

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Лабораторная диагностика бактериального вагиноза

Учебно-методическое пособие

Минск БелМАПО
2014

УДК 618.15-022:579.873.1-078:57.083(075.9)

ББК 57.15+53.4я73

Л 12

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
УМС Белорусской медицинской академии последипломного образования
Протокол № 6 от 20.11.2014г.

Авторы:

Шиманская И.Г., Костюк С.А., Руденкова Т.В., Полуян О.С.

Рецензенты:

к.м.н., доцент кафедры кожных и венерических болезней БГМУ

А.Л. Барабанов;

дерматовенерологическое отделение УЗ «Минский городской клинический
кожно-венерологический диспансер»

Л 12

Лабораторная диагностика бактериального вагиноза: учеб.-метод.
пособие /И.Г. Шиманская, С.А. Костюк, [и др.]. - Минск.: БелМА-
ПО, 2014.-113с.

ISBN 978-985-499-833-6

В пособии даются современные представления об этиологической структуре
бактериального вагиноза и клинической трактовке результатов лабораторных иссле-
дований.

Учебно-методическое пособие предназначено для врачей дерматовенероло-
гов, урологов, акушеров-гинекологов, микробиологов, врачей лабораторной диагно-
стики.

УДК 618.15-022:579.873.1-078:57.083(075.9)

ББК 57.15+53.4я73

ISBN 978-985-499-833-6

© Шиманская И.Г. [и др.], 2014

© Оформление БелМАПО, 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДОВОГО СОСТАВА НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН	7
РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ СЛИЗИСТЫХ МОЧЕПОЛОВЫХ ОРГАНОВ В РАЗВИТИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА	15
МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА	21
МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ	21
Прямая микроскопия нативных препаратов («влажных мазков»)	21
Микроскопия окрашенных препаратов	23
Диагностика, основанная на методе Spiegel	24
Диагностика, основанная на критериях Nugent	24
Диагностика по системе Ison-Hay (Ison C, 2002)	25
Диагностика, основанная на критериях ВОЗ (ВОЗ, 2005)	25
Микроскопическая диагностика с использованием световой микроскопии	27
Преаналитический этап	27
<i>Получение материала для исследования</i>	27
<i>Получение материала для микроскопии нативных препаратов</i>	29
<i>Получение материала для микроскопии окрашенных препаратов</i>	30
<i>Транспортировка материала</i>	31
Аналитический этап	32
<i>Методы окрашивания</i>	32
<i>Методика микроскопии в проходящем свете</i>	34
<i>Проведение микроскопического исследования</i>	36
<i>Оценка данных микроскопического исследования</i>	38
Микроскопия нативных препаратов	42
Микроскопия нативных препаратов при малом увеличении x100... ..	42
Микроскопия нативных препаратов при большом увеличении x400..	47
Микроскопия окрашенных препаратов	53
Оценка результатов при исследовании мазка, окрашенного метиленовым синим	54
Оценка результатов при исследовании мазка, окрашенного по Граму	61
Заключение по результатам микроскопического исследования	64
МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА МАЗКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ	65
Строение эпителия генитального тракта	65
Микроскопическая картина при кандидозной инфекции	65
Микроскопическая картина при гонококковой инфекции	66
Микроскопическая картина при трихомонозе	68
Микроскопическая картина при урогенитальной хламидийной инфекции	69

Микроскопическая картина при шанкроиде (мягкий шанкр, <i>ulcus molle</i>)	70
Микроскопическая картина при паховая гранулема (донованоз, венерическая гранулема).....	71
Микроскопическая картина при неспецифическом (бактериальном) уретрите/цервиците	73
Микроскопическая картина при неспецифическом (бактериальном) вульвовагините	74
Микроскопическая картина при герпесвирусной инфекции	75
Микроскопическая картина при папилломавирусной инфекции	75
Варианты микроскопических картин	76
КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ...	81
ДРУГИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	82
Культуральная диагностика	82
Метод газожидкостной хроматографии	82
Экспресс-тест для диагностики БВ (BVblue)	82
Исследование отделяемого мочеполовых органов методами амплификации нуклеиновых кислот	83
Сравнительная оценка результатов лабораторных исследований у пациентов «классическими» методами и МАНК	87
Сравнительная оценка клинико-микробиологических показателей в зависимости от пола и характера течения заболевания	97
Мультипраймерные МАНК в диагностике бактериального вагиноза ..	103
ЛИТЕРАТУРА.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный вагиноз (БВ) – клинический симптомокомплекс, развивающийся в результате изменения экологии влагалища, когда нормальная аэробная микрофлора, представленная преимущественно лактобактериями, полностью или частично замещается высокими концентрациями ($>10^9$) анаэробной флоры, в частности *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *Mobiluncus* sp., *Porphyromonas* sp., *Gardnerella vaginalis* и *Mycoplasma hominis* (Pheifer TA, 1978).

Влагалище в норме колонизируется лактобактериями, продуцирующими молочную кислоту, что гарантирует поддержание pH в пределах 3.8-4.2 и ингибирует рост других микроорганизмов.

Данные о заболеваемости БВ широко расходятся вследствие различных вариаций в применяемых диагностических критериях: от изоляции *G. vaginalis* в ранних исследованиях до обнаружения смешанной микробной флоры при микроскопии в современных работах, а также вследствие исследования различных популяций: от женщин, посещающих сеть первичной медицинской службы, до тех, кто обращается в кожновенерологические диспансеры. У большого количества женщин, больных БВ (5-25%), заболевание протекает бессимптомно (Kurki T et al, 1992; Ryan CA, 1998; Sanchez S, 1998). Современная литература по эпидемиологии БВ приводит противоречивое доказательство полового пути передачи. БВ наиболее часто определяется у сексуально активных женщин (Amsel R, 1983) и, несомненно, сексуально ассоциирован. Крупных исследований, демонстрировавших эффективность терапии половых партнеров на носительство БВ у мужчин ранее не проводилось (Hiller S, 1999). БВ был обнаружен у женщин, никогда не имевших сексуального контакта, хотя у сексуально активных пациенток БВ встречается значительно чаще и находится в тесной связи с факторами риска ИППП, например, множество половых партнеров, недавняя смена полового партнера (Avonts D, 1990; Haves SE, 1996). Заболеваемость БВ выше среди женщин, посещающих

кожно-венерологические учреждения (Hallen A 1987; Eschenbach D, 1988), или перенесших аборт (Blackwell, 1999).

БВ по определению является дисбактериозом влагалища, поэтому мужчинам такой диагноз не устанавливается. *G. vaginalis* обычно можно выделить из уретры мужчин-половых партнеров пациенток с БВ (Gardner 1955; Pfeifer TA, 1984), иногда возбудители БВ вызывают уретрит у мужчин (Keane, 1997), который проявляется жжением и болью при мочеиспускании. В этом случае необходимо лечение, однако лечение партнеров не предотвращает рецидив заболевания у женщин с нарушениями менструального цикла, в период менопаузы и т.д.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДОВОГО СОСТАВА НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ВЛАГАЛИЩА У ЖЕНЩИН

Микрофлора половых органов здоровой женщины представляет собой комплексную, динамически изменяющуюся микроэкосистему, включающую, кроме лактобацилл [1, 2, 3], факультативные аэробы и анаэробы (табл.1). В состав нормальной микрофлоры влагалища в небольшом количестве могут входить *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans* и анаэробные бактерии (рода *Mobiluncus* и другие) [4, 5].

«Нормальная» микрофлора влагалища высокочувствительна к местным факторам [5, 6], а также к влиянию гормонов [7]. Состав микрофлоры зависит от фазы менструального цикла [8], наличия беременности [9], гормональных изменений после менопаузы [10], гинекологических операций [11], сексуальной активности [12], экспозиции спермы [13], гигиенических привычек [14], приема антимикробных препаратов [15] и других факторов (табл. 1).
Таблица 1 – Видовой состав нормальной микрофлоры влагалища женщин репродуктивного возраста

Группа микроорганизмов	Представители группы
Грамположительные палочки	<i>Lactobacillus spp.*</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i> , <i>Propionibacterium spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i>
Грамотрицательные (строго анаэробные) палочки (в низком титре у 14–55%)	<i>Bacteroides spp.*</i> , <i>Fusobacterium spp.*</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Leptotrichia spp.</i>
Грамположительные кокки (выделяются у 30–80%)	<i>Peptococcus spp.*</i> , <i>Peptostreptococcus spp.*</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus*</i> , <i>Micrococcus varians</i> , <i>Streptococcus group D</i> , <i>Hemolyticus Streptococcus</i> , <i>Streptococcus viridans</i> и др.
Грамотрицательные кокки (редко в низком титре)	<i>Velionella spp.</i> , <i>Acidominococcus fermentas</i> , непатогенные <i>Neisseria spp.</i> (не <i>gonorrhoeae</i>)
Энтеробактерии (редко и в небольшом количестве)	<i>Escherichia coli*</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i>

Примечание – * Микроорганизмы, имеющие наибольшее клиническое значение

В результате спринцевания; применения противозачаточных средств, содержащих 9-ноноксинол, использования внутриматочных контрацептивов, смены половых партнеров, применения антибиотиков широкого спектра действия уменьшается доля лактобацилл в микрофлоре влагалища [7-15]. Одновременно возрастает доля *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* и анаэробных бактерий и развивается дисбактериоз влагалища – бактериальный вагиноз (табл. 2).

Таблица 2 – Некоторые особенности экосистемы влагалища в норме и при БВ

Показатель	Нормальная микрофлора влагалища	БВ
Преобладающая флора	<i>Lactobacillus spp.</i> – 90-95%	Полимикробная, в основном анаэробная микрофлора (<i>Bacteroides spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i>)
Степень колонизации	10 ⁷ КОЕ/мл	10 ⁹ -10 ¹¹ КОЕ/мл
рН	3,8-4,2	> 4,5
Отношение анаэробов к аэробам	2–5:1	100-1000:1
<i>Gardnerella vaginalis</i>	5-60%	> 90%
<i>Mobiluncus spp.</i>	0-5%	50-70%
<i>Mycoplasma hominis</i>	15-30%	65-75%

БВ регистрируется у 5-17% практически здоровых женщин и у 30-38% пациенток, предъявляющих жалобы на выделения из половых путей, посещающих женские консультации и специализированные клиники для лечения ИППП. БВ достоверно чаще встречается у женщин моложе 25 лет.

Микроорганизмы, ассоциирующиеся с БВ, могут вызывать воспалительные процессы в верхних отделах мочеполовой системы, в оболочках плода и амниотической жидкости при беременности и приводить к поздним выкидышам, преждевременным родам, гипотрофии плода, хориоамниониту [16]. БВ может приводить к инфекционным осложнениям после акушерских и гинекологических операций [17], в частности к послеоперационному тазовому целлюлиту, эндометриту [18], воспалительным заболеваниям органов малого таза (ВЗОМТ) [19-20].

Многие микроорганизмы, попадающие на слизистые оболочки урогенитального тракта, удаляются с током слизи, мочой, активностью мукоцилиарного эпителия, т. е. являются транзиторными [21]. Лишь те микробные виды, которые способны прикрепиться к клеткам эпителия и в этих условиях размножиться, составляют в своей совокупности микрофлору урогенитального тракта [22]. Если прикрепление и размножение микроорганизмов не сопровождается воспалительной реакцией, то такой процесс называется колонизацией, и, напротив, если при этом происходит повреждение тканей и возникает местное воспаление, то развивается инфекционный процесс [23].

Слизистые оболочки уретры и влагалища значительно отличаются по способности присоединять к своей поверхности микроорганизмы. Очень немногие клетки эпителия уретры несут на себе прикрепленные бактерии, но зато к отдельной клетке может прикрепиться множество бактерий. На слизистой оболочке влагалища много клеток, которые могут обеспечить прилипание бактерий.

Нормальная микрофлора играет существенную роль в защите от патогенных видов микроорганизмов. У мужчин уретра содержит мало видов бактерий - это *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus ssp.* (преимущественно зеленящие), *Corynebacterium ssp.*, *Ureaplasma urealyticum* в небольшом количестве.

Женская уретра обычно содержит больше микробных тел, как правило этих же комменсалов. Напротив, во влагалище женщин содержится огромное количество бактерий - 10^8 - 10^{10} бактериальных тел на один грамм жидкости. Хотя наличие *U. urealyticum* и *M. hominis* связано с половым путем передачи, их роль в этиологии вагинитов и цервицитов неопределенна, часто эти виды микоплазм встречаются у совершенно здоровых людей [24].

Нормальная вагинальная экосистема у женщин репродуктивного возраста включает аэробные и анаэробные виды бактерий, при этом количество идентифицированных видов анаэробов больше, чем аэробов [25] (табл. 3).

Таблица 3 – Нормальная экосистема у женщин репродуктивного возраста (Hiller S. L., 1993)

Факультативные анаэробы		Облигатные анаэробы	
Виды бактерий	Частота встречаемости в %, (кол-во, КОЕ/мл)	Виды бактерий	Частота встречаемости в %, (кол-во, КОЕ,мл)
<i>Lactobacillus sp.</i>	96 (10^7)	<i>Prevotella spp.</i>	61 ($10^{4,1}$)
H_2O_2 + <i>Lactobacillus</i>	61 ($10^{7,2}$)	<i>Porphyromonas saccharolyticus</i>	31 (10^3)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	46 ($10^{6,0}$)	<i>Bacteroides fragilis</i>	9 ($10^{3,5}$)
<i>Corynebacterium spp.</i>	72 ($10^{3,8}$)	<i>Bacteroides urealyticus</i>	36 ($10^{3,0}$)
<i>Bacillus sp.</i>	4 (-)	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8 ($10^{3,3}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (-)	<i>Mobiluncus spp.</i>	5 (-)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	89 ($10^{4,0}$)	<i>Lactobacillus spp.</i>	17 ($10^{5,2}$)
<i>Streptococcus viridans</i>	55 ($10^{4,7}$)	<i>Clostridium spp.</i>	7 (-)
<i>Enterococcus spp.</i>	39 ($10^{5,7}$)	<i>Actinomyces spp.</i>	6 ($10^{2,3}$)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	15 ($10^{4,2}$)	<i>Propionibacterium acnes</i>	22 ($10^{4,2}$)
<i>Escherichia coli</i>	17 ($10^{4,1}$)	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	32 ($10^{3,0}$)
<i>Mycoplasma hominis</i>	15 ($10^{3,5}$)	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>	21 ($10^{3,7}$)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	78 ($10^{5,0}$)	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1 (-)
<i>Candida albicans</i>	31 (-)	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	53 ($10^{4,2}$)
		<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	88 ($10^{4,0}$)
		<i>Peptostreptococcus niger</i>	20 ($10^{2,7}$)
		<i>Veilonella spp.</i>	14 ($10^{3,5}$)

Примечание: (-) - среднее число бактерий не подсчитывалось.

Нормальная микрофлора очень чувствительна к местным условиям и гормональным влияниям. Эстрогены способствуют депозиту гликогена, а гликоген - оптимальный субстрат для роста лактобацилл. Предполагают, что кислая среда, создаваемая за счет ферментации углеводов лактобациллами, способствует размножению кислотоустойчивых видов микроорганизмов и ограничивает рост других бактерий. Но лактобациллы продуцируют также ферменты и образуют перекись водорода [26], которые обладают антибиотическими свойствами [27]. Низкий уровень гликогена во влагалище во время менопаузы зависит не только от дефицита гликогена. Эстрогены, независимо от депозита гликогена, могут прямо влиять на численность и состав лактобацилл. Считается, что лактобациллы осуществляют антагонизм в отношении других бактерий за счет продукции молочной кислоты, перекиси водорода, лактоцидина, ацидофиллина, лактоцина В [28]. Среди защитных неспецифи-

ческих факторов в половых путях в первую очередь следует отметить слизь [29]. Она секретируется на поверхности слизистых оболочек и обеспечивает ряд функций, основной из которых является lubricация (смазывание). Семенная жидкость человека и цервикальный секрет содержат много слизи. Слизь во влагалище богата углеводами, которые связывают лиганды бактерий, препятствуя их адгезии к клеткам эпителия. В слизи содержатся лизоцим, лактоферрин, дефенсины - катионные антимикробные пептиды с широким спектром активности, а также цинк. Считается, что цинк в простате и ее секрете даже в низких концентрациях играет роль «простатического антибактериального фактора».

Микроэкология влагалища тесно связана с уровнем эстрогенов. У новорожденных детей в течение первых 5-6 дней сохраняется микрофлора влагалища матери. В препубертатном периоде во влагалище у девочек лактобациллы редки и их мало. Гарднереллы, *Prevotella bividus*, микоплазмы и дрожжеподобные грибы также встречаются редко. В репродуктивном периоде у 92% женщин влагалище колонизировано лактобациллами и у 46% - гарднереллами. У 78% женщин влагалище в норме колонизировано уреаплазмами, у 15% - *M. hominis* и у 31% - дрожжеподобными грибами рода *Candida*. Эти данные необходимо учитывать при лабораторной диагностике, не считая колонизацию этими микроорганизмами патологическим процессом. В постменопаузе, если не проводится замещающая терапия, снижается частота колонизации влагалища лактобациллами, гарднереллами, генитальными микоплазмами и превотеллами. Другие виды бактерий, по-видимому, не находятся под эстрогенным контролем (табл. 4) [25-30].

Особое значение имеют лактобациллы, продуцирующие перекись водорода, - это *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii*.

Имеет место изменение нормальной микрофлоры в течение менструального цикла. Дни, когда доминирует лактобациллярная флора, сменяются днями, когда преобладают *Gardnerella vaginalis* и *Bacteroides spp.* Вла-

галищная экосистема динамична, а такие состояния, как бактериальный вагиноз и кандидоз, проявляются перемежающимся образом.

Во время менструального кровотечения и после полового акта количество лактобацилл снижается. Это происходит вследствие влияния менструальной крови и семени, которые повышают pH среды и препятствуют адгезии бактериальных клеток на поверхность эпителия слизистых [30, 31].

Во время менструаций незначительно снижается количество лактобацилл и повышается количество анаэробных бактерий. После полового акта происходит нарастание количества *E. coli*, энтерококков и стрептококков группы В [32]. Эти виды бактерий колонизируют промежность, во время полового акта поступают во влагалище и выживают там из-за повышенного pH после coitus. Недавними исследованиями было выявлено наличие ранее неидентифицированных микроорганизмов, например, *Atopobium vaginae*, во влагалищном отделяемом женщин, больных БВ, отсутствующих в нормальном влагалищном секрете (Ferris, M; 2004; Fredriks D, 2005) [28-33].

Таблица 4 – Вагинальная микрофлора у девушек препубертатного возраста, женщин детородного возраста и женщин в постменопаузе (Hiller S.L., Lau R.Z., 1997)

Виды микроорганизмов	Частота встречаемости в %, (количество, КОЕ/мл)		
	Препубертатный возраст	Беременные	Постменопауза
Факультативные лактобациллы	11 (-)	92 ($10^{6,8}$)	49 ($10^{5,7}$)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	58 ($10^{6,4}$)	27 ($10^{5,3}$)
<i>Corynebacterium sp.</i>	42 ($10^{5,2}$)	78 ($10^{3,8}$)	58 ($10^{4,0}$)
Дрожжеподобные грибы	0	26 (-)	1 (-)
Колиформные	32 ($10^{5,3}$)	16 ($10^{3,7}$)	41 ($10^{4,8}$)
Анаэробные гр(+) палочки	89 ($10^{6,9}$)	90 ($10^{4,5}$)	89 ($10^{4,1}$)
<i>Prevotella bivia</i>	11 (-)	61 ($10^{4,3}$)	33 ($10^{3,8}$)
<i>Fusobacterium spp.</i>	26 ($10^{5,7}$)	12 ($10^{3,1}$)	7 (-)
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	89 ($10^{6,9}$)	92 ($10^{4,5}$)	88 ($10^{4,5}$)
<i>Staphylococcus spp.</i>	68 ($10^{5,8}$)	86 ($10^{4,3}$)	59 ($10^{3,1}$)
<i>Viridans streptococci</i>	42 ($10^{6,1}$)	59 ($10^{4,4}$)	77 ($10^{4,2}$)
Стрептококки группы В	0	16 ($10^{4,2}$)	23 ($10^{5,6}$)
<i>Enterococcus spp.</i>	32 (-)	33 ($10^{5,2}$)	38 ($10^{4,4}$)
<i>Mycoplasma hominis</i>	0	23 ($10^{4,3}$)	0
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	30 (-)	82 ($10^{5,0}$)	13 ($10^{4,6}$)
<i>Actinomyces spp.</i>	32 ($10^{6,8}$)	8 ($10^{2,3}$)	15 ($10^{5,1}$)

Примечание: (-) – среднее число бактерий не подсчитывалось.

Основными клиническими проявлениями бактериального вагиноза являются:

- наличие жидких, беловато-серых влагалищных выделений, количество которых обычно незначительно. При длительно текущем процессе выделения приобретают желтовато–зеленоватую окраску, становятся более густыми, пенистыми;
- наличие неприятного запаха выделений – запаха «тухлой рыбы», – который усиливается или появляется после полового контакта, а также во время менструации;
- дискомфорт, зуд, жжение, дизурия;
- диспареуния не характерна.

Длительность существования этих симптомов может исчисляться годами. Бессимптомное течение БВ встречается нередко – от 35-60% женщин. Они либо не отмечают выделений или каких-либо других субъективных симптомов, либо рассматривают их как норму или связывают с нарушением гигиены.

Кроме того, группы риска, где обследование на БВ является целесообразным:

- лица, занимающиеся коммерческим сексом
- лица моложе 25 лет, имеющие многочисленных половых партнеров.

Показания к обследованию на бактериальный вагиноз:

1. Слизисто-гнойные выделения из влагалища, сопровождающиеся неприятным запахом, субъективные расстройства в области половых органов.
2. Длительное и бесконтрольное применение антибиотиков.
3. Нарушения менструального цикла (преимущественно по типу олигоменореи или неполноценной лютеиновой фазы).
4. Эрозия, эктопия, лейкоплакия, эндоцервицит и эндометриоз шейки матки с частым рецидивированием патологического процесса после проведенной терапии.
5. Длительное использование внутриматочных контрацептивов.
6. Наличие в анамнезе указания на поздние выкидыши, преждевременные роды, инфекционные осложнения во время беременности.
7. Прерывание беременности.
8. Беременность. При этом беременные женщины обследуются трижды: при постановке на учет, при сроке 27-30 недель и при сроке 36-40 недель беременности. Вне указанных сроков обследование беременных женщин проводится по показаниям (появление выделений из половых путей, субъективные жалобы и т.д.);
9. В гинекологических стационарах обследуются все женщины, не обследованные до госпитализации; в родильных домах обследуются все роженицы без обменных карт, родильницы с осложненным течением послеродового периода, лучше на 5-6 день после родов, имеющие воспалительные заболевания половых органов (кольпит, аднексит, ВЗОМТ).

РОЛЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ БАРЬЕРОВ СЛИЗИСТЫХ МОЧЕ-ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ В РАЗВИТИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

Наличие репродуктивных осложнений (невынашивание беременности, бесплодие, антифосфолипидный синдром), рост заболеваний МПО, связанных с активизацией анаэробной микрофлоры, бактериального вагиноза (БВ) приводят к актуализации вопроса оценка локального иммунного статуса пациентов, подбора индивидуальной иммунотерапии и иммунореставрации [34, 35].

В период использования дерматовенерологами «Инструкции по лечению гонореи» (1986г.), «Инструкции по лечению и профилактике сифилиса» (2002г.) показаниями к применению иммунокорригирующих препаратов в лечении ИППП были: давность заболевания более 2 месяцев, первично торпидное течение заболевания, наличие осложнений у пациента, резистентность к антибактериальной терапии, рецидив заболевания. Основными тенденциями в лечении ИППП в период 1980-2010гг. были длительные курсы антибактериальной терапии (14-21 день), комбинации антибиотиков различных групп (макролиды-фторхинолоны, макролиды-тетрациклины, фторхинолоны-тетрациклины), применение иммунокорригирующих препаратов микробного происхождения (гоновакцина, пирогенал, продигиозан), полипрогмазия. Внедрение методов амплификации нуклеиновых кислот в практическое здравоохранение продемонстрировало, что для достижения микробиологического излечения пациентов достаточно более коротких курсов антибактериальной терапии. Снижение длительности антибактериальной терапии привело к внедрению в практику методик пульс-терапии и лечение неосложненных форм инфекций (гонорея, хламидиоз) одной дозой антибактериального препарата. Подобная клиническая стратегия в отношении возбудителей ИППП приводит к быстрой элиминации возбудителя, но не регрессу клинических симптомов заболевания.

Как правило, после завершения курсов антибактериальной терапии длительно сохраняются воспалительная лейкоцитарная реакция в отделяемом мочеполовых органов, поддерживается активность воспалительного процесса в очаге инфекции, болевой синдром, нарушение функции органов в виде снижения гормонообразующей и герминативной, жалобы со стороны пациентов. Проведение бактериологических исследований отделяемого МПО демонстрирует активизацию условно-патогенных возбудителей, анаэробной микрофлоры – бактероидов, пептококков, пептострептококков, фузобактерий, а также представители кишечной микрофлоры семейства *Enterobacteriaceae*. Подобные полимикробные процессы (микстинфекции) характеризуются тем, что этиологическим фактором выступает не какой-либо отдельно взятый микроб, а их ассоциация с присущими только ей биологическими свойствами [36].

