

**ХУЖАЕВА Ш.А.**



**Микрофлора половых органов у женщин репродуктивного  
возраста в норме и при патологических состояниях**

**Ташкент – 2026**

**Министерство здравоохранения Республики Узбекистан**

# Университет Алфраганус

## “Утверждаю”

Проректор по научной работе

проф. Муминов Н.

“ ” 2026 г.

## Микрофлора половых органов у женщин репродуктивного возраста в норме и при патологических состояниях

**Ташкент - 2026**

**Составитель:**

Хужаева Ш.А. – доцент кафедры «Медицина» Университета Алфраганус,  
кандидат медицинских наук

**Рецензенты:**

Каримова З.К. – доцент кафедры «Микробиология, вирусология и  
иммунология» Ташкентского государственного медицинского  
университета, к.м.н.

Базарова Г.Р. – и.о. доцента кафедры «Медицина» Университета Алфраганус,  
DSc.

**Представлено к публикации Ученым советом Университета  
Алфраганус в качестве монографии для магистров, студентов высших  
медицинских учебных заведений и бактериологов Республики  
Узбекистан.**

Ташкент - 2026

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	6
Введение.....	7

### **ГЛАВА 1. Общая характеристика нормальной микрофлоры и факторов местной иммунной системы половых органов.....9**

1.1. Состояние микробиоценоза влагалища и шейки матки в различные периоды жизни женщин.....	9
1.2. Представители вагинального микробиоценоза и их значение.....	15
1.3. Местные неспецифические факторы защиты влагалища и шейки матки.....	28

### **ГЛАВА 2. Методы качественной и количественной оценки микробиоценоза и местных неспецифических факторов защиты половых путей.....35**

2.1. Правила отбора материала для оценки микробиоценоза влагалища.....	38
2.2. Методы исследования микробиоценоза влагалища.....	39
2.2.1. Микроскопический метод.....	39
2.2.2. Бактериологический метод.....	43
2.2.3. Метод газожидкостной хроматографии.....	58
2.2.4. Иммунологический метод.....	60
2.2.5. Серологические методы исследования.....	63
2.2.6. Методы генодиагностического исследования (ПЦР).....	65

### **ГЛАВА 3. Состояние микрофлоры влагалища и шейки матки при патологических состояниях.....72**

3.1. Показатели нарушения микрофлоры влагалища и шейки матки при генитальном герпесе.....	72
---	----

3.2. Состояние микрофлоры влагалища и шейки матки у женщин с мико- или уреаплазмозом.....	78
3.3. Состояние местной иммунной системы влагалища у больных генитальным герпесом и микоплазмозом.....	83
3.4. Ферментативная активность микроорганизмов, выделенных из репродуктивного тракта женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом.....	88

<b>ГЛАВА 4. Способы коррекции нарушений микрофлоры влагалища и шейки матки у женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом.....</b>	<b>94</b>
<b>5. Заключение.....</b>	<b>111</b>
<b>6. Использованная литература.....</b>	<b>113</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БВ	- бактериальный вагиноз
ВМ	- вагинальная микрофлора
ГГ	- генитальный герпес
МПА	- мясо – пептонный агар
ПД	- палочки Додерлейна
КВ	- кандидозный вагиноз
ВБИ	- внутрибольничные инфекции
КОЕ	- колониеобразующая единица
ЛП	- лактозапозитивные
ЛН	- лактозанегативные
ЦНС	- центральная нервная система
ФАН	- фагоцитарная активность нейтрофилов
ВПГ	- вирус простого герпеса
УПМ	- условно-патогенные микроорганизмы

## ВВЕДЕНИЕ

Вся деятельность биосферы непосредственно связана с жизнедеятельностью микроорганизмов. Существование микроорганизмов в природе было обнаружено всего около 300 лет назад. Согласно исследованиям, направленным на оценку биологического разнообразия, было идентифицировано и изучено лишь 5–10% видов микроорганизмов, а по данным последних лет - всего 0,4%.

В человеческом организме существует невероятно большое количество и разнообразие микроорганизмов.

Изучение микрофлоры организма человека в настоящее время является одной из ключевых проблем, находящихся в центре внимания клинических микробиологов. В то же время, этот микробиоценоз реагирует на любые физиологические и патологические изменения в макроорганизме своими качественными и количественными изменениями.

В результате многих факторов, таких как урбанизация человеческого общества, рост экологических проблем, эра антибиотиков и множество факторов, влияющих на иммунную систему макроорганизмов, произошли значительные изменения в микробиоценозах, сформировавшихся в процессе эволюции в организме человека.

Как и другие микробиоценозы, микробиоценоз влагалища в норме состоит из постоянно встречающихся и транзитных микроорганизмов. Со времен Додерлейна (1894) микрофлора влагалища считалась постоянной и однородной. Позднее были разработаны новые методы культивирования микроорганизмов, что позволило сделать вывод о многокомпонентности и изменчивости вагинальной микрэкосистемы.

Основной особенностью микрофлоры влагалища является ее зависимость от эстрогена. Поэтому количественные и качественные показатели микрофлоры влагалища различаются в разные периоды жизни

женщин (детство, период полового созревания, менструальный период, репродуктивный период, постменопауза).

Значение нормальной генитальной микрофлоры в различные периоды жизни женщин чрезвычайно велико, она играет важную роль в формировании микрофлоры новорожденных и выступает в качестве антагониста патогенных микроорганизмов.

Следует отметить, что нормальная микрофлора родовых путей и местная иммунная система представляют собой первую линию защиты, с которой сталкиваются патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. В настоящее время малое количество научных работ посвящено изучению количественного состава вагинальной микрофлоры и состояния местной иммунной системы влагалища при TORCH-инфекциях, которые непосредственно влияют на функцию репродуктивной системы. Недостаточное внимание к вопросам био- и иммунокоррекции при TORCH-инфекциях определяет актуальность темы данного пособия.

Монография рекомендуется магистрантам и студентам для занятий по курсу микрофлоры человеческого организма. В ней представлены данные об особенностях вагинальной микрофлоры, подробно описаны методы культивирования бактерий, диагностики и их идентификации, а также способы коррекции вагинальной микрофлоры при некоторых TORCH-инфекциях.

**Профессор И.М. Мухамедов**

**Доцент Ш.А.Хужаева**



## **ГЛАВА 1. Общая характеристика нормальной микрофлоры и факторов местной иммунной системы гениталий.**

### **1.1. Состояние микробиоценоза влагалища и шейки матки в различные периоды жизни женщин.**

Женские половые пути состоят из влагалища, шейки матки, выстиланной цилиндрическим эпителием, и влагалищного секрета, имеющего морфофизиологическое и биохимическое значение. Каждый из этих биотопов имеет специфический вид микроорганизмов (Ларсен Б., 1988; Кира Е.Ф., 1994; Мухамедов И.М. 2004).

Влагалище покрыто многослойным неороговевающим плоским эпителием, не имеющим желез. В этом эпителии выделяют четыре гистологических слоя: первый слой состоит из базальных клеток, второй и третий — из парабазального и промежуточного слоев. Четвёртый слой формирует наружный пласт. Процесс физиологического роста вагинальных эпителиоцитов, их перемещение и толщина наружного пласта контролируются гормонами яичников. Эпителий влагалища выполняет защитную функцию, обеспечивая стойкость к влиянию патогенных агентов (вирусов, бактерий, грибков). Важным показателем устойчивости эпителия влагалища является объём гликогена в его верхнем пласте. Клетки наружного слоя постоянно перемещаются и подвергаются цитолизу, высвобождая гликоген, который является питательным элементом для обычной микрофлоры. Помимо этого, гликоген участвует в восстановлении тканей и создании иммунных тел. Его объём в клетках влагалищного эпителия зависит от фаз менструального цикла. Наибольший объём гликогена наблюдается в период овуляции.

Таким образом, в периоды жизни женщин с гормональными нарушениями (пубертатный возраст, беременность, менопауза), а также в различные фазы менструального цикла ускоряются ферментативные процессы во влагалище, что отражается на состоянии микрофлоры.

Вагинальный секрет является серозным транссудатом, содержащим лейкоциты, клетки слущенного эпителия, железы слизистой оболочки шейки матки и вещества, выделяемые бартолиновыми железами. Химический состав вагинального секрета многообразен и включает воду, неорганические соли, муцин, белки, жирные кислоты, мочевины и лизоцим. Наиболее часто встречающимися белковыми компонентами являются альбумины и иммуноглобулины (Larsen B., 1993; Коршунов В.М. и др., 1999; Мухамедов И.М. и др., 2007; Raavonen J., 1983).

В норме влагалище новорождённых девочек стерильно в первые часы существования. К завершению первого дня скапливаются аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы. Через несколько дней начинается процветание лактобактерий. Это объясняется следующим образом: эстрогены, передающиеся от матери к ребёнку трансплацентарным путём, содействуют скоплению гликогена в вагинальном эпителии, а гликоген служит субстратом для размножения лактобактерий. Кроме того, гормоны усиливают рецепторную активность вагинального эпителия по отношению к лактобактериям. Лактобактерии расщепляют гликоген до молочной кислоты, что приводит к смещению pH в кислую сторону (от 4,4 до 4,6) и препятствует росту и размножению микроорганизмов, чувствительных к кислой среде. В этот период микрофлора влагалищ новорождённых становится схожей с микрофлорой влагалищ здоровой женщины (Мухамедов И.М., 2004; Хужаева Ш.А., 2008; Ohashi A., 1980; Raavonen J., 1983).

Спустя три недели после рождения эстрогены, переданные от матери, совершенно расщепляются, и эпителий остается тонким и "незрелым". Спад содержания гликогена в эпителии ведет к уменьшению стандартной микрофлоры, в особенности лактобактерий, а также к уменьшению числа органических кислот, которые они изготавливают, что вызывает повышение pH вагинальной среды с 4,5 до 7,0. Приближение pH среды к нейтральному уровню способствует снижению окислительно-восстановительного

потенциала и ведет к дальнейшему спаду числа лактобактерий. В итоге строго анаэробные микроорганизмы начинают преобладать в микрофлоре. У двухмесячных девочек общее число микробов во влагалищной микрофлоре статистически меньше, чем у новорожденных (Соловьева И.В., 1987; Larsen B., 1993).

В период полового созревания, с развитием функции яичников, в теле девочек начинают вырабатываться эндогенные эстрогены, под влиянием которых в клетках влагалищного эпителия скапливается гликоген. Эпителиальный слой уплотняется, и число рецепторов для прикрепления лактобактерий возрастает. Начиная с этого периода, лактобактерии достигают господства во влагалищной микрофлоре, и это положение сохраняется на протяжении всего репродуктивного периода. В итоге метаболизма лактобактерий pH среды смещается в границах 3,8–4,4. В вагинальной среде усиливается окислительно-восстановительный потенциал, что создает неблагоприятные условия для роста и размножения строго анаэробных микроорганизмов.

Влагалищная микрофлора считается глубоко личной и даже в норме изменяется на разных стадиях менструального цикла. Помимо этого, понятие о норме может отличаться в зависимости от возраста, этнической группы и географической области. В связи с этим различают варианты нормального микробиоценоза влагалища (нормоценоз) (табл. 1.1).

У здоровых женщин фертильного возраста эстрогены воздействуют на пролиферативную (фолликулярную) стадию менструального цикла, а гормон прогестерон — на секреторную (лютеиновую) стадию.

Таким образом, наибольшую информацию о качественном и количественном составе микрофлоры влагалища можно получить на 2-14-й день менструального цикла. Минимальное количество микроорганизмов наблюдается во время менструации (Ohashi A., 1980; Sobei J.D., 1981).

Уровень лактофлоры в это время остается постоянным. В первые сутки менструации тканевый редокс-потенциал снижается, и pH влагалища повышается до 5,0-6,0 за счет увеличения числа дегенеративных клеток эндометрия и форменных элементов крови. При этом общее количество лактобацилл уменьшается, а количество факультативных и строго анаэробных бактерий увеличивается.

После окончания менструации популяция лактобацилл быстро восстанавливается и достигает максимума в середине секреторной фазы, поскольку к этому времени эпителий влагалища содержит наибольшее количество гликогена. Этот процесс сопровождается увеличением содержания молочной кислоты и снижением pH до 3,8-4,5. Общее количество микроорганизмов во влагалище в предменструальный период составляет около 10<sup>9</sup> КОЕ/мл.

Представители различных аэробных и строго анаэробных микроорганизмов нормальной микрофлоры чаще встречаются на пролиферативной стадии, чем на секреторной. Во время пролиферативной фазы менструального цикла у женщин повышается восприимчивость к инфекциям.

Имеются данные, что послеоперационные воспалительные осложнения у женщин, перенесших гистерэктомию в пролиферативной фазе менструального цикла, составляют 31,6%, тогда как при проведении операции в секреторной фазе этот показатель снижается до 18%. По данным Ohashi A. (1980), на 2–14-й день менструального цикла количество аэробных бактерий во влагалище превышает количество строго анаэробных микроорганизмов. Однако перед началом менструации численность строго анаэробных бактерий почти в 100 раз превышает количество аэробных.

Повышение уровня гликогена во влагалище во время беременности создает благоприятные условия для жизнедеятельности лактобактерий. В этот период снижается количество бактериоидов, строгих неспорообразующих

анаэробов, а также аэробных грамположительных кокков и грамотрицательных палочек. Эти изменения достигают максимума в третьем триместре беременности (Eschenbach D.A., 1989).

Во время родов происходит первая контаминация организма новорожденного, который до этого момента является стерильным, с вагинальной микрофлорой матери. Состав влагалищной микрофлоры оказывает влияние на формирование микрофлоры конъюнктивы, кожных покровов, а также играет важную роль в установлении нормальной микрофлоры кишечника младенца. Роды приводят к качественным и количественным изменениям состава микрофлоры влагалища (Bartlett J.G., 1984): увеличивается число неспорообразующих анаэробных бактериоидов, эшерихий, в то время как количество лактобактерий и бифидобактерий уменьшается. Нарушения вагинальной микрофлоры через 3–4 дня после родов могут способствовать развитию различных осложнений. Однако эти изменения микрофлоры являются транзиторными и восстанавливаются до нормы в течение 6 недель после родов.

В период менопаузы в генитальном тракте наблюдается существенное снижение уровня эстрогенов, гликогена и окислительно-восстановительного потенциала. Уменьшается число бифидо- и лактобактерий, а pH становится нейтральным. Состав микрофлоры имеет самые низкие качественные и количественные показатели. Основную часть микрофлоры влагалища занимают строго анаэробные бактерии (Furr P.M., Taylor-Robinson D., 1987).

В физиологических условиях цервикальный канал обычно стерилен, микроорганизмы обнаруживаются только на внешней стороне шейки матки, при этом их состав схож с составом вагинальной флоры.

**Таблица №1.1**

**Физиология влагалищной микрофлоры в разные периоды жизни женщины**

<b>Показатели</b>	<b>Беременность/ Новорождённый</b>	<b>Пубертатный возраст</b>	<b>Репродуктивный период</b>	<b>Постменопаузальный период</b>
Уровень эстрогенов	Высокий	Низкий	Высокий	Низкий
рН	Кислотный	Нейтральный	Кислотный	Нейтральный
Окислительно- восстановительный потенциал	Повышен	Снижен	Повышен	Снижен
Уровень гликогена	Очень высокий	Низкий	Высокий	Низкий
Облигатные анаэробы	Не много	Много	Не много	Много
Общее количество бактерий	Повышен	Снижен	Повышен	Снижен
Виды микроорганизмов	Снижен	Снижен	Повышен	Снижен

## 1.2. Представители микробиоценоза родовых путей и их функциональное значение

Вагинальная микрофлора – это динамичная система, состав которой постоянно трансформируется под влиянием различных факторов. Гормональные колебания, вызванные физиологическими процессами и менструальным циклом на разных этапах жизни женщины, являются основными регуляторами качественного и количественного состава вагинального микробиома. Эта микрофлора характеризуется разнообразием микроорганизмов, адаптированных к различным уровням кислорода, включая микроаэрофилов, факультативных анаэробов и строгих анаэробов (Таблица 1.2).

**Таблица 1.2**

### Состав нормальной микрофлоры влагалища

Факультативные микроорганизмы	Анаэробные микроорганизмы
<b>Грам (+) кокки</b>  <i>St.epidermidis</i> <i>St.aureus</i> * <i>Streptococcus D</i> $\beta$ -hemolytic <i>Streptococcus</i> Другие виды стрептококков	<b>Грам (+) кокки</b>  <i>Peptococcus species</i> * <i>Peptococcus anaerobius</i> <i>Peptococcus asaccharolyticus</i> <i>Peptococcus prevotii</i> * <i>Peptococcus varibilis</i> <i>Peptostreptococcus species</i> * <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<b>Грам(+) палочки</b>  <i>Lactobacillus species</i> * <i>Corinebacterium species</i>	<b>Грам (-) кокки</b>  <i>Veillonella species</i> <i>Acidominococcus fermentas</i>
<b>Грам(-) палочки</b>  <i>Echerichia coli</i> * <i>Klebsiella species</i> Другие виды семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	<b>Грам (+) палочки</b>  <i>Lactobacillus species</i> * <i>Bifidobacterium species</i> <i>Clostridium species</i> <i>Eubacterium species</i> <i>Propionbacterium species</i>
	<b>Грам(-) палочки</b>

	Bacteroides melaninogenicus* Bacteroides vulgatus* Bacteroides species* Fusobacterium nucleatum* Fusobacterium species* (группа Sphaerophorus) Leptotrichia species Campylobacter species (“anaerobic vibros”)
--	--

\* - клинически значимые микроорганизмы

Их жизнедеятельность зависит от способности адгезироваться к вагинальному эпителию и конкурировать друг с другом за среду и питательную вещества (Larson R.A., Mick R., 1995; Mehta A., Talwalkar J., 1995).

Основными представителями вагинальной микрофлоры (95-98%) являются лактобактерии, а микроаэрофильные и строго анаэробные виды (5-30%) встречаются реже. Наибольшее распространение среди лактобактерий имеют виды *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. leishmanii*, *L. jensenii*, реже — *L. fermentum*, *L. crispatus*, *L. ruminis*, *L. vaginalis*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* (Giorgi A., 1987).

У здоровых женщин лактобактерии встречаются не только во влагалище, но и в дистальных отделах уретры. Лактобактерии, расположенные в уроэпителиальных клетках, защищают нижние отделы мочеполового тракта от колонизации уропатогенными бактериями. Во влагалище лактобактерии обнаруживаются в количестве  $10^7$ – $10^9$  КОЕ/мл. Они препятствуют адгезии экзогенных микроорганизмов в вагинальном тракте, ограничивая пролиферацию других бактерий (Redondo-Lopez V., 1990).

Выявлено несколько механизмов контроля лактобактерий в вагинальном микробиоценозе (Vandenbergh P.A., 1993). Один из них заключается в том, что в процессе метаболизма лактобактерий происходят



изменения молочной и других органических кислот (Axelsson L.T. et al., 1989; Klebanoff S.J., 1991). Эти кислоты обеспечивают и поддерживают кислый pH вагинальной среды (в норме 3,8–4,5). Низкий pH вагинальной жидкости повышает ее редокс-потенциал, что подавляет рост условно-патогенных анаэробных микроорганизмов. Второй механизм заключается в выработке  $H_2O_2$  лактобактериями (Eschenbach D.A., 1989). Перекись водорода препятствует колонизации таких микроорганизмов, как *G.vaginalis*, *P.bivia*, *P.disiens*, *Mobiluncus* spp. (Кира Е.Ф., 1995; Кубанова А.А., 1996; Skarin A., 1987).

В основе третьего защитного механизма лежит способность клеток влагалищного эпителия к прочному сцеплению с лактобактериями. Это обеспечивается наличием на их поверхности специальных адгезивных факторов. Лактобактерии, в свою очередь, обладают липотейхоевой кислотой, которая выступает в роли их адгезина. Дополнительно, лактобактерии синтезируют ряд биологически активных веществ, включая бактериоцин, лизоцим, лактацидин, лактацин и ацидолин, обладающих антимикробным действием. Таким образом, совокупность характеристик лактофлоры, включая ее видовой состав, количество и другие свойства, является значимым показателем состояния вагинального микробиоценоза.

