

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневич

 2018 г.

Регистрационный № *120-1118*

**Метод определения видового состава микробных сообществ
с использованием Т-ПДРФ анализа рДНК-маркеров**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Е.В. Воропаев, О.В. Осипкина, О.Ю. Баранов, Д.Ю. Рузанов,

Ю.А. Лызикова, Э.Н. Платошкин, А.А. Зятков,

А.С. Шафарост, В.И. Зайцева

Гомель, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д. Л. Пиневич
30.11.2018
Регистрационный № 120-1118

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОБНЫХ
СООБЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
Т-ПДРФ АНАЛИЗА РДНК-МАРКЕРОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Гомельский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: Е. В. Воропаев, О. В. Осипкина, О. Ю. Баранов, Д. Ю. Рузанов,
Ю. А. Лызикова, Э. Н. Платошкин, А. А. Зятков, А. С. Шафарост, В. И. Зайцева

Гомель 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен молекулярно-генетический метод определения видового состава микробных сообществ путем анализа размеров терминальных рестрикционных фрагментов области гена 16S рибосомальной РНК бактерий (рРНК). В основе метода — комбинированный анализ, сочетающий полимеразную цепную реакцию (ПЦР), эндонуклеазную рестрикцию (Т-ПДРФ — полиморфизм длин терминальных рестрикционных фрагментов) и электрофоретическую детекцию высокой степени разрешения в условиях денатурирующего полиакриламидного геля.

Метод метагеномного анализа микробных сообществ может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение видового состава доминирующей микрофлоры в клинических образцах, для лечения заболеваний и патологических состояний, при которых необходимо назначение антибактериальных средств.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-инфекционистов, врачей-бактериологов, врачей-гастроэнтерологов, врачей-пульмонологов, врачей-гинекологов и иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь пациентам, которым необходимо назначение антибактериальной терапии в стационарных и амбулаторных условиях.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Таблица 1. — Изделия медицинской техники для молекулярно-генетического анализа (набор оборудования для молекулярно-генетического анализа)

<i>Пробоподготовка и выделение ДНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С
Твердотельный термостат (диапазон рабочих температур от -10 до +99 °С)
Микроцентрифуга-вортекс
Насос с колбой-ловушкой
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)
Спектрофотометр с возможностью комплексной оценки нуклеиновых кислот
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
УФ-стерилизатор или его аналог
<i>ПЦР</i>
Амплификатор (термоциклер)
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Микроцентрифуга-вортекс
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до + 99 °С
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 5–50; 20–200; 100–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С

Продолжение таблицы 1

Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
<i>Фрагментный анализ областей гена 16S рРНК</i>
ПЦР-бокс с УФ-рециркулятором воздуха
Высокоскоростная термостатированная центрифуга (10000–15000×g), диапазон рабочих температур от 0 до +25 °С
Твердотельный термостат, диапазон рабочих температур от -10 до + 99 °С
Магнитный штатив для пробирок
Микроцентрифуга-вортекс
Комплект пипеточных дозаторов (0,5–10; 10–100; 100–1000 мкл)
Холодильник, диапазон рабочих температур от +2 до +4 °С
Морозильная камера, диапазон рабочих температур от -16 до -18 °С
Система для проведения гель-электрофореза с набором модулей (включая источник питания) и аксессуаров
УФ-трансиллюминатор
Видеосистема для регистрации гелей в комплекте с компьютером
Генетический анализатор (с модулем электрофоретического фракционирования фрагментов нуклеиновых кислот)

Также необходимы следующие изделия медицинского назначения: ПЦР-пробирки, соответствующие типу используемого амплификатора (термоциклера); микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл; наконечники с фильтром объемом 10, 20, 200, 1000 мкл; наконечники без фильтра; халаты, резиновые перчатки, фильтровальная бумага, штативы для пробирок и др.