Большое значение в поддержании противoinфекционного иммунитета на слизистых МПО отводится факторам неспецифической резистентности. Слизистые оболочки МПО служат физическими барьерами (эпителиальные клетки и муцины), имеют низкий pH среды, осуществляют фагоцитоз, обусловленный гранулоцитами или макрофагами, через механизм освобождения реактивных видов кислорода и протеаз, имеющих антимикробные свойства, а также других биологически активных веществ (лизоцим, трансферазы, комплемент, фибронектин, дефенсины). Система локальной иммунной защиты служит мощным препятствием инфицированию внутренних половых органов. Многослойный плоский эпителий слизистой оболочки влагалища преграждает путь инфекционным агентам в подлежащие ткани [37]. Помимо выполнения барьерной функции, многослойный плоский эпителий, контролирует микрофлору влагалища, продуцируя молочную кислоту, перекись водорода и ряд медиаторов врожденного иммунитета. Высокая активность в секретах слизистых оболочек комплемента и лизоцима способствует бактериолизу, препятствует цитoadгезии микроорганизмов к слизистой оболочке [38]. Катионные антимикробные полипептиды, включающие дефензины, яв-

ляются эффекторными молекулами врожденного иммунитета слизистых оболочек в защите от микробов и вирусов. Защитный врожденный ответ против патогенных микроорганизмов инициируется вагинальным эпителием с помощью toll-подобных рецепторов, которые распознают ассоциированные с микробами молекулярные паттерны [39]. Толл-подобные рецепторы (англ. Toll-like receptor, TLR; от нем. toll — замечательный) — класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ. Играют ключевую роль во врождённом иммунитете. Известно 13 толл-подобных рецепторов млекопитающих, обозначаемых аббревиатурами от *TLR1* до *TLR13*, которые связывают различные лиганды и продуцируются в организме различными типами клеток [40]. У человека существует 10 толл-подобных рецепторов (от *TLR1* до *TLR10*). TLR — это трансмембранные гликопротеины с внеклеточным фрагментом, представленным повторяющимися последовательностями с высоким содержанием лейцина. Эти рецепторы состоят из двух доменов. Внешний домен содержит варьирующее число богатых лейцином повторяющихся мотивов (LRR), которые обеспечивают прямое взаимодействие рецептора с компонентами микроорганизмов или их продуктами [41]. Внутренний домен TLR сходен с цитоплазматическим доменом рецептора ИЛ-1, в связи с этим его называют TIR-доменом (англ. Toll/interleukin-1 receptor domain). Этот домен участвует в трансдукции сигнала от активированного TLR внутрь клетки. Toll-подобные рецепторы - это эволюционно-консервативное семейство молекул, распознающих консервативные паттерны микробных структур. В этом качестве они абсолютно необходимы для определения стратегий защиты организма-хозяина от микробных патогенов. Кроме того, Toll-подобные рецепторы играют важную роль в поддержании тканевого гомеостаза, например, при заживлении поврежденных тканей [42]. В исследованиях последних лет было показано, что ряд веществ, используемых в фармакологии, способны активировать TLR-зависимые сигнальные пути, например, такие как имикимод (Hemmi, 2002), иммуномодуля-

тор применяемый для лечения поражений мочеполовых органов, вызванных ВПЧ инфекцией [43].

Нормальная микрофлора слабо иммуногенна для организма-хозяина из-за того, что клетки слизистых оболочек характеризуются низкой или поляризованной экспрессией toll-like рецепторов [38].

Система локальной гуморальной иммунной защиты, важным компонентом которой является секреторный IgA, продуцируемый клетками слизистой оболочки влагалища и шейки матки, служит мощным препятствием инфицированию внутренних половых органов. Антитела могут служить прямым препятствием прикреплению бактерий или вирусов к поверхности слизистой оболочки, активизировать каскад комплемента в уничтожении чувствительных микроорганизмов, усиливать поглощение или разрушение микробов фагоцитарными клетками. Присутствие секреторного IgA коррелирует с устойчивостью к инфицированию разными патогенами бактериальной, вирусной и грибковой природы.

Влагалищное содержимое состоит из жидкостного и клеточного компонентов, слизи, продуцируемой цервикальными железами, транссудата, десквамированного эпителия влагалища и матки, лейкоцитов и микроорганизмов. Процесс образования влагалищного содержимого относительно постоянен и количественно составляет от 0,7 до 4,5 мл/сут. Влагалищная жидкость содержит органические и неорганические вещества. Среди электролитов необходимо отметить ионы Na^+ , K^+ , Mg^+ и хлориды, их содержание оказывает регулирующее воздействие на транссудацию веществ через слизистую оболочку влагалища. Содержание Ca^{2+} и K^+ во влагалищной жидкости в 6 раз превышает этот показатель в плазме крови, уровень Na^+ и хлоридов составляет соответственно 46 и 61% от уровня в плазме. Концентрация ионов Mg^{2+} в физиологических условиях в 4 раза выше, чем в сыворотке крови. Большую роль в регуляции метаболизма играют микроэлементы – железо, медь, цинк, кобальт, которые занимают важное место в обеспечении полноценности процессов фертильности и овуляции, нормального течения беременности. Уста-

новлено влияние половых гормонов на обмен микроэлементов в организме женщины.

Процесс трансудации носит пассивный характер, при этом эпителий влагалища активно реабсорбирует ионы Na^+ и воду, вследствие чего и формируется трансвагинальная разница потенциалов – один из важнейших биофизических показателей влагалища, во многом определяющий гомеостаз влагалищной жидкости и состав ее микрофлоры. Среднее количество белка во влагалищной жидкости составляет 18 мг/л. При электрофоретическом разделении определяются альбумин, $\alpha 1$ -антитрипсин, $\alpha 2$ -гаптоглобин, $\alpha 2$ -макроглобулин, β -липопротеиды, орозомукоид, церулоплазмин, а также IgA, IgG, IgM, лактоферрин и трансферрин. Лактоферрин и трансферрин относятся к группе сидерофилинов, ограничивают доступность железа бактериям, прочно связывая этот микроэлемент, поэтому представляют собой самостоятельную систему естественного иммунитета. Железо, связанное с лактоферрином, может играть определенную роль в генерации активных форм кислорода ацидофильной микрофлорой влагалища. Особенно важно присутствие во влагалищной жидкости лактоферрина, поскольку этот белок сохраняет способность удерживать железо и в кислом диапазоне pH, характерном для влагалищной жидкости в норме [38-44].

Молочная, уксусная, а также летучие жирные кислоты с короткой углеродной цепочкой также являются важными составляющими содержимого влагалища. Они образуются из углеводов, попадающих во влагалищную жидкость из клеток эпителия. Лактобактерии ферментируют углеводы до алифатических жирных кислот, которые являются нормальной физиологической составляющей влагалищной жидкости и обеспечивают поддержание кислотности влагалищного содержимого. В норме pH соответствует кислому диапазону и находится в пределах 3,7–4,5.

При инфицировании мочеполовых органов развивается типичная воспалительная реакция, направленная на распознавание и уничтожение возбудителя и его компонентов. В- и Т-лимфоциты, осуществляющие адаптивный

иммунный ответ, распознают патогены, используя высокоаффинные рецепторы. Однако развитие адаптивного иммунитета обычно происходит достаточно медленно, так как предполагает активацию, пролиферацию лимфоцитов и синтез ими белков: цитокинов и иммуноглобулинов. На первом этапе инфицирования функционируют TLR, индуцирующие активацию и экспрессию специфических генов, экспрессия которых контролирует механизмы, обеспечивающие деструкцию внедряющихся патогенов. В результате активации через TLR возникает широкий спектр биологических реакций – от индукции синтеза провоспалительных цитокинов и интерферонов (обеспечивающих реализацию реакций врожденного иммунитета) до экспрессии коstimулирующих молекул, которые способствуют активации Т-лимфоцитов и стимулируют развитие адаптивного иммунного ответа [42-44].

Широкий спектр лигандов TLR и представленность этих рецепторов на многих клетках способствуют вовлечению TLR в патогенез многих заболеваний. Дефекты в системе TLR, такие как нарушения распознавания лигандов, экспрессии TLR, трансдукции сигнала, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR могут приводить к развитию тяжелых инфекционных заболеваний (сепсис, менингит), аутоиммунных заболеваний, атеросклероза, аллергопатологии. Дефекты молекул, участвующих в трансдукции сигнала от TLR, лежат в основе повышенной чувствительности к инфекциям. Так, дети с мутацией в гене, кодирующем IRAK-4-киназу, с раннего возраста страдают тяжелыми пиогенными инфекциями, вызванными грамположительными микроорганизмами. Изучение молекулярно-генетических основ защитных факторов слизистых оболочек является перспективным направлением медицинской науки [38-46].

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Диагностику БВ можно выполнить как методом нативной микроскопии, так и микроскопировать окрашенные препараты (A Vagoras, 2001; A Savicheva, 2001; Savicheva A, 2007; M Antonenko, 2007, Keane f, 2005). Диагностика проводится микроскопическим исследованием вагинальных мазков, окрашенных по Граму или метиленовым синим (Keane F, 2008; Vagoras A, Naaber P, Domeika). В то же время в Скандинавии микроскопия генитальных мазков, в частности вагинальных влажных препаратов, является прерогативой лечащего врача без вовлечения лаборатории или дополнительного персонала клиники (Schmidt H, 2001).

Прямая микроскопия нативных препаратов («влажных мазков»)

Целью микроскопического исследования нативных препаратов является определение наличия измененной микробной флоры, а также «ключевых клеток», увеличение количества не лактобацильной флоры и уменьшение или полное отсутствие лактобацилл [46]. Доказано, что уменьшение количества лактобацилл и наличие «ключевых клеток» свидетельствует в пользу БВ, и что этого достаточно для начала лечения БВ (A Hallen, 1987). С другой стороны, крайне важно помнить, что микроскопическое исследование нативных препаратов, будучи комплексным исследованием, используется не только для диагностики БВ, но и вагинита и инфекций, вызванных *T vaginalis* и *Candida*.

Лабораторная диагностика, основанная на микроскопии нативного препарата, широко используется в лабораториях, находящихся на одном и том же этаже с клиникой или рядом с ней [47, 48]. При микроскопии нативного препарата в диагностике инфекции, вызванной *T vaginalis*, очень важно соблюдать условия транспортировки. Если нативный препарат был получен в кабинете врача, то его можно подвергать воздушной сушке, транспортировать в лабораторию и исследовать после регидратации (Larsson PG, 1990).

Диагностика, основанная на критериях Amsel (Amsel, 1983).

R. Amsel и др. в 1983 г. предложили диагностировать БВ на основе следующих 4 критериев, при этом диагноз БВ правомочен при наличии минимум трех из перечисленных четырех признаков [49]:

1. ***Специфические вагинальные выделения***

При бактериальном вагинозе – жидкие и однородные.

2. ***pH вагинальных выделений выше 4.5***

Для определения уровня pH вагинальной жидкости используется универсальная индикаторная бумага с эталонной шкалой, позволяющая проводить измерения в пределах от 3.0 до 5.5.

Для измерения pH отделяемое либо наносится тампоном непосредственно на бумагу, либо полоска бумаги помещается в вагинальную жидкость, сохраняющуюся на браншах извлеченного из влагалища вагинального зеркала. Материалом для исследования может быть также смыв содержимого влагалища стерильным физиологическим раствором с нейтральным значением pH. Значение pH вагинального отделяемого при БВ превышает нормальные показатели (более 4,5), что определяется элиминацией лактофлоры или резким снижением ее содержания и уменьшением синтеза лактата. Следует учитывать возможность ложноположительных результатов pH-метрии при попадании в вагинальное отделяемое цервикальной слизи, крови, спермы, поскольку эти биологические жидкости имеют более высокую по сравнению с влагалищным секретом pH. Чувствительность и специфичность теста при БВ относительно невысоки (89 и 85% соответственно). Необходимо отметить, что pH при трихомонадной инфекции также выше.

3. ***«Аминовый» тест***

С целью обнаружения «рыбного» аминowego запаха капля влагалищной жидкости помещается на предметное стекло, затем к ней добавляют каплю 10% КОН. Появляющийся при этом запах оценивают немедленно после добавления щелочи, т.к. он быстро рассеивается.

Появление запаха обусловлено изменением состава органических

кислот в вагинальной жидкости и повышением уровня органических аминов (путресцина, кадаверина, триэтиламина и др.) в процессе реакции декарбоксилирования аминокислот анаэробными бактериями. Нелетучие соли этих соединений при щелочном значении pH превращаются в летучие амины, и «рыбный» запах становится ощутимым или усиливается. Вместе с тем *G.vaginalis*, с высокой частотой выделяемая при БВ, не продуцирует эти соединения. Поэтому в случаях полного доминирования *G.vaginalis* в составе вагинального микроценоза аминотест будет отрицательным. Чувствительность и специфичность этого диагностического теста равны 79 и 97% соответственно.

4. **Детекция «ключевых» клеток при микроскопическом исследовании**

«Ключевые» клетки – это отслоившиеся клетки эпителия влагалища, поверхность которых усеяна размножившимися бактериями, за счет чего клетка имеет «зернистый» вид. Края ключевых клеток выглядят нечеткими или «пунктирными» вследствие адгезии мелких палочек и кокков, в частности *Gardnerella*, *Mobiluncus* и других бактерий, и часто их невозможно различить. Международными исследованиями было выявлено, что количество «ключевых» клеток, обнаруживаемых под большим увеличением светового микроскопа ($\times 400$) в полях зрения, не влияет на результаты диагностики БВ (Forsum U, 2002). Результат считался положительным на наличие «ключевых» клеток, если в трех исследованных полях обнаруживалась хотя бы одна клетка (Schmidt, 2001).

Микроскопия окрашенных препаратов

Окраска метиленовым синим дает неспецифическое окрашивание в тот же цвет. Окраска по Граму позволяет дифференцировать розовые (грамотрицательные) и фиолетовые (грамположительные) элементы в мазке.

Таким образом, для диагностики БВ необходимо отмечать наличие/отсутствие:

- грамположительных лактобацилл в виде палочек различной длины и толщины;
- смешанной микробной флоры, включая «ключевые» клетки;
- увеличенного количества не лактобациллярной флоры.

Внимание! Mycoplasma hominis и Ureaplasma urealyticum, часто ассоциируемые с БВ, не обнаруживаются окрашиванием, идентифицируются культуральным способом или МАНК.

Диагностика, основанная на методе Spiegel [50]

Среди широко используемых методов, в частности в научных исследованиях, является метод Spiegel (Spiegel C, 1983), основанный на классификации бактериальной флоры в окрашенном по Граму мазке влагалищного отделяемого. Метод отражает как изменения в экологии влагалища, так и бактериальные ассоциации, и делит пациенток на больных БВ и без него.

Диагностика, основанная на критериях Nugent [51]

Для оценки грамположительных мазков Nugent R.P. и соавторами была предложена стандартная десятибалльная система (Nugent R, 1991). Эта система основана на определении трех бактериальных морфотипов: крупные грамположительные бактерии (лактобациллы), небольшие грамотрицательные или грамвариабельные бактерии (*G. vaginalis* и анаэробные бактерии) и изогнутые грамотрицательные или грамвариабельные бактерии (например, *Mobiluncus*). Метод Nugent позволяет определить изменения бактериальных морфотипов, проявляющиеся в исчезновении нормальных лактобацилл и доминировании *Gardnerella* и анаэробов, включая *Mobiluncus*. Недостатками методов Spiegel и Nugent являются трудоемкость и сложность применения в рутинной практике.

Диагностика по системе Ison-Hay (Ison C, 2002)

Предлагается пять вариантов влагалищной микрофлоры [52]:

- Уровень 0 - эпителиальные клетки без бактерий,

- Уровень I - нормальная вагинальная флора (морфологические типы лактобацилл),
- Уровень II - уменьшение количества лактобацилл, смешанная бактериальная флора,
- Уровень III - смешанная бактериальная флора, некоторое количество или полное отсутствие лактобацилл,
- Уровень IV - грамположительные кокки.

Уровни 0, I, и IV обнаруживаются у женщин, не болеющих БВ. Уровень II – промежуточный, не обнаруживается у женщин с БВ по критериям Amsel. Уровень III соответствует диагнозу БВ по критериям Amsel. То есть, только уровень III свидетельствует о БВ. Существует доказательство того, что бактериальная флора II уровня поддается лечению клиндамицином, который назначается внутрь, но не вагинально. Нет убедительных доказательств клинического значения уровней 0, II, и IV для популяции и их эффективности в лечении БВ.

Диагностика, основанная на критериях ВОЗ (ВОЗ, 2005) [53]

1. только лактобациллы – норма;
2. смешанная флора, в основном лактобациллы и несколько коротких палочек (коккобациллы) – рассматривается как вариант нормы;
3. наличие «ключевых» клеток, смешанной флоры, в основном *Gardnerella* и анаэробные бактерии, а также несколько лактобацилл – лечить БВ;
4. наличие «ключевых» клеток, смешанной флоры в виде грамположительных, грамотрицательных и грамвариабельных палочек, отсутствие лактобацилл – лечить БВ.

Характеризуя «классические» методы лабораторной диагностики БВ, можно заключить следующее:

1. Диагностика БВ возможна непосредственно с помощью микроскопии нативного препарата [54]. Диагностическими критериями являются: (а) полная или частичная замена лактобацилл смешанной кокковой и/или изогнутой палочковидной флорой; и (б) наличие «ключевых» клеток;
2. Образцы для лабораторного исследования транспортируются как высушенный нативный препарат. После окрашивания метиленовым синим или по Граму подвергаются исследованию, используя вышеперечисленные диагностические критерии;
3. Не рекомендуется использовать культуральную диагностику, а также методы определения антигена в диагностике БВ ввиду их слабой чувствительности и специфичности и непредвиденных материальных затрат.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

Получение материала для исследования

Приготовление микроскопического препарата-мазка – это нанесение на предметное стекло отделяемого с поверхности слизистой оболочки гениталий или уретры, а при необходимости и из экстрагенитальных полостей и локусов. В некоторых случаях материалом для микроскопического исследования служит соскоб, включающий не только выделения, но и часть клеток слизистой и более глубоких слоев. Микроскопическое исследование включает не только идентификацию эпителия, микроорганизмов и других морфологических объектов, но и оценку их количества и соотношения [55, 56].

Информативность микроскопического исследования зависит от физиологического состояния пациента на момент взятия образца.

Наиболее информативен материал, полученный при следующих условиях:

- Клинические образцы получены при наличии клинических признаков заболевания;
- Пациент не использовал местного лечения как минимум в течение последних 48-72 часов;
- Получение материалов из гениталий женщин желательно производить в середине менструального цикла (если заболевание не имеет явных клинических проявлений) или в дни, когда нет кровянистых выделений;
- У мужчин получение образцов из уретры необходимо проводить после задержки мочеиспускания в течение 3-4 часов;
- Пациент не должен принимать душ в течение 24 часов до взятия образцов.

Несоблюдение этих условий может значительно повлиять на качество мазков-препаратов и исказить интерпретацию результатов. Системная терапия антибактериальными препаратами также может значительно повлиять на

результат микроскопического исследования и снизить его диагностическую ценность.

Необходимо также учитывать следующие параметры:

- материал из уретры для микроскопического исследования берут раньше других уретральных образцов или сразу же после взятия выделений или соскобов для культурального исследования на гонококки;
- клинический материал для приготовления нативного (влажного) мазка из влагалища берут раньше других вагинальных образцов. Участок влагалища, с которого предстоит взять образец, выбирают, учитывая клиническую ситуацию. Обильные выделения и подозрение на трихомонадную или кандидозную инфекцию диктует взятие материала из заднего свода влагалища, поскольку там концентрация предполагаемого возбудителя инфекции наибольшая. При обычном количестве выделений образец следует брать с боковой стенки влагалища, т.к. этот материал более надежен для получения информации о состоянии влагалища на данный момент;
- образец из цервикального канала шейки матки для микроскопического исследования берут раньше других цервикальных образцов или непосредственно после взятия образца для культуральной диагностики гонореи;
- предметные стекла должны быть достаточно тонкими (стандартными), сухими, чистыми, не поцарапанными (оптимально применять новое стекло для каждого нового пациента);
- взятый клинический образец наносится тонким слоем на одну сторону предметного стекла так, чтобы получить тонкий мазок;
- при желании можно поместить материал из нескольких мест, взятых у одного пациента, на одно стекло, особенно если количественно взятого материала незначительное, и располагать мазки ближе к центру предметного стекла для удобства микроскопии;

- солевой раствор для приготовления нативного (влажного) препарата должен быть теплым (оптимально 37⁰С). При этой температуре подвижность трихомонад лучше сохраняется во время микроскопии.

Инструменты, которыми лучше всего брать клинический материал – это пластиковые бактериологические петли разного объема и ватные или дакроновые тампоны, предпочтительно дакроновые. Для приготовления нативного препарата всегда берется одно стекло, готовится препарат по способу так называемой раздавленной капли. Материал, взятый бактериологической петлей, наносится штрихами на предметное стекло. Если материал взят дакроновым\ватным тампоном, тампон прокатывается по стеклу для нанесения материала. Все взятые у пациентов материалы и приготовленные из них мазки для направления их в лабораторию должны быть высушены на воздухе, промаркированы и, если это необходимо, зафиксированы.

Получение материала для микроскопии нативных препаратов

У женщин для микроскопии влажных (нативных) препаратов используют выделения из влагалища, у мужчин влажные препараты готовят при наличии обильных выделений из уретры. Если выделений нет, то влажный препарат готовят из смыва уретры.

Вагинальный образец для приготовления влажного препарата берут в зеркалах бактериологической петлей объемом 10 мкл с определенного участка слизистой оболочки влагалища (задний или боковой свод). Материал из уретры берут бактериологической пластиковой петлей объемом 1 мкл. Из препуциального мешка материал берут ватным\дакроновым тампоном.

На предметное стекло наносят каплю теплого физиологического раствора (оптимально 37⁰С). Вагинальные или уретральные выделения перемешивают с каплей физиологического раствора, накрывают покровным стеклом (метод раздавленной капли) и сразу просматривают в световом микроскопе. Если нет условий для микроскопии в кабинете врача, выделения помещают в пробирку с теплым физиологическим раствором (1-2 мл). Пробирку немед-

ленно направляют в лабораторию, где готовят нативный препарат и производят микроскопическое исследование.

Получение материала для микроскопии окрашенных препаратов

Получение клинического материала у мужчин

Образец из уретры для окрашивания по методу Грама или метиленовым синим берут с помощью пластиковой бактериологической петли объемом 1 мкл. При наличии выделений из уретры поверхность головки полового члена и область наружного отверстия уретры следует очистить от выделений с помощью марлевого тампона и отвести крайнюю плоть назад для предотвращения загрязнения. Если нет выделений из уретры, следует попросить пациента скользящими движениями помассировать уретру легкими движениями от основания полового члена к головке. Для взятия материала может быть использован дакроновый\ватный тампон. При взятии материала из уретры пластиковой бактериологической петлей петля вводится в уретру на 1-2 см, плоскость «глазка» петли следует продвигать к отверстию, слегка нажимая петлей на стенку уретры. Вращение петли во время взятия материала ощущается пациентом болезненно, и поэтому не рекомендуется применять его. Петля с взятым материалом накладывается на предметное стекло, с легким нажатием передвигается по стеклу так, чтобы на стекле осталась тонкая полоска клинического материала.

Образец из препуциального мешка берут ватным\дакроновым тампоном.

Получение клинического материала у женщин

Из уретры образец для окрашивания по Граму или метиленовым синим берут с помощью пластиковой бактериологической петли объемом 1 мкл. При большом количестве выделений наружное отверстие уретры следует очистить марлевым тампоном. Если нет свободных выделений из уретры, врач проводит легкий массаж уретры. Пластиковую петлю объемом 1 мкл вводят на глубину 1-2 см, плоскость «глазка» петли нужно, прижимая к стен-

ке уретры, продвигать к отверстию, захватывая заднюю и боковые стенки уретры. Не рекомендуется вращать петлю во время этой процедуры. Клинический материал наносится на предметное стекло. Петля передвигается по нему несколько раз с легким нажимом и оставляет на стекле тонкую полоску клинического материала.

Клинический образец из шеечного канала матки берут в зеркалах. Для взятия материала используют ватный\дакроновый тампон, специальную щеточку или ложечку. Наружное отверстие цервикального канала необходимо тщательно очистить от вагинальных выделений с помощью большого ватного или марлевого тампона. Это необходимо, чтобы предотвратить возможную контаминацию. Введенный в цервикальный канал тампон (на глубину 1-2 см) несколько раз поворачивают. Клинический материал с тампона переносят на предметное стекло и готовят тонкий мазок.

Для микроскопического исследования окрашенных вагинальных мазков материал в зеркалах берут из заднего и с боковых сводов влагалища бактериологической петлей объемом 10 мкл и наносят тонким слоем на предметное стекло.

Транспортировка материала

Клинический материал из очага инфекции переносится на два чистых сухих обезжиренных стекла, мягким движением, не втирая, распределяется по поверхности предметного стекла тем инструментом, которым материал был получен. Далее предметные стекла с нанесенным материалом надлежит высушить при комнатной температуре так, чтобы они не соприкасались одно с другим. Маркировка стекол производится стойкими маркерами с указанием анатомического места, из которого взят клинический материал. Каждое стекло помещают в герметически закрытый контейнер для транспортировки. В направлении указывается фамилия пациента, № истории болезни, дата взятия материала, желаемый метод исследования, и стекла транспортируются в лабораторию.

Если возникает необходимость хранить взятый материал более 24 часов, после высушивания каждое стекло с образцами фиксируют 96% этиловым спиртом в течение 3 мин. Фиксация в пламени горелки нежелательна, т.к. изменяется картина, и результат микроскопии может стать искаженным. В этом случае обязательно в направлении в лабораторию следует указать, что препарат был зафиксирован.

Клинический материал для проведения прямой микроскопии нативных препаратов необходимо срочно (в течение нескольких минут после взятия) доставить в лабораторию при соблюдении температурных условий (30 – 37 С). Желательно при достаточном опыте провести прямую микроскопию на приеме самому врачу.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП

Методы окрашивания

Окраска водным раствором метиленового синего

Процедура окрашивания

1. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют погружением на 3 мин в 96% этиловый спирт.
2. Фиксированный препарат высушивают, затем на него наносят 1% водный раствор метиленового синего на 1 —10 мин (в зависимости от материала).
3. Оставшийся краситель тщательно смывают струей холодной воды, высушивают.

Окраска метиленовым синим по Леффлеру

Процедура окрашивания

1. Препарат высушивают на воздухе
2. Высушенный препарат опускают в стакан с 1% метиленовым синим по Леффлеру на 1-2 мин.
3. Промывают погружением в другой стакан с водопроводной водой.