**Таблица 1.3**

**Значение и процент роста представителей микрофлоры влагалища у здоровых женщин репродуктивного возраста**

<b>Виды микроорганизмов</b>	<b>Процент выделения, %</b>	<b>Болезнетворная способность</b>
<b>Микроаэрофильные бактерии</b>		
L.acidophilus L.fermentum L.crispatus L.jensenii	71-100	-

L.gasseri		
G.vaginalis	6-60	+
<b>Облигатные анаэробные грам (+) бактерии</b>		
Lactobacillus spp. Bifidobacterium spp. B.bifidum B.breve B.adolescentis B.longum	12	-
Clostridium spp.	10-25	+
Propionbacterium spp. P.acnes	25 5	-
Mobiluncus spp.	39-90	+
Peptostreptococcus spp. P.asaccharoliticus P.magnus P.prevotii P.tetradus	80-88 53 32 32	
<b>Облигатные анаэробные грам (-) бактерии</b>		
Bacteroides spp. B.utealyticum B.fragilis B.vulgatus B.ovatus B.distasonis B.uniformis B.caccae	9-13	+
Prevotella spp. P.bivia P.disiens	60	+
Porphyromonas spp. P. asaccharolitica	31	+
Fusobacterium spp. F.nucleatum	14-40	-
Veillonella spp.	11-14	-
<b>Факультативные анаэробные грам (+) бактерии</b>		
Corynebacterium spp. C.aquatum C.minutissium		

C.equi	30-40	-
C.xerosis	8-10	Возбудители
C.bovis		оппортунистических
C.enzymicum		инфекций
C.kutsheri		
Staphylococcus spp.		
S.epidermidis		
S.saprophyticus		
Streptococcus spp.		+
S.viridans	30-40	Заболевания органов
E.fecalis	10-20	дыхания, менингиты,
E.faecium		септицемия у
S.agalactiae		новорождённых
Enterobacteriaceae	5-30	+
E.coli		
Enterobacter spp.	2-10	
Klebsiella spp.		
Proteus spp.		
P.aerugenosa		
M.hominis	2-15	+
U.urealyticum	6-7	+
M.fermentans	2-5	-
<b>Дрожжеподобные грибы рода Candida</b>		
C.albicans	15-20	+
C.tropicalis		
Torulopsis glabrata		

В составе вагинального микробиома также обнаруживаются бифидобактерии. Эти микроорганизмы относятся к грамположительным, облигатным анаэробам и имеют форму прямых или разветвленных палочек. Их концентрация во влагалище здоровых женщин, как правило, ниже, чем у лактобактерий, и варьируется в пределах  $10^3$ - $10^7$  КОЕ/мл. Бифидобактерии демонстрируют адгезию к эпителиальным клеткам, участвуют в регуляции pH влагалища и обладают высокой резистентностью к эндогенным антимикробным агентам. Кроме того, они продуцируют бактериоцины,

лизационим и спирты, что обеспечивает их антагонистическое действие против таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* и *Gardnerella*, ингибируя их пролиферацию (Коршунов В.М., 1999; Bartlett J.G., 1984).

Бифидобактерии также продуцируют аминокислоты, витамины и используют их в процессах метаболизма организма хозяина (Гончарова Г.И., 1992; Воробьев А.А., 1999). Также имеется информация о том, что клеточная стенка бифидобактерий обладает иммуностимулирующей активностью, что способствует формированию иммунного ответа макроорганизма на чуждые агенты.

Пептострептококки являются третьим по значимости представителем вагинальной микрофлоры, входящим в состав флоры Додерлейна. Частота их выделения из влагалища варьируется от 30% до 90%. У здоровых женщин концентрация анаэробных кокков в вагинальном секрете находится в пределах  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл. Эти микроорганизмы обладают условно-патогенными свойствами, и их пролиферация наблюдается при септических абортах, а также при тяжелых патологических состояниях, таких как эндометрит, абсцесс яичников и бактериальный вагиноз. Помимо пептострептококков, вагинальная микробиота представлена анаэробными бактериями, включая клостридии (10-25%), пропионбактерии (до 25%) и *Mobiluncus* (0-5%). Пропионбактерии, являясь комменсалами, вносят вклад в колонизационную резистентность влагалища посредством продукции органических кислот.

Хотя строго анаэробные бактерии, грамотрицательные (G-) также считаются основными представителями вагинальной микрофлоры, они часто являются возбудителями патологических состояний, таких как сальпингит, хориоамнионит, эндометрит и пельвиоперитонит (Eschenbach D.A., 1993). Эти бактерии также часто встречаются при бактериальном вагинозе (Hiller S.L., 1988). К ним относятся *Bacteroides* (9-13%), *Prevotella* (60%),

*Porphyromonas* (31%), *Fusobacterium* (14-40%) и *Veillonella* (11-14%). Их патогенные свойства зависят от их ферментативных систем. Например, у *Bacteroides fragilis* были обнаружены такие ферменты, как гиалуронидаза, коллагеназа, фибринолизин, иммуноглобулин-протеаза, гепариназа и сиалидаза. Некоторые бактерии, включая бактериоиды группы *Fragilis*, обладают защитными механизмами: каталаза помогает им справляться с перекисью водорода от лактобактерий. Другие бактерии, такие как *Porphyromonas* и *Prevotella*, производят ферменты, разрушающие белки (протеазы, коллагеназы) и компоненты крови (гемолизины, фибринолизины). *Fusobacterium necrophorum* выделяет вещества, влияющие на тромбоциты и вызывающие разрушение эритроцитов (гемолизин). Обнаружена также способность бактериоидов, фузобактерий, анаэробных стрептококков и гарднерелл синтезировать фосфолипазу A2. Этот фермент играет ключевую роль в образовании простагландинов, высвобождая арахидоновую кислоту. У беременных женщин, воздействие бактериальных протеаз и липаз на хорион-амниотическую мембрану, наряду с увеличением простагландинов, может спровоцировать преждевременные роды.

Продукты метаболизма бактерий рода *Mobiluncus*, в частности органические кислоты (например, янтарная), оказывают ингибирующее действие на функциональные возможности полинуклеарных нейтрофилов. Это обуславливает существенное снижение или полное отсутствие нейтрофилов в вагинальном экссудате при развитии бактериального вагиноза. К группе микроаэрофильных микроорганизмов относятся гарднереллы, которые обнаруживаются у приблизительно 60% женщин, ведущих половую жизнь. При бактериальном вагинозе их титр превышает  $10^7$  КОЕ/мл (Алекешова Л.Ж., 2001; Мухамедов И.М., 2004; Gardner H., 1995).

Вот перефразированный текст:

Гарднереллы, характеризующиеся сильной способностью прикрепляться к клеткам влагалищного эпителия, служат важным индикатором бактериального вагиноза. Эти бактерии, воздействуя на муколитические ферменты, гемолизин и лейкоциты, продуцируют лейкотоксический фактор, который повреждает структуру и нарушает функции лейкоцитов (Мухамедов И.М., 2004; Jolly J., 1983).

Коринебактерии, в норме присутствующие во влагалище здоровых женщин, обнаруживаются в 6-7% случаев в концентрации 104-105 КОЕ/мл.

Микоплазмы, очень мелкие микроорганизмы (около 300 нм) без клеточной стенки, в норме могут присутствовать во влагалище в количестве до 10<sup>3</sup> КОЕ/мл. Наличие микоплазм или уреаплазм в урогенитальном тракте не всегда означает развитие болезни. Только значительное увеличение количества микоплазм может спровоцировать хориоамнионит и, как следствие, преждевременные роды (Рар В.А., 2004).

Бактериальный вагиноз и *M. hominis*: В развитии бактериального вагиноза *Mycoplasma hominis* играет значительную роль. При этом заболевании частота обнаружения этого микроорганизма возрастает до 50-80%, а его концентрация может достигать 10<sup>5</sup> КОЕ/мл (по данным исследования Furr Р.М., 1987).

**Стафилококки** во влагалищной микрофлоре: Стафилококки, являющиеся факультативными анаэробами, также присутствуют во влагалище. Наиболее распространены коагулазонегативные стафилококки, в основном *Staphylococcus epidermidis*, которые могут составлять до 90% всей стафилококковой популяции. *Staphylococcus aureus* обнаруживается во влагалище непостоянно и выявляется примерно в 5% случаев.

**Стрептококки** во влагалище и их опасность: У здоровых женщин во влагалище могут присутствовать стрептококки, относящиеся к группам А, В и D. Частота обнаружения стрептококков группы А варьируется от 1 до 55%, группы В – от 3 до 15%, а группы D – от 9 до 40%. Особую опасность

представляет *Streptococcus agalactiae* (группа В), которым новорожденный может заразиться во время родов, при преждевременном разрыве плодных оболочек или в результате акушерских манипуляций при сложных родах. Инфицирование *S. agalactiae* может привести к серьезным заболеваниям у новорожденных, таким как инфекции дыхательных путей, менингит и сепсис, которые могут быть смертельными. Зеленыя стрептококки могут быть причиной послеоперационных осложнений.

Во влагалище чаще всего из энтеробактерий обнаруживается кишечная палочка (*Escherichia coli*), её выявляют у 10-25% женщин, при этом количество бактерий составляет от  $10^3$  до  $10^4$  колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл). Другие представители этого семейства бактерий, например, *Proteus spp.* и *Klebsiella spp.*, могут быть причиной инфекций мочеполовой системы.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* присутствуют во влагалище у 10-20% женщин, обычно в концентрации до  $10^4$  КОЕ/мл. В большинстве случаев они не вызывают проблем. Однако во время беременности их количество может увеличиваться. Это связано с тем, что иммунитет женщины временно ослаблен, чтобы предотвратить отторжение плода и обеспечить нормальное течение беременности. Такое ослабление иммунитета способствует росту грибов *Candida* во влагалище. Установлено, что *Candida albicans* выделяет глиотоксин, который негативно влияет на работу белых кровяных клеток (лейкоцитов). Кроме того, *Candida albicans* производит вещество, препятствующее размножению гонококков (*Neisseria gonorrhoeae*).

**Таблица 1.4**

**Частота встречаемости различных микроорганизмов в вагинальных выделениях женщин репродуктивного возраста**

Микроорганизмы	Количество, КОЕ/мл
<b>Микроаэрофильные бактерии</b>	

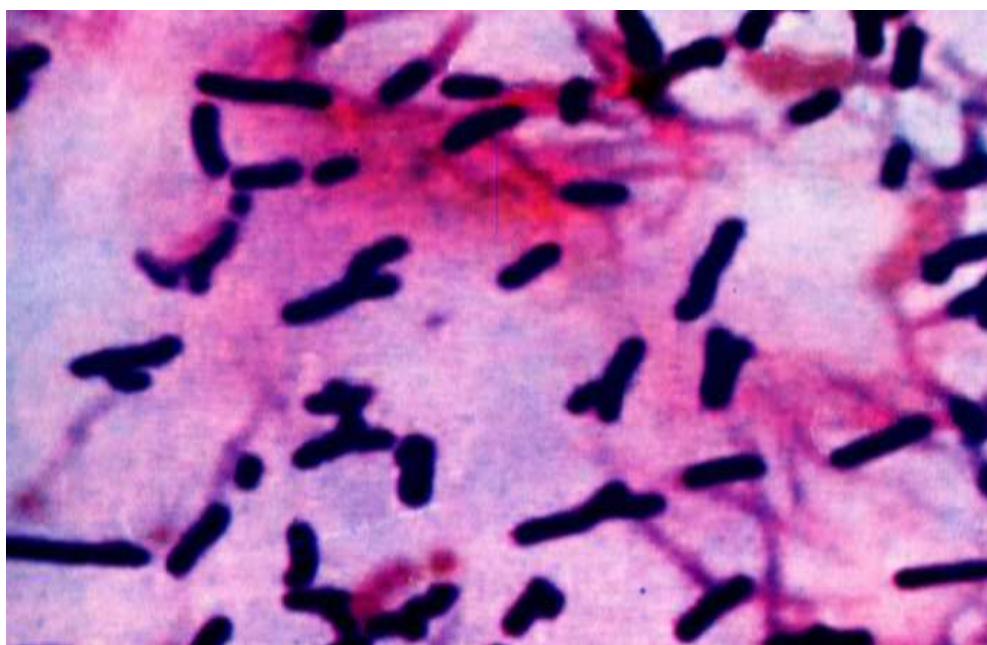
Lactobacillus spp. G.vaginalis	$10^7 - 10^9$ $10^6$
<b>Облигатные анаэробные грам (+) бактерии</b>	
Lactobacillus spp. Bifidobacterium spp. Clostridium spp. Propionbacterium spp. Mobiluncus spp. Peptostreptococcus spp.	$10^7 - 10^9$ $10^3 - 10^7$ до $10^4$ до $10^4$ до $10^4$ $10^3 - 10^4$
<b>Облигатные анаэробные грам (-) бактерии</b>	
Bacteroides spp. Prevotella spp. Porphyromonas spp. Fusobacterium spp. Veilonella spp.	$10^3 - 10^4$ до $10^4$ до $10^3$ до $10^3$ до $10^3$
<b>Факультативные анаэробные грам (+) бактерии</b>	
Corynebacterium spp. Staphylococcus spp. Streptococcus spp. Enterobacteriaceae M.hominis U.urealyticum M.fermentans	$10^4 - 10^5$ $10^3 - 10^4$ $10^4 - 10^5$ $10^3 - 10^4$ $10^3$ $10^3$ до $10^3$
Дрожжеподобные грибы рода Candida	$10^4$

Таким образом, бактерии, составляющие микрофлору влагалища, тесно взаимодействуют друг с другом и с клетками стенок влагалища. Это создает надежную защиту от проникновения других микроорганизмов. Но при определенных обстоятельствах эти же бактерии могут вызывать воспаления мочеполовой системы. Помимо защиты, вагинальная микрофлора играет важную роль в поддержании здоровья влагалища, участвуя в различных процессах, таких как выработка ферментов и витаминов, а также стимуляция иммунитета. Поэтому состояние вагинальной микрофлоры служит показателем здоровья влагалища.

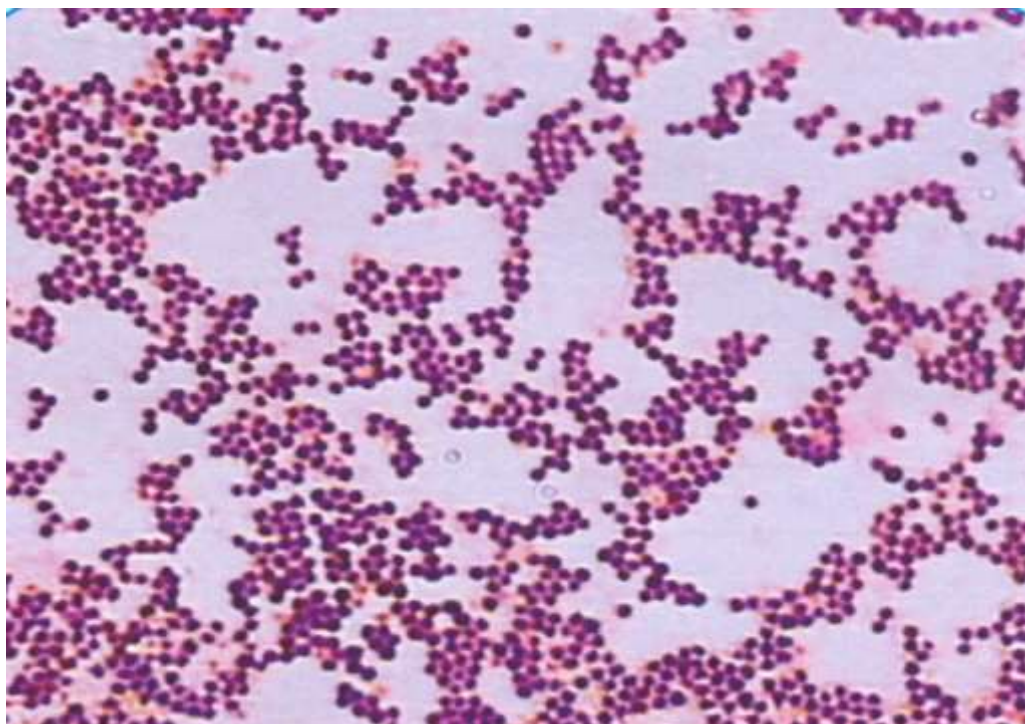




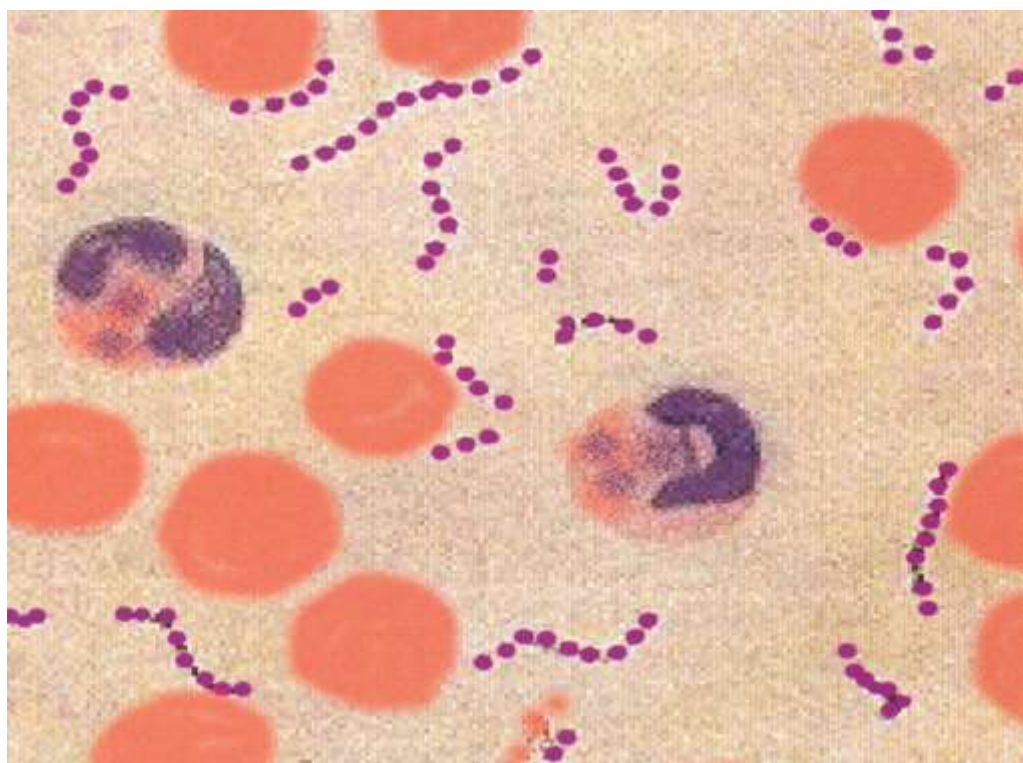
**Рис.1.1. Мазок чистой культуры *Lactobacillus* spp.**