Для молекулярно-генетических исследований необходимы: наборы реагентов для экстракции и очистки ДНК, амплификации, эндонуклеазной рестрикции, проведения горизонтального электрофореза в агарозном геле, электрофоретического анализа фрагментов нуклеиновых кислот с использованием генетического анализатора. Перечень основных реагентов для работы напрямую связан с выбором оригинальных методик анализа и приготовления собственных реакционных смесей или использованием коммерческих наборов.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки (K20-K31); хронические болезни нижних дыхательных путей (J40-J47); другая хроническая обструктивная легочная болезнь (J44); невоспалительные болезни женских половых органов (N80-N98), воспалительная болезнь шейки матки (N72), инфекционные заболевания: бактериальные, вирусные и другие инфекционные агенты B95-B98, другие инфекционные болезни (B99-B99).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

В основе метода лежит молекулярно-генетическая оценка размеров фрагментов гипервариабельной области гена 16S рРНК бактерий. Ген 16S рРНК

является наиболее распространенным маркерным геном бактерий, таксоноспецифичные участки которого используются для проведения видовой идентификации микроорганизмов, в т. ч. труднокультивируемых. Данный анализ можно проводить с использованием дорогостоящего высокопроизводительного секвенирования (NGS – next generation sequencing) или методом анализа размеров терминальных участков рестрикционных фрагментов (Т-ПДРФ), основанного на комбинировании ПЦР-амплификации и эндонуклеазной рестрикции с применением меченых олигонуклеотидных праймеров.

Этапы:

1. Взятие и транспортировка биологического материала (в соответствии с правилами для проведения молекулярно-биологических исследований).

2. Экстракция ДНК. ДНК можно выделять с использованием готовых коммерческих наборов, позволяющих выделять ДНК из небольшого количества образца. Для определения качественных и количественных характеристик полученной ДНК проводят спектрофотометрический анализ. Для дальнейшего анализа используют образцы, для которых соотношение экстинкций составляет: $A_{260}/A_{280} \geq 1,67$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$, $A_{320} \rightarrow 0$.

3. ПЦР. Для амплификации гипервариабельной области гена 16S рРНК бактерий используется метод ПЦР. Структура праймеров приведена в таблице 2. С целью последующей детекции фрагментов ДНК оптическим модулем генетического анализатора в структуру прямого праймера (5-конец) интегрируется флуоресцентный краситель FAM, а в структуру обратного (5-конец) — HEX.

Таблица 2. — Структура праймеров, меченных флуоресцентными метками, используемых для выявления гипервариабельной области гена 16S рРНК, и ориентировочный размер амплифицируемого фрагмента

Праймер	Нуклеотидная последовательность	Ориентировочный размер амплифицируемого фрагмента
МЕТ-прямой	FAM-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	~ 900 пар нуклеотидов (п.н.)
МЕТ-обратный	HEX-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	

Для ПЦР можно использовать готовые коммерческие смеси, программа ПЦР стандартна для амплификации длинных фрагментов; температура отжига — 55 °С.

4. Предварительная детекция продуктов ПЦР. Проводят горизонтальный гель-электрофорез с последующим окрашиванием раствором бромистого этидия (концентрация 0,1–0,5 мкг/мл). Для визуализации полученных результатов и цифрового фотодокументирования изображения используют специализированную (для УФ-сканирования) видеосистему и соответствующее программное обеспечение. Результатами ПЦР-амплификации, направленной на избирательное молекулярное клонирование диагностического фрагмента гена бактериальной 16S рРНК, для каждого образца является наличие электрофоретической зоны размером ≈ 900 п.н., характеризующейся, как правило,

выраженной диффузной структурой (разные по размеру ампликоны), что связано с содержанием генетического материала более чем одного вида микроорганизмов. На рисунке 1 в качестве иллюстрации приведена электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК.