4. Высушивают на воздухе

Препараты просматривают с использованием светового микроскопа (окуляры x7 или x10, объективы x10, x40, а также x100). Мазок на стекле окрашивается в синий цвет. Ядра клеток окрашены в синий цвет, цитоплазма — в голубой цвет разной интенсивности. Бактериальная микрофлора окрашивается в синий цвет разной интенсивности.

Окраска по методу Грама

Окраска по методу Грама, кроме выявления морфологии бактерий, разделяет их на две группы. Бактерии в зависимости от химического строения клеточной стенки обладают способностью удерживать или не удерживать краситель кристаллический фиолетовый, т.е. обесцвечиваться или не обесцвечиваться спиртом. По результатам окрашивания одни бактерии выглядят при микроскопии темно фиолетовыми (грамположительные бактерии), другие – бледно розовыми (грамотрицательные бактерии).

Некоторые виды бактерий невозможно дифференцировать по окраске по методу Грама, например, не имеющие клеточной стенки микоплазмы, имеющие очень мелкий размер клеток хламидии и бактерии, требующие особых методов окраски (например, микобактерии). Ряд бактерий, особенно при приготовлении микроскопических препаратов из старых культур на агаре, могут окрашиваться грамвариабильно.

Процедура окрашивания.

1. Препарат высушивают, фиксируют над пламенем спиртовки несколько секунд. На фиксированный мазок наливают 1% водный раствор кристаллического (или генцианового) фиолетового на 1 мин.
2. Препарат промывают водопроводной водой.
3. На стекло наливают раствор Люголя примерно на 30 сек.
4. Препарат промывают струей водопроводной воды.
5. Мазок обесцвечивают 96% спиртом до тех пор, пока наиболее тонкие участки препарата не станут бледно-серыми, а стекающая с препарата жидкость не станет бесцветной, что занимает, примерно, 12-20 сек. в за-

висимости от плотности мазка. Следует избегать излишнего обесцвечивания, так как это может повлиять на дифференциацию бактерий по цвету.

6. Препарат снова промывают водой.
7. Дополнительно окрашивают препарат 1% раствором нейтрального красного (или сафранина) в течение 3 мин.
8. Краситель сливают со стекла, препарат промывают проточной водой, высушивают на воздухе или снимают влагу фильтровальной бумагой.

Микроскопию начинают с малого увеличения (объектив $\times 10$), затем переходят на большое увеличение (объектив $\times 40$), далее используют иммерсионный объектив (объектив $\times 100$ иммерсионный), окуляры $\times 7$ или $\times 10$. При правильной окраске по Граму клетки крови - нейтрофилы, мононуклеары, эпителий и другие клетки окрашиваются как грамотрицательные бактерии. Грамположительные микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый и красный. При правильной окраске по Граму препарат оранжево-красного цвета на тонких участках, лилово-фиолетового – на толстых. Высокое качество окраски по Граму обеспечивается своевременным прекращением обесцвечивания мазков. При недообесцвечивании грамотрицательные бактерии могут сохранять фиолетовую окраску, а в переобесцвеченных мазках грамположительные микробы могут быть окрашены в оранжево-красный цвет.

Методика микроскопии в проходящем свете

Метод светлого поля является основным при исследовании объекта в проходящем свете. Для этого метода необходимо иметь микроскоп проходящего света, объективы светлого поля ($\times 4$, $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$), конденсор, осветитель. Световой поток от осветителя направляется в конденсор и линзами конденсора пучок света от источника света направляется на плоскость препарата. Конденсор создает световой конус, обеспечивающий заполнение све-

том входное отверстие (апертуру) объектива. Устройство микроскопа и уход за ним приведены в приложении 1.

Порядок работы:

1. Установить стекло с препаратом на предметный столик микроскопа и зафиксировать клеммами его положение.
2. Поворотом объективного револьвера установить объектив $\times 4$ или $\times 10$.
3. Макрометрическим и микрометрическим винтами, глядя в окуляр микроскопа, получить изображение объекта.
4. Раскрыть апертурную диафрагму конденсора.
5. Поднять конденсор до положения наибольшей яркости освещения в плоскости объекта. Далее яркость света и освещенности препарата регулировать только диафрагмой.

Целью микроскопического исследования является идентификация микроорганизмов и подсчет клеток. Для этого просмотр препарата проводится при различных увеличениях микроскопа с использованием объективов разной мощности. Просмотр объекта начинается с маломощного увеличения с переходом к высокому. При этом переходе происходит сужение видимой части мазка. При увеличении $\times 4$ можно видеть сотни клеток в поле зрения, но невозможно различить ни одного микроорганизма, их размер лежит за пределами разрешающей способности объектива малого увеличения. При увеличении $\times 100$ видны только несколько клеток, но сотни микроорганизмов. Каждое последующее увеличение микроскопа позволяет определить различные мелкие детали и в то же время исчезают окружающие предметы. Информация, поступающая при каждом увеличении микроскопа, должна удерживаться в памяти микроскописта и создавать в его воображении весь препарат во всех его деталях. Можно представить себе процесс микроскопической оценки, поделенный на несколько уровней в зависимости от разного увеличения микроскопа. На каждом уровне могут быть сделаны некоторые заключения об объектах, которые можно четко видеть, и некоторые предположения об объектах, которые видны неотчетливо. Каждое следующее увеличе-

ние (уровень) подтверждает или опровергает предположение, возникшее при использовании предыдущего увеличения. Это позволяет перейти от предположения к заключению.

Проведение микроскопического исследования

Последовательность микроскопического исследования мазков может быть избрана самим исследователем. Обычно микроскопию начинают с нативного (влажного) препарата, но можно начинать и с окрашенного мазка, дожидаясь, пока движение жидкости в раздавленной капле под покровным стеклом не прекратится [57]. Выбранный порядок микроскопии должен быть наиболее удобен для получения информации о пациенте.

- ✓ Для исследования влажного препарата нужно поместить предметное стекло на столик микроскопа покровным стеклом вверх. Движением ирисовой диафрагмы конденсора выбрать открытие диафрагмы, позволяющее полностью провести микроскопию влажного препарата. Если микроскоп не оснащен диафрагмой конденсора, подобного эффекта можно достичь опусканием конденсора. После завершения микроскопии влажного препарата диафрагму надо открыть.
- ✓ Выбор объектива. Микроскопию следует начинать с наименьшего увеличения. Ошибка начинающих – приступать к микроскопии не при малом увеличении или пользоваться малым и средним увеличением лишь в течение короткого времени, что приводит к потере важной информации. Наибольшая часть всей информации поступает при самом малом увеличении, большое увеличение фактически только подтверждает то, что было очевидно при малом увеличении. Влажный влагалищный препарат покрывает большую поверхность предметного стекла по сравнению с уретральным или цервикальным препаратами, так что удобно начинать с микроскопии влажного влагалищного препарата, применяя малое увеличение (объектив x4). Если микроскоп не имеет этого объектива, нужно применить объектив x10. Уретральный

и цервикальный влажные препараты занимают обычно меньшую поверхность стекла, поэтому можно начинать их микроскопию с объектива $\times 10$.

- ✓ Под контролем глаза устанавливают наименьшее расстояние между предметным стеклом и объективом с помощью макрометрического винта. Затем, глядя в окуляр микроскопа, вращают этот винт в обратном направлении, наблюдают за появлением изображения и настраивают до получения четкого изображения.
- ✓ Настройка силы света. При микроскопии влажного препарата можно повысить резкость изображения, настраивая силу света. Этого можно достигнуть изменением апертуры диафрагмы. Изменять силу света удобно и при смене объективов во время просмотра мазков, окрашенных метиленовым синим. Маломощный объектив имеет большую апертуру, поэтому достаточно подавать меньше света, и наоборот, для получения изображения высокомоощным объективом требуется больше света.
- ✓ Сканирование, т.е. последовательный просмотр всего влажного препарата, проводится с применением объектива $\times 4$. При просмотре обнаруживаются места с равномерным и неравномерным распределением клинического материала, встречаются места с разной плотностью из-за скопления клеток. При отсутствии таких скоплений и равномерном распределении всех микроскопических объектов можно перейти к следующему увеличению микроскопа путем смены объектива. При большой плотности объекта или при скоплениях клеток следует подвинуть край скопления к центру поля зрения и затем изменить увеличение. Этот участок будет виден более отчетливо. При этом надо помнить, что более высокое увеличение сокращает поле зрения по сравнению с предыдущим увеличением и увеличивает видимость центральной части препарата. Область препарата, которую хотелось бы рассмотреть, а она не появляется в поле зрения при большом увеличении, можно вернуть в центр поля зрения при малом увеличении и затем сменить объектив.

- ✓ Применяя объектив x10, следует изучить, по крайней мере, 10 полей зрения. При этом увеличении можно идентифицировать клетки эпителия и полиморфноядерные лейкоциты.
- ✓ Весь клинический материал из одной анатомической области должен вначале рассматриваться при малом увеличении.
- ✓ При замене объектива нет необходимости пользоваться макрометрическим винтом.
- ✓ Помните, что применение иммерсионного масла необходимо только для объективов x90 или x100. При переходе от масляной иммерсии к более низкому увеличению необходимо опустить предметный столик для предохранения других объективов от загрязнения маслом.

Оценка данных микроскопического исследования

Оценка данных микроскопического исследования должна состоять из описательной части, в которой исследователь качественно и количественно описывает микроскопическую картину препарата, и заключения, в котором содержится краткий вывод об обнаруженных диагностически значимых микроорганизмах и/или об изменениях морфологии клеток эпителия [58].

При проведении микроскопического исследования необходимо обратить внимание на морфологию объектов, попадающих в поле зрения. Это могут быть:

- Эпителиальные клетки – поверхностные клетки слизистой оболочки. В зависимости от анатомического положения они отличаются по виду и по размеру. Наиболее многочисленные поверхностные клетки вагинального эпителия – это относительно крупные клетки полигональной формы с центрально расположенным овальным ядром. Соотношение ядра и цитоплазмы составляет приблизительно 1:15 – 1:25. Эндоцервикс покрыт цилиндрическими эпителиальными клетками. Они имеют форму цилиндра (больше по длине, чем по ширине), по размеру они меньше, чем поверхностные сквамозные клетки эпителия влагалища. Соотношение ядра и цитоплазмы у этих клеток состав-

ляет от 1:3 до 1:5. При микроскопии чаще всего можно видеть не цельную клетку, а только овальные равномерно окрашенные ядра. Окруженные цервикальной слизью эпителиальные клетки уретры по величине и форме занимают промежуточное положение между крупными сквамозными поверхностными клетками влагалища и более мелкими цилиндрическими клетками шейки матки. Они выглядят почти круглыми в поверхностных слоях эпителия слизистой оболочки и удлиненными – в более глубоких слоях.

- Сегментоядерные лейкоциты (полиморфноядерные) – клетки крови. Они часто обнаруживаются в мазках из генитального тракта и по размеру равны ядрам поверхностных эпителиальных клеток влагалища. Во влажном препарате они выглядят круглыми, а цервикальной слизи они выглядят вытянутыми. Сегментированные ядра внутри этих клеток можно разглядеть во влажном препарате при увеличении $\times 400$ и при $\times 1000$ как во влажном препарате, так и в окрашенном метиленовым синим.
- Простейшие, нахождение которых возможно в этой анатомической локализации, - это главным образом *Trichomonas vaginalis* – подвижный микроорганизм, по размеру почти равный ядру сквамозного эпителия., иногда несколько больше. Трихомонады проявляют характерные конвульсивные движения, поскольку они имеют 4 жгутика, расположенные на переднем крае тела простейшего. Их тела можно рассмотреть при увеличении $\times 100$. В препарате, окрашенном метиленовым синим, при увеличении $\times 1000$ можно рассмотреть характерную форму трихомонад, эксцентрично расположенное ядро, вакуолизированную цитоплазму, жгутики и аксостиль.
- Дрожжеподобные грибы, представленные в основном *Candida ssp.* Зачатки (почки) - это споры на стадии начала размножения. На овальной клетке гриба имеется еще маленький овал на одном из ее полюсов. Во влагалище дрожжи размножаются бесполым путем, формируя почки (зачатки). Почки продолжают формироваться, удлиняться, не отделяясь одна от другой. Образуются нити разной длины, они называются псевдогифами и образуют псев-

домицелий. При окраске препаратов метиленовым синим или по Граму хорошо виден псевдомицелий и дрожжевые клетки при увеличении $\times 1000$.

- Сперматозоиды – мужские половые клетки, которые могут содержаться в вагинальном или цервикальном препаратах, а также в уретральном мазке мужчин. Они состоят из маленькой головки, размером, равным одному сегменту полиморфноядерного лейкоцита, и из длинного хвоста. Эти детали строения сперматозоида хорошо видны как в нативных препаратах при увеличении $\times 400$, так и в окрашенных по Граму препаратах ($\times 1000$).
- Слизь постоянно обнаруживается в препаратах из урогениталий. Она представляет собой оптически аморфное образование, образующее фон в цервикальном мазке. Во влажном препарате слизь видна как некая масса, образующая тяжи.
- Микрофлора представляет собой самые мелкие объекты, определяемые с помощью прямой микроскопии. Клетки бактерий имеют круглую (кокки) либо палочковидную форму (палочки, бациллы). *Lactobacillus ssp.* – молочнокислые бактерии являются самыми распространенными обитателями влагалища здоровых женщин. Микроскопически они выглядят как относительно крупные палочки с тупыми концами. В мазках, окрашенных метиленовым синим, они интенсивно синего цвета, по Граму они, являясь грамположительными, окрашиваются в фиолетовый цвет. Некоторые виды лактобацилл выглядят как короткие и толстые палочки.
- Другие часто встречающиеся формы микроорганизмов наблюдаются при бактериальном вагинозе. В препарате они присутствуют в огромном количестве и выглядят как относительно мелкие палочки, которые уместно назвать кокковой флорой. В окрашенных препаратах они выглядят как нечто промежуточное между кокками и палочками. Наиболее серьезными патологическими агентами, которые можно видеть в препаратах из генитального тракта, являются внутриклеточные диплококки гонококки. Они имеют типичную морфологию (форма боба) и расположены внутри или в тесной связи с полиморфноядерными лейкоцитами. Если обнаруживаются только внеклеточные

диплококки или морфологически атипичные внутриклеточные диплококки отнесение их к гонококкам сомнительно.

- Иногда во влажных препаратах могут быть видны липиды – компоненты различных интравагинальных средств - и волокна ваты. Липиды имеют вид округлых бесструктурных объектов разных размеров, обычно они многочисленны. Ворсины ваты неопытный исследователь может принять за псевдогифы дрожжеподобных грибов, но они значительно больше и никогда не имеют ни перегородок, ни почек.

МИКРОСКОПИЯ НАТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

При микроскопии нативных препаратов оценивается наличие и форма эпителиальных клеток, наличие и количество полиморфноядерных лейкоцитов, «ключевых клеток», наличие лактобацилл и других микроорганизмов, псевдомицелия дрожжеподобных грибов, а также трихомонад с их характерной подвижностью.

Путем прямой микроскопии влажного (нативного) препарата могут быть идентифицированы следующие морфологические структуры:

- Клетки вагинального эпителия;
- Сегментоядерные или полиморфноядерные лейкоциты;
- Псевдомицелий и/или бластоспоры дрожжеподобных грибов;
- Трихомонады;
- «Ключевые» клетки;
- Морфотипы лактобацилл - *Lactobacillus ssp* представлены несколькими видами, каждый из которых может быть идентифицирован бактериологическими методами;
- Слизь;
- Мелкая кокковая флора;
- Относительно редко в препарате могут быть выявлены сперматозоиды;
- Капельки липидов;
- Эритроциты;
- Волокна (обычно ваты).

Микроскопия нативных препаратов при малом увеличении x100

Микроскопию влажного препарата проводят вначале при закрытой диафрагме конденсора. Последовательно просматривают образец, пользуясь объективом x10, а если микроскоп имеет объектив x4, то выгодно начать сканирование с этого увеличения. Устанавливают расстояние между объек-

том и объективом и силу света для получения четкого изображения просмотром всего препарата находят участки, где клинический материал распределен равномерно, образуя тонкий слой. При этом увеличении обычно можно видеть клетки плоского эпителия, скопления слизи, могут встречаться большие скопления мицелия. Следует выбрать места, которые необходимо просмотреть при большем увеличении: периферические участки некоторых скоплений, тонкий слой эпителия влагалища и другие, интересные для микроскописта участки нативного препарата

Пользуясь объективом $\times 10$, следует оценить морфологические компоненты в скоплениях. Обычно встречается несколько комбинаций:

1. слизь, инфильтрированная мелкими клетками, не относящимися к вагинальному эпителию;
2. клетки вагинального эпителия, расположенные очень тесно и наслаившиеся друг на друга;
3. большие скопления псевдомицелия дрожжевых грибов, окруженные клетками эпителия и инфильтрированные мелкими клетками.

Могут быть и другие комбинации. Основной целью рассмотрения скоплений является определение наличия или отсутствия мицелия. Далее при малом увеличении определяют соотношение полиморфноядерных лейкоцитов и клеток вагинального эпителия, а также форму клеток вагинального эпителия и четкость очертания их клеточных стенок. Для этого выбирают участок препарата, где клетки эпителия распределены равномерно и где между клетками эпителия имеется некоторое пустое пространство. Иногда можно видеть потоки жидкости между эпителиальными клетками. Это циркуляция воды под покровным стеклом. В этом потоке видны мелкие объекты, имеющие определенную морфологию. Оценивая соотношение клеток эпителия и лейкоцитов при малом увеличении, нужно допустить, что мелкие клетки (равные по величине ядру эпителиальной клетки) – это лейкоциты. Их можно идентифицировать только при большом ($\times 400$) увеличении. Но малое увеличение ($\times 100$) позволяет видеть большую часть препарата и дает воз-

возможность составить представление более близкое к реальности. При большом увеличении мелкие клетки оказываются полиморфноядерными лейкоцитами, а некоторые из этих мелких клеток могут быть определены как эритроциты и другие клетки крови. Они также могут оказаться бластоспорами дрожжеподобных грибов. Но в большинстве случаев в картине вагинального мазка все-таки доминируют лейкоциты.

Не существует определенной нормы содержания лейкоцитов в вагинальном мазке. Трудно установить точное количество лейкоцитов, которое определило бы патологию. Количество лейкоцитов в большой степени зависит от индивидуальных особенностей организма, дня менструального цикла, (количество лейкоцитов повышено в середине менструального цикла), наличия воспаления в цервикальном канале шейки матки или в верхнем отделе генитального тракта. В случае цервицита лейкоциты из цервикального канала попадают в вагинальное содержимое и создают повышенное количество лейкоцитов в вагинальной полости. Содержание лейкоцитов в вагине зависит также от половой активности. Поэтому более информативным является определение соотношения лейкоцитов и клеток вагинального эпителия. У большинства здоровых женщин это соотношение меньше, чем 1:1, т.е. в препарате лейкоцитов меньше, чем клеток плоского эпителия. Это означает, что если в препарате лейкоцитов меньше, чем клеток плоского эпителия при отсутствии клинических признаков заболевания, то можно сделать вывод о нормальном состоянии вагинальной слизистой оболочки. В нативном препарате участки аморфной массы слизи, значительно инфильтрированной лейкоцитами, не годятся для подсчета этого соотношения. Такие скопления обычно не коррелируют с текущим инфекционным процессом во влагалище или в цервикальном канале матки. Это соотношение должно оцениваться на участке, где лейкоциты равномерно распределены между эпителиальными клетками. Все же значение этого соотношения не следует переоценивать. Нет смысла применять строгую математическую формулу к такой тонкой и живой физиологической/экологической системе, какой является поверхностный

слой эпителия, выстилающего влагалище. Взятие исследуемого клинического материала может случайно совпасть с самым началом или концом какого-нибудь патологического процесса или с влиянием некоего химического или физического фактора, что практически невозможно учесть.

Попытки обнаружить в препарате патогенный агент при соотношении лейкоцитов и эпителиальных клеток 2:1 или 3:1, т.е. больше, чем 1:1 довольно реальны. Существует несколько причин изменения этого соотношения. В первую очередь это инфекция, вызванная *Candida ssp* /или *Trichomonas vaginalis* и во вторую очередь это воспаление цервикального канала и\или придатков матки.

Урогенитальный кандидоз и трихомоноз при исследовании влажного препарата имеют прямые и косвенные микроскопические признаки. Точно также воспалительный процесс в цервикальном канале шейки матки и\или в придатках матки имеет специфические признаки, как при клиническом обследовании пациентки, так и при исследовании цервикальных мазков.

Косвенным признаком воспалительного процесса в вагинальном эпителии служит появление круглых клеток вагинального эпителия с измененным соотношением ядра и цитоплазмы. Обычно поверхностные эпителиальные клетки влагалища имеют соотношение ядра и цитоплазмы 1:15 - 1:25 (может быть и другое) и полигональные очертания. При развитии воспаления на слизистой влагалища наблюдаются клетки округлой формы с соотношением ядра и цитоплазмы 1:3 – 1:5 и даже меньше, Это не видоизмененные поверхностные клетки вагинального эпителия. Это клетки из базальных\парабазальных слоев эпителия, которые морфологически не полностью созрели. Они появляются в выделениях из влагалища из-за усиленного сосущивания из воспаленной слизистой оболочки.

Клетки базального и парабазального слоев более часто встречаются во влажном препарате при инфекции, вызванной *Trichomonas vaginalis*.

Прямой признак этой инфекции – обнаружение этиологического агента, т.е. *Trichomonas vaginalis*. В нативном препарате обнаруживаются по-

движные клетки простейшего, размер которых приблизительно равен размеру ядра эпителиальной клетки, иногда немного больше. Отмечается характерная подвижность трихомонад между эпителиальными клетками с характерными неустойчивыми судорожными движениями за счет четырех расположенных на переднем полюсе жгутиков. Чтобы не перепутать эти активные движения с пассивным движением других мелких клеток во влажном препарате, которые движутся по инерции в потоке воды под покровным стеклом, следует обратить внимание на то, что пассивное движение равномерно (как лист по реке).

При инфекции, вызванной дрожжеподобными грибами (*Candida ssp.*), можно видеть псевдомицелий и/или бластоспоры. В вагинальной среде дрожжеподобные грибы размножаются бесполым путем, образуя почки (бластоконидии). Продолжая формироваться, почки удлиняются и, не отделяясь друг от друга, образуют нити различной протяженности и формируют псевдомицелий. Нити псевдомицелия имеют одинаковую толщину по всей протяженности, они могут закручиваться и переплетаться.

При рассмотрении препарата при малом увеличении должна учитываться еще одна деталь. Следует определить очертания клеток вагинального эпителия. При нарушении равновесия в микроэкологии влагалища доминирующие лактобациллы замещаются мелкой кокковой флорой, клетки вагинального эпителия выглядят покрытыми большим количеством этих микроорганизмов. Такое покрытие скрывает очертания клетки, образуются так называемые «ключевые» клетки.

Применение объектива $\times 10$ не обеспечивает четкого изображения морфологических деталей, и большая часть микроскопической оценки носит скорее характер предположения, нежели заключения. И если при следующем увеличении не подтвердится сделанное предположение, то следует вернуться к предыдущему увеличению, чтобы сделать другое предположение.

Микроскопия нативных препаратов при большом увеличении x400

Применяя объектив x40 при изучении влажного препарата можно сделать окончательные выводы. При этом увеличении видны мелкие палочки и\или кокки, которые являются представителями вагинальной микрофлоры. Они могут выглядеть подвижными во влажном препарате, но это не их собственная подвижность, иллюзия подвижности бактерий возникает из-за хаотически движущихся молекул воды, которые сталкиваются с микроорганизмами (броуновское движение). Микроорганизмы при этом колеблются с малой амплитудой, медленно и монотонно. Пользуясь микрометрическим винтом, можно при этом увеличении увидеть ядра мелких клеток, явно не являющихся эпителиальными. Большинство из них имеют полисегментированные ядра, что дает основание идентифицировать их как полиморфноядерные лейкоциты. Другие клетки, которые могут быть видны в небольшом количестве и не столь часто, - это эритроциты. Настраивая фокус микрометрическим винтом, можно увидеть углубление в центре такой клетки. При гемолизе эритроцитов на поверхности клетки образуются маленькие выступы.

Окончательную оценку или заключение при специфическом воспалении дают при выявлении возбудителя. Для трихомонад характерна овальная или грушевидная форма, иногда трихомонады могут выглядеть и круглыми, их размер и форма зависит от вагинальной микросреды. При трихомонадном кольпите в вагинальных выделениях трихомонады обнаруживаются обычно в большом количестве, но для постановки диагноза достаточно опознать один организм, четко увидев жгутики.

При развитии вагинита, вызванного *Candida ssp*/, увеличение x400 позволяет увидеть мелкий псевдомицелий, наличие в нитях псевдомицелия перегородок, а также бластоспоры и почкующиеся формы. Бластоспоры видны как овальные клетки, по размеру равные ядрам клеток плоского эпителия. Почкующиеся формы образуются при размножении дрожжеподобных грибов. Количество бластоспор и псевдомицелия в разных клинических случаях бывает разным. Это зависит от стадии (самое начало, после клинического

обострения, после лечения) и длительности заболевания (первый эпизод заболевания или обострение хронического). Клинические признаки заболевания коррелируют не с количеством дрожжевых клеток или псевдомицелия в препарате, а с соотношением лейкоцитов и клеток вагинального эпителия.

Оценка вагинальной микрофлоры должна производиться при большом (х400) увеличении. В этой микроэкологической системе имеется много вариаций. Наиболее важным является определение наличия или отсутствия морфотипа лактобацилл. Нормальная вагинальная микроэкология характеризуется преобладанием лактобацилл, а также клеток вагинального эпителия с четкими очертаниями клеточной стенки. В случае бактериального вагиноза лактобациллы отсутствуют, характерно наличие «ключевых» клеток (клетки плоского эпителия, покрытые большим количеством мелкой кокковидной микрофлоры), очертания клеточной стенки нечеткие.