**Рис.1.2. Мазок чистой культуры *B. bifidum***

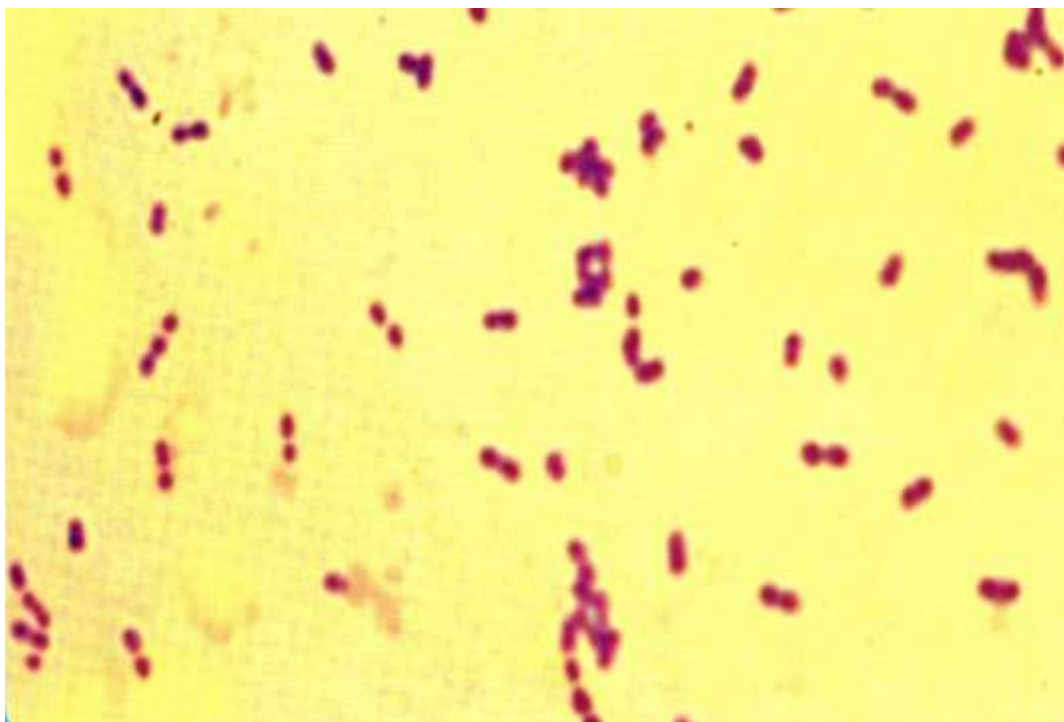


**Рис.1.3. Мазок чистой культуры *St. aureus***

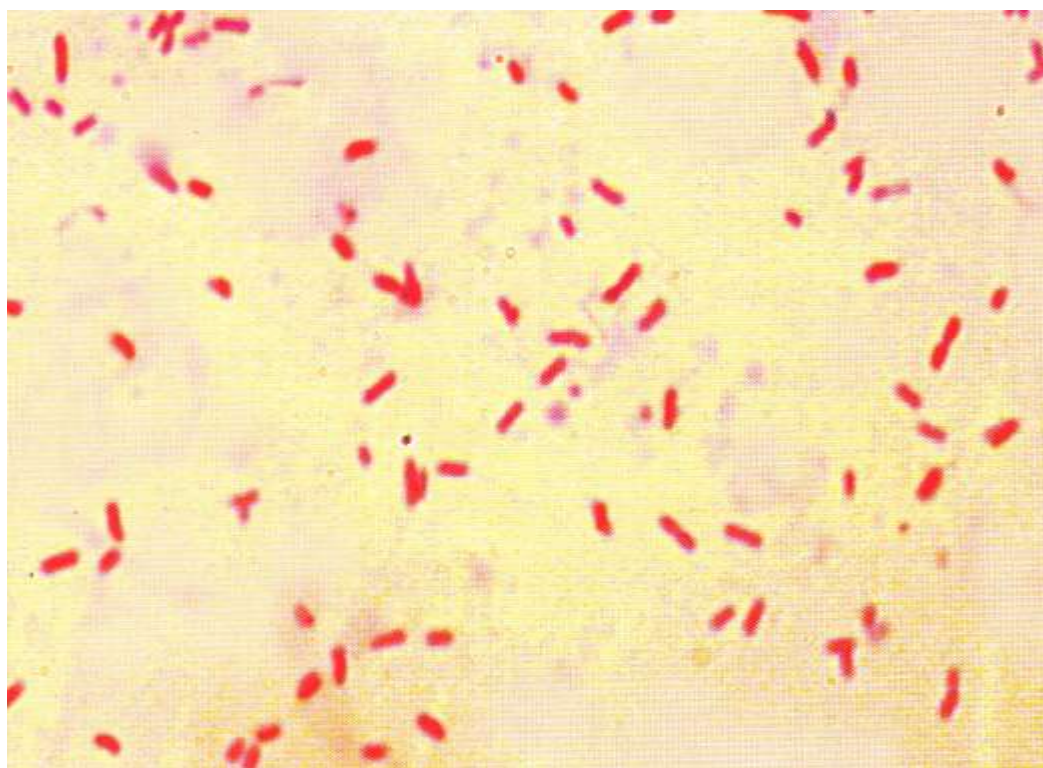


**Рис.1.4. Мазок стрептококков в гное**

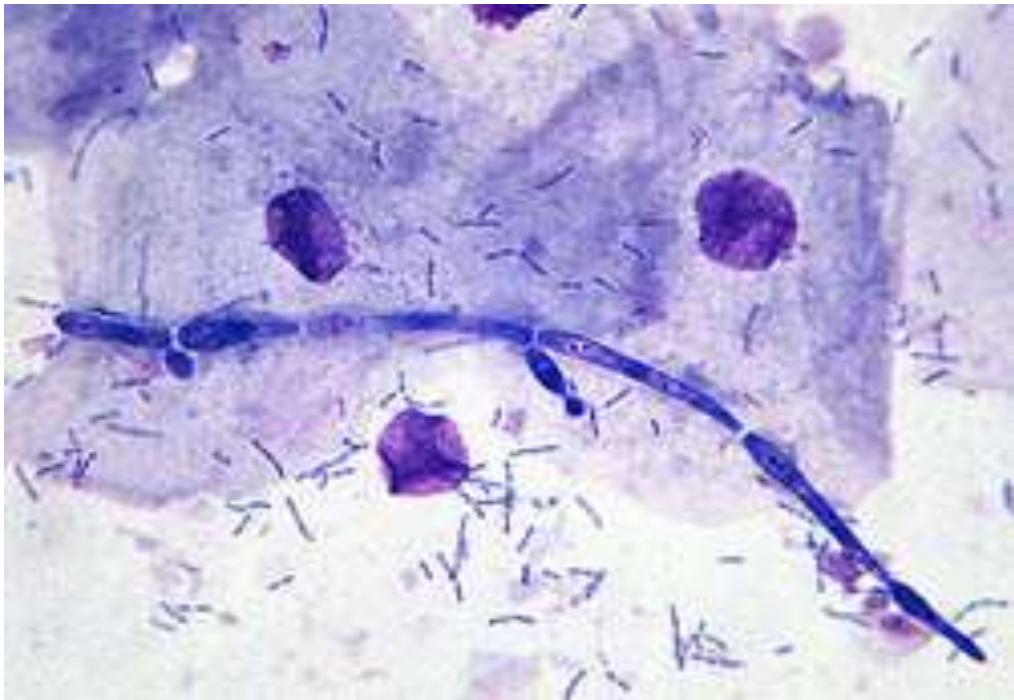




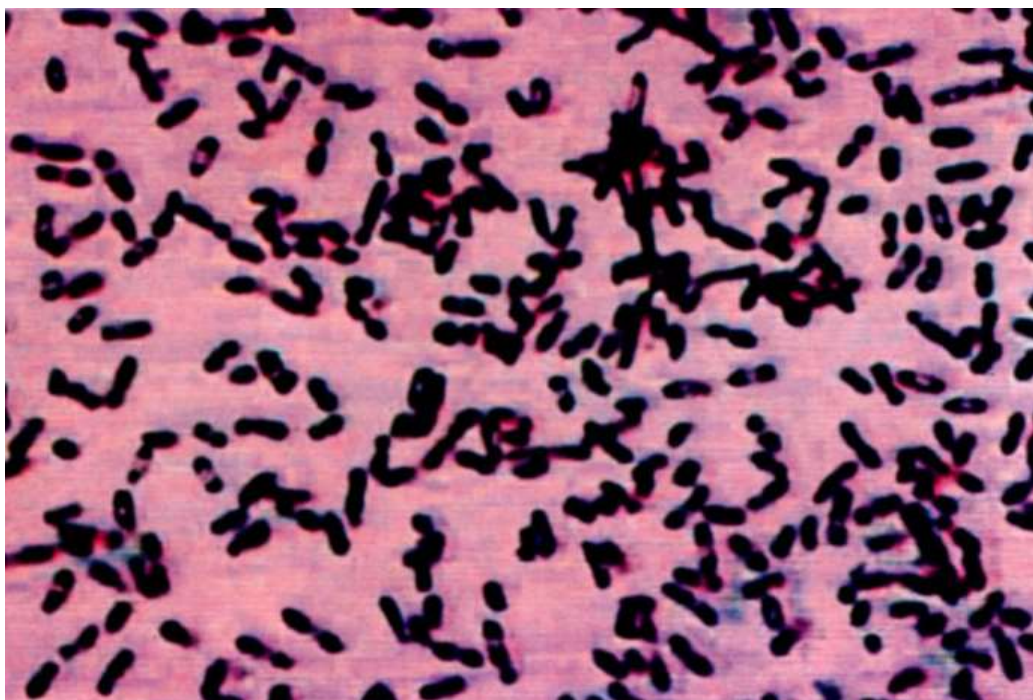
**Рис.1.5. Мазок чистой культуры *E. faecalis***



**Рис.1.6. Мазок чистой культуры *E. coli***



**Рис.1.7. Грибы *Candida* на вагинальном мазке.**



**Рис.1.8. Мазок чистой культуры *B. fragilis***

### **1.3. Местные неспецифические факторы защиты влагалища и шейки матки**

Защита женской репродуктивной системы от инфекций обеспечивается комплексом механизмов, включающим в себя не только полезные бактерии, но и местные иммунные факторы, действующие на слизистой оболочке (Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф., 1998). Эта система защиты, аналогичная той, что работает в кишечнике и дыхательных путях, особенно активна в шейке матки, которая служит главным барьером для инфекций, распространяющихся снизу вверх (Антонова Л.В., 1977; Шварцман Я.С., 1978; Теплякова М.В. и др., 1990).

При заболеваниях репродуктивных органов в шейке матки наблюдается усиление иммунной реакции: увеличивается количество активных нейтрофилов, повышается уровень защитных веществ (лизоцима, лактоферрина, иммуноглобулинов), а также активизируются процессы, связанные с потреблением кислорода (Долгушина В.Ф., 1991).

Примером защитных механизмов являются анатомические и физиологические особенности женских половых органов (Говалло В.И., 1987; Долгушина В.Ф., 1991).

Воспалительные процессы, как правило, начинаются во влагалище и распространяются вверх.

В стенке влагалища, под слизистой оболочкой, сосредоточено множество иммунных клеток, таких как плазматические клетки и Т-лимфоциты. Исследования показали, что эти клетки попадают сюда из костного мозга и лимфатических узлов через лимфатические сосуды.

Иммуноглобулины, присутствующие в вагинальном секрете, образуются как местно, так и поступают из крови. При попадании во влагалище бактерий, вирусов или грибков, уровень секреторного IgA, местного иммуноглобулина, повышается, что указывает на активную выработку антител в этой области.

У здоровых женщин в вагинальном отделяемом преимущественно определяются IgA, IgG и секреторный IgA. При инфицировании их

концентрация увеличивается, а также появляется IgM — иммуноглобулин, характерный для острого ответа иммунной системы.

В вагинальном секрете также обнаруживаются компоненты системы комплемента, лизоцим и лактоферрин. Эти вещества синтезируются нейтрофилами и эпителиальными клетками (Долгушина В.Ф., 1991; Tourville D.R., 1970).

К гуморальным факторам местного иммунитета также относят вагинальные выделения, формирующиеся в результате миграции и аутолиза эпителиальных клеток. Эти выделения смешиваются со слизью, продуцируемой маткой и шейкой матки. В норме в течение суток образуется до 1 мл секрета, и благодаря его постоянному движению сверху вниз обеспечивается естественная элиминация микроорганизмов, проникающих извне (Грищенко В.И. и др., 1981; Говалло В.И., 1987; Долгушина В.Ф., 1991; Воробьев А.А., 1997).

Во многих исследованиях основное внимание уделяется гуморальным факторам вагинального иммунитета, тогда как сведений о клеточных механизмах защиты от инфекции в литературе представлено недостаточно. Наличие лимфоидных фолликулов, диффузных лимфоцитов и макрофагов в слизистой оболочке влагалища свидетельствует о существовании на этом уровне самостоятельных иммунных реакций (Уткин В.М. и др., 1985; Waldman R.H., 1974).

Согласно данным I.A.Hill (1987) и его соавторов, лимфоциты и макрофаги, локализованные в женских половых органах, в ответ на проникновение микроорганизмов или спермы во влагалище начинают продуцировать лимфокины и монокины. Эти цитокины оказывают влияние на подвижность как микробных агентов, так и сперматозоидов.

Нейтрофилы, обнаруживаемые в вагинальном секрете, играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза (Пауков В.С., 1988; Маянский А.Н., 1989, 1993). Они составляют 93–96% от общего числа лейкоцитов, при

этом доля жизнеспособных клеток не превышает 40% (Долгушина В.Ф., 1991).

Нормальная микрофлора также играет ключевую роль в обеспечении резистентности репродуктивного тракта к инфекциям. Ее защитные функции реализуются через:

- антагонизм по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре,
- стимуляцию лимфоидного аппарата репродуктивного тракта,
- продукцию витаминов и других биологически активных веществ (Соловьева И.В., 1987; Телешева Л.Ф., 1998; Свелев Ю.В., Кира Е.Ф., 1990).

При нарушении барьерной функции влагалища по различным причинам инфекционный процесс может распространиться на шейку матки, что нередко становится причиной развития патологических изменений.

Слизистая оболочка шейки матки выстлана цилиндрическим эпителием, в толще которого находятся стекловидные железы, секретирующие вязкий слизистый секрет. Этот секрет заполняет цервикальный канал, образуя своеобразную пробку, препятствующую проникновению патогенных микроорганизмов. У здоровых женщин репродуктивного возраста суточная секреция цервикальной слизи составляет в среднем 20–60 мг. В период, предшествующий овуляции, под действием эстрогенов объем секрета возрастает в 10 раз, достигая 700 мг в сутки. Основу цервикального секрета составляют муциновые волокна, обладающие выраженными антиадгезивными свойствами, благодаря чему они эффективно ингибируют прикрепление бактерий к эпителию (Nabil Seyfein Moxarib et al., 1981; Долгушина В.Ф., 1991, 1997; Еропкина Е.М., 1994).

Жидкая часть цервикального секрета представляет собой сложную биологическую среду, включающую белки, электролиты, аминокислоты и полисахариды. Эти макромолекулы взаимодействуют с микроорганизмами, изменяя их поверхностные структуры и функциональное состояние. В

результате повышается вероятность связывания патогенов с рецепторами клеток-мишеней, что инициирует процессы агрегации микробных клеток и снижает уровень их колонизации эпителия хозяина.

Важным защитным компонентом цервикального канала является *лизоцим* — фермент, синтезируемый эпителиальными клетками и нейтрофильными лейкоцитами. Лизоцим обладает выраженным бактерицидным действием, разрушая клеточные стенки грамположительных бактерий, а также усиливает фагоцитарную активность нейтрофилов, способствуя более эффективному уничтожению патогенов.

У здоровых небеременных женщин в цервикальном отделяемом обнаруживаются основные классы иммуноглобулинов: IgA, IgG, IgM, а также секреторный IgA (sIgA), который играет ключевую роль в защите слизистых оболочек.

В научной и медицинской литературе представлены разнообразные данные о концентрации этих факторов местного иммунитета, что может объясняться различиями в методиках забора материала, а также вариативностью лабораторных методов определения уровня иммуноглобулинов в вагинальном секрете. Такие расхождения подчеркивают необходимость стандартизации подходов к исследованию локального иммунитета в женском репродуктивном тракте (Jalanti R., 1977; Bouvet J. P., 1994).

Наибольшая концентрация обнаруживается у sIgA и IgG, в меньшей — у IgA. IgM выявляется в очень малых количествах и только у некоторых женщин. Изменения уровней IgA и IgG отражают стадии менструального цикла. Соотношение IgG:IgA в среднем составляет от 2,5:1 до 6:1. Повышение этого соотношения свидетельствует об усилении активности местного иммунитета и увеличении продукции антител плазмócитами цервикального канала (Прозоровская К.Н., 1977; Куперт А.Ф., 1983; Doric Miljenko, 1984; Minkoff H., 1986; Yonekura M.L., 1988).



Имеются данные, свидетельствующие о том, что при нарушениях в системе местного синтеза иммуноглобулинов могут вырабатываться антиспермальные антитела, что, в свою очередь, приводит к развитию иммунологического бесплодия (Яковишина В.Л., 1991).

Также было обнаружено, что количество лейкоцитов неодинаково в разных частях цервикального канала. Анализ показал, что лейкоциты преимущественно локализуются в центральной области цервикального секрета.

Кроме того, нормальные цервикальные эпителиальные клетки способны продуцировать цитокины (Дахно Ф.В., 1981).

В цервикальном канале микроорганизмы локализуются в цилиндрическом эпителии и цервикальных железах. В нормальных физиологических условиях верхняя часть шейки матки остается стерильной (Воробьев А.А., 1997).

Уровень pH в цервикальном канале выше, чем во влагалище, однако микробиота шейки матки менее разнообразна (Кейт Л.Г., 1988).

Таким образом, шейка матки представляет собой часть женского репродуктивного тракта с высокой иммунологической активностью и служит основным барьером на пути восходящей инфекции.

Матка – это сложный орган, состоящий из различных тканей, который защищен от проникновения микробов как местными, так и общими защитными механизмами организма. Внутренняя поверхность матки, выстланная эпителием, служит надежным барьером, предотвращающим инфекции. Однако во время менструации этот барьер разрушается, что увеличивает вероятность заражения. Хотя иммунные клетки, такие как нейтрофилы и макрофаги, помогают бороться с микробами, основная защита мышечного слоя матки (миометрия), как и других мягких тканей, обеспечивается хорошим кровоснабжением и защитными компонентами

крови. У здоровых женщин матка обычно стерильна благодаря эффективной защите репродуктивной системы от инфекций.

За маткой находятся маточные трубы. Во время овуляции, когда яйцеклетка выходит из яичника, трубы выделяют больше жидкости. Эта жидкость похожа по составу на плазму крови, но содержит меньше белка. В ней присутствуют антитела (IgA, IgG, IgM), компоненты комплемента (усиливают иммунный ответ) и лактоферрин (обладает антибактериальными свойствами) (Телешева Л.Ф., 1998).

Таким образом, защита женской репродуктивной системы от инфекций обеспечивается сложным комплексом механизмов. Эти механизмы варьируются в зависимости от отдела полового тракта, демонстрируя органоспецифичность. Шейка матки, являясь главным барьером, также выступает центром интенсивной иммунной реакции при проникновении возбудителей.

## ГЛАВА 2. Методы качественной и количественной оценки микробиоценоза и местных неспецифических факторов защиты половых путей

В 1910 году А.Ф.М. Neurlein разработал бактериологическую классификацию для оценки микрофлоры влагалища, разделив её на четыре степени в зависимости от количества лактобацилл, лейкоцитов и эпителиальных клеток. Несмотря на это, современная наука считает эту классификацию устаревшей и неполной. Проблема заключается в том, что термин “степень чистоты” уместен только для первой степени, которая соответствует здоровой, физиологичной микрофлоре. Для третьей и четвертой степеней, характеризующихся наличием гнойных выделений и патогенных микроорганизмов, использование термина “чистота” некорректно (см. таблицу 2.1).

**Таблица 2.1**

**Оценка степени чистоты влагалища  
(по А.Ф.М. Neurlein)**

Микроскопическая картина	Уровни			
	I	II	III	IV
Палочки Додерлейна	+++	++	+	-
<i>Сomma variable</i>	-	-	++	++
Грам (-) кокки и/или палочки	-	-	++	++
Анаэробы, стрептококки, колибациллы, трихомонады	-	-	+/-	+++
Лейкоциты	-	+	++	+++
Эпителиальные клетки	Очень мало	+	+	++

В зарубежных странах для оценки состояния микрофлоры влагалища часто используется классификация О. Jirovec (1948) (Таблица 2.2)..

Таблица 2.2

## Степени чистоты влагалища

(по О. Jirovec)

1. Мазки здоровых женщин, состоящие из эпителиальных клеток и палочек Додерлейна.
2. Небактериальный кольпит: отсутствуют лейкоциты, но обнаруживаются множественные бактерии, не образующие гной.
3. Гнойный бактериальный кольпит: обнаруживается большое количество гноеродных бактерий и лейкоцитов.
4. Гонококковая инфекция: мазки, содержащие гонококки.
5. Трихомонадная инфекция: картина трихомониаза.
6. Кандидозный кольпит (инфекция <i>C. albicans</i> ): картина вагинального микоза.

Учитывая современные достижения клинической бактериологии и углублённое изучение инфекционных заболеваний женской половой системы, Е.Ф. Кира в 1994 году разработала оригинальную классификацию микроскопических характеристик влагалищного биоценоза. В ней выделены четыре типа вагинального биоценоза с указанием соответствующих каждому типу нозологических форм (см. Таблицу 2.3.).

Согласно эпидемиологическим исследованиям, основную долю среди инфекционно-воспалительных заболеваний женских половых органов составляют воспалительные процессы, вызванные условно-патогенными микроорганизмами и грибами — такими как *Ureaplasma urealyticum*, *Bacteroides spp.*, *Candida spp.* и др., которые входят в состав нормальной микрофлоры. При отсутствии выраженных признаков воспаления диагностика таких состояний затруднена, что способствует переходу заболевания в хроническую форму и развитию осложнений.

Выявление отдельных видов микроорганизмов во влагалищной микрофлоре не позволяет объективно оценить состояние микроценоза и

принять обоснованное решение о необходимости проведения этиотропной терапии. Полноценная характеристика вагинального биоценоза возможна только на основе количественных исследований, определяющих соотношение различных видов микроорганизмов, а также анализа их биологических свойств.