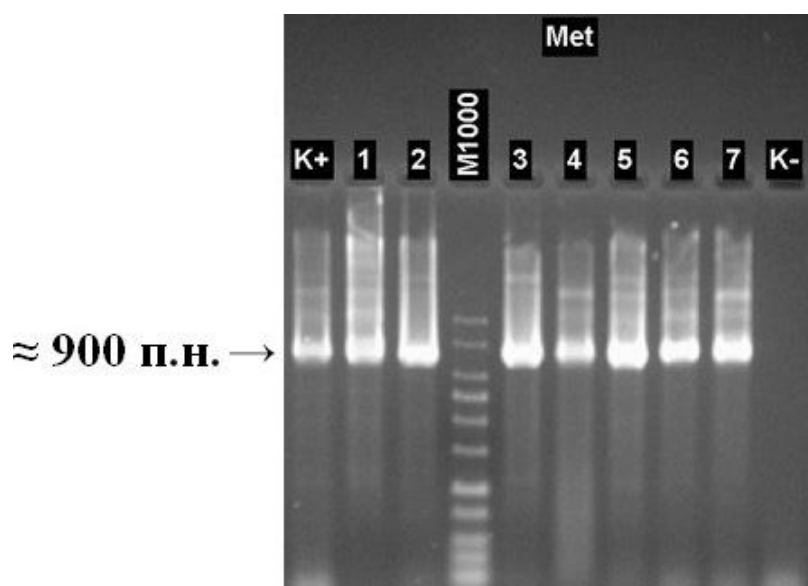


Рисунок 1. — Электрофоретическая детекция амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК

Интерпретация результатов электрофоретического фракционирования, представленных на рисунке 1: в качестве отрицательного контроля K- использована вода (амплификация отсутствует); положительный контроль — образец K+ — амплифицируется фрагмент размером ≈ 900 п.н.; для образцов № 1–7 получены ампликоны с прогнозируемой по размеру зоной.

5. Рестрикционный анализ ампликонов, для определения состава бактериальной микрофлоры проводят с применением рестриктаз (эндонуклеаз рестрикции) согласно инструкции компании-производителя. В данной инструкции приведены результаты анализа с использованием эндонуклеазы MspI. Электрофоретический анализ высокой степени разрешения проводят с использованием генетического анализатора согласно протоколу, рекомендуемому компанией-производителем. Размер терминальных рестрикционных фрагментов определяют при сравнении с эталонными образцами (электрофоретическими стандартами) путем построения калибровочного графика. Размер рестриктов (нуклеотидов) вычисляется путем проекции вершины электрофоретических пиков на ось X; количество (уровень сигнала) — на ось Y.

Рестриктаза MspI (HpaII) — фермент, распознающий сайты C[^]CGG. Для анализа микробиомов MspI является наиболее информативной по сравнению с другими эндонуклеазами (AvaI, HaeIII, HhaI, HpaII, MboI, MvaI, TaqI и др.), что связано с высоким уровнем варьирования расположения сайта C[^]CGG среди различных видов бактерий и соответственно возможностью дифференцировать значительное количество генотипических вариантов, ассоциированных с

таксономической принадлежностью бактериальных организмов. Анализ результатов проводят с помощью специализированных программных пакетов, предназначенных для оценки электрофоретических спектров, полученных с использованием генетического анализатора (например, GeneMapper).

6. Расчет ожидаемого размера терминальных рестриционных фрагментов проводят с помощью программного обеспечения, представленного в открытом доступе на интернет-ресурсах (например, NEBcutter). Сравнительный анализ расчетных и детектируемых электрофоретических данных позволяет сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.

7. Верификация идентификации микроорганизмов контрольных образцов осуществляется методом секвенирования по Сэнгеру (терминация цепи), включающим этапы ПЦР, очистки ампликонов, секвенирующую реакцию с применением меченых дидезоксинуклеотидтрифосфатов, электрофоретическое фракционирование полученных меченых фрагментов различной длины с последующей детекцией. Данные о нуклеотидной последовательности в формате FASTA используют для поиска с помощью программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) в международном генном банке NCBI.

В качестве пример, в инструкции приведены результаты анализа образцов бактериальных культур с установленным видовым статусом (*Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Результаты фрагментного анализа представлены на рисунках 2, 4, 6. На рисунке 2 представлена электрофореграмма рестриктов, полученных после обработки рестриктазой MspI контрольного образца *Helicobacter pylori*. На фореграмме отмечены два пика, соответствующих терминальным рестриционным фрагментам размером 269 и 425 нуклеотидов, получаемые при фрагментации ампликона.