Состояние влагалища оценивается как нормальное при следующих условиях:

- Очертания клеток вагинального эпителия четкие.
- Соотношение полиморфноядерных лейкоцитов и клеток вагинального эпителия $<1:1$.
- Доминирование лактобацилл.
- Отсутствие псевдомицелия, бластоспор дрожжеподобных грибов, трихомонад.

Диагноз бактериального вагиноза при оценке методом прямой микроскопии можно поставить, если:

- Очертания клеток вагинального эпителия размытые, нечеткие.
- Соотношение лейкоцитов и клеток вагинального эпителия $<1:1$
- Доминируют мелкие кокковидные микроорганизмы.
- Островки мелкой кокковой микрофлоры видны между эпителиальными клетками.

- Отсутствуют псевдомицелий, бластоспоры дрожжеподобных грибов, трихомонады.

Возможное воспаление цервикального канала (без изменения вагинальной экологии) или пролиферативная фаза менструального цикла:

- Очертания клеток эпителия четкие.
- Соотношение полиморфноядерных лейкоцитов и клеток вагинального эпителия $>1:1$.
- Доминирование лактобацилл.
- Отсутствие псевдомицелия, бластоспор дрожжеподобных грибов, трихомонад.

Неспецифический бактериальный кольпит; возможное воспаление цервикального канала (с сопутствующим изменением вагинальной экологии, характерным для бактериального вагиноза):

- Очертания клеток вагинального эпителия нечеткие, размытые.
- Отношение полиморфноядерных лейкоцитов к клеткам вагинального эпителия $>1:1$.
- Доминирование мелкой кокковой микрофлоры (лактобациллы отсутствуют).
- Отсутствие псевдомицелия, бластоспор дрожжеподобных грибов, трихомонад.

Кандидозный вульвовагинит:

- Очертания клеток вагинального эпителия четкие.
- Отношение полиморфноядерных лейкоцитов к клеткам вагинального эпителия: $>1:1$.
- Доминируют лактобациллы.
- Наличие псевдомицелия и/или бластоспор дрожжеподобных грибов.
- Отсутствие трихомонад.

Трихомониаз:

- Очертания клеток вагинального эпителия размытые, нечеткие.

- Отношение полиморфноядерных лейкоцитов и клеток вагинального эпителия $>1:1$.
- Наличие подвижных простейших, имеющих жгутики.

Нативные препараты исследуются при трех увеличениях с применением объективов $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$ (табл. 4).

Таблица 4 – Оценка нативного (влажного) мазка.

Увеличение	Заключение	Предположения
Малое (объективы $\times 4$ или $\times 5$)	• клинический материал имеется • для дальнейшего увеличения выбираются какие-то определенные участки мазка • видны эпителиальные клетки • видна слизь • видны некоторые другие (меньше, чем эпителиальные) клетки или их скопления	• клетки крови?
Среднее (объектив $\times 10$)	• форма эпителиальных клеток (круглые или многоугольные) • граница эпителиальной клетки и ее четкость • соотношение мелких и эпителиальных клеток • псевдомицелий • распределение мелких клеток в мазке (равномерное или нет) • другие морфологические единицы	• "ключевая" клетка или нет? • лейкоциты? • эритроциты? • трихомонады? • микроорганизмы? • бластоспоры? • скопления псевдомицелия?
Большое (объектив $\times 40$)	• "ключевые" клетки • лейкоциты • эритроциты • трихомонады (видны жгутики) • микроорганизмы (кокки или палочки) • бластоспоры • псевдомицелий	

Микроскопия влажного мазка проводится при увеличениях микроскопа $\times 100$ и $\times 400$ (табл. 5).

Таблица 5 – Микроскопическая картина при исследовании влажного (нативного) мазка при разных увеличениях микроскопа

Объектив $\times 10$	Объектив $\times 40$	Заключение
Клетки эпителия большие, полигональные. Немногочисленные мелкие клетки.	Очертания клеток эпителия четкие. Соотношение лейкоцитов и клеток эпителия $<1:1$. Доминирование лактобацилл. Отсутствие псевдомицелия, бласто-спор и трихомонад.	Нормальное физиологическое состояние влагалища
Клетки вагинального эпителия большие, полигональные. Немного мелких клеток.	Очертания клеток эпителия нечеткие. Соотношение лейкоцитов и клеток эпителия $<1:1$. Доминирование мелкой кокковой микрофлоры (лактобациллы отсутствуют). Островки мелкой кокковой микрофлоры между клетками эпителия. Отсутствие псевдомицелия, бласто-спор* и трихомонад.	Бактериальный вагиноз
Клетки эпителия большие, полигональные. Много мелких клеток.	Очертания клеток эпителия четкие. Соотношение лейкоцитов и клеток эпителия $>1:1$. Доминирование лактобацилл. Отсутствие псевдомицелия, бласто-спор и трихомонад.	Возможное воспаление шейки и/или придатков матки (без изменения вагинальной экологии)
Клетки эпителия большие, полигональные. Много мелких клеток.	Очертания клеток эпителия нечеткие. Соотношение лейкоцитов и клеток эпителия $>1:1$. Доминирование мелкой кокковой микрофлоры (лактобациллы отсутствуют). Островки мелкой кокковой микрофлоры между клетками эпителия. Отсутствие псевдомицелия, бласто-спор и трихомонад.	Возможно воспаление шейки и/или придатков матки (с сопутствующим изменением вагинальной экологии, характеризующим бактериальный вагиноз)
Наличие больших полигональных клеток вагинального эпителия, и в то же время мелких незрелых клеток базального слоя. Много мелких клеток.	Очертания клеток эпителия четкие. Соотношение лейкоцитов и клеток эпителия $>1:1$. Доминирование лактобацилл. Наличие псевдомицелия и/или бласто-спор. Отсутствие трихомонад	Инфекция, вызванная <i>Candida spp.</i> (кандидозный вульвовагинит)

Наличие больших полигональных клеток плоского эпителия, и одновременно мелких незрелых клеток базального слоя. Огромное количество мелких клеток.	Очертания клеток эпителия нечеткие. Соотношение лейкоцитов и клеток эпителия $>1:1$. Доминирование мелкой кокковой микрофлоры (лактобациллы отсутствуют). Островки мелкой кокковой микрофлоры между клетками эпителия. Отсутствие псевдомицелия или бластоспор. Наличие подвижных простейших, имеющих жгутики.	Инфекция, вызванная <i>T. vaginalis</i> (трихомониаз)
---	--	--

Примечание: * - в небольшом числе случаев имеется сопутствующая инфекция *Candida* spp.; в таких случаях соотношение между количеством лейкоцитов и клеток эпителия $>1:1$, кроме того, будет определяться и наличие псевдомицелия и/или бластоспор.

МИКРОСКОПИЯ ОКРАШЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Если отсутствуют условия для проведения микроскопического исследования на приеме, взятые на предметные стекла препараты – мазки направляются в лабораторию. В этом случае материал из уретры, влагалища и цервикального канала берется на два предметные стекла. Одно стекло предназначается для окраски по Граму, второе – для окрашивания метиленовой синей. Врач-лаборант в лаборатории оценивает наличие эпителия в препаратах, количество лейкоцитов, эритроцитов, морфотип бактерий (лактобациллы, кокки, коккобактерии), наличие диплококков вне- и внутриклеточных расположенных. При наличии цервицита количество полиморфноядерных лейкоцитов повышено (более 10 в поле зрения при увеличении $\times 1000$). При клиническом осмотре принимается во внимание наличие или отсутствие слизисто-гнойных цервикальных выделений (зеленовато-желтый гной со слизью на белом ватном тампоне).

Как и при исследовании вагинального влажного препарата, нужно помнить, что число лейкоцитов зависит от индивидуальных особенностей организма, от дня менструального цикла, наличия внутриматочной спирали и т.п. Поэтому для диагностики слизисто-гнойного цервицита рекомендуется использовать оба критерия – наличие клинических проявлений и воспалительный характер цервикального мазка.

Диагноз уретрита у женщин подтверждается нахождением более 10 лейкоцитов в поле зрения при увеличении $\times 1000$. Следует помнить, что патологический воспалительный процесс во влагалище и/или в шейке матки могут сопровождаться обильными выделениями из влагалища и уретральный мазок всегда «загрязнен» материалом этих выделений (клетки плоского эпителия, лейкоциты, вагинальная микрофлора) и не годится для дальнейшей оценки.

Для постановки диагноза уретрита у мужчин достаточно обнаружения 4 лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 1000$.

Мазки, окрашенные метиленовым синим или по Граму, оцениваются при использовании двух увеличений: с применением x10 и x100 (табл. 6).

Таблица 6 – Оценка окрашенного мазка.

Увеличение	Заключение	Предположения
Среднее (объектив x10)	• клинический материал имеется • клинический материал представляет те анатомические участки, из которых он взят • наличие загрязнения из других анатомических участков (например, вагинальные эпителиальные клетки и лейкоциты в цервикальном мазке) • для дальнейшего просмотра при среднем увеличении выбраны определенные участки • видны эпителиальные клетки цервикального канала или уретры • видна слизь • видны некоторые другие (более мелкие, чем эпителиальные) клетки или их скопления	➤ лейкоциты? ➤ эритроциты? ➤ микроорганизмы? ➤ другие морфологические объекты?
Большое (объектив x100)	• лейкоциты • эритроциты • микроорганизмы (кокки и палочки) • внутриклеточные диплококки	

Оценка результатов при исследовании мазка, окрашенного
метиленовым синим

При прямой микроскопии мазка из цервикального канала, окрашенного метиленовым синим, можно определить следующие морфологические объекты:

- Цервикальная слизь (голубовато-фиолетовая аморфная масса\пучки, которая создает фон изображения);

- Цилиндрический эпителий цервикального канала (в большинстве случаев видны только ядра: они овальные по форме, одинаково окрашены, размером с лейкоцит).
- Сегментоядерные или полиморфноядерные лейкоциты;
- Внутриклеточные диплококки;
- Другие микроорганизмы;

Редко:

- Сперматозоиды;
- Эритроциты;

В повседневной врачебной практике техника взятия цервикального мазка имеет огромное значение для дальнейшей его оценки. Неправильно взятый мазок содержит вагинальные эпителиальные клетки, микроорганизмы и лейкоциты, исходящие из влагалища. Такие мазки непригодны для анализа, поскольку имеют ограниченное значение для оценки состояния цервикального канала. Перед взятием клинического материала из цервикального канала важно тщательно очистить шейку матки от выделений.

Прямая микроскопия мазка из цервикального канала, окрашенного метиленовым синим, проводится при открытой диафрагме конденсора. Можно начать микроскопию окрашенного мазка из шейки. Используя объектив x10.

Настраивается расстояние между объектом и объективом, а также сила света для получения четкого изображения. Следует просматривать весь мазок, чтобы оценить качество взятия материала и для нахождения участков мазка, пригодных для дальнейшего исследования. Следует найти в мазке место, где цервикальная слизь образует тонкий слой, и в слизи могут быть различимы мелкие клетки. Даже при малом увеличении можно видеть, что некоторые из мелких клеток имеют сегментированные ядра (лейкоциты), а также видны овальные равномерно окрашенные ядра цилиндрического эпителия.

Для более подробного исследования желательно найти наиболее репрезентативный участок. Почти в каждом цервикальном мазке имеются места, в которых ничего нет, кроме одной мелкой клетки. И напротив, можно видеть места, где такие мелкие клетки многочисленны. Такие участки представляют собой скопления (наслоения) слизи, инфильтрированные клетками эпителия и мелкими клетками, по большей части лейкоцитами. Такие участки не годятся для дальнейшего исследования.

Если при микроскопическом исследовании в мазке из цервикального канала обнаруживается более 100 клеток вагинального эпителия и\или в поле зрения при увеличении $\times 1000$ имеется более 100 микроорганизмов, а также видно много лейкоцитов имеет место контаминация мазка материалом из влагалища.

Наилучшими полями зрения, представляющими материал из цервикального канала, являются такие, в которых форма лейкоцитов скорее овальная, чем круглая. Это указывает на их цервикальное, а не вагинальное происхождение. Между лейкоцитами видны ядра цилиндрического эпителия, количество лейкоцитов умеренное или большое. Необходимым условием для заключения является просмотр участка, где слизь располагается тонким слоем.

При микроскопии с применением объектива $\times 100$ нужно считать лейкоциты по меньшей мере в пяти полях зрения и определять наличие или отсутствие внутриклеточных диплококков.

Большое количество (10-20) лейкоцитов в поле зрения при увеличении $\times 1000$ подтверждает наличие цервицита. Следует принимать во внимание наличие или отсутствие слизисто-гнойных выделений в шейке матки (желто-зеленый гной со слизью на белом ватном тампоне) при клиническом исследовании и установлении диагноза цервицита. Как и при исследовании влажного вагинального препарата, нужно помнить, что число лейкоцитов зависит от индивидуальных особенностей организма, от дня менструального цикла, наличия внутриматочной спирали и т.д.

Рекомендуется использовать оба критерия для обсуждения и диагностики слизисто-гнойного цервицита.

При проведении прямой микроскопии мазка из уретры, окрашенного метиленовым синим, можно выявить следующие морфологические объекты:

- Слизь (фиолетово-синяя аморфная масса или пучки, которые иногда могут наблюдаться при прямой микроскопии, чаще в мазках пациентов-мужчин);
- Цилиндрический\кубовидный эпителий уретры;
- Сегментоядерные или полиморфноядерные лейкоциты;
- Внутриклеточные диплококки;
- Другие микроорганизмы.

Редко:

- Сперматозоиды у мужчин;
- Эритроциты.

В ежедневной практике взятие клинического образца у мужчин и у женщин имеет разное значение. У женщин воспалительный процесс во влагалище и/или в цервикальном канале сопровождается обильными выделениями, и уретральный мазок всегда загрязнен этим материалом (клетки плоского эпителия, лейкоциты, вагинальная микрофлора) и не годится для дальнейшей оценки, т.к. он не отражает состояния слизистой уретры. Если во влагалище нет острого воспалительного процесса, то можно получить репрезентативный мазок из уретры, содержащий мало или совсем не содержащий вагинального эпителия и микрофлоры.

У мужчин материал, взятый из уретры, всегда отражает процесс, протекающий в уретре. Для получения качественного образца пациенту не следует мочиться не менее 3-4 часов.

Прямая микроскопия мазка из уретры, окрашенного метиленовым синим проводится с открытой диафрагмой конденсора. Можно начать микроскопию с объектива $\times 10$, настроив расстояние между объектом и объекти-

вом и силу света для получения четкого изображения. Для оценки качества образца и выявления участков, пригодных для дальнейшей оценки, нужно просмотреть весь мазок. Следует найти места, где эпителий уретры расположен тонким слоем. Мелкие клетки, имеющие сегментированные ядра, должны присутствовать не только среди клеток эпителия, но также и в слизи. Даже при малом увеличении заметно, что некоторые из этих клеток являются лейкоцитами или (редко) эритроцитами.

Следующий этап – это поиск определенного участка для более подробного изучения. Почти в каждой мазке есть места, где невозможно найти ни одного лейкоцита. Если ни одного лейкоцита в образце не найдено, это означает, что на момент взятия образца нет никакого воспаления. Выявленные участки, где предположительно видны лейкоциты, должны быть исследованы более тщательно. Очень важно выявить лейкоциты между клетками эпителия и в слизи.

Наилучшие участки препарата, отражающие процесс, происходящий в уретре, являются такие, в которых среди тонкого слоя эпителиальных клеток наибольшее количество лейкоцитов. При остром уретрите лейкоциты равномерно покрывают все поля зрения, а при хроническом они располагаются небольшими скоплениями в слизи.

При использовании объектива $\times 100$ и $\times 1000$ с иммерсией подсчет лейкоцитов следует проводить по меньшей мере в пяти полях зрения. Особое внимание следует обратить на поиск внутриклеточно расположенных в лейкоцитах диплококков.

Диагноз уретрита у мужчин подтверждается выявлением более 4 лейкоцитов в поле зрения при использовании объектива $\times 100$ (при просмотре не менее пяти полей зрения с наивысшей концентрацией лейкоцитов).

У женщин диагноз уретрита подтверждается нахождением более 10 лейкоцитов в поле зрения при использовании объектива $\times 100$ (при просмотре не менее пяти полей зрения с наибольшей концентрацией лейкоцитов).

При микроскопии мазка из влагалища, окрашенного метиленовым синим, можно определить следующие морфологические объекты:

- Слизь (фиолетово-синяя аморфная масса\пучки, которая образует фон препарата);
- Нормальные клетки влагалищного эпителия (цитоплазма голубого цвета, ядро темно-синее, края клеток четкие);
- «Ключевые» клетки (эпителиальные клетки с нечеткими краями, ядро темно-синее, поверхность клетки покрыта коккобактериями синего цвета);
- Сегментоядерные лейкоциты;
- Микроорганизмы;
- Дрожжеподобные грибы (псевдомицелий, дрожжевые клетки);
- Трихомонады (клетки с пенистой цитоплазмой голубого цвета и эксцентрично расположенным темно-синим ядром).

Редко:

- Сперматозоиды;
- Эритроциты

Результатом микроскопического исследования отделяемого влагалища должна быть оценка состояния микробиоценоза (при увеличении микроскопа $\times 1000$). Для этого выделяют следующие показатели: количество и качество эпителия, наличие ключевых клеток, количество полиморфноядерных лейкоцитов, наличие слизи, выраженность фагоцитоза, соотношение клеток эпителия и лейкоцитов, качественный и количественный состав микроорганизмов. Для формулировки заключения можно использовать принятую в данном медицинском учреждении классификацию состояния микробиоценоза влагалища.

При микроскопии мазка из влагалища детей, окрашенного метиленовым синим, можно определить следующие морфологические объекты:

- слизь (фиолетово-синяя аморфная масса\пучки, которая образует фон препарата);

- нормальные клетки плоского эпителия (цитоплазма голубого цвета, ядро темно-синее; края клеток четкие);
- «ключевые» клетки (края нечеткие, ядро темно-синее, поверхность клетки покрыта коккобактериями синего цвета);
- сегментоядерные (полиморфноядерные) лейкоциты;
- микроорганизмы;
- дрожжеподобные грибы (псевдомицелий, дрожжевые клетки);
- трихомонады (клетки с пенистой цитоплазмой голубого цвета и эксцентрично расположенным темно-синим ядром сперматозоиды (редко);
- эритроциты (редко).

На основании микроскопического исследования отделяемого влагалища можно поставить диагноз специфического (кандидозного, трихомонадного) и неспецифического (бактериального) вагинита, а также бактериального вагиноза (табл. 7).

Таблица 7 – Микроскопические критерии вульвовагинита/вагиноза.

Критерии	Норма	Бактериальный вагиноз	Неспецифический вагинит	Кандидоз	Трихомоноз
Эпителий	Единичный	Умеренно, наличие «ключевых» клеток	Много	Много	Много
Лейкоциты	Единичные	Единичные	Много	Много	Много
Фагоцитоз	Отсутствует	Умеренный	Выраженный	Умеренный	Умеренный
Слизь	Умеренно	Много	Много	Умеренно	Много
Особенности микрофлоры	Преобладают лактобациллы	Отсутствие лактобацилл, обилие бактерий (коккобактерии, кокки, вибрионы).	Обильная смешанная микрофлора	Псевдомицелий и почкующиеся формы дрожжеподобных грибов	Трихомонады
Соотношение лейкоцитов и эпителиальных клеток (Л:Э)	1:1	<1:1	>1:1	>1:1	>1:1

Методические подходы к микроскопической оценке отделяемого влагалища одинаковы как при исследовании мазков, окрашенных метиленовым

синим, так и мазков, окрашенных по Граму. При необходимости уточнения этиологического фактора исследования могут быть использованы другие методы лабораторной диагностики (культуральные, молекулярно-биологические и прочие).

Оценка результатов при исследовании мазка, окрашенного по Граму

Методика оценки мазка, окрашенного по Граму, принципиально не отличается от методики оценки мазка, окрашенного метиленовым синим (см. выше). Окраска по Граму позволяет определять в картине мазка розово-красные (грамотрицательные) или сине-фиолетовые (грамположительные) элементы. Основной целью исследования является оценка микробиоценоза гениталий, выявление грамотрицательных диплококков, трихомонад, дрожжеподобных грибов, сопутствующих микроорганизмов, наличие или отсутствие воспалительного процесса.

При правильной окраске препарат должен быть оранжево-красного цвета.

При проведении микроскопии мазка, окрашенного по Граму, можно определить следующие морфологические объекты:

- Слизь (красноватая аморфная масса/пучки, которая образует фон препарата);
- Эпителиальные клетки (в большинстве случаев видны только ядра: они овальные/круглые, мономорфны по своей окраске, ярко-фиолетового цвета, такие же большие, как лейкоциты);
- Сегментоядерные лейкоциты (ядра окрашены в фиолетовый цвет, часто их периферия имеет оранжево-красный оттенок, цитоплазма бледно-розового цвета);
- Диплококки (оранжево-красного цвета, расположены в лейкоцитах и на эпителиальных клетках);
- «Ключевые» клетки (клетки плоского эпителия, покрытие грамвариабельными микроорганизмами);

- Микроорганизмы (грамотрицательные и грамположительные);
- Дрожжеподобные грибы (псевдомицелий, дрожжевые клетки ярко-фиолетового цвета);
- Трихомонады (клетки с пенистой цитоплазмой розового цвета и эксцентрично расположенным фиолетовым ядром).

Редко:

- Сперматозоиды;
- Эритроциты.

При микроскопии материалов, полученных из цервикального канала и уретры и окрашенных по Граму, обращают внимание на количество лейкоцитов и качественный и количественный состав микрофлоры. При неспецифическом цервиците или уретрите выявляется большое количество лейкоцитов и обилие разнообразных грамвариабельных микроорганизмов.

Метод является одним из основных при постановке диагноза гонореи. При подозрении на гонорею материал следует брать у женщин отдельно из уретры, отдельно из цервикального канала. У мужчин - из уретры. При необходимости исследуют материал из прямой кишки или глотки.

На основании микроскопического исследования диагноз гонореи ставится по трем признакам: форма, расположение и окраска гонококков. Только наличие всех трех признаков позволяет поставить диагноз. Если же выпадает хотя бы один из них, требуется культуральное исследование. Форма гонококка – диплококк, имеющий форму кофейного зерна и располагающийся попарно вогнутыми сторонами друг к другу. Решающее значение при микроскопической диагностике гонореи имеет учет расположения диплококков. Гонококки в основном располагаются внутри лейкоцитов и эпителиальных клеток. На основании обнаружения диплококков, расположенных вне клеток, микроскопический диагноз гонореи не ставится, требуется культуральное исследование. При окраске гонококков по методу Грама – диплококки красного

цвета (грамотрицательные). Ядра лейкоцитов и эпителиальных клеток окрашиваются в фиолетовый цвет.

Микроскопическая картина мазка при острой гонорее отличается от таковой при хроническом процессе. При острой гонорее в препарате имеется большое количество лейкоцитов, клеток цилиндрического эпителия цервикального канала или уретры, грамотрицательные диплококки, расположенные вне- и внутриклеточно, сопутствующая микрофлора практически отсутствует.

При хроническом процессе количество лейкоцитов может быть обильным или умеренным, грамотрицательные диплококки вне- и внутриклеточно расположенные, большое количество сопутствующих микроорганизмов и слизи.

Принципиальными моментами, определяющими качество микроскопической диагностики гонореи, являются качество взятия и нанесения на предметное стекло материала от больных, качество окраски препарата (строгое соблюдение времени окрашивания и обесцвечивания – возможность дифференцирования по цвету клеточных ядер и диплококков). При неправильной окраске необходимо проводить повторное взятие материала от больного.

По результатам микроскопического исследования формулируется заключение: «при микроскопии обнаружены грамотрицательные диплококки, расположенные внутриклеточно и морфологически сходные с гонококками».

При типичной клинической картине заболевания такой ответ достаточен для установления диагноза гонореи. В сомнительных случаях, при диагностики гонореи у беременных, детей, при случаях сексуального насилия диагноз подтверждают культуральным исследованием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Заключение по результатам микроскопического исследования фиксируется в специальном лабораторном журнале и оформляется для выдачи врачу клиницисту в виде бланка, в котором должно быть отражено наличие воспаления по количеству лейкоцитов, по соотношению лейкоцитов и эпителиальных клеток, количественный и качественный состав микрофлоры, а также наличие специфических возбудителей. Заключение формулируется не в виде диагноза, а в виде описания картины мазка. Формулировка диагноза является прерогативой лечащего врача, а не лабораторного работника.

МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА МАЗКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Строение эпителия генитального тракта

Вагина: поверхностный слой вагинального эпителия состоит из нескольких рядов больших полигональных клеток; ядра мелкие, расположены в центре клеток эпителия; клетки вагинального эпителия постоянно слущиваются в просвет вагины, смешиваются с цервикальным и вагинальным секретом и влагалищной микрофлорой, образуя вагинальные выделения.

Цервикальный канал: поверхностный слой состоит из клеток цилиндрического эпителия с ядрами, занимающими большую часть клетки. Эти клетки выстилают цервикальный канал и могут быть видны в препарате в большем или меньшем количестве в зависимости от возраста и гормонального статуса пациентки.

Уретра: поверхностный слой уретры состоит из кубовидных клеток с овальным ядром, расположенным в центре клетки.

Микроскопическая картина при кандидозной инфекции

Кандидозное поражение слизистой влагалища - кандидозный вагинит является распространенным заболеванием женщин репродуктивного возраста. Наряду с клинически выраженным заболеванием существует бессимптомная колонизация влагалища дрожжеподобными грибами. Возможно также кандидозное поражение органов мочевыделительной системы (главным образом, пиелонефрит). У мужчин дрожжеподобные грибы могут вызывать воспаление головки полового члена, крайней плоти, а также мочевыделительных органов.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* широко распространены в природе. Заболевания у людей возникают при гормональном дисбалансе, дефек-

тах общего и местного иммунитета, нарушениях нормального микробиоценоза полостей вследствие передозировки антибиотиков широкого спектра действия, при этом в качестве возбудителя заболевания выступают грибы, находящиеся в самом организме.

При исследовании вагинального отделяемого наиболее часто выделяют вид *Candida albicans* (около 90%), а также и другие виды этого рода - *C. tropicalis*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. lambica*. В последние годы *C. glabrata* описан как опасный возбудитель внутрибольничных инфекций.