**Таблица 2.3.**

**Микроскопическая характеристика влагалищного биоценоза  
(по Е.Ф. Кире)**

<b>Состояние (тип) биоценоза</b>	<b>Характеристика симптомов</b>	<b>Нозологическая форма</b>
Нормоценоз	Микрофлора представлена преимущественно лактобактериями. Патогенные микроорганизмы (грамотрицательные бактерии, споры, мицелий, псевдогифы) и лейкоциты отсутствуют. Эпителиальные клетки в небольшом количестве, без признаков воспаления.	Нормальное состояние биотопа влагалища
Промежуточный тип	Лактобактерий мало. Обнаруживаются грамположительные кокки и грамотрицательные палочки. Имеются лейкоциты, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки.	Чаще наблюдается у здоровых женщин, иногда возникают субъективные жалобы и клинические признаки.
Дисбиоз	Лактобактерии крайне редки или	Бактериальный

влагалища	отсутствуют. Преобладает полиморфная грамположительная и грамотрицательная палочковая и кокковая микрофлора. Обнаруживаются «ключевые» клетки. Количество лейкоцитов варьирует. Фагоцитоз отсутствует или незавершенный. Полимикробная картина мазка.	вагиноз
Вагинит (воспалительный тип мазка)	Отмечается большое количество лейкоцитов, моноцитов и эпителиальных клеток. Выраженный фагоцитоз. Обнаруживаются гонококки, трихомонады, мицелии, псевдогифы и споры.	Неспецифический вагинит, гонорея, трихомоноз, микотический вагинит

## 2.1. Правила взятия материала для оценки состояния микробиоценоза влагалища

Успех бактериологической диагностики напрямую зависит от двух ключевых моментов: точной техники забора биологического материала и его своевременной транспортировки. Важно помнить, что забор материала должен производиться либо до начала терапевтического курса, либо не ранее чем через десять дней после его окончания, если применялись антибиотики или биопрепараты. Чтобы сохранить жизнеспособность микроорганизмов, чувствительных к внешним факторам, и предотвратить размножение нежелательной микрофлоры, материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию. Для этого используются специальные транспортные питательные среды, среди которых есть универсальные варианты, способные поддерживать жизнь большинства культивируемых

бактерий. Для получения надежных результатов, образец должен быть богат эпителиальными клетками, но содержать минимальное количество слизи и крови. Присутствие этих примесей может привести к ошибочным результатам – как ложноположительным, так и ложноотрицательным. Именно поэтому перед взятием материала из цервикального канала шейки матки предварительно очищают от слизи с помощью стерильного тампона. Затем, с использованием зонда или ложки Фолькмана, получают отделяемое. Зонд вводят в цервикальный канал на глубину 0,5–1,5 см и поворачивают на 360°, при этом важно избегать контакта инструмента со стенками влагалища при извлечении.

При заборе материала из влагалища задняя стенка также очищается от слизи стерильным тампоном, после чего мазок берется с помощью стерильного шпателя, зонда или ложки Фолькмана.

Для получения образца из уретры, пациентке рекомендуется воздержаться от мочеиспускания в течение полутора-двух часов до проведения процедуры. Если из уретры выделяется гной, мазок берут спустя 15-20 минут после мочеиспускания.

Перед взятием материала, отверстие уретры аккуратно очищают стерильным физиологическим раствором. Затем, специальный зонд осторожно вводят в уретру на глубину 1-1,5 см и делают несколько мягких вращательных движений для сбора образца.

Сразу после получения образца готовят мазок для исследования. Если необходимо провести бактериологический посев, зонд помещают в пробирку со специальной транспортной средой, обеспечивающей сохранность бактерий.

Если доставить образец в лабораторию в течение двух часов невозможно, пробирку необходимо заморозить при температуре -20°C. Транспортировка замороженного материала осуществляется в сумке-холодильнике. Замороженный образец можно хранить не более 15 дней.

## **2.2. Методы исследования микробиоценоза влагалища**

### **2.2.1. Микроскопическое исследование**

Для микроскопического исследования мазок готовят, высушивают на воздухе, фиксируют, а затем окрашивают.

**Приготовление мазка.** Исследуемый материал наносят тонким слоем на тщательно обезжиренное предметное стекло. Затем его накрывают вторым предметным стеклом и, удерживая оба стекла между первыми и вторыми пальцами обеих рук, плавно разводят их в противоположные стороны. Важно, чтобы стекла плотно соприкасались друг с другом во время движения. В результате равномерного распределения материала образуется мазок.

#### **Сушка и фиксация мазков**

Мазок, нанесенный на предметное стекло, высушивают на воздухе и закрепляют лишь после полного высыхания. Фиксация обеспечивает прочное прикрепление микробных клеток на стекле, предотвращает их смывание при последующем окрашивании и способствует лучшему восприятию красителя мертвыми клетками. Существуют два основных способа фиксации: физический (термический) и химический.

#### **Физический метод фиксации**

Предметное стекло с высохшим мазком удерживают пинцетом или первыми двумя пальцами правой руки (мазком вверх) и 2–3 раза быстро проводят через пламя спиртовки. Необходимо, чтобы общее время воздействия не превышало 2 секунд. Качество фиксации проверяют следующим образом: прикасаются тыльной стороной левой ладони к немазковой части стекла. Если стекло довольно горячее, но не вызывает ощущения жжения, фиксация выполнена правильно.

#### **Химический метод фиксации**

Для фиксации мазка используются такие химические вещества и соединения, как 96% этиловый спирт, ацетон, смесь Никифорова (смесь



спирта и эфира в соотношении 1:1), жидкость Карнуа (60 мл 96% спирта, 30 мл хлороформа, 10 мл уксусной кислоты).

Предметное стекло с высушенным мазком помещают в емкость с фиксирующим веществом на 10-15 минут, а затем высушивают на воздухе. После высыхания мазок окрашивают по методу Грама или Романовского-Гимзы.

Окрашивание по Граму относится к числу сложных методов микроскопической диагностики. В рамках этого метода используется два красителя: основной и дополнительный. Кроме красителей, применяются также обесцвечивающие вещества, такие как спирт или кислота. Основная особенность метода Грама заключается в различной восприимчивости клеточных стенок микроорганизмов к красителям группы трифенилметана, таким как генциановый фиолетовый, метилвиолет или кристаллический фиолетовый. Некоторые бактерии, например стафилококки и стрептококки, формируют прочные комплексы с основным красителем и йодом. Эти комплексы устойчивы к действию обесцвечивающих агентов, таких как спирт, поэтому такие бактерии сохраняют фиолетовую окраску даже после дополнительного окрашивания фуксином, который используется как контрастный краситель. Таким образом, бактерии, сохраняющие фиолетовую окраску, называются **грамположительными**, а те, что обесцвечиваются спиртом и затем приобретают розовую окраску от фуксина, — **грамотрицательными**.

**Грамотрицательные микроорганизмы** (к примеру, бактероиды, фузобактерии и другие) образуют с кристаллическим генцианом либо метилвиолетом и йодом комплексы, которые легко разрушаются под влиянием спирта. В итоге клетки теряют фиолетовую окраску, обесцвечиваются и впоследствии окрашиваются фуксином, приобретая розово-красный цвет.

Метод окрашивания по Граму имеет большое диагностическое значение, поскольку позволяет быстро определить принадлежность бактерий к грамположительной или грамотрицательной группе, что важно при выборе антибактериальной терапии.

#### **Порядок выполнения окрашивания по Граму:**

1. **Нанесение основного красителя.** На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги, затем наносят **карболовый кристаллический фиолетовый** краситель и оставляют на 1–2 минуты.
2. **Промывание.** Бумагу снимают, мазок промывают водой.
3. **Обработка раствором Люголя.** Мазок покрывают **раствором Люголя** (водный раствор йода и йодида калия) на 1–2 минуты.
4. **Обесцвечивание.** Мазок обрабатывают **96% спиртом** или **ацетоном** в течение 10–30 секунд до лёгкого обесцвечивания.
5. **Повторное промывание.** Мазок снова промывают водой.
6. **Контрастное окрашивание.** Наносят дополнительный краситель — **водный или спиртовой фуксин** (или сафранин) — на 1 минуту.
7. **Финальное промывание и сушка.** Мазок промывают водой, подсушивают на воздухе, затем исследуют под микроскопом (в масляной иммерсии).

#### **Результаты окрашивания по Граму**

**Грамположительные микроорганизмы** после окрашивания основным красителем сохраняют фиолетовую окраску. **Грамотрицательные микроорганизмы** теряют фиолетовый цвет после обработки спиртом и затем воспринимают светло-малиновый (розовый) оттенок от дополнительного красителя.

Одним из недостатков метода является возможное неравномерное окрашивание микроорганизмов в мазках, взятых из влагалищного секрета. Это связано с наличием большого количества слизи и продуктов жизнедеятельности бактерий, которые могут исказить результаты. В таких

случаях затрудняется точное определение грамстатуса микроорганизмов только на основании окраски.

### 2.2.2. Бактериологическое исследование

Бактериологическое исследование является одним из ключевых методов лабораторной диагностики, позволяющим получить полную качественную и количественную характеристику вагинальной микрофлоры. С развитием этого метода существенно изменились представления о составе нормальной и патологической микрофлоры влагалища.

Совершенствование бактериологических методов, включая улучшение состава питательных сред, оптимизацию условий культивирования, внедрение современных методов выделения и идентификации микроорганизмов, стало важным шагом к пересмотру нормативных критериев оценки микробиоценоза.

Первоначально считалось, что в состав нормальной микрофлоры влагалища, помимо лактобацилл, входят также условно-патогенные микроорганизмы — такие как стафилококки, стрептококки и некоторые грамотрицательные бактерии.

С начала 1970-х годов, с внедрением методов культивирования **анаэробных микроорганизмов**, представления о нормальной влагалищной микрофлоре существенно изменились. Совершенствование анаэробной техники и применение более точных методов **идентификации анаэробов** позволили значительно расширить перечень микроорганизмов, которые могут быть частью нормального микробиоценоза влагалища.

Тем не менее, **бактериологический метод не является универсальным**. Его диагностические возможности ограничены и во многом зависят от ряда **субъективных и технических факторов**, таких как:

- уровень технического оснащения бактериологической лаборатории;
- качество используемых питательных сред;

- методика забора, хранения и транспортировки материала;
- профессиональная подготовка и опыт лабораторного специалиста.

Поэтому результаты, полученные разными авторами, отличаются друг от друга, и до настоящего времени четко не определены критерии нормального и патологического состояния влагалища. Это, в свою очередь, создает трудности при постановке диагноза, предотвращении патологического процесса и его осложнений, а также проведении эффективного этиотропного лечения.

Бактериологический метод исследования позволяет проводить как качественную, так и количественную оценку бактериального состава вагинальной микрофлоры. Определение рода, семейства и вида микроорганизмов, то есть их дифференциация и идентификация, является одним из самых сложных и ответственных этапов бактериологического анализа. На этом этапе изучаются морфологические, тинкториальные (окрашивание), культуральные (характер роста), ферментативные и антигенные свойства микроорганизмов.

При идентификации микроорганизмов необходимо использовать только чистую культуру, поскольку наличие посторонних микроорганизмов может исказить результаты исследования и привести к ошибочным выводам.

В лабораторной практике различают метод точной количественной оценки и приближённый полуколичественный метод.

**Вагинальные выделения высеваются на питательные среды двумя способами:**

1. Сбор с помощью ложки Фолькмана или бактериологической петли диаметром 3 мм. Материал помещают в пробирку с 1 мл жидкой транспортной питательной среды. Затем готовят серийные разведения в соотношении 10:1 (объём/вес) и засевают по 0,1 мл на различные селективные питательные среды.

2. Сбор с помощью микробиологического тампона. Полученное отделяемое засевают на тиогликолевую питательную среду. После инкубации производится пересев на селективные питательные среды в чашках Петри.

В первом случае степень роста микроорганизмов (прироста) рассчитывается относительно 1 мл вагинального отделяемого и выражается в единицах, формируемых колониями (КОЕ/мл).

При использовании полуколичественного метода рост микрофлоры оценивается по четырём уровням:

**Оценка роста микроорганизмов при полуколичественном методе:**

- **Рост отсутствует:** На твёрдых питательных средах колонии не образуются. Рост возможен только в жидких питательных средах.
- **Очень слабый (разреженный) рост:** На твёрдой питательной среде определяется до 10 колоний одного вида микроорганизмов.
- **Умеренный рост:** На твёрдой питательной среде выявляется от 10 до 100 колоний одного вида микроорганизмов.
- **Обильный (чрезмерный) рост:** На твёрдой питательной среде наблюдается более 100 колоний одного вида микроорганизмов.

Бактериологический посев проводится на стандартных питательных средах, обеспечивающих максимально возможное выявление спектра микроорганизмов. Для выделения всех видов факультативных анаэробных бактерий и определения их количественного содержания используется агар с добавлением 5% донорской крови.

**Стафилококки** представляют собой широко распространённую в природе группу микроорганизмов, включающую как сапрофитные, так и патогенные виды с различной степенью вирулентности. Поэтому выделение стафилококков из вагинального секрета со смешанной флорой не является достаточным доказательством их этиологической значимости. Патогенность стафилококков можно с уверенностью установить лишь при

выделении монокультуры из закрытых гнойных очагов — вне зависимости от свойств конкретного штамма.

Для выделения стафилококков применяются элективные питательные среды, такие как яично-солевой агар Чистовича, молочно-солевой агар и агар *Staphylococcus*. Эти среды содержат 7,5% NaCl, маннит и желатин, что способствует селективному росту стафилококков. Кроме того, по способности образовывать лецитиназу на яично-солевом агаре можно различать патогенные и непатогенные виды стафилококков.

**Стрептококки** культивируются на агаре Columbia с добавлением 5% дефибринированной крови лошади или овцы, налидиксовой кислоты (15 мг/л) и колистина (10 мг/л). Однако на этой среде могут также расти каталазоположительные стафилококки, поэтому при идентификации необходимо дополнительно проводить **тест на каталазу**, позволяющий их различить.

**Энтерококки** (представители группы D стрептококков) культивируются на питательных средах *Enterococcus agar* (Serva), *Enterococcus agar* (Difco), *Slanetz and Bartley agar* или *Bile Esculine agar*. При количественном анализе посеvy осуществляются из разведений материала в концентрациях  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$ .

Все указанные агары, за исключением *Bile Esculine agar*, содержат хлорид трифенилтетразолия. В результате расщепления этого вещества энтерококками формируются колонии характерного малинового или розового цвета.

Для культивирования грамотрицательных, не образующих споры факультативных анаэробных бактерий используются среда Эндо и питательная среда MACCONKEY. При количественных исследованиях производят посев из разведений материала  $10^{-5}$  и  $10^{-7}$ . Лактозонегативные и лактозопозитивные кишечные палочки учитываются отдельно. Для

биохимической идентификации этих микробов используется дифференциально-диагностическая питательная среда Клиглера.

Для выделения грибов рода *Candida* используется среда Сабуро с добавлением хлорамфеникола (400 мг/л). На этой среде грибы при температуре +37°C через 24-48 часов образуют кремообразные, круглые колонии с ровными краями. При количественном исследовании производят посев из разведения материала 10<sup>-3</sup>.

Для выделения *G. vaginalis* используются селективные питательные среды, такие как агар *Gardnerella vaginalis*, агар Columbia CNA или HBT Bilayer medium (BBL). Для определения β-гемолизина в среду добавляют 10% крови. В атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при температуре +37°C через 48 часов *Gardnerella vaginalis* образует на среде серые, блестящие, гладкие, округлые колонии диаметром 0,25–0,45 мм с β-гемолизом.

Для исследования микоплазм применяются специальные транспортные питательные среды, содержащие лошадиную сыворотку и дрожжевой экстракт. Посев проводят на агарах А7, ЭД-1 и других питательных средах, предназначенных для культивирования микоплазм.

Питательная среда ЭД-1 была разработана в Узбекистане (Эшбоев Э.Х., Давуров А.М., 2000). Её основой служит экстракт мяса и печени кролика, в который добавляют 2% агар-агара, 1% пептона и 0,5% поваренной соли. Смесь стерилизуют в автоклаве при давлении 0,5 атм и температуре +120°C в течение 20 минут.

На втором этапе в питательную основу добавляют вторичные компоненты, необходимые для роста микоплазм: 40% лошадиной сыворотки, асцитическую жидкость, витамины, а также антибактериальные и противогрибковые препараты. Для культивирования *Ureaplasma urealyticum* дополнительно вводят 2 мл 10% раствора мочевины и 0,5 г 30% линкомицина гидрохлорида.

Рост микоплазм и уреаплазм в указанных средах оценивается через 48–72 часа.

Наблюдения проводятся микроскопическим методом. Для культивирования, количественного определения, идентификации и оценки чувствительности микоплазм к антибиотикам может использоваться тест-набор **Mycoplasma DOU**.

**Лактобактерии** культивируются на питательной среде **МРС**. При проведении количественных исследований посев выполняется из разведений  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$  исследуемого материала. Для предотвращения роста грибов в среду добавляют **сорбиновую кислоту** в концентрации **14 г/л**. После посева чашки Петри помещаются в **анаэроостат** без использования палладиевого катализатора (то есть без поглощения кислорода). Инкубацию проводят в термостате при температуре **+37°C** в течение **48 часов**.

При выделении строго **облигатных анаэробных бактерий**, не образующих спор и являющихся доминирующими микроорганизмами в микрофлоре человека, необходимо обеспечить защиту от губительного воздействия кислорода до момента посева. Изоляция анаэробов — один из наиболее тонких и ответственных этапов лабораторной диагностики. Для успешного выращивания анаэробных бактерий из питательных сред удаляют молекулярный кислород, создавая благоприятные условия для их роста.

Перед посевом пробирки с питательной средой кипятят на водяной бане в течение 10–20 минут. При кипячении из среды удаляется растворённый кислород. Сразу после кипячения питательную среду быстро охлаждают с помощью льда или под струёй холодной воды, после чего она используется для посева.

Для уменьшения диффузии кислорода из воздуха в питательную среду на её поверхность наносят слой вазелинового или парафинового масла толщиной 1,0–1,5 см. При внесении биологического материала с помощью



пипетки пробирку слегка наклоняют и осуществляют посев, пропуская пипетку через масляный слой.

Ткани паренхиматозных органов обладают способностью активно связывать кислород, что используется при приготовлении **среды Китта-Тароцци**, широко применяемой для культивирования анаэробов. В состав жидких питательных сред также могут добавляться вещества, адсорбирующие кислород, такие как хлопок или пемза.

#### Культивирования **анаэробов в вакуумных условиях**

Вакуумные условия для культивирования анаэробных микроорганизмов создаются в **анаэростатах** или **эксикаторах**. Биологический материал или культура микроорганизмов засеваются на жидкие питательные среды в пробирках или на твердые питательные среды в чашках Петри. Сразу после посева чашки или пробирки помещают в **микроанаэростат**, содержащий:

- палладиевый катализатор, поглощающий кислород;
- индикатор, реагирующий на наличие свободного кислорода.

Перед использованием катализатор активируют, выдерживая в сушильном шкафу при температуре +175–180 °С в течение одного часа.

После помещения посевов внутрь устройства, анаэростат герметично закрывается. Далее воздух удаляется с помощью **вакуумного насоса**, и система заполняется **азотом** для создания условий, исключающих присутствие молекулярного кислорода.



**Рис. 2.1. Микроанаэростат.**

Из микроанаэростата снова выпускают газ, после чего его наполняют газовой смесью, содержащей 10%  $\text{CO}_2$ , 10%  $\text{H}_2$  и 80%  $\text{N}_2$ , и помещают в термостат. Анаэробные условия в микроанаэростате также могут быть созданы с использованием **газогенераторного пакета**. Через 48 часов инкубации проводят первичное исследование: для изучения культуральных свойств микроорганизмов и их идентификации из выросших колоний отбираются те, которые вызывают подозрение на анаэробные бактерии. Эти колонии пересевают:

- на жидкие питательные среды, поддерживающие рост анаэробов;
- на твёрдые питательные среды, где инкубация проводится в **аэробных условиях** — с целью определения, являются ли они факультативными анаэробами.

После первичного исследования культуры снова помещают в термостат для дальнейшей **72-часовой инкубации**. Во время вторичного исследования обращают внимание на образование характерного чёрного пигмента. Также колонии, появившиеся спустя 48 часов, но отсутствовавшие ранее, дополнительно засевают в жидкую питательную среду для подтверждения анаэробного роста.

**Микроаэрофилы** (*G. vaginalis* и *Lactobacillus spp.*) выращиваются в условиях с низким содержанием  $O_2$ . Для выделения бифидобактерий их культивируют на питательных средах «**Блаурокко**» и «**Агар для бифидобактерий**» фирмы *Himedia*. Для предотвращения роста аэробных бактерий в питательную среду добавляют натрия азид в концентрации 100 мг/л.

При количественных исследованиях материал засевают из разведений  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-9}$ . При полуколичественном методе посев проводят на полужидкую или твёрдую питательную среду в чашках Петри методом агаровой колонки.

Инкубацию осуществляют в микроанаэроостате при температуре  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 48 часов. Бифидобактерии образуют колонии в виде семян гречки или, иногда, в форме дисков.

**Анаэробные грамположительные кокки** выделяют на среде **Columbia Agar Base** с добавлением 5% бараньей крови, налидиксовой кислоты (10 мг/л), колистина (10 мг/л) или фенилэтилового спирта (2,5 г/л).