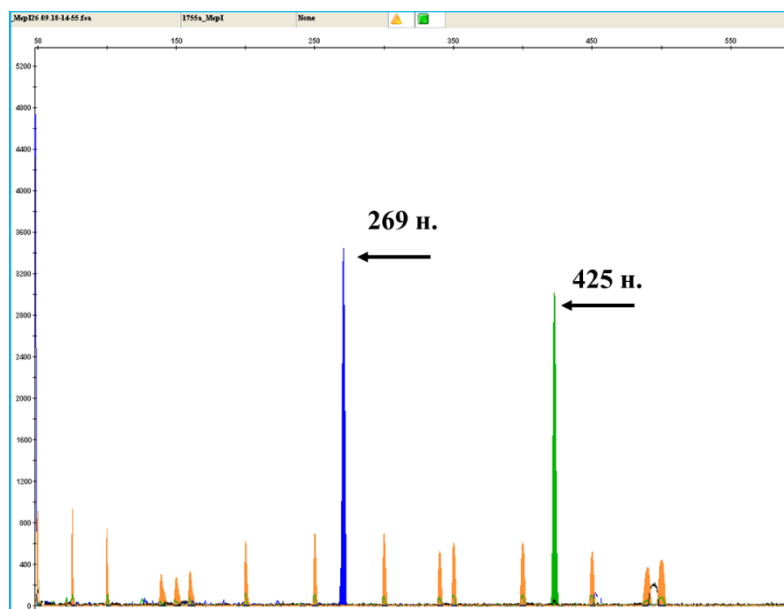


Рисунок 2. — Электрофоретический спектр терминальных рестриционных фрагментов *Helicobacter pylori*

Анализ нуклеотидной последовательности методом секвенирования и последующей идентификации при помощи международного ресурса GenBank показал соответствие амплифицированной нуклеотидной последовательности бактерии *Helicobacter pylori*. Полученные результаты соответствуют данным рестрикционной карты MspI *Helicobacter pylori*, созданной с помощью программного обеспечения (рисунок 3).

На рисунке 3 представлена электрофореграмма рестрикетов, полученных после обработки рестриктазой MspI образца *Helicobacter pylori*.

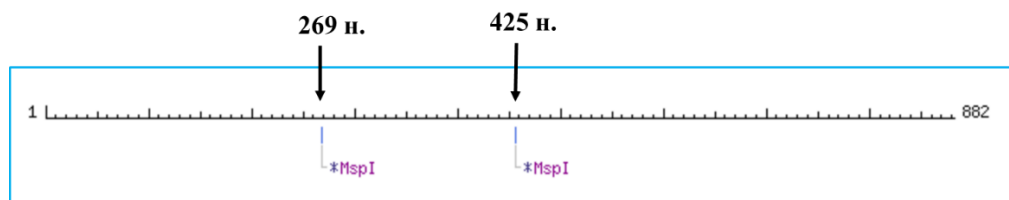


Рисунок 3. — Рестрикционная карта MspI ампликона *Helicobacter pylori*

На рисунке 4 представлена электрофореграмма рестрикетов, полученных после обработки рестриктазой MspI образца *Staphylococcus aureus*.

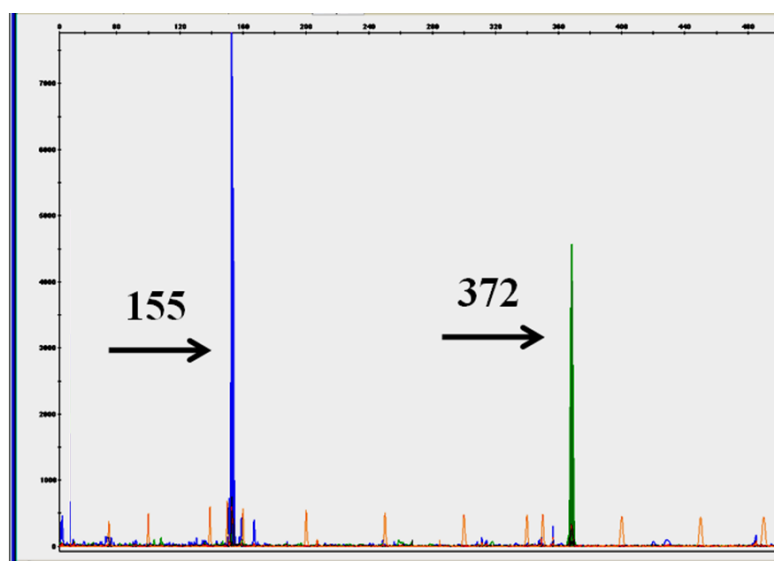


Рисунок 4. — Электрофоретический спектр терминальных рестрикционных фрагментов *Staphylococcus aureus*

На электрофореграмме присутствуют два пика, соответствующих терминальным рестрикционным фрагментам размером 155 и 372 н.о., получаемых при фрагментации ампликона (рисунок 4). Результаты соответствуют данным рестрикционной карты MspI *Staphylococcus aureus*, созданной с помощью программного обеспечения (рисунок 5).