Для постановки диагноза урогенитального кандидоза предпочтительным является микроскопический метод, поскольку у 20% здоровых женщин во влагалище присутствуют кандиды, которые также вырастут при посеве, что даст основание для необоснованного диагноза кандидоза влагалища. Культуральный метод полезен при хроническом рецидивирующем течении заболевания, при изучении действия лекарственных препаратов, при атипичном течении заболевания, когда исключены другие возможные возбудители.

Для микроскопии используют неокрашенные препараты, а также препараты, окрашенные по Граму, по Романовскому-Гимзе, метиленовым синим.

В основе диагноза лежит обнаружение элементов гриба: единичных почкующихся клеток, псевдомицелия, других морфологических структур (бластоконидии, псевдогифы).

Микроскопическая картина при гонококковой инфекции

Возбудителем гонореи является грамотрицательный диплококк *Neisseria gonorrhoeae*, входящий в состав семейства *Neisseriaceae* рода *Neisseria*. Это бобовидной формы кокк, клетки которого располагаются парами вогнутыми сторонами друг к другу. Размеры кокков - 1,25 - 1,60 мкм в длину и 0,7 - 0,8 мкм в поперечнике.

Диагностика гонореи включает микроскопический, культуральный и молекулярно-биологический методы.

Для микроскопического исследования необходимо готовить одновременно два препарата для двух методов окраски - по Граму и метиленовым синим. При наличии показаний параллельно проводят культуральное исследование. Учитывая высокую чувствительность гонококков к высыханию и температурным воздействиям, посев рекомендуется делать сразу на шоколадный агар или другую питательную среду для выделения гонококков.

Окрашенные препараты микроскопируют с иммерсией (объектив x100, окуляр x10).

При острой гонорее обращают внимание на:

- отсутствие или малое количество нормальной микрофлоры;
- большое количество полиморфноядерных лейкоцитов, обычно не разрушенных;
- наличие грамтрицательных диплококков, расположенных внутри клеток - фагоцитов.

При хронической гонорее выявляется:

- большое количество полиморфноядерных лейкоцитов, расположенных как по всему полю зрения, так и отдельными скоплениями в слизи; часть лейкоцитов может быть дегенерирована.
- наличие грамтрицательных диплококков, расположенных вне- и внутриклеточно.
- наличие смешанной гамма-вариабельной микрофлоры.

При обнаружении в мазке грамтрицательных диплококков, расположенных внутриклеточно, лечащий врач устанавливает больному диагноз гонореи. При постановке диагноза гонореи у беременных и детей обязательным является также проведение культурального исследования вне зависимости от результатов микроскопического исследования. Кроме того, культуральное исследование на гонорею проводится при наличии грамтрицательных или

грамвариабельных диплококков в мазках и отсутствии клинических проявлений заболевания, при исследовании материалов из экстрагенитальной локализации (носоглотка, прямая кишка и др.), при хроническом течении заболевания.

Микроскопическая картина при трихомонозе

Trichomonas vaginalis - простейшее из класса жгутиковых (*Fragellata*), является возбудителем заболеваний урогенитального тракта как мужчин, так и женщин. Имеется лишь одна форма или стадия развития влагалищных трихомонад - трофозоит, цист *T.vaginalis* не образует. Паразит представляет собой клетку, ограниченную клеточной мембраной. Форма клетки овоидная или грушевидная с ядром, расположенным ближе к тому концу клетки, на котором расположены 4 жгутика. Вдоль клетки тянется ундулирующая мембрана, по всему телу проходит аксостиль. Величина клетки в длину - 10 мкм, в ширину - 5 мкм. Все элементы строения влагалищной трихомонады выявляются при специальных методах окраски, при обычных диагностических анализах ориентируются на величину, форму клетки и подвижность.

Важно помнить, что исследовать необходимо свежевзятый материал: отделяемое уретры, секрет предстательной железы, влагалищное отделяемое или смыв из влагалища.

Основным методом диагностики до настоящего времени остается микроскопическое исследование. В патологическом материале выявляют живые подвижные трихомонады. Для этого из полученного смыва или суспензии из взятых выделений готовят препарат по методу "раздавленной" или "висячей" капли и микроскопируют при увеличении x280 или x400 (объектив x40, окуляр x7 или x10) при опущенном конденсоре. Среди клеточных элементов (эпителий, лейкоциты) трихомонады различают по их форме (грушевидная, овальная), величине (примерно равны ядру клетки плоского эпителия) и характерной подвижности - толчкообразное, поступательное и вращательное движения за счет жгутиков и ундулирующей мембраны.

Одновременно с приготовлением "раздавленной" или "висячей" капли целесообразно приготовить препарат из этого же материала для окраски метиленовым синим (1% раствор по Леффлеру), по Граму и по Романовскому-Гимзе. Окрашенные препараты микроскопируют, используя иммерсионный объектив, что позволяет лучше видеть форму и строение паразита, в особенности при окраске по Романовскому-Гимзе.

У мужчин перечисленные методы могут не выявить трихомонады вследствие их небольшого количества. Поэтому целесообразно применять культуральное исследование.

Так как у мужчин в отделяемом уретры трихомонады количественно представлены меньше, чем во влагалищном отделяемом у женщин, рекомендуется проводить несколько повторных анализов и лишь после ряда отрицательных результатов считать, что имеющееся заболевание, вероятно, связано с другими возможными микроорганизмами.

В настоящее время в некоторых случаях используют ПЦР-диагностику для выявления трихомонад. Метод нередко может давать ложноположительные результаты. Поэтому предпочтительнее пользоваться культуральным методом диагностики.

На сегодняшний день нельзя рекомендовать использование в широкой практической работе методов ПИФ и ИФА в связи с тем, что существующие наборы не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью, позволяющую осуществлять качественную диагностику трихомониаза.

Микроскопическая картина при урогенитальной хламидийной инфекции

Микроскопическая (цитологическая) диагностика с использованием таких методов окрашивания как окраска по Романовскому-Гимзе, Папаниколау, Май-Грюнвальд, раствором Люголя и др. неприемлема в связи с очень низкой чувствительностью и специфичностью.

В диагностике генитального хламидиоза упор делается на лабораторные методы, с помощью которых определяют наличие живых, размножаю-

щихся хламидий (культуральный метод), наличие антигенов хламидий с помощью иммунофлюоресцентной микроскопии или иммуноферментного метода в его различных модификациях, наличие генетического материала хламидий с помощью молекулярно-биологических методов. Можно сказать, что относительная простота и высочайшая чувствительность молекулярно-биологических методов (ПЦР, ПЦР в реальном времени, NASBA в реальном времени) делает их предпочтительными в скрининговых исследованиях.

Микроскопическая картина при шанкроиде (мягкий шанкр, *ulcus molle*)

Возбудитель мягкого шанкра – грамотрециательная неподвижная палочка *Haemophilus ducreyi*.

Перед взятием материала для микроскопического и культурального исследования необходимо очистить поверхность язвы от гноя марлевым тампоном, смоченным физиологическим раствором. Взятие материала производится ватным/дакроновым тампоном из-под края язвенного дефекта, затем материал переносится на предметное стекло путем аккуратного прокатывания тампона по стеклу для того, чтобы не нарушить клеточную морфологию, что может быть легко сделано, если материал размазывается по стеклу тампоном. Материал для культурального исследования может быть взят как тампоном, так и петлей из-под края язвенного дефекта.

При окраске мазков по Граму *Haemophilus ducreyi* выявляется в виде небольшой грамотрециательной неподвижной палочки 0,5-0,6 мкм толщиной и 1,6-2,0 мкм длиной. При исследовании мазков палочки располагаются скоплениями в виде групп или коротких цепочек. Иногда микроорганизмы располагаются один за другим в ряд в виде правильных парных линий, напоминающих «железнодорожные пути», что считается достаточно характерным для *H. ducreyi*. Однако полезность микроскопического исследования мазков, окрашенных по Граму, для диагностики шанкроида, окончательно не ясна. Чувствительность метода, достигающая 40-60%, в принципе считается приемлемой, но специфичность до сих пор хорошо не определена. Это связано с

тем, что микроорганизмы, имеющие сходную морфологию с *H. ducreyi*, могут быть обнаружены в отделяемом генитального тракта. Именно поэтому, результаты микроскопического исследования мазков, окрашенных по Граму, могут быть использованы только в качестве основания для предварительного диагноза. Исследование мазков аспирата пораженных лимфатических узлов, окрашенных по Граму, является более специфичным, но и в этом материале обнаружить микроорганизмы оказывается значительно труднее.

Окончательный диагноз необходимо все же стараться подтвердить данными культурального исследования.

Микроскопическая картина при паховой гранулеме (донованоз, венерическая гранулема)

Возбудитель донованоза - *Calymmatobacterium granulomatis* - грамотрицательная неподвижная неспорообразующая инкапсулированная коккобацилла (0,5-1,5 мкм на 1-2 мкм).

Наиболее приемлемыми и эффективными методами для лабораторного подтверждения диагноза донованоза являются биопсия с гистологическим исследованием взятой ткани и цитологическое исследование мазков-отпечатков.

Материал для исследования забирается из области грануляционной ткани по периферии язвенного очага поражения, которая сначала тщательно очищается влажными марлевыми тампонами, смоченными физиологическим раствором и затем осушается сухой марлей. Появление крови не влияет значительно на результат исследования. Небольшой кусочек ткани (величиной не меньше спичечной головки) получают, используя пинцет, ложечку Фолькмана, небольшую кюретку или при помощи пункционной биопсии.

Полученный кусочек ткани несколько раз последовательно прикладывают к предметному стеклу, делая таким образом мазок-отпечаток. Не следует повторно прикладывать кусочек ткани к одному и тому же месту, или размазывать его по стеклу, или пытаться делать мазок-отпечаток высохшим ма-

териалом, так как это приведет только лишь к дополнительному разрушению клеток и сделает исследование неинформативным.

Мазок высушивается на воздухе, фиксируется 96% этанолом в течение 5 минут и окрашивается. Оставшийся кусочек ткани направляется на гистологическое исследование.

Используются различные методы окраски препарата. При окраске гематоксилин-эозином хорошо выявляются признаки острого или хронического воспаления с образованием грануляционной ткани. Тельца Донована при этой краске могут быть выявлены только при их наличии в большом количестве. Другие окраски (как при микроскопии мазков-отпечатков, так и при гистологическом исследовании), такие как окраска по Райту, Гимзе и др., проводятся по стандартным методикам, за исключением окраски по Райту, имеющей свои особенности.

Положительный ответ выдается при обнаружении в материале внутриклеточных включений *Calymmatobacterium granulomatis* в гистиоцитах, которые в этом случае имеют вид характерных «патогномоничных клеток». Эти увеличенные в размерах от 20 до 90 мкм клетки имеют эксцентрично расположенное ядро и содержат отдельно или группами расположенные микроорганизмы в инкапсулированных или цистоподобных включениях в цитоплазме. В цитоплазме таких мононуклеарных клеток небольшие включения в виде прямых или перекрученных палочек, напоминающих «безопасные булавки», имеют цвет от синего до насыщенно пурпурного и окружены розовой капсулой. Разрушенные тканевые клетки не пригодны для исследования, так как могут содержать много внеклеточных включений, похожих по размеру и характеру. Большие «патогномоничные клетки» определяются при малом увеличении (x400) и подтверждаются исследованием при увеличении x1000.

Микроскопическая картина при неспецифическом (бактериальном) уретрите/цервиците

Этиологическими факторами развития неспецифического уретрита/цервицита являются факультативные и анаэробные бактерии (стафилококки, стрептококки, энтеробактерии и др.), а также микоплазмы, уреаплазмы. Этот диагноз устанавливается методом исключения гонококковой и хламидийной инфекции как у пациента, так и у партнера.

Клинический диагноз подтверждается микроскопическим исследованием мазков из уретры или цервикального канала, окрашенных по Граму и/или метиленовым синим. В мазке отмечается наличие большого количества полиморфноядерных лейкоцитов, выявляются десквамированные эпителиальные клетки, единичные лимфоциты и грам-вариабельная микрофлора.

Микроскопические критерии:

- уретрит у мужчин: более 4 полиморфноядерных лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 1000$ и просмотре не менее 5 полей зрения.
- уретрит у женщин: более 10 полиморфноядерных лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 1000$ и просмотре не менее 5 полей зрения
- цервицит: более 10 полиморфноядерных лейкоцитов в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 1000$ и просмотре не менее 5 полей зрения в сочетании со слизисто-гнойными выделениями из цервикального канала.

Диагностические критерии хронического неспецифического уретрита такие же, как и острого, но следует отметить, что при хроническом процессе в мазке из уретры выявляются преимущественно лимфоциты, в то время как при остром – преобладают полиморфноядерные лейкоциты.

При наличии клинических проявлений цервицита в сочетании с большим числом полиморфноядерных лейкоцитов в препарате из цервикального канала (>30 в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 1000$ и про-

смотре не менее 5 полей зрения) следует проводить повторные исследования для исключения хламидийной или гонококковой этиологии.

Микроскопическая картина при неспецифическом (бактериальном) вульвовагините

Этиологическими факторами неспецифического вульвовагинита могут являться грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Клинический диагноз подтверждается микроскопическими исследованиями отделяемого влагалища (нативных и окрашенных метиленовым синим или по Граму мазков). В мазках отмечается наличие большого количества полиморфноядерных лейкоцитов (которое может меняться в зависимости от фазы менструального цикла), выявляются десквамированные эпителиальные клетки и грамвариабельная микрофлора.

Микроскопические критерии:

- соотношение лейкоцитов и клеток эпителия более, чем 1:1 при увеличении $\times 1000$ и просмотре не менее 5 полей зрения;
- количество лейкоцитов более, чем 40-60 в поле зрения при увеличении $\times 1000$ и просмотре не менее 5 полей зрения;
- наличие большого количества слизи;
- наличие большого количества слущенного эпителия;
- появление парабазальных клеток и «голых» ядер.

При упорном течении воспалительного процесса с резистентностью к использованным методам лечения необходимо дополнительное культуральное или молекулярно-биологическое исследование с целью уточнения возможных этиологических факторов (стафилококки, стрептококки, энтеробактерии, микоплазмы, уреаплазмы, гарднереллы, бактероиды, вибрионы и др.) и определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Микроскопическая картина при герпесвирусной инфекции

Микроскопическая (цитологическая) диагностика герпетической инфекции с использованием неспецифических методов окрашивания не должна использоваться в связи с очень низкой чувствительностью и специфичностью.

Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) являются основными в диагностике данной инфекции

Серологические методы исследования в диагностике герпетической инфекции являются вспомогательными.

Микроскопическая картина при папилломавирусной инфекции

В лабораторной диагностике папилломавирусной инфекции применяют исключительно МАНК.

Для микроскопического (цитологического) исследования используется метод окраски мазков по Папаниколау, хотя следует отметить его относительно низкую чувствительность и значительную зависимость получаемых результатов от качества взятия материала. Характерными цитологическими признаками папилломавирусной инфекции являются вирусная атипия клеток и койлоцитоз. Койлоциты - это клетки с неоднородными гиперхромными ядрами, окруженными перинуклеарно более светлым ободком цитоплазмы, имеющей по периферии более интенсивное окрашивание. Диагноз папилломавирусной инфекции может также подтверждаться другими цитологическими признаками, такими, как дискератоз, многоядерность клеток или потеря ими ядра и паракератоз. Связь этих изменений с папилломавирусной инфекцией должна быть подтверждена молекулярно-биологическими методами (ПЦР, ЛЦР, ПЦР с системой гибридной ловушки, ПЦР в реальном времени).

Варианты микроскопических картин
(A.Hallen, M.Domeika, 2008, Uppsala University)

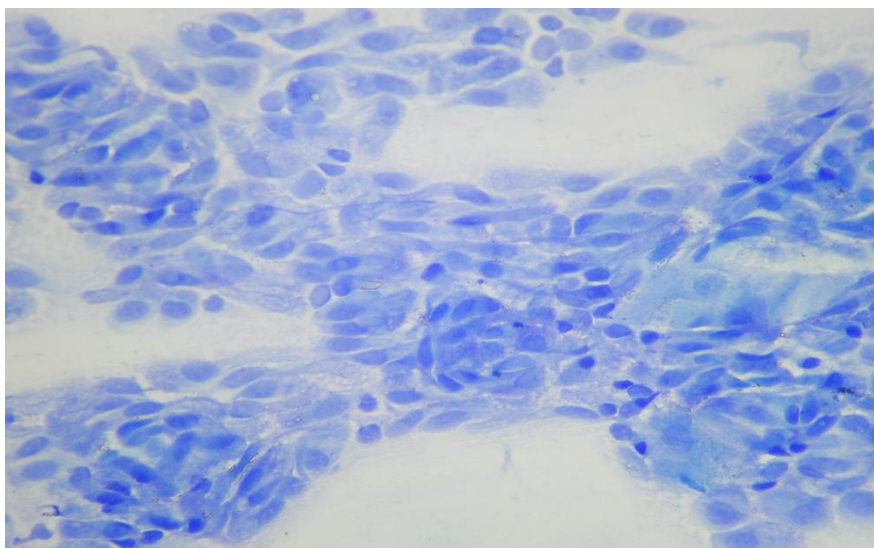


Рисунок 1 – Нормальная микроскопическая картина
отделяемого уретры мужчины

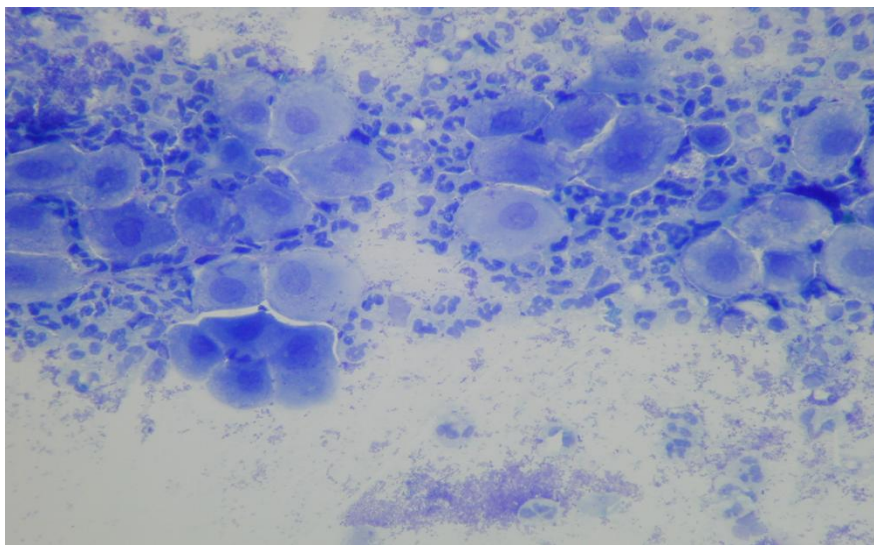


Рисунок 2 – Негонококковый уретрит (мужской мазок)

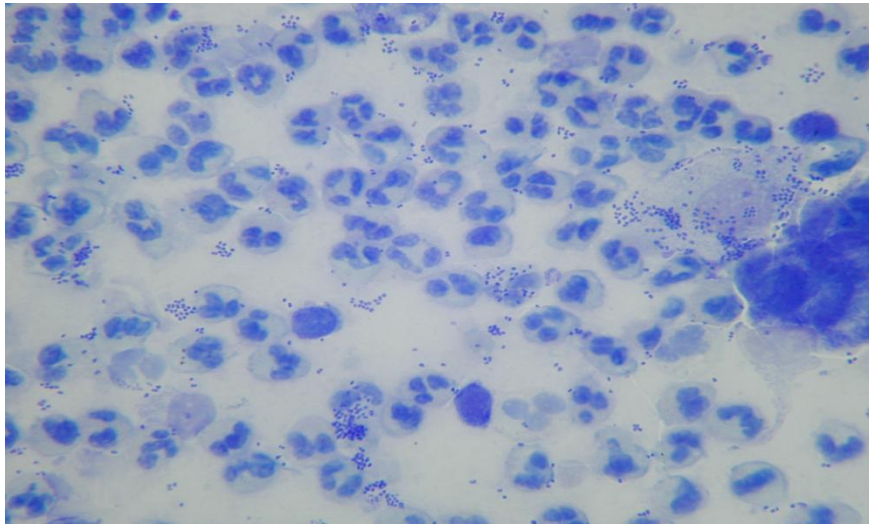


Рисунок 3 – Гонококковый уретрит (мужской мазок)

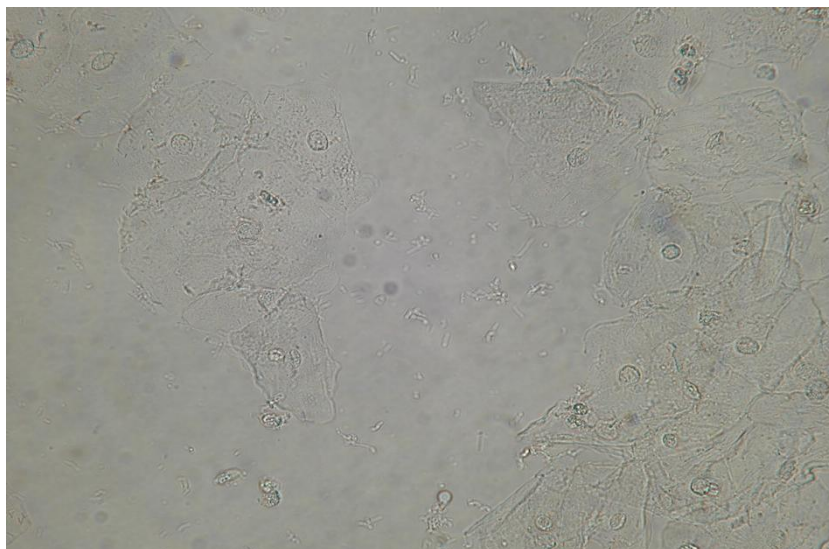


Рисунок 4 – Женское влагалище. Нормоценоз.

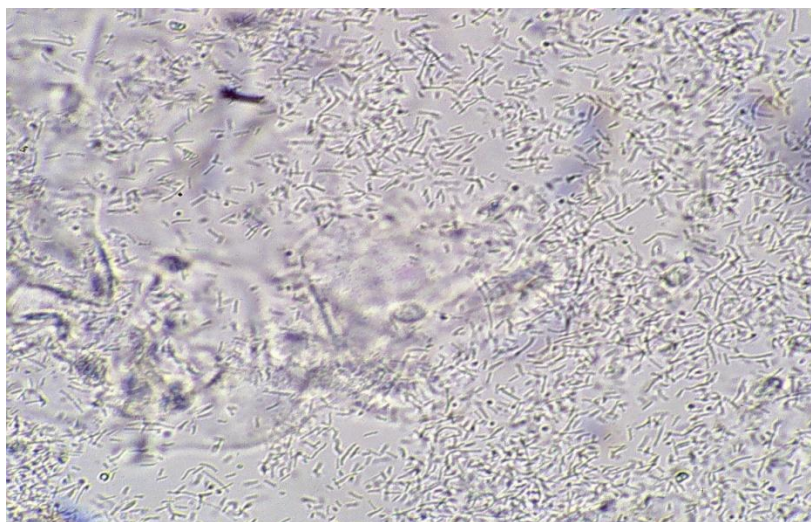


Рисунок 5 – Женское влагалище. Нормоценоз.