Для выделения бактерий рода *Mobiluncus* в питательную среду **Columbia Agar Base** добавляют 2,5% лошадиной сыворотки, 15 мкг/мл налидиксовой кислоты и 1,0 мкг/мл тинидазола. Может также использоваться альтернативный селективный агар, при приготовлении которого в **Columbia Agar Base** добавляют 5% бараньей крови, 15 мкг/мл налидиксовой кислоты и 10 мкг/мл колистина.

Культуру инкубируют в анаэробных условиях при температуре +37 °С в течение 4–5 суток.

Для выделения клостридий применяется твёрдая питательная среда **МРС**. Растворённую среду, разлитую по пробиркам по 9 мл, охлаждают до +48 °С, после чего в неё засевают исследуемый материал (при количественных исследованиях — из разведений  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-7}$ ).

Затем в каждую пробирку добавляют ещё небольшое количество (около 1,5 см) расплавленной среды **МРС** для предотвращения диффузии кислорода.

В питательной среде **МРС** содержится метиленовый синий в концентрации 1:20 000. Результаты оцениваются после 10–18 часов инкубации.

Для выделения *Clostridium perfringens* используется селективная питательная среда **TSC**. В неё добавляют D-циклодекстрин (400 мг/л) и эмульсию яичного желтка (50 мг/л).

*C. perfringens* образует колонии чёрного цвета благодаря присутствию в среде метабисульфита натрия и цитрата железа. Эмульсия яичного желтка способствует выявлению лецитиназопозитивных клостридий.

Культуральные (ростовые) признаки микроорганизмов определяются характером их роста на питательных средах. Эти признаки являются постоянными для каждого вида микроорганизмов и имеют важное значение в диагностике.

Идентификация чистых культур бактерий проводится либо до рода, либо до вида — в зависимости от целей исследования.

Идентификация чистой культуры бактерий до видового уровня проводится общепринятыми методами в соответствии с **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** (9-е издание, 1984 г., дополненное в 1997 г.).

При определении видов стафилококков учитываются их способность коагулировать плазму, гемолизировать эритроциты, продуцировать пигменты и лецитиназу.

*Staphylococcus aureus*, считающийся патогенным микроорганизмом, образует жёлтый пигмент в питательной среде.

Для определения способности к расщеплению маннита на колонию наносят 0,04% раствор бромтимолового синего. При изменении окраски индикатора на жёлтую реакция считается положительной (+).

Для выявления способности к гидролизу желатина на колонию наносят 20% раствор сульфосалициловой кислоты (реакция Стоуна). Появление прозрачной зоны вокруг колонии свидетельствует о положительной реакции (+).

Для подтверждения принадлежности бактерии к виду *S. aureus* дополнительно проводят тесты на плазмокоагулазу и ДНК-азу.

Активность ДНК-азы определяется на среде **ДНК-агара**. Подозрительные колонии засевают штриховым методом от центра к краям чашек Петри с питательной средой.

После инкубации нуклеазную активность стафилококков оценивают путём добавления на поверхность среды 0,1% раствора толуидинового синего. Появление розового окрашивания свидетельствует о положительной реакции на нуклеазу.

Для дополнительного подтверждения принадлежности стафилококков к виду *Staphylococcus aureus* применяется идентификационная система **Staphyslide-Test**, основанная на реакции агглютинации эритроцитов, сенсibilизированных человеческим фибриногеном.

Биохимическая идентификация стафилококков проводится с использованием тест-систем **API 20 Staph** и **RAPIDEC Staph**.

**Довидовая идентификация стрептококков** основана на их биохимической активности и может проводиться с использованием тест-системы **API 20 Strep**.

Для идентификации **лактозопозитивных бактерий** применяется тест-система **Enterofermtub**, а для **лактозонегативных** — тест-система **Oxifermtub**.

При отсутствии этих тест-систем энтеробактерии идентифицируют с помощью стандартных биохимических тестов. С их помощью определяют способность расщеплять глюкозу, лактозу, мальтозу, маннит и сахарозу; рост на цитратном агаре Симмонса; воздействие на мочевины и малонат натрия; подвижность, а также образование сероводорода и индола.

Для довидовой идентификации *Candida albicans*, обладающей способностью к образованию хламидоспор, подозрительные колонии (белые или розовые), выращенные на среде Сабуро, инокулируют в среду **РСВ** (рисово-сироватковый бульон) в пробирке.

Пробирки с посевами оставляют при комнатной температуре для инкубации.

Через 24–48 часов определяют локализацию роста микроорганизмов и готовят разветвлённый мазок между двумя окнами. Мазки исследуют с помощью микроскопии в затемнённом поле. В зоне образования филаментов ищут хламидоспоры.

Если хламидоспоры не обнаружены, посев повторяют. При повторно отрицательном результате проводят биохимическую идентификацию дрожжеподобных грибов с использованием тест-систем **API 20C AUX** или **Micotube**.

Довидовая идентификация грибов рода *Candida* также может быть выполнена с использованием микробиологической системы **Quantum**.

При идентификации *Gardnerella vaginalis* учитываются морфологические особенности колоний, выращенных на селективной

питательной среде после 2–4 суток инкубации. Обычно колонии выпуклые, шаровидной формы, с признаками гемолиза.

При микроскопии наблюдаются грамвариабельные (грампеременные) мелкие палочки или коккобациллы.

Микроорганизмы каталазо- и оксидаза-отрицательны, расщепляют крахмал и мальтозу с образованием кислоты, чувствительны к метронидазолу и триметоприму.

Примерная идентификация лактобактерий проводится микроскопическим методом с использованием окраски по Граму. В мазке лактобактерии представлены в виде прямых палочек, не образующих спор. Бактерии рода *Lactobacillus* не продуцируют каталазу и оксидазу.

**Идентификация факультативных анаэробных лактобактерий** осуществляется с помощью бумажной индикаторной системы **SIB-L** (для лактобактерий). Для анализа используют грамположительные, каталазоотрицательные палочки, выращенные на питательной среде **MRS** в течение 48 часов.

Дифференциация основана на способности бактерий ферментировать различные углеводы и многоатомные спирты (глюкоза, мелибиоза, манноза, мелицитоза, рамноза, салицин), что позволяет оценить их ферментативные свойства.

Результаты теста оцениваются спустя 72 часа инкубации при температуре +37 °С. Интерпретация биохимических реакций проводится с использованием таблицы биохимических свойств лактобактерий.

Анаэробные лактобактерии идентифицируются с применением полуавтоматической системы **Sceptor**.

Предварительная идентификация строго анаэробных грамотрицательных бактерий проводится на основании следующих критериев:

- рост на питательных средах, содержащих желчь (5 мг на диск), канамицин (1000 мкг на диск), бриллиантовый зелёный (100 мкг на диск);
- способность к расщеплению глюкозы;
- наличие или отсутствие черного пигмента.

На основе этих признаков бактерии условно делятся на четыре группы:

**1-я группа — род *Bacteroides*.** Все представители этой группы расщепляют глюкозу, растут на средах с желчью и канамицином, но не растут в присутствии бриллиантового зелёного.

**2-я группа — род *Prevotella*.** Бактерии растут на средах с канамицином, но не растут в присутствии желчи и бриллиантового зелёного. Расщепляют глюкозу.

**3-я группа — род *Porphyromonas*.** Асахаролитические бактерии (не расщепляют сахара), не растут на средах с желчью и бриллиантовым зелёным, но растут в присутствии канамицина. Образуют чёрный пигмент. Представители этой группы чувствительны к ванкомицину.

**4-я группа — род *Fusobacterium***

- Не растут в средах с желчью и канамицином.
- Растут в присутствии бриллиантового зелёного.

**Дополнительная идентификация некоторых строго анаэробных бактерий** может проводиться с использованием **люминесцентной микроскопии** в длинноволновом УФ-свете. Для этого применяют микроскоп с фильтрами **FS 1-2** и **SZS 24-4**.

- При наличии бактерий группы *Prevotella melaninogenica* / *Porphyromonas asaccharolytica* колонии излучают **малиновый свет**.

- *Fusobacterium spp.* и *Clostridium difficile* — излучают **зелёный свет**.

Анаэробные кокки грам (+) идентифицируются по биохимическим свойствам и чувствительности к новобиоцину.

Примерная идентификация бифидобактерий проводится микроскопическим методом. В мазках, окрашенных по Граму,



бифидобактерии выглядят как X-, Y- и V-образные прямые или разветвленные палочки с расширенными концами. Бактерии рода *Bifidobacterium* продуцируют фермент фруктозо-6-фосфатфосфокетолазу (F6-ФФК), не образуют индол и каталазу, не восстанавливают нитраты, не расщепляют адонит, дульцит, эритрит, глицерин, рамнозу и альфа-метил-D-маннозид.

Биохимическая идентификация клостридий проводится с помощью идентификационной системы API 20A или Rap ID Ana II.

Довидовая идентификация гарднерелл по морфологии (по Граму - грамвариабельные мелкие палочки) и биохимическим свойствам проводится с помощью идентификационной системы API 20 Strep API Zym.

В связи с технической сложностью культивирования строго анаэробных и микроаэрофильных бактерий отсутствует единое представление о нормативных показателях, вследствие чего в настоящее время не определены четкие критерии нормоценоза вагинальной микрофлоры. Ниже приведены критерии, применяемые при бактериологической диагностике вагинальных выделений.

Нормоценоз:

- общее количество микроорганизмов в вагинальном отделяемом составляет  $10^6$ - $10^8$  КОЕ/мл;
- большое количество лактобактерий;
- количество условно-патогенных микроорганизмов - менее  $10^4$  КОЕ/мл;

Бактериальный вагиноз:

- общее количество микроорганизмов в вагинальном отделяемом превышает  $10^9$  КОЕ/мл;
- лактобактерии отсутствуют или их титр резко снижен до  $10^4$  КОЕ/мл;
- микрофлора носит полимикробный характер и в ней преобладают *G.vaginalis* и строго анаэробные бактерии;

Следует обратить внимание на то, что при бактериологическом исследовании при выделении некоторых видов *G.vaginalis* и строго анаэробных бактерий не всегда ставится диагноз бактериального вагиноза, так как *G.vaginalis* и строго анаэробные бактерии являются индигенными представителями микрофлоры влагалища. Поэтому бактериологическая диагностика бактериального вагиноза должна основываться на интегральной оценке микрофлоры. При этом в первую очередь учитывается не видовой и количественный состав микрофлоры, а количественное соотношение ее компонентов.

### **2.2.3. Метод газожидкостной хроматографии**

Использование газожидкостной хроматографии в диагностике бактериального вагиноза в основном опирается на распознавание веществ обмена микроорганизмов. К таким метаболитам относятся парящие жирные кислоты (уксусная, изопропионовая, пропионовая, изовалериановая, валериановая) и непарящие органические кислоты (молочная, янтарная). В роли материала применяется промывание вагинальных выделений в физиологическом растворе. Для этого во влагалище вводят 3 мл стерильного физиологического раствора, микробиологическим ватным тампоном подготавливают промывку вагинальных выделений со стенок влагалища и заливают её в пробирку.

Для анализа летучих жирных кислот готовят их эфирные экстракты. К 1 мл образца добавляют 0,5-1,0 мл диэтилового эфира и центрифугируют в течение 1 минуты с помощью миницентрифуги. После этого выделяют эфирный экстракт. При этом используется безводная пастерова пипетка с сульфатом магния.

Для анализа нелетучих компонентов к 2 мл промывки добавляют 4 мл метанола, пробирку плотно закрывают и помещают в холодильник при температуре – 20°C на 45 минут.

Затем жидкость переносят в герметичную пробирку и добавляют 0,2 мл 50% раствора серной кислоты. Пробирку выдерживают при температуре +80 °С в течение 30 минут.

После завершения процесса этерификации пробирку охлаждают под проточной водой и добавляют 2 мл дистиллированной воды.

Для экстракции летучих эфиров используют 1 мл хлороформа. 1 мкл полученного экстракта набирают с помощью микрошприца и вводят в инжектор газового хроматографа.

В качестве эталонов используют экстракты водных растворов летучих и нелетучих жирных кислот.

Для газожидкостной хроматографии используется хроматограф «Хром-5», оснащённый пламенно-ионизационным детектором и стеклянной колонкой, заполненной 15% сорбентом ФАП.

#### **Условия работы прибора:**

- Температура испарителя: +190 °С
- Температура термостата: +50 °С
- Температура детектора: +250 °С
- Скорость потока газоносителя (азота) и водорода: по 30 мл/мин
- Скорость подачи воздуха: 300 мл/мин

**Идентификация исследуемых веществ** проводится по времени их удерживания в колонке (времени задержки). **Концентрация** определяется по **площади пика** на хроматограмме.

Результаты интерпретируются путём сравнения с данными руководств по микробиологии и хроматографии.

Метод газожидкостной хроматографии позволяет **оценить содержание лактобактерий и строго анаэробных микроорганизмов** во влагалищном секрете на основании анализа их основных продуктов метаболизма — **молочной и янтарной кислот.**

Нормальное соотношение янтарной и молочной кислот составляет 0,4. При бактериальном вагинозе этот показатель превышает 0,4.

По данным зарубежных авторов, чувствительность и специфичность метода составляет от 78–81% до 100%. Согласно данным Анкирской А.С. и соавт., чувствительность составляет 80%, а специфичность — 88,6%.

При бактериальном вагинозе также наблюдается высокая концентрация летучих жирных кислот, продуцируемых строгими анаэробами. Однако на практике этот метод применяется редко из-за высокой сложности выполнения и высокой стоимости.

#### **2.2.4. Иммунологические методы**

##### **Определение содержания иммуноглобулинов (А, М, G) в вагинальном секрете**

Агар, нагретый до 55–56 °С, смешивают с антисывороткой в соотношении 3:1 и заливают в чашку Петри, установленную на горизонтальной поверхности.

После затвердевания в агаре делают 33 лунки, в которые с помощью пастеровской пипетки вводят исследуемое вагинальное отделяемое.

В четыре центральные лунки помещают тест-сыворотку, содержащую известное количество иммуноглобулина, предварительно разведённую в четыре раза.

После этого чашку Петри помещают в эксикатор в горизонтальном положении и оставляют при температуре +4 °С на 24–48 часов (для IgG и IgA — 24 часа, для IgM — 48 часов).

Результаты оцениваются через 24–48 часов. Кольцо преципитации, хорошо видимое при наклонном освещении, измеряется с помощью линейки.

Для оценки результата по диаметру кольца вокруг ямки с тест-сывороткой строится калибровочная кривая (на логарифмической бумаге). С

её помощью определяется концентрация иммуноглобулинов в исследуемых образцах.

Калибровочная кривая составляется отдельно для каждого класса иммуноглобулинов. При её построении важно учитывать, что в определённом интервале концентраций диаметр кольца прямо пропорционален логарифму концентрации иммуноглобулинов.

После измерения диаметра кольца в исследуемых образцах, на основании калибровочной кривой оценивается содержание иммуноглобулинов в секрете.

Концентрация выражается в МЕ, мг% или г/л.

### **Определение фагоцитарной активности нейтрофилов**

Фагоцитарную активность нейтрофилов в вагинальном секрете определяли по методу Караулова А.В. (1999).

Для очистки полученного экстракта его центрифугировали в буферном растворе при 1000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливали, к осадку добавляли 0,5 мл физиологического раствора. Из полученного материала брали 0,2 мл и смешивали с 0,1 мл однодневной культуры стафилококка ( $5 \times 10^8$  клеток/мл). Смесь встряхивали и инкубировали во влажной камере при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 30 минут.

Затем из инкубированной смеси готовили мазок и окрашивали его по методу Романовского—Гимзы. Под микроскопом подсчитывали 200 лейкоцитов, среди которых определяли количество фагоцитирующих клеток, и выражали результат в процентах.

### **Определение уровня лизоцима в вагинальном секрете**

Метод определения лизоцима состоит из двух этапов и основан на способности лизоцима лизировать клетки *Micrococcus lysodeikticus*.

#### 1. Приготовление 0,1 М раствора бифталата калия

- Отвешивают **20,42 г сухого бифталата калия**.
- Растворяют в **1 литре дистиллированной воды**.
- Измеряют **pH раствора** с помощью потенциометра.
  - Начальный pH обычно составляет **3,9–4,0**.
- Для доведения pH до **6,2** добавляют **раствор NaOH**.

#### 2. Приготовление агаровой среды

- К **100 мл 0,1 М фталатного буфера** добавляют **1 г агара Difco**.
- Смесь помещают в **водяную баню** и нагревают до полного растворения агара.

- Охлаждают раствор до **45–50 °C**.

#### 3. Приготовление суспензии *Micrococcus lysodeikticus*

- Отвешивают **150 мг ацетонового порошка *Micrococcus lysodeikticus*** на **100 мл жидкого агара**.

- Перемешивают в **фарфоровой ступке** до однородности.

**Примечание:** Используют **10 мл 0,1 М буфера** на каждые 100 мл жидкого агара при повторном перемешивании.

#### 4. Разливка и подготовка агаровых чашек

- В полученную смесь добавляют 100 мл охлажденного агарового раствора.
- Тщательно перемешивают и разливают по **15 мл в чашки Петри**.
- Для застывания и стабилизации среды чашки помещают в холодильник на **30–40 минут**.

#### 5. Проведение анализа методом агаровой диффузии

- На затвердевшем агаре делают **5 лунки диаметром 8 мм**:
  - **3 лунки** — для **контрольных растворов лизоцима** известной концентрации,
  - **2 лунка** — для **исследуемого вагинального отделяемого**.
- В каждую лунку вносят по **0,15 мл раствора**.

- Чашки инкубируют при **+37 °С в течение 18–20 часов**.
- После инкубации измеряют **диаметр зоны лизиса** вокруг каждой лунки.
- По контрольным образцам строится **калибровочная кривая (дуга)**.
  - По этой кривой определяют **концентрацию лизоцима** в исследуемом образце.

## 6. Модификация метода по Алиеву Ш.Р. (1994)

Альтернативный способ количественной оценки лизоцима с использованием бумажных дисков:

- Стерильные **бумажные диски** пропитываются вагинальным отделяемым.
- Диски помещают на поверхность **агаровой среды**, засеянной газоном **M. lysodeikticus**.
- Посев инкубируют в термостате при **+37 °С в течение 24 часов**.
- Измеряют **зону отсутствия роста** вокруг диска.
- Расчёт титра лизоцима проводят по **диаметру зоны лизиса**, используя ранее составленную шкалу соответствий.

### 2.2.5. Серологические методы

Метод обнаружения антител в сыворотке крови обычно проводится во время реконвалесценции или через определенное время после перенесенного заболевания, когда образуются антитела. Известно, что антитела могут присутствовать в сыворотке крови пациентов после болезни или вакцинации. Они "маскируют" иммунный ответ на инфекции. Известно, что небольшое количество антител в инфицированном или вакцинированном организме усиливает синтез гомологичных иммуноглобулинов, в то время как большое количество подавляет этот синтез. Поэтому в диагностике имеет значение не

наличие антител, а их титр. Более выраженным показателем в динамике заболевания является увеличение титра антител в 4 раза. Для этого обследование повторяют через 7-14 дней. Следует обратить внимание на то, что в серологических реакциях специфичность не является полной в случаях, когда возбудители имеют общий антиген и специфические детерминанты, характерные для одного или нескольких видов. Выявление иммуноглобулинов различных классов (IgG, IgM) повышает диагностическую ценность серологических исследований. IgM образуется на ранних стадиях заболевания и указывает на недавнее заражение. Впоследствии уровень IgM снижается, и появляется IgG. IgM является термостабильным, разрушается под действием меркаптоэтанола и этими свойствами отличается от IgG. Специфичность серологических тестов зависит от качества используемых диагностикумов. Например, сыворотки, подвергшиеся гемолизу, не могут быть использованы в реакции связывания комплемента (РСК). Сыворотки с бактериальным загрязнением, многократно замороженные и размороженные, хранившиеся при комнатной температуре, считаются непригодными для исследования. В серологических реакциях определяется либо антиген, либо антитело. Для выявления антител используются стандартные антиген-диагностикумы (живые или инактивированные возбудители, растворимые антигены или эритроцитарные антигенные препараты). Для обнаружения антигенов применяются специальные сыворотки.

### **Реакция иммунофлюоресценции**

РИФ основана на связывании антигенов бактерий, риккетсий или вирусов со специфическими антителами, мечеными специальным красителем (флуоресцеин изотиоцианатом). На приготовленный мазок наносится специальная сыворотка, и препарат исследуется под люминесцентным микроскопом. При соответствии АГ и АТ под микроскопом наблюдается свечение.



### **Радиоиммунный метод**

К исследуемой сыворотке добавляют референсную сыворотку, содержащую антитела. Смесь инкубируют в течение 1-2 дней, затем добавляют референс-антиген, меченный I125+, и инкубируют еще 24 часа. К образовавшемуся растворимому комплексу АГ-АТ добавляют антииммуноглобулин, вызывающий преципитацию против референс-сыворотки, и образуется преципитат. Результат реакции оценивается на счетчике по наличию и количеству импульсов в преципитате.