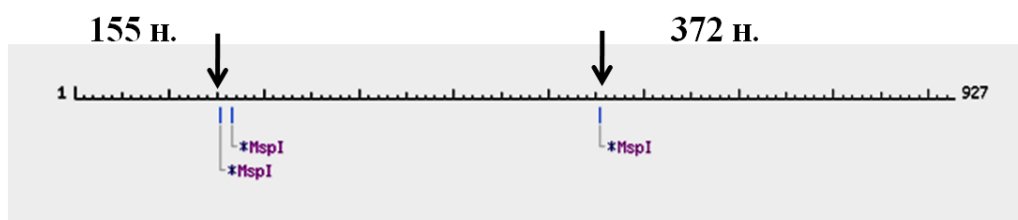


Рисунок 5. — Рестрикционная карта MspI ампликона *Staphylococcus aureus*

Анализ нуклеотидной последовательности при помощи секвенирования и последующей идентификации в GenBank показал соответствие амплифицированной нуклеотидной последовательности бактерии *Staphylococcus aureus*.

На рисунке 6 представлена электрофореграмма рестрикетов, полученных после обработки рестриктазой MspI контрольного образца *Pseudomonas aeruginosa*. На фореграмме представлены два пика, соответствующие фрагментам длиной 143 и 313 нуклеотидов, характерные для данного микроорганизма.

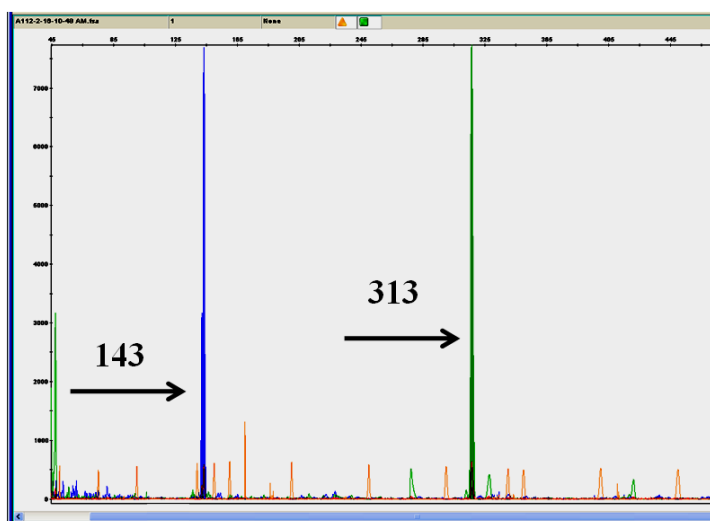


Рисунок 6. — Электрофоретический спектр терминальных рестрикционных фрагментов *Pseudomonas aeruginosa*

Полученные результаты соответствуют данным рестрикционной карты MspI *Pseudomonas aeruginosa*, созданной с помощью программного обеспечения (рисунок 7).

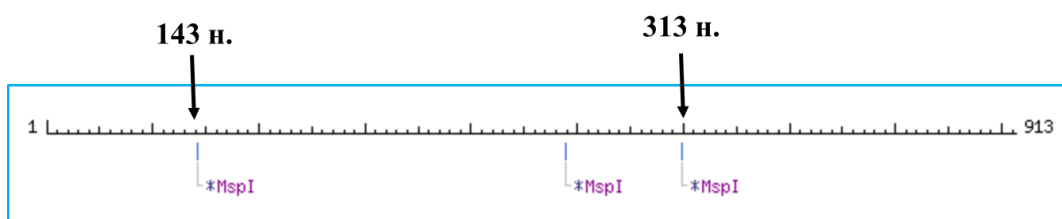


Рисунок 7. — Рестрикционная карта MspI ампликона *Pseudomonas aeruginosa*

Анализ нуклеотидной последовательности методом секвенирования и последующей идентификации при помощи международного ресурса GenBank показал соответствие амплифицированной нуклеотидной последовательности бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Анализ и верификация видов в случае микробных сообществ путем прямого секвенирования образцов не представляются возможными, что связано с получением смешанных данных – непригодных для интерпретации. В то же время использование подхода Т-ПДРФ позволяет определить широкий спектр родов микроорганизмов в смешанном микробном сообществе (так, например, *Actinomyces*, *Granulicatella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Lactobacillus* и др.).