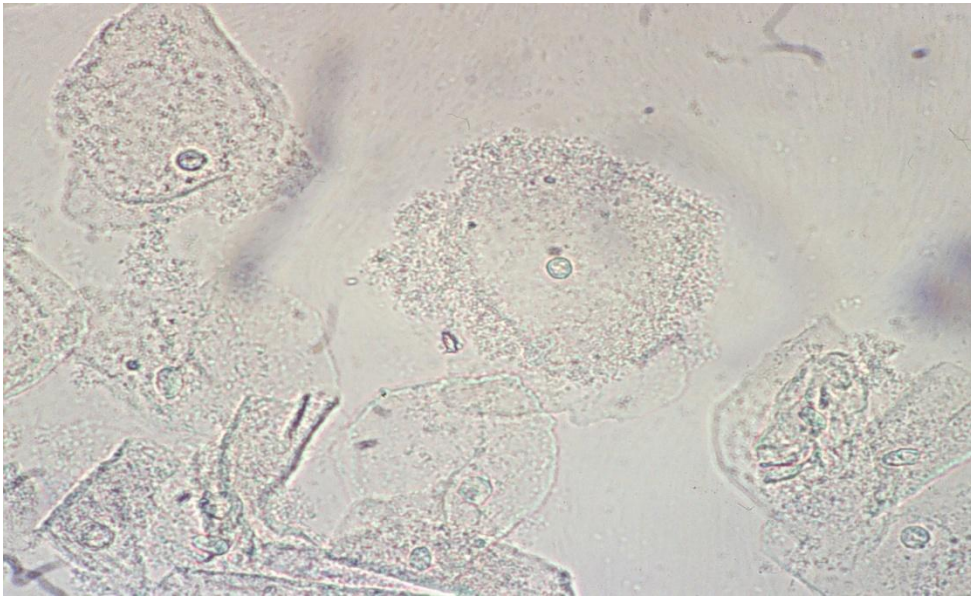


Рисунок 6 – Бактериальный вагиноз

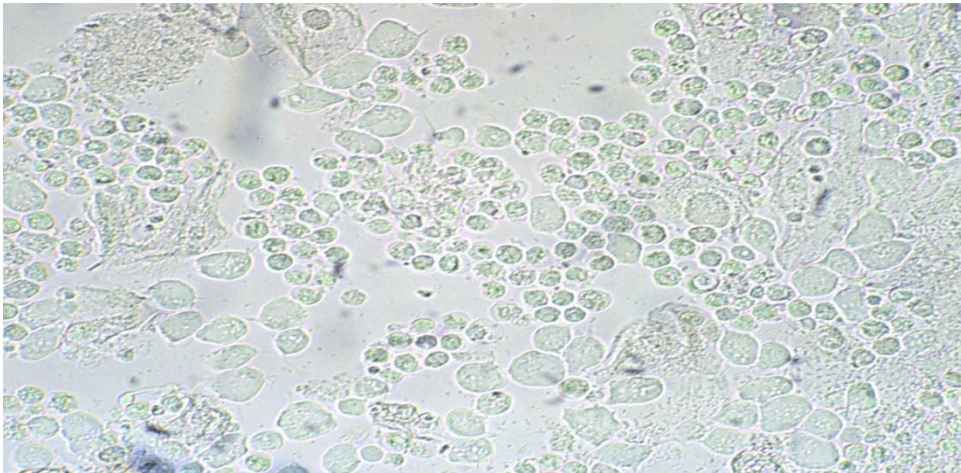


Рисунок 7 – Трихомонадная инфекция

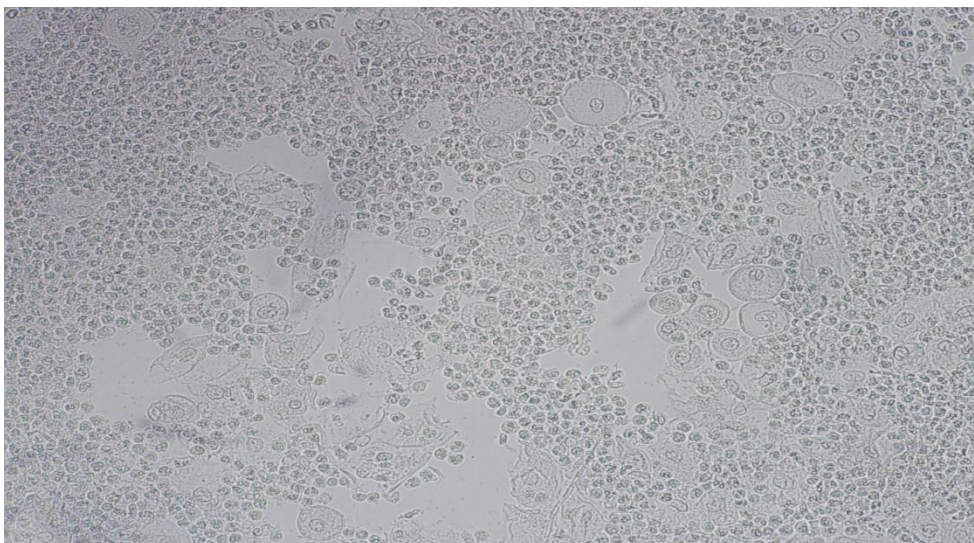


Рисунок 8 – Неспецифический вагинит

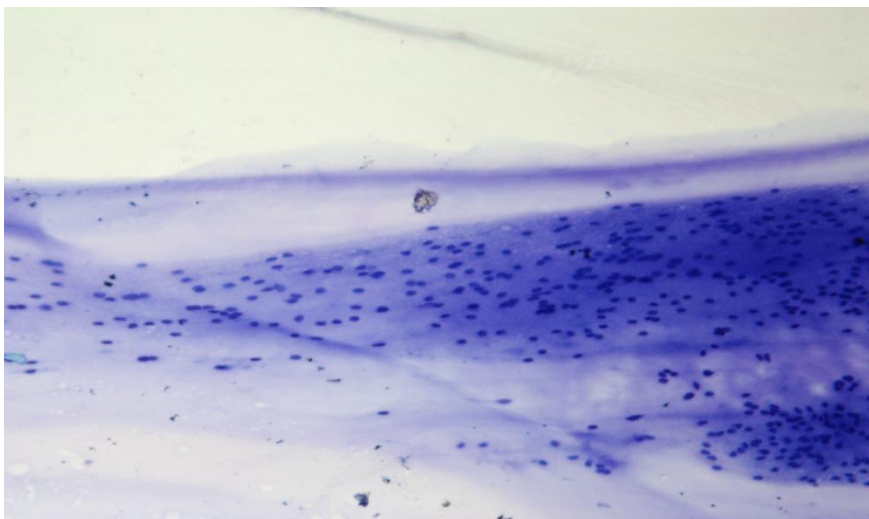


Рисунок 9 – Цервикальный канал. Норма.

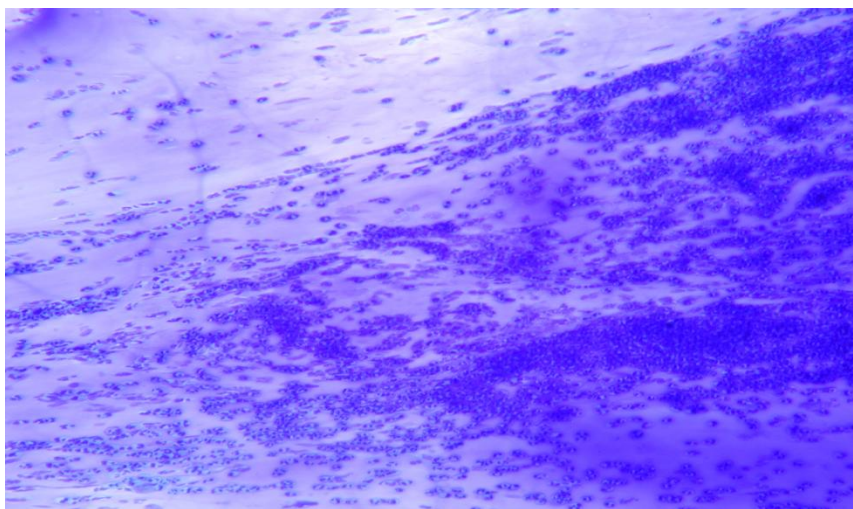


Рисунок 10 – Неспецифический цервицит.

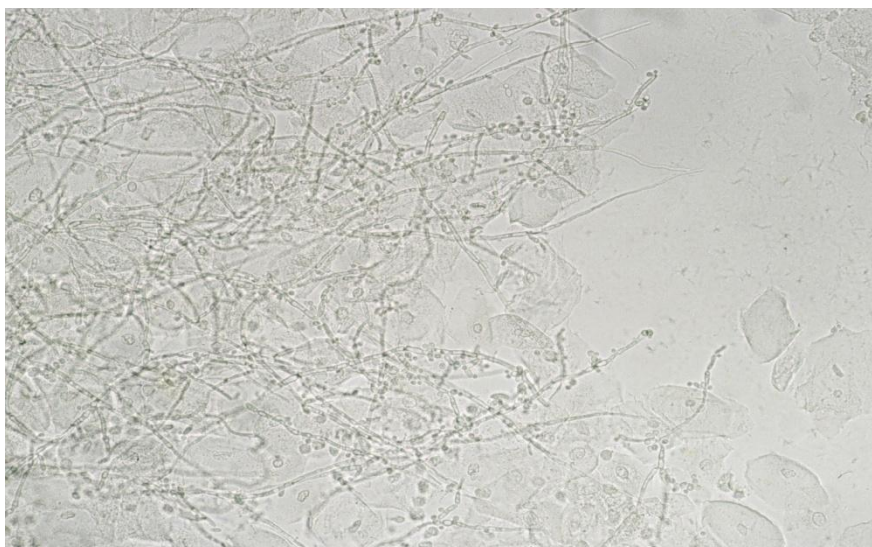


Рисунок 11 – Кандидозный вульвовагинит.

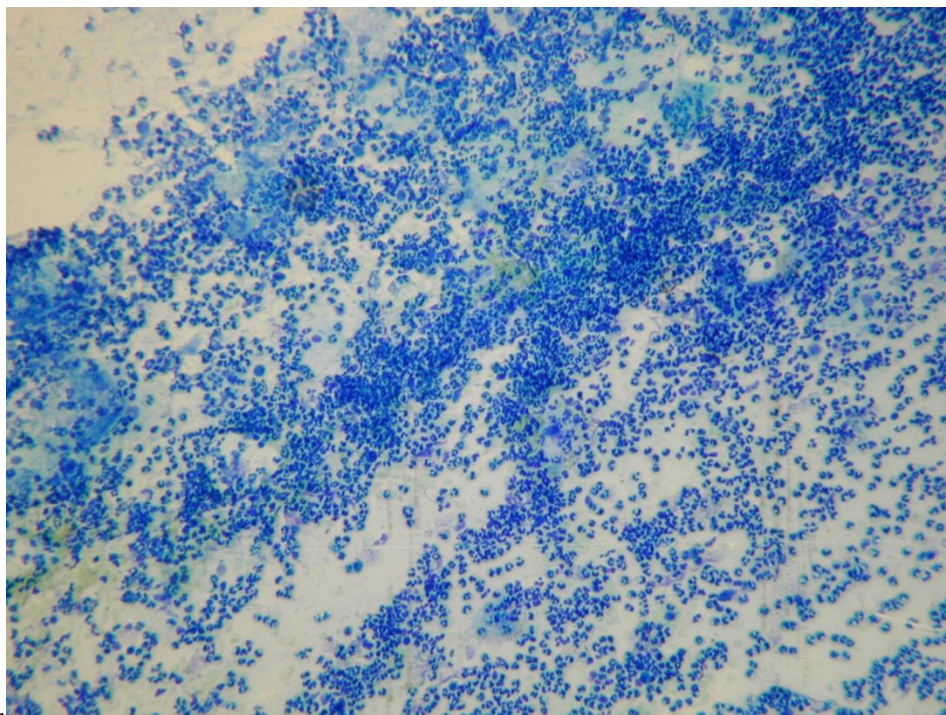


Рисунок 12 – Гонококковый цервицит.

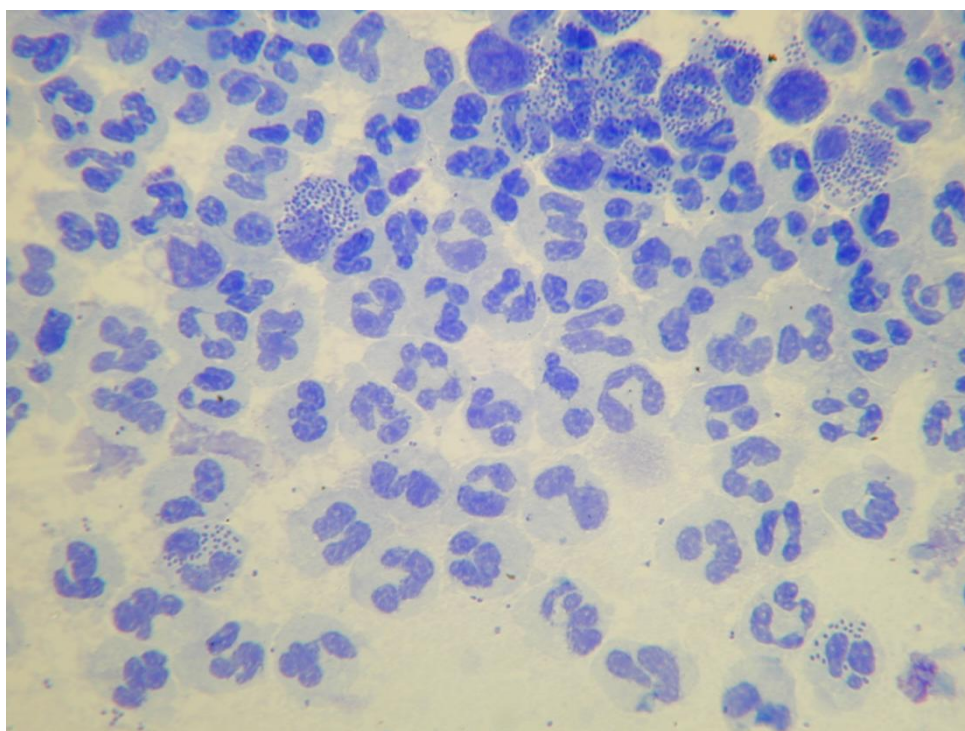


Рисунок 13 – Гонококковый цервицит.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

При проведении процедуры окрашивания препаратов для микроскопического исследования каждая партия мазков должна содержать контрольные стекла с заведомо грамположительными и грамотрицательными бактериями [59].

Источники ошибок:

- неудовлетворительное техническое состояние микроскопа затрудняет оценку результата;
- неправильное и неадекватное взятие клинического материала может привести к невозможности правильной интерпретации результата;
- использование маркера, не предназначенного для маркировки стекол, в процессе фиксации и окрашивания он может загрязнить препарат;
- неправильное нанесение материала на стекло (необходимо прокатывать тампон по стеклу) может привести к повреждению клеток, вследствие чего может быть нарушена их морфология;
- недостаточная фиксация в пламени горелки может привести к удалению материала со стекла во время окраски;
- перегрев во время фиксации может привести к окраске артефактов и повреждению клеток;
- использование раствора Люголя после истечения его срока годности (обычно раствор является пригодным в течение 90 дней при хранении при комнатной температуре);
- при переобесцвечивании мазка грамположительные микроорганизмы могут окраситься как грамотрицательные;
- при недообесцвечивании мазка грамотрицательные микроорганизмы могут окраситься как грамположительные;
- реактивы, загрязненные другими микроорганизмами, могут давать ошибочные результаты.

ДРУГИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуральная диагностика

Выделение чистых культур в клинической практике неразумно, т.к. микроорганизмы, связанные с БВ, часто являются компонентом нормальной вагинальной флоры, а диапазон определяемых микроорганизмов слишком широк. Все это делает культуральную диагностику дорогостоящей, трудоемкой и неубедительным индикатором БВ [24].

Метод газожидкостной хроматографии

Метод позволяет сравнить содержание в вагинальном отделяемом основных продуктов метаболизма лактобацилл и *G. vaginalis*: молочной кислоты (лактата) и янтарной (сукцината). При БВ концентрация янтарной кислоты (сукцината) во влагалищном содержимом увеличивается, а количество молочной кислоты (лактата), продуцируемой лактобациллами и стрептококками, снижается. Высокое содержание сукцината по сравнению с лактатом используется в качестве диагностического критерия БВ. В норме соотношение янтарной и молочной кислот менее 0,4, а при БВ – более 0,4. Чувствительность и специфичность метода варьируют и, по данным различных авторов, составляют от 78–81 до 100% . При БВ также выявляют высокие концентрации летучих жирных кислот, продуцируемых строгими анаэробами – бутирата, ацетата и пропионата. На практике метод газожидкостной хроматографии используется редко из-за высокой степени сложности и дороговизны [60].

Экспресс-тест для диагностики БВ (BVblue)

В 2001г. для диагностики БВ был предложен цветной диагностический тест BVBlue (Gryphus Diagnostics, L.L.C., Birmingham, Ala.), основанный на определении активности фермента сиалидазы в вагинальных мазках. Сиалидаза продуцируется представителями группы патогенных бактерий, вызывающих бактериальный вагиноз: *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.*,

Prevotella spp., *Mobiluncus spp.*, и способствует адгезии бактерий к клеткам эпителия. Сиалидаза обладает также муциназной активностью и может облегчать проникновение флоры, ассоциированной с БВ, в верхние отделы мочеполовой системы. Повышенный уровень сиалидазы коррелирует с БВ и с преждевременными родами у женщин, страдающих БВ.

Тампон с вагинальным отделяемым на 10 минут опускают в тестовую пробирку с хромогенным субстратом. Затем в пробирку добавляют проявитель. При уровне активности фермента $\geq 7,8$ ед. хромогенный субстрат тест-системы меняет окраску на сине-зеленую (положительный результат теста), а при более низкой активности сиалидазы окраска раствора остается желтой (отрицательный результат).

Исследование отделяемого мочеполовых органов методами амплификации нуклеиновых кислот

Основными симптомами БВ являются обильные непрозрачные выделения, частый зуд в области гениталий, неприятные ощущения во время полового акта. БВ является одной из причин раннего прерывания беременности, преждевременных родов, хориоамнионита, послеродового эндометрита, послеоперационных осложнений после гинекологических операций, воспалительных заболеваний малого таза у женщин [18-22], при бактериальном вагинозе увеличивается риск инфицирования ВИЧ-инфекцией и другими половыми инфекциями [23-27].

В норме генитальный тракт колонизирован комплексной микрофлорой, включающей сапрофитные, условно-патогенные аэробные и анаэробные микроорганизмы, находящиеся в динамическом равновесии друг с другом. У 87-100% здоровых женщин обнаруживаются аэробные микроорганизмы, среди которых наиболее часто встречаются лактобактерии (45-88%), стрептококки (53-68%), энтерококки (27-32%), коагулазо-негативные стафилококки (34-92%) и колиформные микроорганизмы.

Доминирующими агентами в микробиоценозе являются лактобакте-

рии, продуктом жизнедеятельности которых является а-оксипропионовая молочная кислота, перекись водорода, лизоцим и другие гликолитические ферменты, которые создают кислую реакцию влагалищного содержимого, препятствующую размножению патогенных микроорганизмов [28-32].

Видовой состав микрофлоры женских гениталий относительно стабилен. Определенные различия в ней обусловлены возрастом, беременностью, менструальным циклом [33, 34].

БВ представляет собой нарушение нормальной микрофлоры влагалища. При этом резко сокращается количество лактобактерий, повышается концентрация условно-патогенных микроорганизмов [35, 36].

В норме влагалищный микробиотоп имеет следующий качественный и количественный состав: *Lactobacillus* sp. (95%) – 10^8 – 10^{10} бактерий/мл; соотношение анаэробы:аэробы – 2:1–5:1; отсутствуют или очень мало *Gardnerella vaginalis* (до 40%); до 10^5 *Mobiluncus* sp., *Prevotella* sp., *Atopobium* spp.

При синдроме бактериального вагиноза чаще всего преобладают анаэробные микроорганизмы *Gardnerella vaginalis* (98-100%); до 10^8 – 10^{10} *Mobiluncus* sp., *Prevotella* sp., *Atopobium* sp.; соотношение анаэробы: аэробы – 100:1 – 1000:1; отсутствуют или снижена концентрация *Lactobacillus* sp. – 10^4 – 10^5 бактерий/мл.

При исследовании культуральным и ПЦР методами основных видов *Lactobacillus* sp. установлено значительное снижение в концентрации *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, и *L. Iners* во влагалище у здоровых женщин в сравнении с БВ [37, 38].

Возникновение нарушений количественно-качественных взаимоотношений резидентных микроорганизмов – сапрофитных и условно-патогенных, населяющих мочеполовую систему в норме, приводит к возникновению дисбаланса.

Развитие дисбаланса микробиоценоза может сопровождаться метаболическими, иммунными нарушениями и в ряде случаев клиническими проявлениями.

ями, степень выраженности которых варьируется от бессимптомного носительства до выраженной клинической манифестации [39].

Снижению количества вагинальных лактобацилл способствуют многие факторы, в первую очередь - масштабное применение большого количества антибактериальных препаратов (антибиотиков, антисептиков, дезинфектантов), курение, неконтролируемое спринцевание, смена трех и более половых партнеров в течение года.

Некоторые авторы связывают изменения влагалищного биоценоза с генетическим полиморфизмом иммунной системы [40, 43, 44].

По данным разных авторов, *Gardnerella vaginalis* имеется у 15-25% здоровых женщин, поэтому обнаружение только лишь гарднереллы не позволяет поставить диагноз бактериального вагиноза. В то время как *Atopobium vaginae* (Atopobium vaginae) считается одним из наиболее специфичных микроорганизмов для бактериального вагиноза. У женщин с *Atopobium vaginae* гораздо чаще наблюдаются рецидивы (повторные случаи) вагиноза. Еще одной важной особенностью данного микроорганизма является его устойчивость к нитроимидазолам (метронидазолу).

Истинное разнообразие микрофлоры при БВ открылось только с внедрением молекулярно-биологических подходов (FISH, ПЦР) с помощью которых было описано много новых (часто некультивируемых или очень трудно культивируемых) анаэробных микроорганизмов [61], таких как *Atopobium vaginae* [62], *Megasphaera* spp [63], *Leptotrichia* spp., *Dialister* spp., бактерии, ассоциированные с БВ (bacterial vaginosis associated bacteria) BVAB1, BVAB2, BVAB3, принадлежащих порядку Clostridiales [64]. *Megasphaera* species [63], *Sneathia* species [62].

Молекулярный анализ с использованием современных методов (культура-независимый ПЦР-денатурирующий градиентный гель-электрофорез, метод пиросеквенирования, количественная ПЦР) показал, что специфическим маркером БВ не может быть один возбудитель, а только выявление в ассоциации таких бактерий, как *Gardnerella*, *Atopobium*, *Megasphaera*,

Eggerthella, *Aerococcus*, *Leptotrichia/Sneathia*, *Prevotella* и *Papillibacter*, является диагностическим критерием БВ [65]. Кроме того применение технологий нового поколения (*metagenome shotgun sequencing*) позволяет изучить генетическую последовательность и метаболический потенциал некультивируемых микроорганизмов.

Метод ПЦР с детекцией результата по окончании реакции позволяет быстро и эффективно выявить искомый патогенный или условно-патогенный микроорганизм, минуя стадию культивирования и выделения чистых культур. Основным преимуществом ПЦР является возможность достаточно легкой адаптации ПЦР для быстрой диагностики любого интересующего нас микроорганизма. Основным ограничением ПЦР является игнорирование всех «немишенезированных» возбудителей [66]. Однако, выявление условно-патогенных микроорганизмов методом ПЦР без учета количества конкретного микроорганизма и количественно-качественного состава исследуемого биотопа в целом, не имеют диагностического значения в решении вопроса об этиологической роли выявленных условно-патогенных микроорганизмов в развитии БВ [57].

Количественная ПЦР позволяет дифференцировать цитологически выявленные дисбиотические процессы по степени их выраженности и позволяет получить количественные данные о микрофлоре влагалища, включая некультивируемые формы микроорганизмов [68]. Применение количественных ПЦР в значительной степени унифицирует диагностику БВ, основанную на методе золотого стандарта при комбинировании критериев Amsel и Nugent [69]. Кроме того, исследования с использованием молекулярных и культуральных технологий помогут установить механизмы взаимодействия микроорганизмов друг с другом, с эпителиальными клетками хозяина, генетическими факторами человека и разнообразными физиологическими и инфекционными условиями [70, 71].

Для получения достоверных ПЦР-результатов первостепенное значение имеет организация контроля качества на пре-аналитическом этапе. Пре-

аналитический этап (долабораторный и лабораторный), включающий качество взятия биоматериала, хранение, транспортировку и предварительную обработку, требует обязательной стандартизации. Одним из способов контроля правильности взятия биоматериала может являться оценка содержания геномной ДНК человека в образце [72].

Таким образом, более широкое внедрение современных молекулярно-генетических методов в практическое здравоохранение значительно расширит диагностические возможности оценки состояния влагалищного биотопа, что позволит своевременно диагностировать как клинически выраженные проявления, так и скрытые формы БВ.

Сравнительная оценка результатов лабораторных исследований у пациентов «классическими» методами и МАНК

Оценка клинико-микробиологических показателей у пациентов на фоне бактериального вагиноза

С целью изучения микробиологической структуры БВ, возможности половой трансмиссии ряда этиологических агентов, клинических особенностей течения БВ были проанализированы истории болезней пациентов с БВ и их половых партнеров. Группу исследования составили женщины (n=91), страдающие БВ и их половые партнеры (n=91), которые были обследованы на наличие возбудителей ИППП и БВ. По результатам обследования пациенты были разделены на 4 группы, в зависимости от клинико-микробиологических вариантов течения БВ (рис. 14).

Группа 1 (n=31) - «классическое» симптоматическое течение БВ у женщин, лабораторно подтвержденное, сопровождалось отсутствием клинических проявлений поражения МПО у мужчин и отрицательными лабораторными тестами.

Группа 2 (n=18) - клинически и лабораторно выраженное течение БВ у женщин сопровождалось асимптомным выделением возбудителей

G.vaginalis, *A.vaginae* и *G.vaginalis*+*A.vaginae* в отделяемом мочеполовых органов их половых партнеров.

Группа 3 (n=23) - асимптомное клиническое течение БВ у женщин в сочетании с положительными результатами лабораторных тестов сопровождалось симптоматическим течением у мужчин (баланит, баланопостит, уретрит) и положительными результатами лабораторных тестов.

Группа 4 (n=19) - асимптоматическое течение БВ у лиц обоего пола в комбинации с положительными результатами микроскопического и ПЦР исследований.

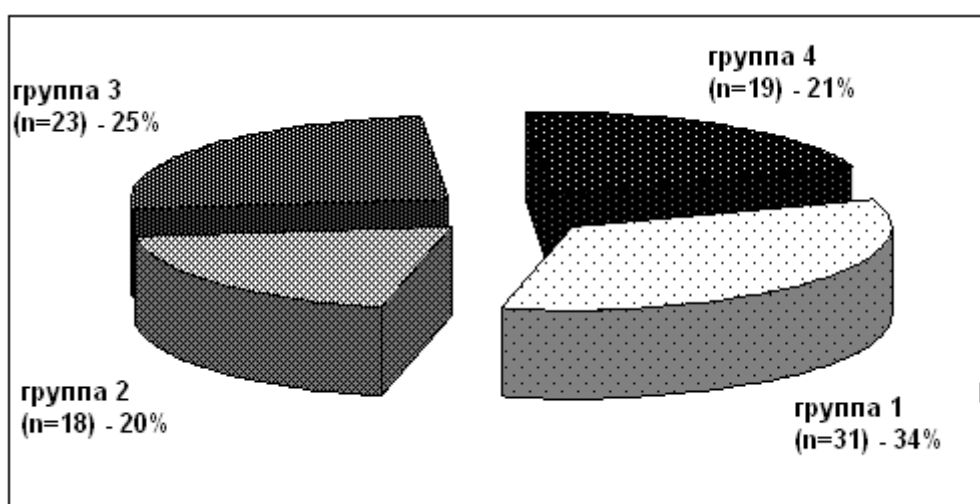


Рисунок 14 – Распределение пациентов с БВ по группам.

Оценка клинико-микробиологических показателей у пациентов на фоне БВ проводилась по наличию клинических проявлений, а также с применением методов микроскопии и ПЦР-анализа. Клинические проявления БВ были выявлены у 53,8% (n=49) обследованных пациенток. По данным микроскопии наличие ключевых клеток и отсутствие лактобактерий были обнаружены у 100% пациенток (n=91), а более 15 эпителиальных клеток в поле зрения – у 82,4% (n=75) пациенток.