### **Иммуноферментный анализ**

ИФА обладает достаточной чувствительностью и считается простым методом. Реакция проводится на пластиковых планшетах. Антиген фиксируется в лунках планшета. В лунку добавляют исследуемую сыворотку, и образуется комплекс АГ - АТ. Затем на него наносят антиглобулиновую сыворотку, меченную ферментом. Эта антиглобулиновая сыворотка связывается с комплексом АГ - АТ и фиксируется в лунке. Затем в эту систему добавляют вещество, вступающее в цветную реакцию с ферментом, и оценивают интенсивность окрашивания.

#### **2.2.6. Методы генодиагностического исследования**

Методы молекулярно-биологической идентификации нуклеиновых кислот микроорганизмов широко используются в практической медицине. Основной целью молекулярно-биологического подхода к решению медицинских задач является изучение бактериологической микрофлоры, встречающейся в организме человека в нормальных и патологических состояниях. Поэтому при нарушениях микробиоценоза (дисбактериоз влагалища, кишечника) необходимо проведение лабораторной диагностики. Основными лабораторными методами исследования при этих патологиях являются культуральный посев и микроскопия. Культуральный посев

считается "золотым стандартом" микробиологии. Этот тест обладает 100% специфичностью по отношению к возбудителю. Основным методом микробиологии заключается в культивировании бактериальной флоры и выделении чистых культур. Поскольку возможности применения микробиологических анализов ограничены, невозможно полностью оценить состояние микрофлоры. По различным данным, культивировать можно только 15% микроорганизмов, обитающих в организме человека. Некультивируемые микроорганизмы не способны расти в лабораторных условиях или находятся в состоянии спор. Проблема культуральной диагностики дисбиоза заключается в том, что большая часть культивируемой микрофлоры является анаэробной (строго или факультативно) и микроаэрофильной. Хотя выращивание факультативных анаэробов не представляет сложности, бактериологическое культивирование строгих анаэробов и микроаэрофилов вызывает трудности. Для проведения бактериологического исследования анаэробов и микроаэрофилов необходимо создание специальных транспортных и питательных сред, а также оптимальных условий. Несмотря на то, что были разработаны питательные среды для выделения таких микроорганизмов, как *G.vaginalis*, *M.hominis*, *U.urealyticum*, *Mobiluncus* spp., их культивирование и идентификация являются деликатной процедурой, требующей длительного времени и большого опыта. В обычных бактериологических лабораториях невозможно соблюдать такие требования. Даже в хорошо оснащенных клинικο-диагностических центрах процент культивирования этих микроорганизмов составляет 12-60%. Основным недостатком культурального посева является его длительность. Для выращивания некоторых микроорганизмов требуется от нескольких дней до нескольких недель. И за это время пациенты не могут получить эффективное лечение.

Только методы генодиагностики (ДНК-ДНК гибридизация и ПЦР) способны решить проблему быстрого и качественного выявления

представителей анаэробной микрофлоры и микроаэрофилов. При использовании этих методов микроорганизмы обнаруживаются непосредственно в урогенитальном мазке. То есть их можно идентифицировать без выращивания и получения чистой культуры. Метод генодиагностики основан на обнаружении ДНК возбудителя в клиническом материале. Благодаря тому, что физико-химические свойства всех нуклеиновых кислот схожи, стало возможным создать универсальный метод определения ДНК любого микроорганизма в биопrobe. Специфика наследственного материала любого возбудителя обеспечивает специфичность метода и позволяет идентифицировать возбудителя вплоть до вида. Для проведения генодиагностики не требуются специальные транспортные питательные среды, благоприятные условия транспортировки и хранения, что снижает стоимость самостоятельного анализа. Проведение анализа занимает 4,5-5 часов.

Основным методом генодиагностики, используемым при обследовании пациенток с бактериальным вагинозом, является полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ее модификации. В основе метода ПЦР лежит комплементарное построение фрагмента генома ДНК или РНК возбудителя (в условиях *in vitro* с помощью термостабильной ДНК-полимеразы). Специфичность метода определяется уникальностью наследственного материала выявляемого инфекционного агента. Для генетического материала инфекционного агента подбираются олигонуклеотидные праймеры, которые участвуют в процессе амплификации. ПЦР-анализ клинического материала состоит из трех основных этапов: подготовка образца, амплификация и регистрация результатов. Клинические образцы, взятые для ПЦР, не требуют специальных транспортных питательных сред. В качестве объекта исследования должен быть взят любой биоматериал (соскоб из цервикального канала и уретры, вагинальное отделяемое) и доставлен в ПЦР-лабораторию при низкой температуре. Из полученного биоматериала

выделяется нуклеиновая кислота (ДНК или РНК), которая служит матрицей в реакции амплификации. Реакция амплификации - это многократно повторяющийся цикл синтеза специфического участка ДНК-мишени. Этот цикл происходит с участием термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы. В каждом цикле количество копий амплифицированного участка удваивается, и в результате 30-40 циклов накапливается достаточное количество участка ДНК для детектирования. Детекция продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза в агаровом геле или путем гибридизации.

Отличие ПЦР-диагностики от других анализов заключается в том, что в этой реакции используется универсальный подход к выявлению инфекционных агентов. Объектом исследования служит молекула ДНК. Поскольку молекулы ДНК химически идентичны у всех организмов, методы идентификации ДНК вирусов, бактерий и ДНК человека будут одинаковыми.

Наряду с культуральным методом и микроскопией, ПЦР также является методом прямого обнаружения возбудителя, отличаясь при этом очень высокой чувствительностью. ПЦР особенно эффективна при диагностике представителей внутриклеточной или мембранной микрофлоры (например, *Chlamydia trachomatis*, представители семейства *Mycoplasma*), а также трудно выращиваемых или не растущих микроорганизмов.

Применение метода ПЦР позволяет избежать сложной идентификации микроорганизмов небольшого размера и различной формы.

Чаще всего ПЦР-диагностика используется для выявления условно-патогенных микроорганизмов, таких как *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Gardnerella vaginalis*, являющихся возбудителями бактериального вагиноза. По данным зарубежных исследователей, *Gardnerella vaginalis* выявляется практически у всех пациенток с бактериальным вагинозом (в 10 из 11 наблюдений), а также у 40% женщин вне зависимости от наличия клинических проявлений.

Применение ПЦР при выявлении представителей семейства условно-патогенных микоплазм повышает эффективность и специфичность проводимых анализов. Так, при обследовании 50 больных с урогенитальной патологией при ПЦР *Ureaplasma urealiticum* была обнаружена у 12 (24%), а при бактериологическом культивировании - у 5 больных (10%). Методом генодиагностики можно определить не только наличие *Ureaplasma urealiticum* в клиническом образце, но и степень его патогенности. Популяция *ureaplasma urealiticum* является гетерогенной группой микроорганизмов. Имеется 14 серотипов *Ureaplasma urealiticum*, которые с помощью молекулярно-биологических подходов были включены в 2 больших биовара (Т-960 и Парво). Биовар Парво является более патогенным, чем биовар Т-960, и играет важную роль в развитии уреаплазменных инфекций. При проведении ПЦР-анализа определяется, в какой биовар входит *Ureaplasma urealiticum*, и тем самым можно оценить степень его патогенности. Согласно имеющимся данным, 83% уреаплазменных инфекций вызывается биоваром *Parvo*, и 17% — биоваром *T-960*. В настоящее время проведены клинические испытания новых тест-систем, позволяющих выявлять представителей анаэробной флоры — *Mobiluncus curtisii*, *Prevotella (Bacteroides) bivia* — методом ПЦР из клинического материала. В 12% проанализированных образцов был обнаружен *Mobiluncus curtisii*, в 28% — *Prevotella bivia*. Эти результаты согласуются с общепринятыми данными о том, что *Mobiluncus curtisii* и *Prevotella bivia* выявляются при бактериальном вагинозе в 8–35% и до 80% случаев соответственно, что еще раз подтверждает их значимую роль в патогенезе заболевания.

В научных исследованиях метод ПЦР также применяется для определения устойчивости к тетрациклину и эритромицину у представителей анаэробной флоры, таких как *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas* и *Mycoplasma hominis*, часто обнаруживаемых при бактериальном вагинозе.

Особо следует отметить роль ПЦР-диагностики при обследовании больных бактериальным вагинозом. Метод полимеразной цепной реакции не заменяет традиционные методы, используемые в диагностике данного заболевания (культуральный посев, микроскопия), а, напротив, дополняет их. ПЦР имеет решающее значение в выявлении анаэробных микроорганизмов, микроаэрофилов, вирусов и внутриклеточных паразитов. В некоторых случаях применение ПЦР в сочетании с культуральным методом позволяет сократить время анализа и повысить его чувствительность. Комплексное использование всех необходимых методов лабораторной диагностики обеспечивает полноценное обследование больных, направленное на выявление этиологического агента наблюдаемого дисбиоза и, как следствие, на определение эффективной тактики лечения.

### **MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Современная клиническая микробиология стремится к максимально быстрой и точной идентификации возбудителей инфекций, что критично для своевременного начала рациональной антибактериальной терапии. Одним из наиболее эффективных методов, внедрённых в лабораторную практику за последние два десятилетия, является MALDI-TOF масс-спектрометрия (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) [96, 97].

Метод основан на анализе белкового профиля микроорганизмов и позволяет идентифицировать их до уровня вида в течение нескольких минут [98].

Принцип работы MALDI-TOF включает четыре основных этапа: (1) нанесение биологического материала на металлическую мишень с добавлением матрицы; (2) лазерная десорбция и ионизация белков; (3) измерение времени пролёта ионов в масс-спектрометре; (4) сопоставление полученного спектра с эталонной базой данных [97].

Ключевым фактором точности является объём и качество используемой библиотеки спектров [96].

MALDI-TOF показал высокую эффективность в диагностике широкого спектра бактериальных и дрожжевых инфекций, включая *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* и др. [96, 98].

Метод обеспечивает:

- скорость анализа - 5–10 минут после получения чистой колонии;
- точность до 95–99% при наличии спектра в базе данных [97];
- экономичность при большом количестве исследований.

В клинической практике MALDI-TOF способствует ранней коррекции антибактериальной терапии, что особенно важно при сепсисе, менингите и тяжёлых госпитальных инфекциях [98].

Ограничениями метода являются невозможность прямого определения антибиотикочувствительности, трудности при идентификации смешанных культур и зависимость от полноты базы данных [96, 97].

MALDI-TOF масс-спектрометрия является «золотым стандартом» быстрой идентификации микроорганизмов в клинических лабораториях [97]. Перспективными направлениями развития являются прямое исследование клинических образцов без предварительного культивирования, расширение библиотек спектров, а также интеграция с методами ПЦР и искусственного интеллекта для повышения точности и скорости анализа [96, 98].

### **ГЛАВА 3. Состояние микрофлоры влагалища и шейки матки при патологических состояниях**

#### **3.1. Показатели нарушения микрофлоры влагалища и цервикального канала при генитальном герпесе**

В последние годы в акушерско-гинекологической практике проводится множество теоретических, экспериментальных и клинических исследований, посвящённых TORCH-инфекциям. Однако патогенез, особенности клинического течения, хронические формы заболевания, а также специфические лечебные мероприятия при TORCH-инфекциях до конца не изучены.

Кроме того, крайне мало данных о состоянии генитального микробиоценоза при TORCH-инфекциях и его влиянии на течение и рецидивы заболевания. Недостаточно исследовано также воздействие возбудителей TORCH-инфекций на биоценоз других биотопов организма и на местные факторы защиты слизистой оболочки половых путей.

С учётом вышеизложенного, нами были изучены показатели микробиоценоза влагалища и шейки матки (цервикального канала), а также особенности местного иммунного ответа при TORCH-инфекциях, генитальном герпесе и микоплазмозе.

Результаты исследования имеют важное значение для акушерско-гинекологической практики, поскольку генитальная микрофлора и местный иммунитет играют ключевую роль в элиминации инфекционных агентов и предотвращении рецидивов заболевания.

В общей сложности были изучены показатели микрофлоры влагалища, цервикального канала и факторов местного иммунитета у 90 женщин с TORCH-инфекциями. Для анализа вагинальной микрофлоры дополнительно было обследовано 47 женщин с генитальным герпесом.

В ходе количественного и качественного анализа состава микрофлоры влагалища и шейки матки у этих пациенток были получены следующие результаты (табл. 3.1.)

**Таблица 3.1**

**Частота встречаемости микроорганизмов во влагалище и  
цервикальном канале у женщин с генитальным герпесом**



Микроорганизмы	Встречаемость микроорганизмов, %			
	Влагалища		Цервикальный канал	
	Контрольная группа	Генитальный герпес	Контрольная группа	Генитальный герпес
<i>Lactobacillus</i> spp.	95,0	48,9	95,0	51,0
<i>Bifidobacterium</i> spp.	85,0	78,7	85,0	80,8
<i>Bacteroides</i> spp.	15,0	34,0	15,0	34,0
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	25,0	42,5	20,0	38,2
ЛП <i>E. coli</i>	25,0	27,6	15,0	19,1
ЛН <i>E. coli</i>	10,0	42,5	10,0	31,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	25,5	-	21,3
<i>Staph.epidermidis</i>	55,0	63,8	40,0	61,7
<i>Staph.haemolyticus</i>	20,0	55,3	15,0	48,9
<i>Streptococcus</i> gr.A	-	27,6	-	29,7
<i>Streptococcus</i> gr.D	50,0	34,0	35,0	21,3
<i>Diphtheroides</i>	25,0	25,5	25,0	25,5
<i>Candida albicans</i>	35,0	44,7	25,0	38,3
<i>Gardnerella vaginalis</i>	5,0	4,2	5,0	4,2

На основании полученных показателей можно сделать вывод, что у женщин с генитальным герпесом наблюдается выраженный дисбиоз микрофлоры влагалища и цервикального канала. Это проявляется значительным снижением содержания лактобактерий и стрептококков группы D — основных представителей индигенной микрофлоры — по сравнению с нормой (в 2,00 и 1,47 раза соответственно).

Одновременно отмечено достоверное увеличение количества условно-патогенных микроорганизмов, таких как *E. coli*, *Staphylococcus haemolyticus*. Кроме того, патогенные микроорганизмы *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus* gr. A были выявлены у 25,5% и 27,6% женщин соответственно, тогда как в контрольной группе они не обнаруживались ни во влагалищной, ни в цервикальной микрофлоре (см. рис. 1).

Таким образом, на фоне герпетической болезни наблюдается дисбаланс в нормальной микрофлоре влагалища у женщин, то есть отмечается увеличение процента роста условно-патогенных микроорганизмов вследствие снижения частоты встречаемости нормальных индигенных микроорганизмов во влагалище и цервикальном канале.

В таблице 3.2 представлены количественные показатели вагинальной микрофлоры у женщин с генитальным герпесом до лечения. Анализ результатов показал достоверное снижение количества лактобактерий по сравнению с нормальным показателем ( $P < 0,05$ ). Аналогичная ситуация наблюдалась и у бифидобактерий. Это, в свою очередь, повлияло на показатель общего количества анаэробов во влагалище и привело к их достоверному снижению от уровня нормы ( $P < 0,05$ ).

Количество пептострептококков и бактероидов во влагалище увеличилось в 1,67 и 1,9 раза соответственно по сравнению с нормой. Из приведенных данных видно, что при генитальном герпесе во влагалище нарушен строгий баланс между анаэробами.

У аэробных бактерий, в отличие от анаэробов, наблюдалась тенденция к размножению. Общее количество аэробов в цервикальном канале у здоровых женщин составило  $Lg 4,88 \pm 0,46$  КОЕ/мл, а у больных  $Lg 5,64 \pm 0,22$  КОЕ/мл. У больных генитальным герпесом появились представители агрессивных штаммов, обладающих патогенными ферментами - *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus gr.A*, тогда как в контрольной группе они не встречались. Было обнаружено некоторое увеличение количества грибов рода *Candida* ( $Lg 1,99 \pm 0,36$  КОЕ/мл).

Кроме того, количество лактозонегативной кишечной палочки и гемолитических стафилококков из представителей условно-патогенных микроорганизмов во влагалище и цервикальном канале увеличилось по сравнению с контрольной группой (соответственно во влагалище в 2,8 и 2,0 раза, в цервикальном канале в 3,8 и 2,1 раза).

Таблица 3.2

**Микрофлора влагалища и цервикального канала у женщин с  
генитальным герпесом Lg M±m КОЕ/мл**

Микроорганизмы	Количество микробов в 1 мл выделения			
	Влагалища		Цервикальный канал	
	Контрольная группа	Генитальный герпес	Контрольная группа	Генитальный герпес
Общее количество анаэробов	6,55±0,13	5,26±0,32*	6,57±0,14	5,15±0,31
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,60±0,47	3,72±0,32*	4,18±0,42	3,95±0,29
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,46±0,33	3,03±0,44*	5,97±0,34	3,08±0,45*
<i>Bacteroides</i> spp.	1,01±0,55	1,96±0,41	0,85±0,46	1,83±0,36
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1,37±0,54	2,29±0,41	1,44±0,58	2,19±0,41
Общее количество аэробов	6,23±0,21	6,12±0,17	4,88±0,46	5,64±0,22
<i>E. coli</i> ЛП	1,63±0,65	1,96±0,45	0,85±0,40	1,35±0,41
<i>E. coli</i> ЛН	0,76±0,52	2,16±0,39*	0,42±0,20	1,59±0,33*
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	1,36±0,36*	-	1,19±0,34
<i>St.epidermidis</i>	2,16±0,43	3,01±0,35	1,54±0,45	2,29±0,28
<i>St.haemolyticus</i>	1,34±0,61	2,66±0,37	1,04±0,56	2,18±0,31
<i>Streptococcus</i> gr.A	-	1,13±0,32*	-	1,54±0,37
<i>Streptococcus</i> gr.D	2,87±0,66	1,76±0,35	2,08±0,65	0,68±0,20*
<i>Diphtheroides</i>	1,35±0,54	1,21±0,31	1,02±0,40	1,09±0,30
<i>Candida albicans</i>	1,65±0,58	1,99±0,36	0,70±0,35	0,98±0,19
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,30±0,00	0,31±0,20	0,20±0,00	0,31±0,21

Примечание: \* - P<0,05 статистически достоверные различия по сравнению с контрольной группой.

Еще одним показателем, представляющим для нас интерес, является степень дисбиотических изменений влагалища и цервикального канала у женщин с генитальным герпесом. Дисбиотические изменения условно оценивались в 4 степени.

Из 47 обследованных женщин у 7 выявлен дисбактериоз I степени (14,9%), у 14 больных женщин (29,8%) - II степени, у 9 женщин - III степени (19,1%) и у 6 женщин - IV степени. У 11 (23,4%) женщин дисбиотических изменений на фоне заболевания не наблюдалось. При первой степени дисбиоза наблюдалось снижение индигенных микроорганизмов. Дисбиоз второй и третьей степени объяснялся чрезмерным снижением или отсутствием лакто-и бифидобактерий, а также увеличением условно-патогенной кишечной палочки и патогенных *St.aureus*, гемолитических стрептококков, не встречающихся у здоровых женщин. У 6 пациентов с дисбиозом четвертой степени лактобактерии были элиминированы, и наряду с условными патогенами наблюдалось увеличение количества грибов рода *Candida* на уровне  $10^5$ - $10^6$ . Это свидетельствует о крайнем ослаблении местных иммунных факторов во влагалище и цервикальном канале на фоне генитального герпеса. Это также может быть связано с иммунодепрессивным действием вирусов в организме.

Таким образом, в микрофлоре влагалища и цервикального канала у женщин с генитальным герпесом на фоне заболевания отмечались глубокие дисбиотические изменения.