Метод метагеномного анализа микробных сообществ может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на определение видового состава доминирующей микрофлоры в клинических образцах для лечения заболеваний и патологических состояний, при которых необходимо назначение антибактериальных средств, например, болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки (K20-K31); хронические болезни нижних дыхательных путей (МКБ-10 - J40-J47); невоспалительные болезни женских половых органов (N80-N98), воспалительная болезнь шейки матки (N72), инфекционные заболевания (бактериальные, вирусные и другие инфекционные агенты (B95-B98) и др.

При определении доминирующей патогенной микрофлоры, колонизирующей определенные анатомические структуры или органы человека (желудок, кишечник, бронхи, полость рта, цервикальный канал, матка и т. д.), проводят оптимизацию этиопатогенетической терапии различных инфекционных и соматических заболеваний, особенно у иммунокомпрометированных пациентов, что способствует профилактике различных дисбактериозов, возникающих на фоне антибиотикотерапии.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Для правильной организации высококачественных молекулярно-генетических исследований необходимо строгое соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Нарушение этих правил — причина неверной диагностики и интерпретации полученных результатов. В первую очередь, на ход дальнейшего анализа влияют концентрация и чистота ДНК: низкий количественный выход, деградация, наличие ингибиторов ПЦР препятствуют высокотехнологичным исследованиям. Причина ложноположительных результатов – контаминация загрязненными реагентами, инструментарием, продуктами ПЦР и перекрестная контаминация от пробы к пробе. Выявить случаи контаминации в отдельных пробах можно при постановке реакции в двух или трех параллелях, а также использовании в каждой постановке отрицательного контроля, проводимого через все стадии

пробоподготовки. Одновременно с опытными образцами в каждом эксперименте должны использоваться специальные контроли, позволяющие верифицировать результаты.

Обоснование целесообразности практического использования метода

По последним данным, в организме *Homo sapiens* в среднем обитает около 100 трлн бактериальных клеток, что на порядок превышает общее число клеток человеческого организма, а микробные геномы в совокупности кодируют в 100 раз больше генов, чем геном человека. Существенную роль в анализе состава и функций микробиома отдельных органов и систем организма сыграли методы молекулярной биологии, используя которые можно проанализировать состав бактериального микрогенома путем определения генетического профиля рРНК (рибосомные рибонуклеиновые кислоты). Существует три основных типа рРНК, образующие основу рибосом прокариот из которых для исследования бактериальных метагеномных сообществ наиболее часто используется генетический анализ 16S рРНК. Данный вид молекулярно-генетических исследований проводят, используя фрагментный анализ 16S рРНК, секвенирование ДНК по Сэнгеру и современные возможности секвенирования нового поколения — next generation sequence (NGS). Последний метод открывает большие возможности для исследования метагеномных сообществ, но в настоящее время является достаточно дорогим и относительно малодоступным широкому кругу исследователей. Использование же фрагментного анализа 16S рРНК для изучения микробиома позволяет определить спектр доминирующей микрофлоры, что делает данный вид исследований экономически целесообразным для большинства лабораторий, применяющих молекулярно-генетические методы.

Значительная часть микробной массы человека обитает в его желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), микробиом которого, помимо участия в усвоении питательных веществ из пищи играет важную роль в метаболических и когнитивных процессах, иммунных реакциях, и его изменение приводит к развитию аллергических и аутоиммунных заболеваний, сахарного диабета, ожирения, онкологических заболеваний и другой патологии. Существенную роль в развитии патологических состояний ЖКТ оказывает *Helicobacter pylori* — единственная бактерия классифицированная ВОЗ как канцероген I типа, избирательно колонизирующая эпителий желудка и являющаяся этиологическим агентом MALT-лимфомы, рака желудка, хронического гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, в то время как роль других микроорганизмов в развитии патологии желудка малоизучена.