Результаты, полученные в ходе выполнения ПЦР-анализа, позволили установить присутствие в биологическом материале пациенток ДНК *G.vaginalis* (как в качестве единственного инфекционного агента, так и в со-

стае ассоциации возбудителей) в 91,2 % (n=83) случаев, присутствие ДНК *A.vaginae* (как в качестве единственного инфекционного агента, так и в составе ассоциации возбудителей) в 74,7 % (n=68) случаев. При этом совместное присутствие *G.vaginalis* и *A.vaginae* было выявлено в 65,9% (n=60) случаев. Также в биологическом материале пациентов с применением метода ПЦР было проведено выявление ДНК *Ur.urealiticum*, *M. hominis*, а также других возбудителей ИППП (*Ch.trachomatis*, *T. vaginalis*, *M.genitalium*).

Сбор данных анамнеза позволил установить, что отягощенный акушерский анамнез был у 57,1% (n=52) обследованных пациенток, а рецидивы БВ – у 11,0% (n=10) (табл. 8).

Таблица 8 – Структура бактериального вагиноза у женщин в группе исследования

Показатели	Количество пациентов (n=91)	
	абс.	%
Клинические проявления	49	53,8
Микроскопия		
Ключевые клетки	91	100
Отсутствие лактобактерий	91	100
Эпителиальный клетки более 15 в поле зрения	75	82,4
Результаты ПЦР исследования		
<i>Gardnerella vaginalis</i>	83	91,2
<i>Atopobium vaginae</i>	68	74,7
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	60	65,9
<i>Ur.urealiticum</i>	44	48,4
<i>M. hominis</i>	21	23,1
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	13	14,3
Другие возбудители ИППП	52	57,1
Отягощенный акушерский анамнез	49	53,8
Рецидив бактериального вагиноза	10	11,0

У пациентов группы 1 – «классическое» течение (обнаружение 3 из 4 положительных критериев по Амселю) 34% (n=31) пациентов – наличие БВ сопровождалось положительными результатами микроскопии в 100% случаев, обнаружением ДНК *G. vaginalis* у 87,1% обследуемых пациенток данной группы, *A. vaginae* – у 35,5%, одновременным выделением возбудителей *G.vaginalis*+*A.vaginae* – у 22,6%, ДНК возбудителей микоплазмозов (*M.hominis*, *Ur.urealiticum*) у пациентов данной группы не была выявлена,

ДНК других возбудителей ИППП выявлена у 16,1% пациенток. «Классическое течение» бактериального вагиноза у женщин не сопровождалось рецидивами заболевания ($n=0$), отягощенный акушерский анамнез был отмечен лишь у 9,7% ($n=3$) пациенток.

У половых партнеров, пациенток данной группы отсутствовали клинические проявления поражения мочеполовых органов (МПО), результаты микроскопического и ПЦР исследований на наличие в биологическом материале мужчин *G.vaginalis*, *A.vaginae*, *Ur.urealiticum*, *M. hominis* были отрицательными (табл. 9).

Таблица 9 – Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 1

Показатели	% женщин, (n=31)	% мужчин, (n=31)
Клинические проявления	100,0**	0,0
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	0,0
Отсутствие лактобактерий	100,0**	0,0
Эпителиальный клетки более 15 в поле зрения	54,8	54,8
Результаты ПЦР исследования		
<i>Gardnerella vaginalis</i>	87,1**	0,0
<i>Atopobium vaginae</i>	35,5**	0,0
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	22,6**	0,0
<i>Ur.urealiticum</i>	0,0	0,0
<i>M. hominis</i>	0,0	0,0
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	0,0	0,0
Другие возбудители ИППП	16,1	0,0
Отягощенный акушерский анамнез	9,7	0,0
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	0,0

Примечание — ** — достоверное отличие между женщинами и мужчинами, $p<0,01$

В группу 2 было включено 18 (20%) обследованных пар пациентов. В данной группе клинически выраженное течение БВ у женщин сопровождалось асимптомным выделением следующих возбудителей в отделяемом мочеполовых органов их половых партнеров: *G.vaginalis* у 83,3% ($n=15$), *A.vaginae* — у 77,8% ($n=14$), *G.vaginalis*+*A.vaginae* — у 61,1% ($n=11$),

Ur.urealiticum – 61,1% (n=11), M. hominis – у 55,6% (n=10), Ur.urealiticum+M.hominis – у 27,8% (n=5). Среди пациентов данной группы рецидивы БВ и отягощенный акушерский анамнез были отмечены у 55,6% (n=10) пациенток, другие возбудители ИППП были выделены у 66,7% (n=12) пациенток (табл. 10).

В биологическом материале пациентов-мужчин данной группы методом ПЦР были выявлены ДНК T.vaginalis – в 83,3% (n=15) случаев, ДНК A.vaginae – в 77,8% (n=14) случаев, ДНК Ur.urealiticum – в 61,1% (n=11) случаев, ДНК M. hominis – в 55,6% (n=10) случаев, ДНК других возбудителей ИППП – в 66,7% (n=12) случаев.

Таблица 10 – Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 2

Показатели	% женщин, (n=18)	% мужчин, (n=18)
Клинические проявления	100,0**	5,6
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	0,0
Отсутствие лактобактерий	100,0**	0,0
Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения	88,9	72,2
Результаты ПЦР исследования		
Gardnerella vaginalis	94,4	83,3
Atopobium vaginae	88,9	77,8
G.vaginalis+A.vaginae	83,3	61,1
Ur.urealiticum	66,7	61,1
M. hominis	44,4	55,6
Ur.urealiticum+M.hominis	33,3	27,8
Другие возбудители ИППП	66,7	66,7
Отягощенный акушерский анамнез	55,6	-
Рецидив бактериального вагиноза	55,6	55,6

Примечание — ** — достоверное отличие между женщинами и мужчинами, $p < 0,01$

У пациентов группы 3, которая составила 25% (n=23) от обследуемых пар, было установлено асимптомное течение БВ у женщин в сочетании с положительными результатами микроскопического исследования в 100% случаев (n=23), положительными результатами ПЦР: G. vaginalis – у 91,3%

(n=21) пациентов, *A. vaginae* – у 100,0% (n=23) пациентов, *G.vaginalis*+*A.vaginae* – у 91,3% (n=21) пациентов. При этом у половых партнеров-мужчин течение воспалительного процесса сопровождалось симптоматическим течением заболевания (баланит, баланопостит, уретрит), сдвигами в показателях микроскопического исследования: ключевые клетки были выделены в 17,4% (n=4) случаев; а также, при проведении ПЦР-анализа: выявлением в биологическом материале ДНК *G.vaginalis* – в 87,0% (n=20) случаев, ДНК *A.vaginae* – в 82,6% (n=19) случаев, совместное присутствие ДНК *G.vaginalis*+*A.vaginae* – в 69,6% (n=16) случаев.

Другие возбудители ИППП регистрировались в данной подгруппе пациентов в 100% (n=23) случаев, отягощенный акушерский анамнез отмечался у 91,3% пациенток (n=21) (табл. 11).

Таблица 11 – Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 3

Показатели	% женщин, (n=23)	% мужчин, (n=23)
Клинические проявления	0,0**	100,0
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	17,4
Отсутствие лактобактерий	100,0**	0,0
Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения	100,0	100,0
Результаты ПЦР исследования		
<i>Gardnerella vaginalis</i>	91,3	87,0
<i>Atopobium vaginae</i>	100,0	82,6
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	91,3	69,6
<i>Ur.urealiticum</i>	78,3**	39,1
<i>M. hominis</i>	30,4	26,1
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	17,4	13,0
Другие возбудители ИППП	100,0	100,0
Отягощенный акушерский анамнез	91,3	87,0
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	0,0

Примечание — ** — достоверное отличие между женщинами и мужчинами, $p < 0,01$

У пациентов в группе 4 (n=19) было установлено асимптоматическое течение БВ у лиц обоего пола в сочетании положительными результатами

микроскопического исследования (в 100% (n=19) случаев у женщин, и 15,8% (n=3) у мужчин). При ПЦР-исследовании была выявлена ДНК инфекционных агентов: *G.vaginalis* – у 94,7% (n=18) женщин и 100% (n=19) мужчин, *A.vaginae* – у 94,7% (n=18) женщин и 78,9% (n=15) мужчин, *G.vaginalis*+*A.vaginae* – у 89,5% (n=17) женщин и 78,9% (n=15) мужчин) Отягощенный акушерский анамнез был отмечен у 78,9% пациенток данной группы (табл. 12).

Таблица 12 – Характеристика клинико-микробиологических показателей у пациентов группы 4

Показатели	% женщин, (n=19)	% мужчин, (n=19)
Клинические проявления	0,0%	0,0
Микроскопия		
Ключевые клетки	100,0**	15,8
Отсутствие лактобактерий	100,0**	0,0
Эпителиальный клетки более 15 в поле зрения	100,0	100,0
Результаты ПЦР исследования		
<i>Gardnerella vaginalis</i>	94,7	100,0
<i>Atopobium vaginae</i>	94,7	78,9
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	89,5	78,9
<i>Ur.urealiticum</i>	73,7	52,6
<i>M. hominis</i>	31,6	26,3
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	15,8	10,5
Другие возбудители ИППП	63,2	63,2
Отягощенный акушерский анамнез	78,9	78,9
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	0,0

Примечание — ** — достоверное отличие между женщинами и мужчинами, $p<0,01$

Наименьшая частота встречаемости отягощенного акушерского анамнеза была выявлена в группе 1 и находилась на уровне 9,7%, а наиболее часто данное осложнение встречалось в группе 3 (91,3%) (рис. 15). Анализ полученных данных позволил установить достоверные отличия частоты встречаемости отягощенного акушерского анамнеза в группах 2, 3, 4 в сравнении с группой 1 ($p<0,01$), а также между группами 2 и 3 ($p<0,01$).

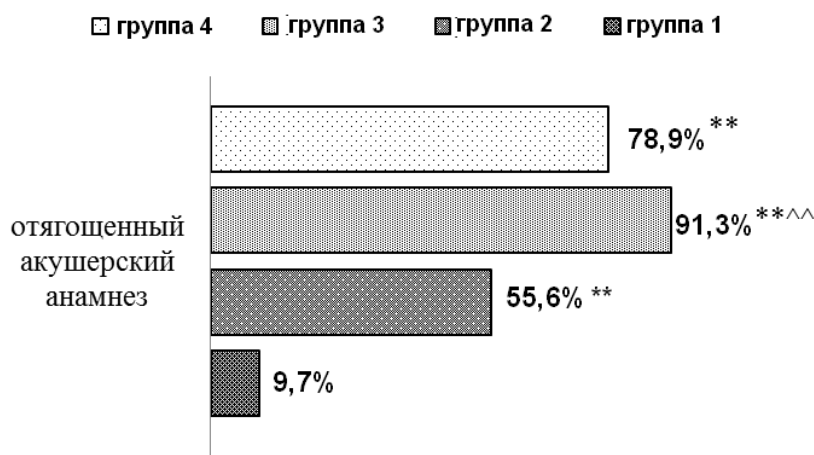


Рисунок 15 – Частота встречаемости отягощенного акушерского анамнеза в обследованных группах пациенток.

Примечания: ** — достоверное отличие от группы 1, $p < 0,01$
 ^^ — достоверное отличие от группы 2, $p < 0,01$

По результатам проведения ПЦР-анализа были установлены частота инфицирования пациенток другими возбудителями ИППП, *Ur.urealiticum*, *M.hominis* *G.vaginalis*, *A.vaginae* (рис. 16).

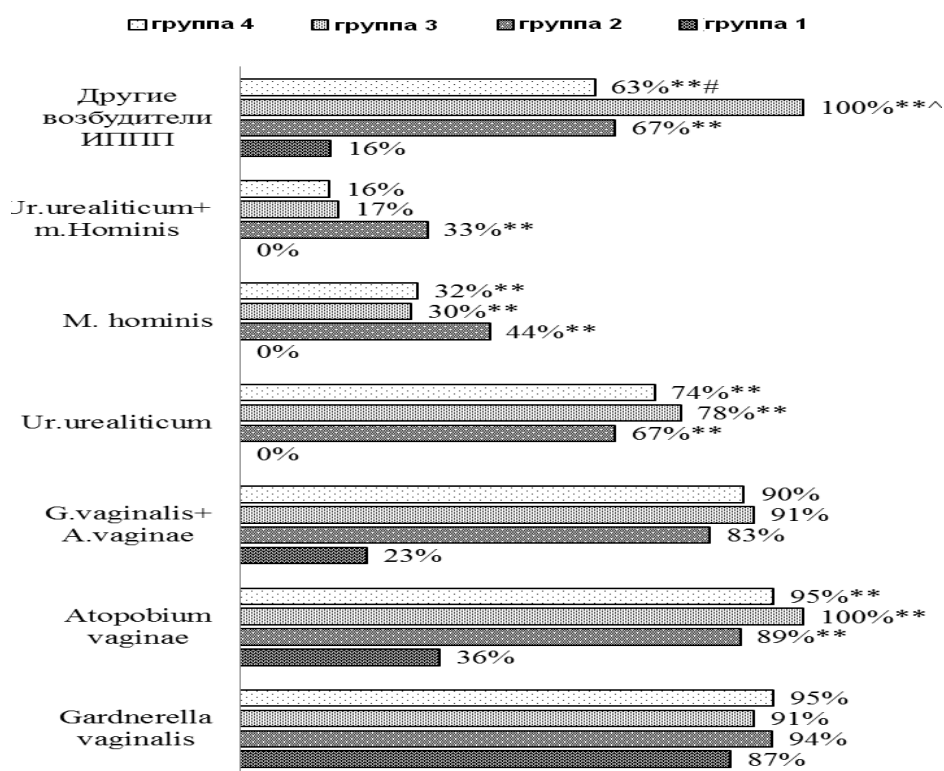


Рисунок 16 – Результаты ПЦР исследования в обследованных группах у женщин.

Примечания: ** — достоверное отличие от группы 1, $p < 0,01$
 ^^ — достоверное отличие от группы 2, $p < 0,01$
 # — достоверное отличие от группа 2, $p < 0,05$

Анализ полученных данных позволил установить достоверные отличия частоты встречаемости инфицирования пациенток другими возбудителями ИППП, *Ur.urealiticum*, *M.hominis* *G.vaginalis*, *A.vaginae* в группах 2, 3, 4 по сравнению с группой 1 ($p<0,01$).

Результаты ПЦР-анализа и анализ полученных данных, позволили частоту инфицирования другими возбудителями ИППП, *Ur.urealiticum*, *M.hominis* *G.vaginalis*, *A.vaginae* у пациентов-мужчин (рис. 17). Достоверные отличия были найдены в группах 2, 3, 4 по сравнению с группой 1 ($p<0,01$).

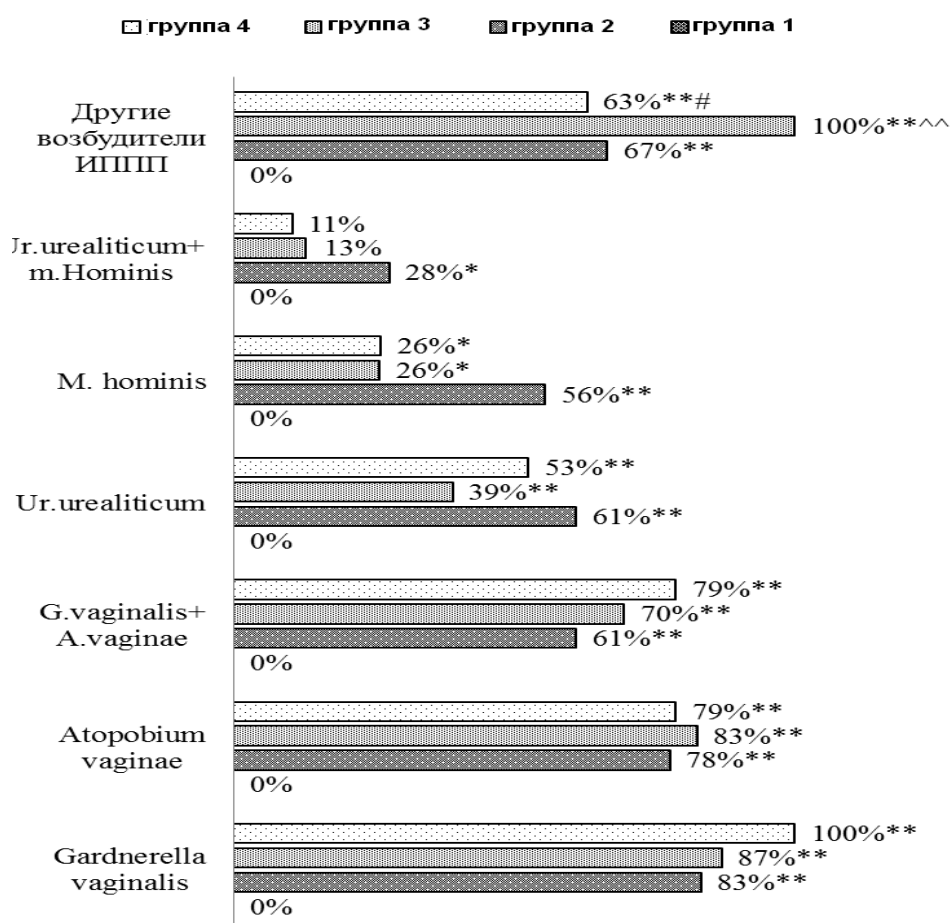


Рисунок 17 – Результаты ПЦР в обследованных группах у мужчин.

Примечания:
 * — достоверное отличие от группа 1, $p<0,05$
 ** — достоверное отличие от группы 1, $p<0,01$
 ^^ — достоверное отличие от группы 2, $p<0,01$
 # — достоверное отличие от группа 2, $p<0,05$

Проведенное исследование позволило продемонстрировать высокую чувствительность полимеразной цепной реакции в качестве метода лабораторной диагностики БВ у женщин и дало возможность выявить ДНК как единичных инфекционных агентов, так и ассоциаций бактерий-возбудителей

БВ в биологическом материале из МПО мужчин. С использованием метода ПЦР у пациентов-мужчин были выявлены ДНК *G.vaginalis* – у 91,2 % (n=83) обследуемых, ДНК *A. vaginae* – 74,7% (n=68), а также ассоциация *G.vaginalis* и *A. vaginae* – в 65,9% (n=60) случаев.

Анализ среднего значения положительных ПЦР выявления ДНК инфекционных агентов в биологическом материале мужчин и женщин, позволил установить, что в группах 2 и 4 не было достоверных отличий между средними значениями положительных ПЦР у мужчин и у женщин, а в группах 1 и 3 отличия были достоверны между группами мужчин и женщин (рис. 18).

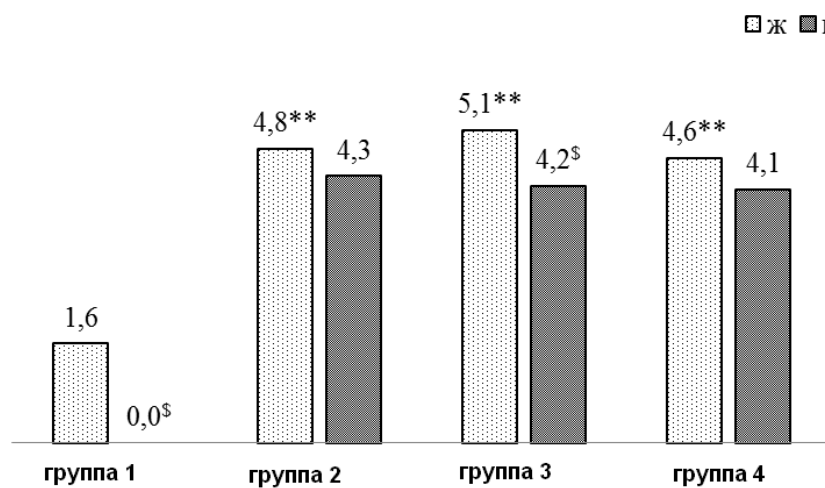


Рисунок 18 – Распределение среднего значения положительных ПЦР по группам в зависимости от пола.

Примечания: ** — достоверное отличие от группы 1, $p < 0,01$
 \$ — достоверное отличие между женщинами и мужчинами внутри группы, $p < 0,05$

Учитывая полимикробную ассоциацию возбудителей БВ, в дальнейшем требуется внедрение и апробация методов комплексной оценки микробиоты слизистых МПО как у женщин, так и у мужчин на основе полимеразной цепной реакции с целью разработки алгоритма дифференцированного ведения пациентов.

Сравнительная оценка клинико-микробиологических показателей в зависимости от пола и характера течения заболевания

Сравнительный анализ полученных клинико-микробиологических показателей позволил охарактеризовать основные отличия между выделенными группами пациентов. Так в группах 1 и 2 у пациенток-женщин наблюдались клинические проявления БВ в 100% случаев, а в группах 3 и 4 клинические проявления у пациенток отсутствовали.

Данные микроскопического исследования биологического материала позволили выявить достоверные различия по показателю «Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения» между группой 1 и группами 2, 3, 4 ($p < 0,01$), также достоверные различия по данному показателю были найдены для групп 2 и 4 ($p < 0,01$).

Результаты, полученные после проведения ПЦР-исследований, позволили выявить высокий процент инфицирования *G.vaginalis* во всех группах исследования (87,1 – 94,7%). Высокая частота инфицирования *A.vaginae* была характерна для групп 2, 3, 4 (88,9 – 100%), и имела достоверные отличия ($p < 0,01$) от частоты в группе 1 – 35,5% случаев. Частота ассоциаций *G.vaginalis*+*A.vaginae* также была достоверно выше в группах 2, 3, 4 ($p < 0,01$).

Выявление ДНК возбудителей микоплазменной инфекции – *Ur.urealiticum* и *M. hominis*, а также их ассоциации – позволило установить преобладание инфицирования *Ur.urealiticum* в группах 2, 3, 4 (66,7 – 78,3%). При этом частота выявления ассоциаций *Ur.urealiticum* и *M. hominis* в группах 3, 4 не имела достоверных отличий от группы 1, а в группе 2 отличия были достоверны в сравнении с группой 1 ($p < 0,01$).

Частота выявления ДНК других возбудителей ИППП (*Ch.trachomatis*, *T. vaginalis*, *M.genitalium*) была максимальной в группе 3 и достигала 100%, в группах 2 и 4 данный показатель составлял 66,7% и 63,2% соответственно. При этом все группы имели достоверные отличия в сравнении с группой 1, а также достоверные различия были установлены между показателями групп 3 и 4.

Частота отягощенного акушерского анамнеза в группах 2, 3, 4 была выявлена на уровне от 55,6% в группе 2 до 91,3% в группе 3. Достоверные отличия были выявлены для показателей 2, 3, 4 групп в сравнении с группой 1, а также при сравнении показателей 2 и 3 групп ($p < 0,01$).

Рецидивы БВ были характерны только для пациентов группы 2. Частота рецидивов была выявлена на уровне 55,6% (табл. 13).

Таблица 13 – Сравнительная оценка клинико-микробиологических показателей в зависимости от характера течения заболевания среди женщин

Показатели	Группа 1, n=31	Группа 2, n=18	Группа 3, n=23	Группа 4, n=19
Клинические проявления	100,0	100,0	0,0 ^{^^}	0,0 ^{^^}
Микроскопия				
Ключевые клетки	100,0	100,0	100,0	100,0
Отсутствие лактобактерий	100,0	100,0	100,0	100,0
Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения	54,8	88,9*	100,0**	100,0** [^]
Результаты ПЦР исследования				
<i>Gardnerella vaginalis</i>	87,1	94,4	91,3	94,7
<i>Atopobium vaginae</i>	35,5	88,9**	100,0**	94,7**
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	22,6	83,3**	91,3**	89,5**
<i>Ur.urealiticum</i>	0,0	66,7**	78,3**	73,7**
<i>M. hominis</i>	0,0	44,4**	30,4**	31,6**
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	0,0	33,3**	17,4	15,8
Другие возбудители ИППП	16,1	66,7**	100,0** ^{^^}	63,2** [#]
Отягощенный акушерский анамнез	9,7	55,6**	91,3** ^{^^}	78,9**
Рецидив бактериального вагиноза	0,0 ^{^^}	55,6**	0,0 ^{^^}	0,0 ^{^^}

Примечания: ** — достоверное отличие от группы 1, $p < 0,01$

^{^^} — достоверное отличие от группы 2, $p < 0,01$

[#] — достоверное отличие от группа 3, $p < 0,05$

У пациентов-мужчин клинические проявления воспалительных процессов МПО наблюдались только в группах 2 и 3 в 5,6% и 100% случаев соответственно, в группах 1 и 4 клинические проявления у пациентов отсутствовали.

По данным микроскопического исследования ключевые клетки в биологическом материале мужчин были выявлены у пациентов 3 и 4 групп в 17,4% и 15,8% случаев. Во всех группах у пациентов были выявлены более

15 эпителиальных клеток в поле зрения: от 54,8% в группе 1, до 100% в группах 3 и 4. Достоверные различия по данному показателю были установлены между группой 1 и группами 3, 4 ($p<0,01$), а также между группами 2 и 4 ($p<0,05$).

Результаты, полученные после проведения ПЦР-исследований, позволили выявить отсутствие ДНК патологических агентов в биологическом материале мужчин группы 1. У мужчин групп 2, 3, 4 были обнаружены ДНК *G.vaginalis* (83,3 – 100%), ДНК *A.vaginae* (77,8 – 82,6%), ДНК *G.vaginalis*+*A.vaginae* (61,1 – 78,9%), ДНК *Ur.urealiticum* (39,1 – 61,1%), ДНК *M. hominis* (26,1 – 55,6%). Показатели частоты выявления данных инфекционных агентов (табл. 14) в группах 2, 3, 4 имели достоверные отличия с показателями группы 1 ($p<0,01$).

