораживание материала при температуре -20 С на срок не более 1 месяца.

Оборудование и программное обеспечение



Детектирующий термоциклер ДТ-96, «ДНК-Технология»

Оценка и расшифровка результатов

Оценка общей обсемененности:

- Оценивается общее количество бактерий в исследуемом материале – общая бактериальная масса. Нормальные ее значения колеблются в пределах 10^8 - 10^9 геном-эквивалентов/образец.
- Снижение этого показателя ниже 10^5 чаще всего свидетельствует о проведенном курсе лечения (применение антибиотиков и антисептиков). Повторить такой анализ рекомендуется через 14 дней.
- Снижение показателя у женщин в перименопаузе или постменопаузе является доказательством атрофических процессов.

Исследование нормофлоры влагалища:

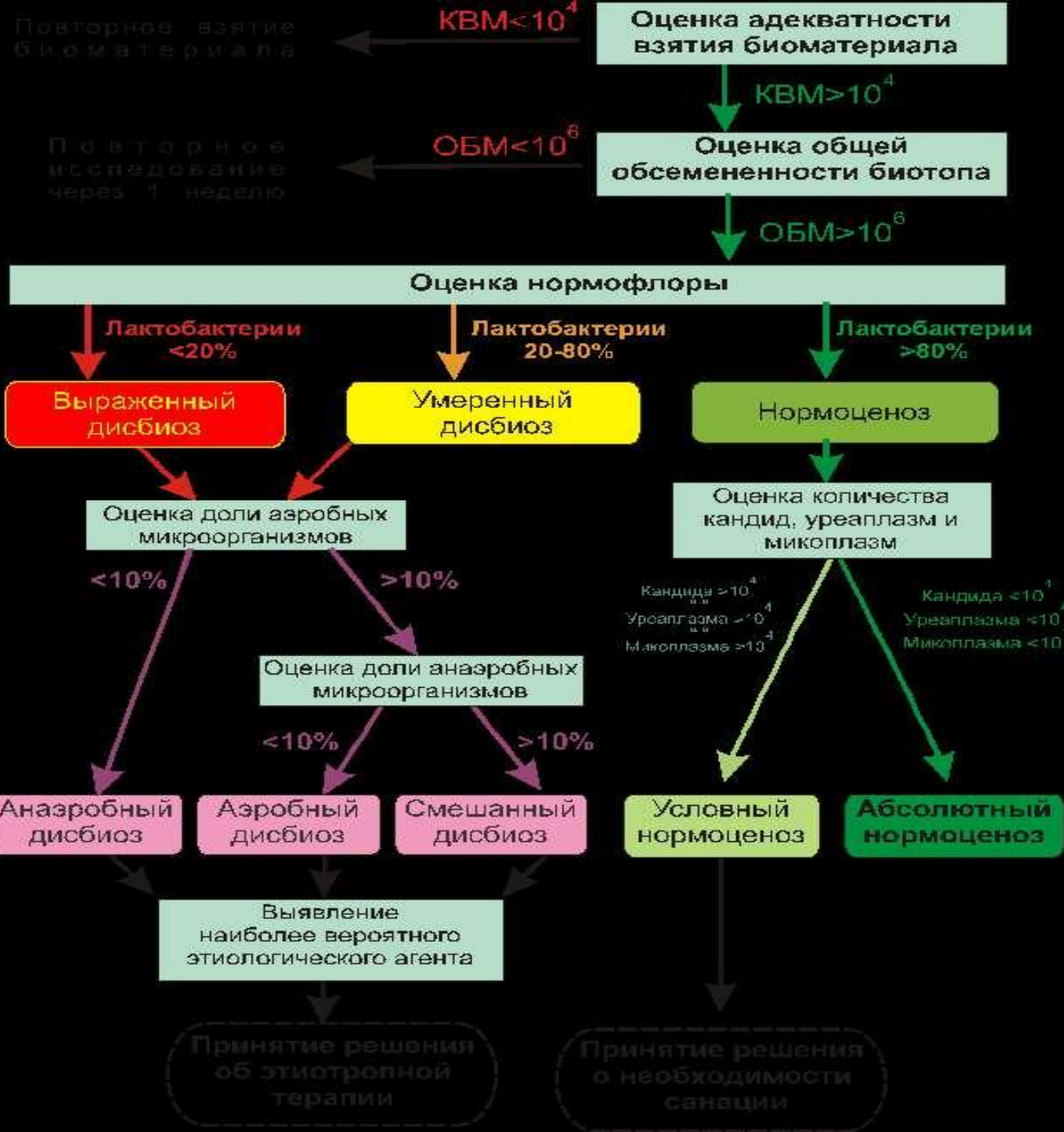
- В идеале нормальная флора женщины представлена микроорганизмами *Lactobacillus* spp, их количество равно общей бактериальной массе, то есть 10^8 - 10^9 ГЭ/образец.
- В ходе анализа проводится корреляция общего количества бактериальной массы, лактобацилл и доли факультативной флоры.
- **При нормоценозе доля лактобацилл составляет не менее 95%. Снижение ее до 80% говорит о умеренном дисбиозе, а до 20% - о крайне выраженном нарушении состава флоры.**