Молекулярно-генетические исследования показали, что микробиота желудка человека в здоровых условиях в основном представлена комменсальными микроорганизмами родов *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Pasteurellaceae*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Porphyromonas* и *Lactobacillus* без существенных различий в анатомических областях желудка, в то время как развитие рака желудка, связанного непосредственно с *Helicobacter pylori*, имеет явные анатомические особенности. В 60–70 % случаев рак желудка, этиологическим фактором которого является *Helicobacter pylori*, развивается в антральном и пилорическом отделе желудка; в 10–15 % — на малой кривизне тела желудка; в 8–10 % — в кардии; в 2–5 % — на передней и задней стенках желудка.

Хроническая инфекция *Helicobacter pylori*, иммуносупрессивный статус, антибиотикотерапия и изменения кислотности желудка в сторону увеличения $pH > 4$ уменьшают биологическое разнообразие бактериального микробиома желудка, что выражается в увеличении колонизации *Lactobacillus* и снижении количественного состава микроорганизмов из родов *Prevotella* и *Fusobacterium*.

Таким образом, микробиом желудка играет важную роль в функционировании желудочно-кишечного тракта, и нарушения его структуры могут выступать в качестве индуктора развития различной патологии ЖКТ.

Верхние отделы кишечника пересекаются с дыхательными путями, что приводит к возможности взаимного обмена микрофлоры этих систем организма как непосредственно, так и через кровь. Для микрофлоры верхних дыхательных путей в норме характерно незначительное количество микроорганизмов из внешней среды, так как большая часть их задерживается в полости носа. В составе микробиома легких и ротоглотки доминируют представители типов *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*. Доминирующие роды в ротоглотке — *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia* и *Veillonella spp.* M. Hilty et al. (2012) на основании ранее выполненного анализа 5054 бактериальных сиквенсов 16S рРНК в образцах от 43 добровольцев показали, что в микробиоме нижних дыхательных путей здоровых людей наиболее распространены представители родов *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria* и *Veillonella*, а потенциально патогенные *Haemophilus* и *Neisseria* встречаются реже. У пациентов с бронхиальной астмой (БА) наблюдается снижение разнообразия микробиоты. В частности, происходит увеличение доли протеобактерий, таких как *Haemophilus*, *Neisseria* или *Streptococcus*, и уменьшение удельного веса комменсалов (*Prevotella* и *Veillonella spp.* и др.). По мнению A. R. Panzer и S. V. Lynch, это является следствием дисбиоза в кишечном микробиоме, который играет важную роль в иммунном ответе организма, особенно в детском возрасте. Состав микробиома дыхательных путей влияет не только на риск развития БА, но и течение процесса. Так, у пациентов с неконтролируемой астмой, получавших соответствующую терапию, значительно чаще в составе микробиома обнаруживали *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydia pneumoniae*. По данным J. L. Simpson et al., существуют специфические изменения микробиома мокроты при различных фенотипах астмы. Например, при нейтрофильной астме наблюдается снижение бактериального разнообразия в сочетании с высокой распространенностью *Haemophilus influenzae*, тогда как эозинофильная астма имела обилие *Tropheryma whipple*.

Репродуктивное здоровье женщины также во многом определяется составом микробиома ее урогенитального тракта. Микрофлора влагалища выступает в качестве барьера, защищающего дистальные отделы репродуктивной системы от проникновения патогенных микроорганизмов, а также поддерживает адекватный уровень функционирования иммунной системы, проявляя иммуномодулирующие свойства. В микробиоме влагалища здоровой женщины преобладают представители рода *Lactobacillus*, несколько реже встречаются бактерии родов *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*.

При инфекционных заболеваниях репродуктивной системы наблюдается увеличение биоразнообразия микрофлоры. Так, в случае специфического хронического эндометрита в биоптате эндометрия обнаруживаются вирусы (*Herpes simplex 1* и *2* типов), в составе микробиома увеличивается доля патогенных бактерий (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma genitalium* и др.) и уменьшается количество молочно-кислых бактерий. Именно представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* играют важнейшую роль в поддержании постоянства состава микробиоты женского урогенитального тракта.

Таким образом, изучение комплексной роли микроорганизмов в функционировании отдельных систем и всего организма в целом позволяет использовать полученные данные в практической медицине для разработки новых методов диагностики и терапии различных заболеваний.