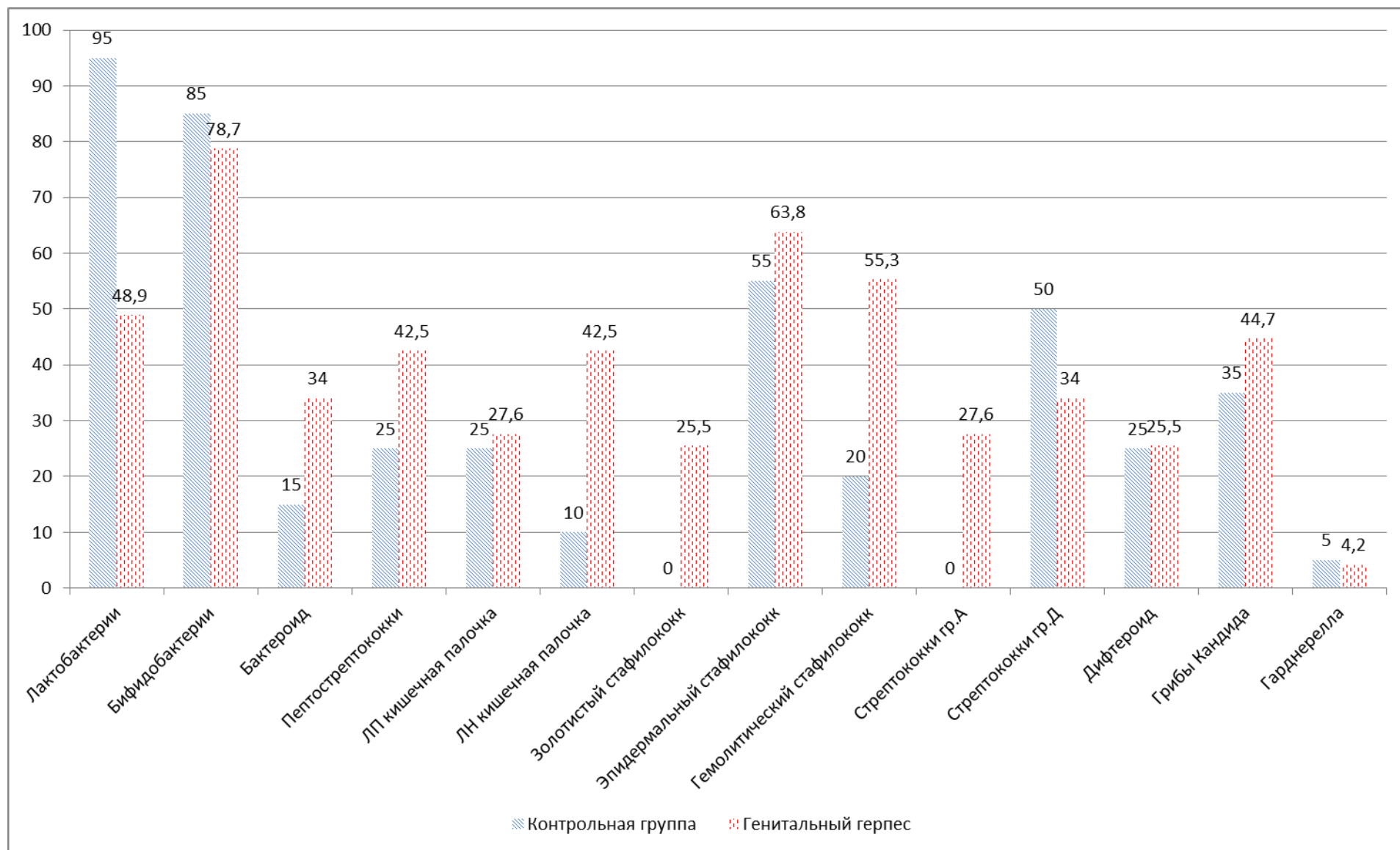


Рисунок 3.1. Частота встречаемости микроорганизмов в вагинальной микрофлоре у женщин с генитальным герпесом

Было обнаружено, что лакто- и бифидобактерии, которые считаются индигенной микрофлорой, уменьшились как в процентном соотношении, так и количественно. Естественным образом эти две группы микроорганизмов обеспечивают постоянную кислую среду в генитальном тракте, в то время как при дисбиотическом состоянии уменьшение их количества приводит к сдвигу среды в генитальном тракте в щелочную сторону и создает благоприятные условия для размножения условно-патогенных микроорганизмов. Исходя из этого, у 76,6% из 47 обследованных женщин с генитальным герпесом было выявлено состояние дисбиоза.

### **3.2. Состояние микрофлоры влагалища и цервикального канала у женщин с мико- или уреоплазмозом**

Для изучения вагинальной микрофлоры мы обследовали 43 женщин с мико-или уреоплазмозом. В таблице 3.3 представлена частота встречаемости микрофлоры влагалища и шейки матки у женщин с микоплазмозом в процентах.

**Таблица 3.3**

#### **Частота встречаемости микроорганизмов во влагалище и цервикальном канале у женщин с мико- или уреоплазмозом**

Микроорганизмы	Встречаемость микроорганизмов, %			
	Влагалища		Цервикальный канал	
	Контроль ная группа	Мико- плазмоз	Контрольн ая группа	Мико- плазмоз
Lactobacillus spp.	95,0	62,8	95,0	65,1
Bifidobacterium spp.	85,0	55,8	85,0	60,4
Bacteroides spp.	15,0	46,5	15,0	44,1
Peptostreptococcus spp.	25,0	37,2	20,0	37,2
E. coli ЛП	25,0	30,2	15,0	25,5
E. coli ЛН	10,0	23,2	10,0	20,9

Staphylococcus aureus	-	18,6	-	16,2
Staphylococcus epidermidis	55,0	37,2	40,0	41,8
Staphylococcus haemolyticus	20,0	79,0	15,0	74,4
Streptococcus gr.A	-	16,2	-	16,2
Streptococcus gr.D	50,0	48,8	35,0	34,8
Diphtheroides	25,0	25,5	25,0	27,9
Candida albicans	35,0	37,2	25,0	27,9
Gardnerella vaginalis	5,0	6,9	5,0	6,9
Mycoplasma hominis	0	100,0	10,0	100,0

Как видно из таблицы, при этом патологическом процессе также происходили дисбиотические изменения в микрофлоре генитального тракта: лактобактерии, являющиеся основным компонентом микробиоценоза влагалища и цервикального канала, были обнаружены у 62,8% женщин, что в 1,5 раза меньше, чем у здоровых женщин.

Аналогичные изменения наблюдались и у бифидобактерий, частота которых также была в 1,5 раза ниже нормы. При сравнении флоры влагалища и цервикального канала по частоте встречаемости лакто-и бифидобактерий существенной разницы между ними не наблюдалось. Один из наиболее интересных результатов был связан с приростом количества бактериоидов. Строго анаэробные, не образующие спор бактериоиды выявлялись во влагалище и цервикальном канале в 3 раза чаще по сравнению с нормой и составили 46,5% и 44,1% соответственно в общей группе.

При сравнении этого показателя с аналогичными данными у женщин с генитальным герпесом было установлено, что частота выявления бактериоидов в общей группе превышает герпетическую группу в 1,36 раза.

Вышеуказанные дисбиотические изменения микрофлоры влагалища и цервикального канала при микоплазмозе также отрицательно повлияли на частоту встречаемости факультативных аэробных бактерий.

Процент лактозонегативных эшерихий среди условно-патогенной микрофлоры увеличился в 2,3 раза по сравнению с нормой. Гемолитический стафилококк, наблюдавшийся только у 4 (20%) из 20 женщин в контрольной группе, был выявлен у 34 (79,0%) из 43 женщин с микоплазмозом, что почти в 4 раза выше контрольных значений. Этот показатель также оказался в 1,4 раза выше, чем у женщин с генитальным герпесом.

При микоплазменных вагинозах, помимо условно-патогенной микрофлоры, у 16–18% пациенток были обнаружены патогенные штаммы стафилококков и стрептококков, нехарактерные для данных биотопов.

Как видно из таблицы 3.4, изменения количественных показателей вагинальной микрофлоры у женщин с мико-или уреаплазмозом также были характерны для дисбиотического состояния. Количество общих анаэробов во влагалище снизилось по сравнению с нормальными значениями ( $P < 0,05$ ).

**Таблица 3.4**

**Микрофлора влагалища и цервикального канала у женщин с мико- и уреаплазмозом ( $Lg M \pm m$  КОЕ/мл)**

Микроорганизмы	Количество микробов в 1 мл выделения			
	Влагалища		Цервикальный канал	
	Контрольная группа	Мико-плазмоз	Контрольная группа	Мико-плазмоз
Общее количество анаэробов	6,55±0,13	5,36±0,15*	6,57±0,14	5,47±0,85
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,60±0,47	2,77±0,38*	4,18±0,42	2,87±0,36*
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,46±0,33	2,98±0,36*	5,97±0,34	3,42±0,39*
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1,37±0,54	1,99±0,40	1,44±0,58	1,99±0,40
<i>Bacteroides</i> spp.	1,01±0,55	2,51±0,42*	0,85±0,46	1,83±0,32*
Общее количество аэробов	6,23±0,21	6,17±0,08	4,88±0,46	5,38±0,09
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	0,93±0,31	-	0,78±0,28



St.epidermidis	2,16±0,43	1,59±0,32	1,54±0,45	1,41±0,26
St.haemolyticus	1,34±0,61	3,16±0,26*	1,04±0,56	2,93±0,25*
Streptococcus gr.A	-	0,62±0,24	-	0,53±0,18
Streptococcus gr.D	2,87±0,66	2,09±0,32	2,08±0,65	1,57±0,32
E. coli ЛП	1,63±0,65	1,72±0,40	0,85±0,40	0,98±0,26
E. coli ЛН	0,76±0,52	1,09±0,33	0,42±0,20	0,89±0,27
Diphtheroides	1,35±0,54	0,73±0,21	1,02±0,40	0,91±0,23
Candida albicans	1,65±0,58	1,75±0,35	0,70±0,35	0,82±0,20
Gardnerella vaginalis	0,30±0,00	0,50±0,28	0,20±0,00	0,35±0,20
Mycoplasma hominis	-	5,85±0,16*	0,37±0,23	6,15±0,08*

Примечание: \* -  $P < 0,05$  статистически достоверные различия относительно показателей контрольной группы.

Снижение произошло в основном за счёт лакто- и бифидобактерий: их содержание во влагалище уменьшилось в 1,8 и 1,6 раза соответственно по сравнению с нормальными показателями. На фоне уменьшения индигенной микрофлоры наблюдалось увеличение количества других анаэробных и условно-патогенных микроорганизмов. Так, уровень пептострептококков увеличился в 1,45 раза, а бактероидов — в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой.

Такое нарушение естественного баланса микроорганизмов во влагалищном тракте приводит к активному размножению других условно-патогенных микроорганизмов, присутствующих во влагалище и цервикальном канале. На фоне дисбиотических изменений количество стафилококков с гемолитическими свойствами увеличилось в 2,35 раза во влагалище и в 2,8 раза — в цервикальном канале по сравнению с контрольной группой. Аналогичная тенденция наблюдается и в отношении количества лактозонегативных штаммов *E. coli*, а также грибов рода *Candida*.

Содержание микоплазм и уреаплазм в вагинальном и цервикальном содержимом превышало норму в 5–6 раз у всех обследованных женщин.

Анализ дисбиотических изменений во влагалищном тракте у женщин с мико- или уреаплазмозом показал следующую степень выраженности дисбиоза: из 43 обследованных женщин у 9 (20,9%) был диагностирован дисбиоз I степени, у 13 (30,2%) — дисбиоз II степени, у 9 (20,9%) — дисбиоз III степени и у 4 (9,3%) — дисбиоз IV степени. Таким образом, дисбиотические изменения выявлены у 35 женщин (81,3%). У 8 пациенток (18,6%) признаков дисбиоза не отмечалось.

Из 35 женщин с дисбиотическими изменениями у 22 (62,8%) не были выявлены лактобактерии. В частности, лактобактерии отсутствовали у 3 пациенток с дисбиозом I степени (33,3%), у 7 — с дисбиозом II степени (53,8%), у 8 — с дисбиозом III степени (88,9%) и у всех 4 пациенток с дисбиозом IV степени (100%).

Как видно из приведённых данных, частота выявления лактобактерий напрямую коррелирует со степенью выраженности дисбиотических изменений.

Ещё одним примечательным аспектом является количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) мико- или уреаплазм в генитальном тракте в зависимости от степени дисбиоза. При дисбиозе I степени концентрация мико- или уреаплазм составляла  $10^4$  КОЕ/мл вагинального секрета, тогда как при дисбиозе II и III степени — от  $10^5$  до  $10^7$  КОЕ/мл. По нашему мнению, это связано с тем, что при лёгком дисбиозе (I степени) лактобактерии сохраняются в большем количестве по сравнению с более тяжёлыми формами (II и III степени), что способствует поддержанию кислой среды, препятствующей размножению микоплазм.

Таким образом, было установлено, что у женщин с микоплазмозом в генитальном тракте наблюдается выраженное дисбиотическое состояние: из

43 обследованных пациенток у 35 (81,3%) были выявлены признаки дисбиоза I, II, III или IV степени.

### **3.3. Состояние местной иммунной системы у больных с генитальным герпесом и микоплазмозом**

Тяжесть и продолжительность воспалительных заболеваний женских половых органов зависят от множества факторов, в том числе от состояния местного иммунитета. В норме локальный иммунитет обеспечивает оптимальный уровень фермента лизоцима и иммуноглобулинов (sIgA, IgA, IgG, IgM), которые играют важную роль в обеспечении антибактериальной активности секрета влагалищного и цервикального каналов [3].

Одновременно с микробиологическими исследованиями в изучаемых группах проводились и иммунологические исследования. Среди местных иммунологических факторов в вагинальном секрете до и после лечения определяли уровень лизоцима, фагоцитарную активность нейтрофилов и уровень секреторного иммуноглобулина А.

Как видно из данных, представленных в таблице 3.5, у женщин с генитальным герпесом отмечается выраженный дефицит местных иммунных факторов.

Несмотря на то что иммунодефицит наблюдается по всем показателям, следует подчеркнуть, что наиболее значительное снижение зафиксировано в уровне фагоцитарной активности нейтрофилов. У здоровых женщин этот показатель составлял  $76,5 \pm 0,94\%$ , тогда как у пациенток с генитальным герпесом он снизился до  $39,0 \pm 1,59\%$ . У больных микоплазмозом среднее значение этого показателя составило  $52,2 \pm 1,47\%$ .

Этот показатель достоверно ( $P < 0,05$ ) ниже нормы, но достоверно ( $P < 0,05$ ) выше, чем у женщин с генитальным герпесом (рис. 2).

**Таблица 3.5**

**Факторы местного иммунитета репродуктивного тракта у женщин  
с генитальным герпесом и микоплазмозом (до лечения)**

№	Показатели	Контрольная группа	Генитальный герпес	Мико-плазмоз
1	Фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН), %	76,5±0,94	39,0±1,59*	52,2±1,47*
2	s IgA, г/л	0,165±0,002	0,085±0,006*	0,124±0,002*
3	Титр лизоцима, г/л	25,2±0,83	14,2±0,61*	22,9±2,10

Примечание: \* -  $P < 0,05$  статистически достоверные различия относительно показателей контрольной группы.

Аналогичная картина наблюдалась и при изучении уровня sIgA и фермента лизоцима: оба показателя существенно различались у пациенток с генитальным герпесом и микоплазмозом. Дефицит местных иммунных факторов на поверхности слизистой оболочки влагалища и цервикального канала при генитальном герпесе был более выраженным по сравнению с аналогичными показателями у женщин с микоплазмозом.

Эти исследования были проведены повторно после традиционного лечения. Как и ожидалось, традиционные лечебные мероприятия оказали положительное влияние на факторы местной системы защиты гениталий. Результаты представлены в таблице 3.6.

**Таблица 3.6.**

**Показатели местного иммунитета репродуктивного тракта у  
женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом (после лечения)**

№	Показатели	Контрольная группа	Генитальный герпес	Мико-плазмоз
1	Фагоцитарная активность	76,5±0,94	52,0±0,93*	64,4±2,41*

	нейтрофилов (ФАН), %			
2	s IgA, г/л	0,165±0,002	0,121±0,002*	0,139±0,003*
3	Титр лизоцима, г/л	25,2±0,83	19,2±0,73*	22,5±1,31

Примечание: \* -  $P < 0,05$  статистически достоверные различия относительно показателей контрольной группы.

Интересно отметить, что наиболее выраженное улучшение после лечения наблюдалось в показателе фагоцитарной активности нейтрофилов. У женщин с генитальным герпесом этот показатель увеличился до  $52,0 \pm 0,93\%$ , а при микоплазмозе — до  $64,4 \pm 2,41\%$ . Аналогичная положительная динамика была зафиксирована и по уровню фермента лизоцима, а также по уровню sIgA (рис. 3.2).

На основании полученных данных можно утверждать, что фагоцитарная активность нейтрофилов — один из ключевых факторов местной иммунной системы — имеет существенное значение и в определённой степени влияет на выраженность дисбактериоза.

Тем не менее, несмотря на положительное влияние стандартных лечебных мероприятий на местные факторы защиты, состояние иммунодефицита полностью не устранилось и продолжало сохраняться.

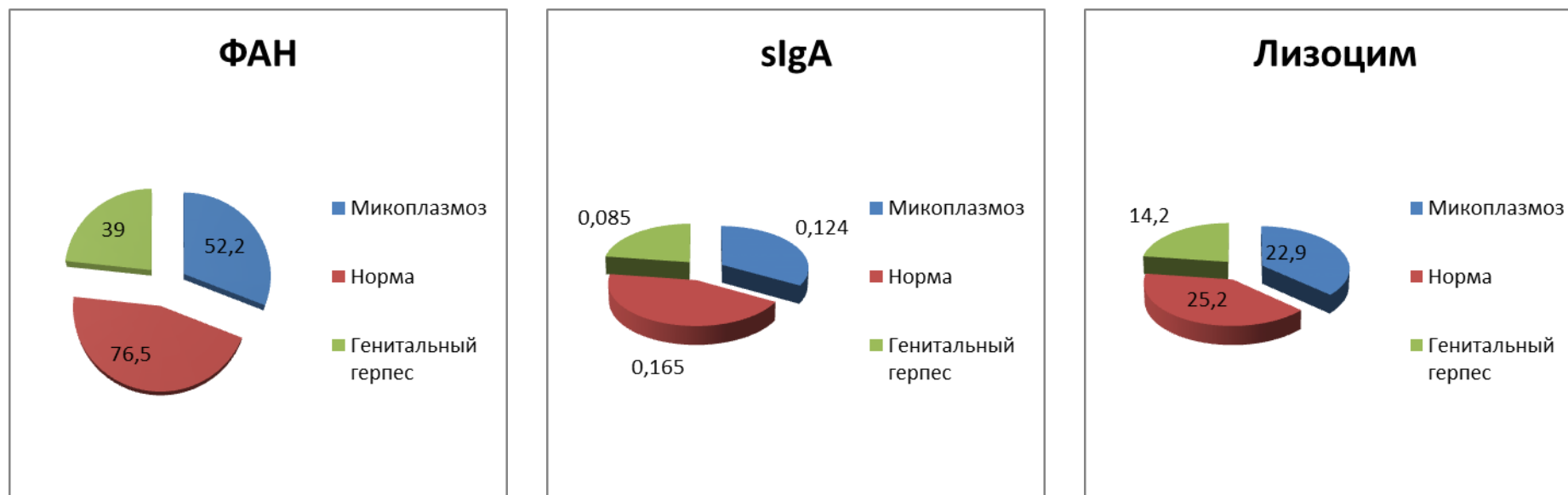


Рис. 3.2. Факторы иммунитета репродуктивного тракта у женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом (до лечения)

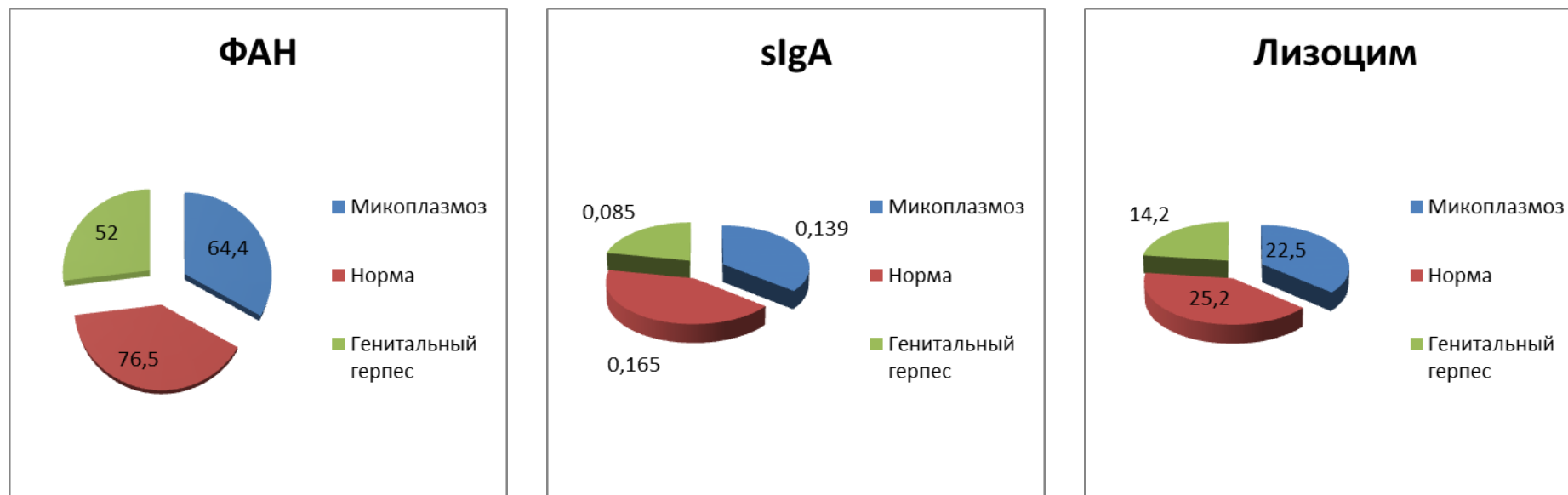


Рис. 3.3. Факторы местного иммунитета репродуктивного тракта у женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом (после лечения)

### **3.4. Ферментативная активность микроорганизмов, выделенных из репродуктивного тракта женщин с TORCH-инфекцией**

Биз микрофлорани ташкил этган микробларнинг микдорий кўрсаткичлари билан бир қаторда, бактерияларга хос бўлган бир қатор хоссаларини ҳам ўрганиб чиқдик.