Оценка и расшифровка результатов

Показатель/микроорганизм	Нормальные значения	Каких заболевания возникают при повышении количества?
Представители нормофлоры		
Общая бактериальная масса	10^6-10^8	При снижении - дисбиоз
<i>Lactobacillus</i> spp.	10^6-10^8	При снижении - дисбиоз
Факультативно-анаэробная флора		
<i>Enterobacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	10^2-10^4	Неспецифический вагинит (аэробный), бактериальный вагиноз
Облигатно-анаэробная флора		
<i>Sneathia</i> spp./ <i>Leptotrihia</i> spp./ <i>Fusobacterium</i> spp.	До 10^4	Анаэробный дисбиоз, неспецифический вагинит
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Prevotella bivia</i> / <i>Porphyromonas</i> spp.	10^2-10^4	Повышение – бактериальный вагиноз
<i>Eubacterium</i> spp.	10^2-10^4	Повышение – анаэробный дисбиоз, неспецифический вагинит
<i>Moryluncus</i> spp./ <i>Corynebacterium</i> spp.	До 10^4	Бактериальный вагиноз
<i>Megasphaera</i> spp./ <i>Veilonella</i> spp./ <i>Dialister</i> spp.	До 10^4	Бактериальный вагиноз
<i>Lachnobacterium</i> spp./ <i>Clostridium</i> spp.	До 10^4	Бактериальный вагиноз
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	До 10^4	Бактериальный вагиноз
<i>Atopobium</i> vaginae	До 10^4	Бактериальный вагиноз
Дрожжевые грибы		
<i>Candida</i> spp.	До 10^3	Вагинальный кандидоз
Микоплазмы		
<i>Mycoplasma hominis</i>	До 10^3	Микоплазмоз, неспецифический вагинит, уретрит
<i>Ureaplasma</i> (<i>urealyticum</i> + <i>parvum</i>)	До 10^3	Уреаплазмоз, неспецифический вагинит, уретрит

Патогенная флора, выявляемая при выполнении теста «Фемофлор».

Показатель/микроборганизм	Нормальные значения	Вызываемое заболевание
Mycoplasma genitalium	Не выявлено	Микоплазмоз
Neisseria gonorrhoeae	Не выявлено	гонорея
Trichomonas vaginalis	Не выявлено	Трихомониаз
Chlamydia trachomatis	Не выявлено	Хламидиоз
Herpesvirus 1	Не выявлено	Генитальный герпес
Herpesvirus 2		
Citomegalovirus	Не выявлено	ЦМВ-инфекция



Примеры результатов проведенных исследований (1)

br013		Фемофлор-16 КВМ=6,1 ВК=3,6	
A5	Бакмасса	8,1	
B5	Лактобактерии	8,1	
C5	Enterobacterium_spp.	2,4	
D5	Streptococcus_spp.	2,0	
E5	Staphylococcus_spp.	3,2	
F5	Gard/Pre/Porph	4,8	
G5	Eubacterium_spp.	4,0	
H5	Sne/Lept/Fuso	1,2	
A6	Mega/Veil/Dial		
B6	Lachno/Clost	1,1	
C6	Mobi/Coryne		
D6	Peptostrept	3,4	
E6	Atopobium_vaginae		
F6	Mycoplasma_spp.		
G6	Ureaplasma_spp.	4,6	
H6	Candida_spp.	2,8	