Таблица 14 – Сравнительная оценка клинико-микробиологических показателей в зависимости от характера течения заболевания среди мужчин

Показатели	Группа 1, n=31	Группа 2, n=18	Группа 3, n=23	Группа 4, n=19
Клинические проявления	0,0	5,6	100,0**^^	0,0#
Микроскопия				
Ключевые клетки	0,0	0,0	17,4	15,8
Отсутствие лактобактерий	0,0	0,0	0,0	0,0
Эпителиальные клетки более 15 в поле зрения	54,8	72,2	100,0**^^	100,0**^
Результаты ПЦР исследования				
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,0	83,3**	87,0**	100,0**
<i>Atopobium vaginae</i>	0,0	77,8**	82,6**	78,9**
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	0,0	61,1**	69,6**	78,9**
<i>Ur.urealiticum</i>	0,0	61,1**	39,1**	52,6**
<i>M. hominis</i>	0,0	55,6**	26,1*	26,4*
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	0,0	27,8*	13,0	10,5
Другие возбудители ИППП	0,0	66,7**	100,0**^^	63,2**#
Отягощенный акушерский анамнез	0,0	55,6**	87,0**^^	78,9**
Рецидив бактериального вагиноза	0,0	55,6**	0,0^^	0,0^^

Примечания:

* — достоверное отличие от группа 1, $p<0,05$

** — достоверное отличие от группы 1, $p<0,01$

^ — достоверное отличие от группа 2, $p<0,05$

^^ — достоверное отличие от группы 2, $p<0,01$

— достоверное отличие от группа 3, $p<0,05$

Анализ частоты совпадений результатов обследования в парах половых партнеров, позволил установить, что совпадение результатов в 100% случаев было получено для группы 4 по показателю «клинические проявления», для группы 3 по показателю «эпителиальных клетки более 15 в поле зрения», для группы 1 – «Ur.urealiticum», «M. hominis», «Ur.urealiticum+M.hominis», а также для групп 3 и 4 – «Рецидив бактериального вагиноза» (табл. 15).

Таблица 15 – Процент совпадения микробиологических результатов в паре в подгруппах

Показатели	Группа 1, n=31	Группа 2, n=18	Группа 3, n=23	Группа 4, n=19
Клинические проявления	0,0	11,1	4,3	100,0**^^#
Микроскопия				
Ключевые клетки	0,0	0,0	17,4	15,8
Отсутствие лактобактерий	0,0	0,0	0,0	0,0
Эпителиальных клетки более 15 в поле зрения	54,8	61,1	100,0**^	94,7**^
Результаты ПЦР исследования				
<i>Gardnerella vaginalis</i>	16,1	77,8**	78,3**	89,5**
<i>Atopobium vaginae</i>	61,3	77,8	82,6	78,9
<i>G.vaginalis</i> + <i>A.vaginae</i>	74,2	66,7	65,2	68,4
<i>Ur.urealiticum</i>	100,0	50,0**	43,5**	36,8**
<i>M. hominis</i>	100,0	55,6**	52,2**	63,2**
<i>Ur.urealiticum</i> + <i>M.hominis</i>	100,0	38,9**	69,6**	73,7*
Другие возбудители ИППП	80,6	55,6	95,7^^	78,9
Отягощенный акушерский анамнез	90,3	61,1*	78,3	63,2*
Рецидив бактериального вагиноза	96,8	38,9**	100,0^^	100,0^^

Примечания:

* — достоверное отличие от группа 1, $p < 0,05$

** — достоверное отличие от группы 1, $p < 0,01$

^ — достоверное отличие от группа 2, $p < 0,05$

^^ — достоверное отличие от группы 2 $p < 0,01$

— достоверное отличие от группа 3, $p < 0,05$

Комментируя результаты собственных исследований можно сказать:

- 1 Среди обследованных пациентов - 91 пара (половые партнеры – мужчина и женщина), прошедших лечение по поводу бактериального вагиноза (БВ). В зависимости от клинико-микробиологических показателей, выявленных в ходе обследования, сформированы 4 группы: группа 1 (n=31) – «классическое» симптоматическое течение БВ у женщин, лабораторно подтвержденное, сопровождалось отсутствием клинических проявлений поражения МПО у мужчин и отрицательными лабораторными тестами; группа 2 (n=18) – клинически и лабораторно выраженное течение БВ у женщин сопровождалось асимптомным выделением возбудителей *G.vaginalis*, *A.vaginae* и *G.vaginalis*+*A.vaginae* в отделяемом мочеполовых органов их половых партнеров; группа 3 (n=23) – асимптомное клиническое течение БВ у женщин в сочетании с положительными результатами лабораторных тестов сопровождалось симптоматическим течением у мужчин (баланит, баланопостит, уретрит) и положительными результатами лабораторных тестов; группа 4 (n=19) – асимптоматическое течение БВ у лиц обоего пола в комбинации с положительными результатами микроскопического и ПЦР исследований.
- 2 Клинические проявления БВ были выявлены у 53,8% (n=49) обследованных пациенток. По данным микроскопии наличие ключевых клеток и отсутствие лактобактерий были обнаружены у 100% пациенток (n=91), а более 15 эпителиальных клеток в поле зрения – у 82,4% (n=75) пациенток. В биологическом материале пациенток с БВ выявлено присутствие ДНК *G.vaginalis* в 91,2 % (n=83) случаев, ДНК *A.vaginae* в 74,7 % (n=68) случаев. При этом совместное присутствие *G.vaginalis* и *A.vaginae* было выявлено в 65,9% (n=60) случаев. Присутствие ДНК *Ur.urealiticum* было выявлено в 48,4% (n=44) случаев, *M. hominis* – в 23,1% (n=21) случаев, ассоциация *Ur.urealiticum* и *M. hominis* – в 14,3% (n=13) случаев. Наличие ДНК других возбудителей ИППП (*Ch.trachomatis*, *T. vaginalis*, *M.genitalium*) было установлено в 57,1% (n=52) случаев.

- 3 У пациентов-мужчин с применением метода ПЦР были выявлены ДНК *G.vaginalis* – у 91,2 % (n=83) обследуемых, ДНК *A. vaginae* – 74,7% (n=68), а также ассоциация *G.vaginalis* и *A. vaginae* – в 65,9% (n=60) случаев.
- 4 Анализ частоты совпадений результатов обследования в парах половых партнеров, позволил установить, что совпадение результатов в 100% случаев было получено для группы 4 по показателю «клинические проявления», для группы 3 по показателю «эпителиальных клетки более 15 в поле зрения», для группы 1 – «*Ur.urealiticum*», «*M. hominis*», «*Ur.urealiticum*+*M.hominis*», а также для групп 3 и 4 – «Рецидив бактериального вагиноза».

МУЛЬТИПРАЙМЕРНЫЕ МАНК В ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

Мультипраймерные МАНК (ММАНК) предназначены для исследования состояния биоценоза урогенитального тракта у женщин методом полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени и используются для выявления ДНК условно-патогенных микроорганизмов, ДНК лактобактерий и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала). Данное исследование предназначено для исследования качественного и количественного состава биоценоза урогенитального тракта. Принцип метода основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающемся в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройкой полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

Набор реагентов ММАНК включает: смесь для ПЦР-амплификации, специфичную для всех бактерий (общая бакмасса), смесь, специфичную для нормофлоры (*Lactobacillus spp*) и смеси, специфичные для условно-патогенных микроорганизмов. В реакционную смесь для проведения ПЦР введены ДНК-зонды, каждый из которых несет флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации. ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации ДНК общей бакмассы, лактобактерий и большинства условно-патогенных микроорганизмов, помечены флуоресцентными метками FAM, ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации

внутреннего контрольного образца, контроля взятия материала и микоплазмы генитальной, помечены HEX.

После прохождения амплификации, по показателю индикаторного цикла программно рассчитывается количество общей бакмассы, лактобактерий и каждого из условно-патогенных микроорганизмов. По их соотношению можно судить о состоянии биоценоза. Для исключения ложноотрицательных результатов учитывается показатель амплификации геномной ДНК человека (контроль взятия биологического материала). Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоев, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоев и превращение их в реакционную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Диагностическая чувствительность данного исследования для выявления дисбиотических состояний составляет 88,7%, специфичность – 89,6%.

Для бактериального вагиноза чувствительность исследования достигает 95%.

Специфичность набора реагентов подтверждена сиквенсом 16s РНК.

Клиническая трактовка полученных результатов

Оценка результатов мультипраймерного тестирования пациентов на основании результатов лабораторного исследования осуществляется врачом-лаборантом. Вместе с тем ряд авторов (Болдырева М.П., Донников А.Е., Тумбинская Л.В., 2010) применяют термины «дисбиоз», «нормоценоз» (рис. 19). Учитывая отсутствие в МКБ 10 данной нозологической формы, а также потребность не только количественной оценки видового состава микрофлоры, но и клинической интерпретации полученных результатов, рекомендуется клинический диагноз устанавливать на основании оценки результатов микроскопического исследования и ММАНК.

1 этап. Учет результатов микроскопического исследования: при повышении уровня лейкоцитов в отделяемом заднего свода влагалища более 10-15 и наличии 3х из 4-х критериев Амсея устанавливается диагноз «бактериальный вагинит», при отсутствии лейкоцитарной реакции – «бактериальный вагиноз».

2 этап. Учет результатов ММАНК: оценка доли лактобактерий относительно общей биомассы (доля лактобактерий от 20 до 80% - умеренное снижение нормофлоры; доля лактобактерий менее 20% - выраженное).

3 этап. Учет ММАНК наличия патогенных микроорганизмов *M. genitalium*: выявлены или не выявлены.

4 этап. Учет ММАНК условно-патогенных микроорганизмов (виды *Ureaplasma* (*urealyticum* + *parvum*), *M. hominis*, виды дрожжеподобных грибов рода *Candida*) на основании количественных характеристик: до 1000 ГЭ в образце идентифицированные возбудители трактуются как условно-патогенные и не требующие проведения терапии, и более 1000 ГЭ в образце как патогенные.

5 этап. Оценка факультативно- и облигатно-анаэробных микроорганизмов осуществляется с учетом количественного и видового состава микроорганизмов и указанием преобладающей группы возбудителей.

Факультативно - и облигатно-анаэробные микроорганизмы

- доля микроорганизма в ОБМ $-2 \lg$ (менее 1%)
- доля микроорганизма в ОБМ $-2 \lg$ до $-1 \lg$ (от 1% до 10%)
- доля микроорганизмов в ОБМ от $-1 \lg$ до $-0,4 \lg$ (от 10% до 40%)

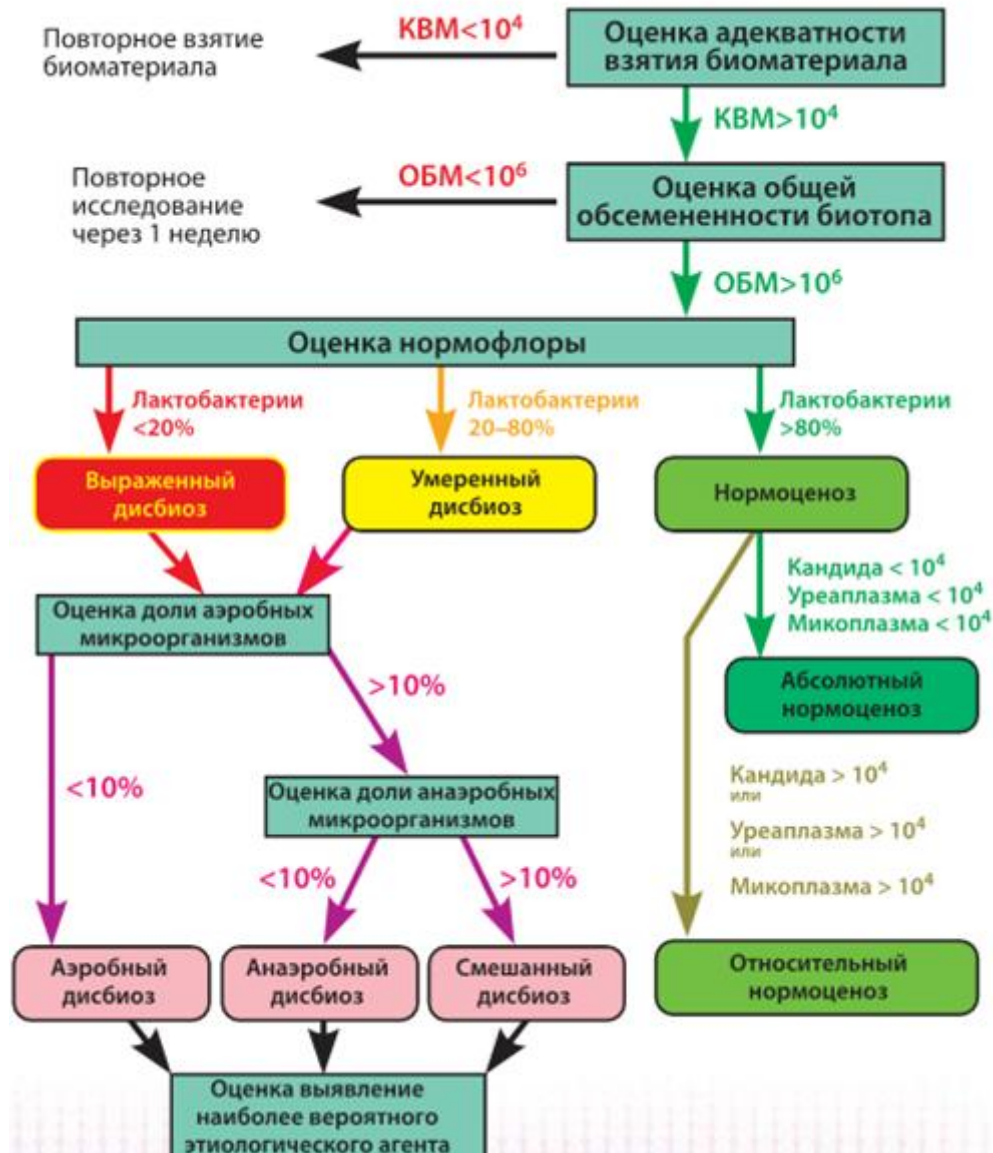


Рисунок 19 – Алгоритм формирования заключения для женщин репродуктивного возраста (вагина).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wincellaus S.J. Recurrent bacterial vaginosis-an old approach to a new problem / S.J. Wincellaus, G.Calver // Int J STD AIDS. – 1996.– Vol. 7, № 4. – P. 284-287.
2. Анкирская А.С., Бактериальный вагиноз (Обзор литературы) // Акушерство и гинекология. – 2005. – № 3. – с. 10-13.
3. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов. (Медицинская технология). М.; 2011. 20 с.
4. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy /Bradshaw C.S. [et al.] // J Infect Dis. – 2006 . – Vol. 194, № 6. – P. 828-836.
5. Современные подходы к диагностике и лечению негонококковых уретритов / Кисина В.И. [и др.] // Consilium Medicum. – 2005. – Т.7, №1.
6. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Опыт микробиологической диагностики оппортунистических инфекций влагалища / А.С. Анкирская, В.В. Муравьева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001 – Т.3. – №2. – С.190-194.
7. Heinemann C. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy /Heinemann C, Reid G //Can J Microbiol. – 2005. Vol. 51, № 9. – P. 777-781.
8. Yan D.H., Comparison of main lactobacillus species between healthy women and women with bacterial vaginosis /Yan DH, Lü Z, Su JR // Chin Med J (Engl). – 2009. – Vol. 122, № 22.– P. 2748-2751.
9. Association between *Lactobacillus* species and bacterial-vaginosis associated bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women / Tamrakar R. [et al.] // BMC Infect. Dis. – 2007. – № 7. – P. 128.
10. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women / Pabich W.L. [et al.] // J Infect Dis. – 2003. – Vol. 188, № 7.– P. 1054-1058.

11. A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology / Chernes T.L. [et al.] // *Sex Transm Dis.* – 2008. – Vol. 35, № 1. – P. 78-83.
12. Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women. Fethers K. [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 2 – e30633.
13. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001–2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health / E.H Koumans [et al.] // *Sex Transm Dis.* – 2007. – № 34. – P. 864–869.
14. Exposure to chronic stress and ethnic differences in rates of bacterial vaginosis among pregnant women / J.F. Culhane [et al.] // *Am J Obstet Gynecol.* – 2002. – №187. – P 1272–1276.
15. Biotypes and antibiotic resistance patterns of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from healthy women and women with bacterial vaginosis / I.Tosun [et al.] // *Mikrobiyol Bul.* – 2007. – Vol. 41, № 1. – P. 21-27.
16. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз. - Санкт-Петербург, 2001. – 363 с.
17. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections in Estonia in 2001-2002: shortcomings with impact on diagnostic quality and surveillance / P. Naaber [et al.] // *Sex Transm Dis.* – 2005. – Vol. 32, № 12. – P. 759-764.
18. Bacterial vaginosis and anaerobic bacteria are associated with endometritis / C.L. Haggerty [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2004. – Vol. 39, № 7. – P.990-995.
19. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage / P.E. Hay [et al.] // *BMJ.* – 1994. – Vol. 308, № 6924. – P.95-98.
20. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation / D.B. DiGiulio // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3, № 8 – e3056.
21. Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints / Schweirtz A. [et al.] // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2006. – №5. – P. 444–452.

22. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques / R.F. Lamont [et al.] // *BJOG*. – 2011. – Vol. 118, № 5. – P. 533-549.
23. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor / C. Marconi // *Am J Reprod Immunol*. – 2011. – Vol. 65, № 6. – P. 549-556.
24. Cultivation-independent analysis of changes in bacterial vaginosis flora following metronidazole treatment / Ferris M.J. [et al.] // *J. Clin. Microbiol*. – 2007. – № 45. – P. 1016–1018.
25. Fredericks D.N., Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis / Fredericks D.N., Fielder T.L., Marrazzo J.M. // *N. Engl. J. Med*. – 2005. – № 353. – P. 1899-1911.
26. O'Hanlon, D.E. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide / O'Hanlon DE Moench TR, Cone RA // *BMC Infect Dis* [Electronic resource]. – 2011. - Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/200>
27. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal Lactobacilli: role of hydrogen peroxide production / A.C. Vallor [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*.]. – 2001. – Vol. 184, № 11. – P. 1431–1436.
28. Kaewsrichan J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens / Kaewsrichan J, Peeyanantarassri K, Kongprasertkit J. // *FEMS Immunology and Medical Microbiology* – 2006. – Vol. 48, № 1. – P. 75–83.
29. Vaginal Microbiota of Healthy Pregnant Mexican Women is Constituted by Four Lactobacillus Species and Several Vaginosis-Associated Bacteria / César Hernández-Rodríguez [et al.] // *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2011. [Electronic resource]. – 2011.– Article ID 851485, 9 pages doi:10.1155/2011/851485.
30. Jones B.M., Amines in semen-free vaginal secretions / Jones B.M. // *Int. J. STD AIDS*. – 1994. – Vol. 5, № 4. – P. 301-302.

31. Jones B.M., The determination of amines in the vaginal secretions of women in health and disease. / Jones BM, al-Fattani M., Gooch H. // *Int J STD AIDS*. – 1994. – Vol.5, № 1. – P. 52-55.
32. Selection, Phenotyping and Identification of Acid and Hydrogen Peroxide Producing Bacteria from Vaginal Samples of Canadian and East African Women / John J. Schellenberg [et al.] // *PLoS One*. 2012; 7(7): e41217.
33. Видовая идентификация влагалищных лактобацилл, выделенных у женщин репродуктивного возраста / А.С. Исаева [и др.] // *акушерство и гинекология*. – 2012. – № 3. – С.60-64.
34. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of immune response. *Nature*, 2007, 18: 819-826.
35. Характеристика биоценозов урогенитального тракта у женщин репродуктивного возраста / Андросова Л.Д. [и др.] // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2013- № 1. – P. 51–53.
36. Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Биология рецепторов врожденной иммунной системы. *Физиол. и патол. Иммунной системы*, 2008, 6: 3-28.
37. Ганковская О.А. «Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием». *Медицинская иммунология*, 2010, 1-2: 87-94.
38. Прошин С.Н., Глушаков Р.И., Шабанов П.Д, Сайковская Л.А., Семенова И.В., Тапильская Н.И. Значение экспрессии TLR для выбора фармакологической коррекции патологии шейки матки и эндометрия. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2011, 6(1): 91-97.
39. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета. *Иммунология* 2005; 26 (6): 368-376.
40. Allison J.P., Benoist C., Chervonsky A. (2011). Nobels: Toll pioneers deserve recognition. *Nature* 479, 178;
41. Kawasaki A, Medzhitov R (October 2004). «Toll-like receptor control of the adaptive immune responses». *Nat. Immunol.* 5 (10): 987–95.

DOI:10.1038/ni1112. PMID 15454922.

- 42.Randhawa AK, Hawn TR (August 2008). «Toll-like receptors: their roles in bacterial recognition and respiratory infections». *Expert Rev Anti Infect Ther* 6 (4): 479–95. DOI:10.1586/14787210.6.4.479. PMID 18662115.
- 43.Роговская С.И., Прилепская В.Н. Профилактика папилломавирусной инфекции и рака шейки матки. *Гинекология*. 2005; 7 (1): 3–6.
- 44.Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women / Genc M.R. [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. – 2004. – Vol. 116, № 2. – P. 152-156.
- 45.Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* / Verstraelen H [et al.] // *J Reprod Immunol*. – 2009. – Vol. 79, № 2.– P. 163-73.
- 46.Дмитриев Г.А. Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций.- Москва: Медицинская книга, Н.Новгород: Издательство НГМА, 2003. 336 с.
- 47.Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases/E. Van Dick, A.Z. Meheus, P.Piot. WHO, 1999.135p.
- 48.Microscopy for STIs/Ed. by C.A.Ison, M.Savage, D.Taylor-Robinson. Yale Press Ltd., London, UK,2001.36p.
- 49.Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations / Amsel R. [et al.] // *Am J Med*. – 1983. – № 74. – P. 14–22.
- 50.Spiegel C.A., Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid / Spiegel C.A., Amsel R., Holmes K.K. // *J Clin Microbiol*. – 1983. – Vol. 18, № 1. – P. 170-177.
- 51.Nugent R.P., Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation / Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. // *J Clin Microbiol*. – 1991. – Vol. 29, № 2. – P. 297-301.
- 52.Ison C.A., Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics / Ison C.A., Hay P.E. // *Sex Transm*

Infect – 2002. – Vol. 78, № 6. – P. 413–415.

- 53.WHO. Sexually transmitted and other reproductive tract infections. A guide to essential practice. Annex 3. Laboratory tests for STI, 2005.
- 54.Laboratory methods for the diagnosis of sexually transmitted diseases/Ed. by B.B.Wentworth, F.N.Judson, M.J.R.Gilchrist. APHA, St.Mary's Press, USA, 1991.340p.
- 55.Савичева А.М., Соколовский Е.В., Домейка М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путем. - СПб: ООО «Издательство Фолиант», 2004. – 128 с.
- 56.Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах под ред.А.И. Карпищенко, Санкт-Петербург, Интермедика, 2002.
- 57.Егорова О.В. С микроскопом на «ты». - СПб.: Интермедика, 2000. 328 с.
- 58.Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections in Belarus / O. Pankratov [et al.] // M. Acta Derm Venereol. – 2011. – Vol. 91, № 1. – P. 64-65.
- 59.Порядок проведения микроскопического исследования мазков из урогенитального тракта. Методические рекомендации для лечащих врачей / А. М. Савичева, Е. В. Соколовский, М. Домейка — Санкт-Петербург: «Издательство Н-Л», 2007.— 60 с.
- 60.Осипов Г.А., Хромато-масс-спектрометрическое исследование микроорганизмов и их сообществ. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1995.
- 61.Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis / Zozaya-Hinchliffe M. [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – № 48. – P. 1812–1819.
- 62.Targeted PCR for detection of bacteria associated with bacterial vaginosis / Fredricks D.N. [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2007. – № 45. – P. 3270–3276.
- 63.Multiplex detection of bacteria associated with normal microbiota and with bacterial vaginosis in vaginal swabs by use of oligonucleotide-coupled fluorescent microspheres / Dumonceaux T.J. [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2009. – № 47. – P. 4967–4977.
- 64.Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacte-

- rial vaginosis / Ling Z. . [et al.] //BMC Genomics. – 2010. - Mode of access: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/488>.
- 65.Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies /Harwich MD Jr. [et al.] // BMC Genomics. – 2010.
- 66.Multiplex detection of bacteria in complex clinical and environmental samples using oligonucleotide-coupled fluorescent microspheres / Dumonceaux T.J.[et al.] //J. Vis Exp. – 2011. - № 56. – e3344.
- 67.Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis / Menard J-P. [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2008. – № 47. – P. 33–43.
- 68.Ludwig W., How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts?/ Ludwig, W., H. Schleifer // Syst. Appl. Microbiol. – 2000. – № 23. – P. 556-562.
- 69.Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women / Sha B.E. [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – № 43. – P.4607–4612.
- 70.Development and Validation of a Semiquantitative, Multitarget PCR Assay for Diagnosis of Bacterial Vaginosis / Charles P. [et al.] // – J Clin Microbiol. – 2012- Vol. 50, № 7. – P. 2321–2329.
- 71.A New Era of the Vaginal Microbiome: Advances using Next-Generation Sequencing / Jennifer M. Fettweis, Myrna G. Serrano,Philippe H. Girerd, Kimberly K. Jefferson, Gregory A. Buck Chem Biodivers. – 2012. Vol. 9, №5. – P. 965–976.
- 72.Организация системы контроля качества исследований методом полимеразной цепной реакции / Н.А. Бадыгина, С.А. Костюк, Т.В. Руденкова, О.С. Полуян // Лабораторная диагностика Восточная Европа. – 2012. – № 1 (01). – С. 28–38.

Учебное издание

Шиманская Ирина Григорьевна
Костюк Светлана Андреевна
Руденкова Татьяна Владимировна
Полуян Ольга Сергеевна

Лабораторная диагностика бактериального вагиноза

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск И.Г. Шиманская

Подписано в печать 20. 11. 2014. Формат 60х84/16. Бумага «Discovery».

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 7,13. Уч.- изд. л. 5,38. Тираж 100 экз. Заказ 228.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусская медицинская академия последипломного образования.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.