Нормоценоз*

Состояние нормоценоза характеризуется следующими показателями:

Контроль взятия материала (КВМ) >10⁴ (4 Log)

Общая бакмасса от 10⁶ до 10⁹ (6-9 Log)

Нормофлора от 10⁶ до 10⁹ (6-9 Log) относительно ОБМ – от 0-до 0,5 – нормальный уровень

Аэробная и анаэробная условно-патогенная флора относительно ОБМ меньше 3 – нормальный уровень

Микоплазмы: *Mycoplasma (hominis + genitalium)* – отсутствуют,

Уреаплазмы: больше 10⁴ диагностически значимый уровень

Грибы рода *Candida*. Менее 10³ (<3 Log) диагностически незначимый уровень

Нормальный биоценоз обладает свойствами устойчивости и саморегуляции.

Примеры результатов проведенных исследований (2)

		Фемофлор-16 КВМ=5,1 ВК=4,0	
A9	Бакмасса	7,0	
B9	Лактобактерии	6,5	
C9	Enterobacterium_spp.	2,4	
D9	Streptococcus_spp.	2,0	
E9	Staphylococcus_spp.	2,3	
F9	Gard/Pre/Porph	0,9	
G9	Eubacterium_spp.	6,2	
H9	Sne/Lept/Fuso	1,7	
A10	Mega/Veil/Dial	4,9	
B10	Lachno/Clost	2,8	
C10	Mobi/Coryne	2,8	
D10	Peptostrept	2,2	
E10	Atopobium_vaginae		
F10	Mycoplasma_spp.		
G10	Ureaplasma_spp.	5,0	
H10	Candida_spp.	3,0	

Умеренный дисбаланс

Состояние умеренного дисбаланса характеризуется следующими показателями:

Контроль взятия материала (КВМ) > 10⁴ (4 Log)

Общая бакмасса от 10⁶ до 10⁹ (6-9 Log)

Нормофлора (Lactobacillus spp.) 0-0,5 относительно ОБМ – нормальный уровень

Аэробная и анаэробная условно-патогенная флора Больше -1 – значительно увеличенный уровень.

Микоплазмы: отсутствуют;

Уреаплазмы: *Ureaplasma (urealiticum + parvum)* больше 10⁴ - диагностически значимый уровень.

Грибы рода *Candida*. Менее 10³ (<3 Log).
Диагностически незначимый уровень

Примеры результатов проведенных исследований (3)

		Фемофлор-16 КВМ=5,8 ВК=4,1	
A1	Бакмасса	7,9	
B1	Лактобактерии	4,9	
C1	Enterobacterium_spp.	2,5	
D1	Streptococcus_spp.	2,5	
E1	Staphylococcus_spp.	3,4	
F1	Gard/Pre/Porph	7,9	
G1	Eubacterium_spp.	7,0	
H1	Sne/Lept/Fuso	2,2	
A2	Mega/Veil/Dial	3,7	
B2	Lachno/Clost	3,3	
C2	Mobi/Coryne	3,9	
D2	Peptostrept	3,7	
E2	Atopobium_vaginae		
F2	Mycoplasma_spp.		
G2	Ureaplasma_spp.		
H2	Candida_spp.	6,2	

Выраженный дисбаланс

Состояние выраженного дисбаланса характеризуется следующими показателями:

Контроль взятия материала (КВМ) $>10^4$ (4 Log)

Общая бакмасса может иметь нормальный, повышенный или пониженный уровень.

Нормофлора (*Lactobacillus spp.*) – относительно ОБМ – значительно сниженный уровень

Аэробная и анаэробная условно-патогенная флора отличается разнообразием микроорганизмов. Доля большей части представителей условно-патогенной микрофлоры превышает долю лактобактерий в общей бактериальной массе. Значительно повышенный уровень.

Микоплазмы: *Mycoplasma (hominis + genitalium)* – могут присутствовать в диагностически значимых количествах.

Уреаплазмы: *Ureaplasma (urealiticum + parvum)* могут присутствовать в диагностически значимых количествах.

Грибы рода *Candida*. присутствие более 10^3 (>3 Log) – диагностически значимый уровень.

Спасибо за внимание!!!