Известно, что микроорганизмы, обитающие в женском генитальном тракте, способны продуцировать различные агрессивные ферменты. Кроме того, вирулентность потенциально патогенных микроорганизмов (ВПМ), обнаруженных во влагалище и цервикальном канале, обусловлена их адгезивными, колонизирующими и инвазивными свойствами, способностью снижать местные защитные факторы и вырабатывать токсические вещества [25, 68].

Одним из проявлений инвазивности микроорганизмов является продукция ферментов, разрушающих ткани или повреждающих клетки, что способствует их проникновению в организм. С помощью этих патогенных ферментов микроорганизмы могут преодолевать защитные барьеры организма.

К числу таких ферментов относятся ферменты, расщепляющие гиалуроновую кислоту, коагулирующие плазму, расщепляющие лецитин клеточной стенки, а также растворяющие волокна фибрина.

Мы исследовали ферментативные свойства микробов, выделенных из генитального тракта здоровых женщин и женщин с TORCH-инфекциями. Для определения патогенных ферментов использовались общепринятые методы:

- **Гемолитические свойства** — посев культуры на 5% кровяной агар;



- **Плазмокоагуляционные свойства** — инокуляция культуры в плазму кролика с цитратом, разбавленную физиологическим раствором в соотношении 1:5;
- **Лецитиназная активность** — посев исследуемой культуры на солевой агар с добавлением яичного желтка, с последующей оценкой наличия или отсутствия зоны помутнения вокруг колонии.
- **Фибринолитическая активность** — по методу Кристи-Чепмана;
- **Гиалуронидазная активность** — по методу Мак-Клина на основе модификации А. М. Смирновой (1988).

В ходе изучения способности штаммов бактерий продуцировать ферменты патогенности было выявлено, что штаммы бактерий, выделенные у больных с генитальным герпесом и микоплазмозом, отличаются от штаммов микробов, изолированных у здоровых женщин, рядом выраженных ферментативных свойств.

Полученные данные представлены в таблице 3.7. Как видно из результатов, 20 штаммов (стафилококков, стрептококков, эшерихий, лактобактерий), выделенных из генитального тракта здоровых женщин, продуцировали агрессивные ферменты (21,5%). Из них 9 штаммов (9,67%) обладали гемолитической активностью, 4 штамма (4,3%) — фибринолитической, 4 штамма (4,3%) — лецитиназной активностью, 2 штамма (2,15%) — активностью плазмокоагулазы, а один штамм стрептококков продуцировал гиалуронидазу (1,1%).

Были изучены ферментативные свойства 206 вышеуказанных бактериальных штаммов, выделенных из влагалища и цервикального канала у женщин с генитальным герпесом. Из них 161 штамм (78,1%) обладал различными агрессивными ферментами. Из приведённых данных видно, что уровень агрессивных ферментов у бактерий, выделенных из гениталий

женщин с генитальным герпесом, был в 3,6 раза выше, чем у здоровых женщин.

Из 71 штамма стафилококков, выделенных у пациенток с генитальным герпесом, гемолитические свойства были выявлены у 69% штаммов, что в 7,1 раза превышает аналогичный показатель в контрольной группе. Кроме того, у 12,6% стафилококков была обнаружена гиалуронидазная активность, у 19,7% — активность плазмокоагулазы, а у 24,0% — лецитиназная активность. Эти ферментативные свойства у штаммов, выделенных у здоровых женщин, выявлялись в значительно меньшем проценте либо отсутствовали вовсе.

Аналогичные данные были получены при изучении ферментативных свойств стрептококков и эшерихий. При генитальном герпесе среди 206 штаммов бактерий, выделенных из влагалища и цервикального канала, у 77 (37,4%) выявлены гемолитические свойства, что в 3,8 раза превышает показатели контрольной группы. Наибольшей гемолитической активностью отличались стафилококки — 69,0%.

Фибринолитическая активность бактерий, выделенных у пациенток с генитальным герпесом, также увеличилась почти в 2 раза по сравнению с нормой. Фермент гиалуронидаза был обнаружен у 12,1% штаммов, лецитиназная активность — у 11,6%, а активность плазмокоагулазы — у 8,2% микроорганизмов основной группы.

Из 210 штаммов бактерий, выделенных у женщин с микоплазмозом, агрессивные ферменты были обнаружены у 147 (70,0%) из них (табл. 3.8), что в 3,2 раза превышает показатели контрольной группы. Гемолитические свойства выявлены у 72 (34,2%) штаммов, что в 3,5 раза выше, чем у здоровых женщин.

Кроме того, при микоплазмозе наблюдалось достоверное увеличение выработки следующих ферментов по сравнению с контрольной группой:

Таблица 3.7

Агрессивная ферментативная активность микрофлоры влагалища и цервикального канала у здоровых женщин и женщин с генитальным герпесом

Микроорганизм ы	Количество изученных штаммов	Выработка ферментов бактериями									
		Гемолизин		Фибринолизин		Гиалоурони- даза		Плазмокоа- гулаза		Лецитиназа	
		колич ество	%	колич ество	%	колич ество	%	количес тво	%	колич ество	%
В контрольной группе											
Стафилококки	26	5	19,2	1	3,85	-	-	2	7,69	3	11,5
Стрептококки	17	3	17,6	1	5,9	1	5,9	-	-	-	-
Эшерихии	12	1	8,3	-	-	-	-	-	-	1	8,3
Лактобактерии	38	-	-	2	5,26	-	-	-	-	-	-
Всего	93	9	9,67	4	4,3	1	1,1	2	2,15	4	4,3
У больных											
Стафилококки	71	49	69,0	4	5,6	9	12,6	14	19,7	17	24,0
Стрептококки	53	17	32,0	6	11,3	10	18,8	3	5,6	1	1,9
Эшерихии	35	11	31,4	4	11,4	6	17,1	-	-	6	17,1
Лактобактерии	47	-	-	4	8,5	-	-	-	-	-	-
Всего	206	77	37,4	18	8,7	25	12,1	17	8,2	24	11,6

плазмокоагулазы — в 3 раза, гиалуронидазы — почти в 8 раз, лецитиназы — в 2,5 раза, фибринолизина — в 2 раза.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при дисбиотических изменениях, вызванных генитальным герпесом и микоплазмозом, происходит не только увеличение количества и частоты выделения условно-патогенных бактерий во влагалище и цервикальном канале, но также значительно повышается их ферментативная активность. Это свидетельствует об усилении инвазивных и патогенных свойств микрофлоры, способствующих хронизации воспалительных процессов и снижению местной резистентности.

С одной стороны, это способствует более широкому распространению патогенных микроорганизмов в генитальном тракте, а с другой - приводит к ослаблению местных факторов иммунной защиты и повышает устойчивость бактерий к иммунному ответу организма.

Это, в свою очередь, может способствовать более тяжелому течению основного заболевания и переходу его в хроническую форму. Полученные нами результаты согласуются с данными, представленными в исследованиях других авторов. Таким образом, при анализе ферментативных свойств условно-патогенной микрофлоры, выделенной из влагалища и цервикального канала женщин с вагинальным дисбиозом на фоне генитального герпеса и микоплазмоза, было установлено достоверное повышение способности микроорганизмов к продукции агрессивных ферментов. Эти изменения значительно отличаются от показателей контрольной группы и свидетельствуют о повышенной вирулентности микрофлоры в условиях нарушенного биоценоза. Усиленная ферментативная активность условно-патогенных бактерий может способствовать дальнейшему прогрессированию дисбиотических процессов, хронизации воспалительных состояний и снижению эффективности защитных механизмов местного иммунитета.

Таблица 3.8

**Агрессивная ферментативная активность микрофлоры влагалища и цервикального канала у здоровых женщин и женщин с микоплазмозом**

Микроорганизмы	Количество изученных штаммов	Выработка ферментов бактериями									
		Гемолизин		Фибринолизин		Гиалоуронида за		Плазмокоагул аза		Лецитиназа	
		колич ество	%	колич ество	%	колич ество	%	количес тво	%	колич ество	%
В контрольной группе											
Стафилококки	26	5	19,2	1	3,85	-	-	2	7,69	3	11,5
Стрептококки	17	3	17,6	1	5,9	1	5,9	-	-	-	-
Эшерихии	12	1	8,3	-	-	-	-	-	-	1	8,3
Лактобактерии	38	-	-	2	5,26	-	-	-	-	-	-
Всего	93	9	9,67	4	4,3	1	1,1	2	2,15	4	4,3
У больных											
Стафилококки	81	57	70,4	6	7,4	12	14,8	14	17,3	18	22,3
Стрептококки	50	12	24,0	5	10,0	6	12,0	-	-	2	4,0
Эшерихии	24	3	12,5	4	16,6	-	-	-	-	3	12,5
Лактобактерии	55	-	-	5	9,0	-	-	-	-	-	-
Всего	210	72	34,2	20	9,5	18	8,6	14	6,6	23	10,9

## **ГЛАВА 4. Способы коррекции нарушений микрофлоры влагалища и шейки матки у женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом**

Основываясь на результатах, полученных в предыдущих главах, можно сказать, что у пациенток с генитальной инфекцией дисбиотические нарушения вагинальной микрофлоры и изменения защитных факторов местной иммунной системы встречаются практически всегда. Это, в свою очередь, может привести к обострению основного заболевания, различным осложнениям, патологическим процессам, возникающим у матери или ребенка после родов.

Как уже упоминалось выше, основными представителями микробиоценоза влагалища и цервикального канала являются лакто- и бифидобактерии. Во всех рассматриваемых инфекциях наблюдался дисбаланс за счет снижения количества этих микроорганизмов..

До настоящего времени дисбиоз влагалища (Кафарская Л.И., 1994; Анкирская А.С., 1996; Кубанова А.А., 1996; Кира Е.Ф., 1996; Закопаева Е.С., 1997; Созаева Л.Г., 1997; Коршунов В.М., 1999; Кафарская Л.И., 2001; Алекшева Л.Ж., 2002; Мухамедов И.М., 2004; Сапаева Ш.А., 2006) и дисбиозы кишечника (Амбарцумян К.Ф., 1989; Барзашка-Попова С.Н., 1990; Ганина В.И., 1996; Бредихина Н.А., 1998; Лобзин Ю.В., 2000; Шербакова Э.Г., 2000) проведены ряд научных работ по применению бактериальных препаратов.

Помимо бактериальных препаратов, наряду с лечебными мероприятиями, были проведены работы по применению местной иммуностимулирующей терапии (Пинегин Б.В., 1997; Алешкин В.А., 2000; Коджаева М.Х., 2002; Сапаева Ш.А., 2006).

В этих работах в основном рассматривался бактериальный и кандидозный вагиноз. Поэтому в нашей работе мы сочли необходимым

провести био-и иммунокоррекцию у больных генитальным герпесом и микоплазмозом, которые относятся к категории TORCH-инфекций.

Для коррекции микрофлоры влагалища и кишечника у 27 женщин с генитальным герпесом мы использовали эубиотик лактобактерин "Ором" (Огай Д.К., Норбаева С.Э., 1994), разработанный Институтом микробиологии АН РУз, *per vaginum* 2 раза в день в течение 10 дней.

У 23 женщин с микоплазмозом для биокоррекции использовали эубиотик "Нарине плюс" в течение 10 дней 2 раза до еды *per os* и 10 дней 2 раза *per vaginum*.

Причина дифференцированного подхода к назначению различных эубиотиков заключается в особенностях нарушений микробиоценоза при различных инфекциях. У пациенток с генитальным герпесом было выявлено преимущественное снижение количества лактобактерий, что обусловило необходимость использования моноштаммового пробиотика, содержащего только *Lactobacillus spp.*

В то же время у женщин, страдающих микоплазмозом, было обнаружено снижение численности как лактобактерий, так и бифидобактерий, что потребовало назначения комбинированного пробиотического препарата.

Для коррекции нарушений микрофлоры у данной группы пациенток применялся эубиотик «Нарине плюс», содержащий живые пробиотические бактерии *Lactobacillus acidophilus* Er 317/402 и *Bifidobacterium bifidum* №1, обладающие высокой антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре. Преимуществом препарата является устойчивость штаммов к антибиотикам и химическим препаратам.

Для коррекции местных факторов защиты у больных генитальным герпесом и микоплазмозом использовали ректальный суппозиторий "Виферон-3" (Краснопольский В.И., 2002).

Препарат "Виферон-3" разработан отделом интерферонов НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Н.Ф.Гамалеи Российской академии медицинских наук (руководитель отдела профессор Малиновская В.В.). Препарат выпускается в форме суппозитория и состоит из рекомбинантного интерферона  $\alpha 2b$  и антиоксидантов -  $\alpha$ -токоферола ацетата (витамин Е) и аскорбиновой кислоты (витамин С). Суппозитории "Виферон-3" обладают как иммуномодулирующим, так и противовирусным действием.

Известно, что пейеровы бляшки, расположенные в тонком кишечнике, являются одним из источников плазматических клеток, синтезирующих IgA для всех слизистых оболочек и железистых органов организма. Стимуляция иммунокомпетентных клеток пейеровых бляшек может привести к активации иммунной системы мочеполового тракта. Местно применяемый иммуностимулятор воздействует на клетки пейеровых бляшек, в результате чего нормализуется синтез IgA и секреторного IgA (Beagley K.W., 1989; Coffman R.L., 1989; Belyakov I.M., 2000).

До и после лечения (через 15 дней), а затем через 2 месяца проводили забор вагинального отделяемого для исследования микрофлоры влагалища и кишечника, а также местных факторов защиты. Поскольку состав микрофлоры влагалища и цервикального канала при рассмотренных выше патологических процессах был практически идентичным, после коррекции мы изучили только микрофлору влагалища.

Как видно из таблицы 4.1, у женщин с генитальным герпесом при применении лактобактерий "Ором" по 2 раза в день *per vaginam* в течение 10 дней и суппозитория Виферон-3 по 2 раза в день в течение 10 дней (20 суппозитория), затем по 1 суппозиторию 2 раза в неделю (10 суппозитория) *per rectum* наблюдалось увеличение показателей роста лакто- и бифидобактерий (с 48,9% до 100,0% и с 78,7% до 88,8% соответственно) и уменьшение количества других анаэробных микроорганизмов.

Положительные изменения наблюдались и в показателях аэробных микроорганизмов. Уменьшился процент встречаемости условно-патогенных



микроорганизмов: ЛП E.coli, ЛН E. coli, Staphylococcus haemolyticus, Candida albicans. Изменений в показателях Streptococcus gr.D и Diphtheroides не наблюдалось. После биокоррекции рост патогенных штаммов, таких как Staphylococcus aureus и Streptococcus gr.A, вообще не обнаруживался.

В таблице 4.2 представлены результаты микробиологических исследований пациентов с генитальным герпесом после традиционного лечения и коррекции. После лечебных мероприятий произошло частичное восстановление лакто- и бифидобактерий, являющихся основным компонентом анаэробной флоры.

Следует особо отметить, что традиционные лечебные мероприятия не привели к исчезновению патогенных видов стафилококков и стрептококков (соответственно  $Lg 0,80 \pm 0,21$  КОЕ/мл и  $Lg 0,56 \pm 0,38$  КОЕ/мл).

Таблица 4.1

Влияние биокоррекции на микрофлору влагалища у женщин с генитальным герпесом ("Ором" лактобактерин + Виферон-3)

Микроорганизмы	Встречаемость микроорганизмов, %		
	До лечения	После лечения	После коррекции
Lactobacillus spp.	48,9	82,3	100,0
Bifidobacterium spp.	78,7	82,3	88,8
Bacteroides spp.	34,0	35,3	11,1
Peptostreptococcus spp.	42,5	23,5	14,8
ЛП E. coli	27,6	23,5	11,1
ЛН E. coli	42,5	29,4	7,4
Staphylococcus aureus	25,5	23,5	0
Staphylococcus epidermidis	63,8	58,8	55,5
Staphylococcus haemolyticus	55,3	29,4	14,8

Streptococcus gr.A	27,6	11,8	0
Streptococcus gr.D	34,0	41,2	33,3
Diphtheroides	25,5	35,2	22,2
Candida albicans	44,7	29,4	33,3

Как видно из результатов, несмотря на то, что проведенное традиционное лечение оказывает положительное влияние на микрофлору гениталий, состояние дисбиоза микрофлоры влагалища сохраняется. Однако оно приобрело несколько более легкую форму.

Таблица 4.2

Состояние микрофлоры влагалища у женщин с генитальным герпесом после биокоррекции (Lg M $\pm$ m КОЕ/мл)  
("Ором" лактобактерин + Виферон-3)

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов в 1 мл влагалищных выделений		
	До лечения	После лечения	После коррекции
Lactobacillus spp.	3,03 $\pm$ 0,44	4,68 $\pm$ 0,46*	6,57 $\pm$ 0,13*
Bifidobacterium spp.	3,72 $\pm$ 0,32	3,94 $\pm$ 0,46	4,20 $\pm$ 0,30
Bacteroides spp.	1,96 $\pm$ 0,41	1,70 $\pm$ 0,66	0,72 $\pm$ 0,40*
Peptostreptococcus spp.	2,29 $\pm$ 0,41	1,53 $\pm$ 0,69*	0,89 $\pm$ 0,42*
ЛП E. coli	1,96 $\pm$ 0,45	1,00 $\pm$ 0,46	0,73 $\pm$ 0,40*
ЛН E. coli	2,16 $\pm$ 0,39	1,49 $\pm$ 0,58*	0,42 $\pm$ 0,29*
Staphylococcus aureus	1,36 $\pm$ 0,36	0,80 $\pm$ 0,21*	0
Staphylococcus epidermidis	3,01 $\pm$ 0,35	2,46 $\pm$ 0,52	1,78 $\pm$ 0,33*
Staph.haemolyticus	2,66 $\pm$ 0,37	1,27 $\pm$ 0,63*	0,83 $\pm$ 0,39*
Streptococcus gr.A	1,13 $\pm$ 0,32	0,56 $\pm$ 0,38	0
Streptococcus gr.D	1,76 $\pm$ 0,35	1,67 $\pm$ 0,37	1,44 $\pm$ 0,43
Diphtheroides	1,21 $\pm$ 0,31	1,53 $\pm$ 0,52	0,91 $\pm$ 0,37
Candida albicans	1,99 $\pm$ 0,36	1,41 $\pm$ 0,55	1,29 $\pm$ 0,36

<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,31±0,20	0	0
------------------------------	-----------	---	---

Примечание: \*-  $p < 0,05$  статистически достоверные различия по сравнению с показателями до лечения.

После биокоррекции усилилось снижение количества пептострептококков и бактероидов среди анаэробных микроорганизмов, а также увеличение количества бифидо- и особенно лактобактерий, приближение их показателей к норме.

Среди аэробных бактерий достоверно снизилось количество таких микроорганизмов, как *Staphylococcus haemolyticus* ( $Lg\ 0,83 \pm 0,39$  КОЕ/мл), лактозонегативная *E.coli* ( $Lg\ 0,42 \pm 0,29$  КОЕ/мл), *Candida albicans* ( $Lg\ 1,29 \pm 0,36$  КОЕ/мл), а *Streptococcus gr.A* и *Staphylococcus aureus* полностью элиминировались.

Таким образом, можно считать, что после проведения био-и иммунокоррекции в комплексе с лактобактерией "Ором" и препаратом "Виферон-3" произошло полное восстановление вагинальной флоры как в качественном, так и в количественном отношении. Произошло полное восстановление анаэробных бактерий, нормализация численности условно-патогенных микроорганизмов и 100% элиминация патогенных микробов.

Наряду с лечением у больных мико-или уреаплазмозом для коррекции применяли эубиотик "Нарине плюс" 2 раза в день за 20-30 минут до еды 10 дней *per os* и 2 раза в день 10 дней *per vaginum*, препарат "Виферон-3" по схеме (10 дней 2 раза в день (20 суппозитория), затем 5 дней 2 раза в день (10 суппозитория)).

Традиционное лечение при мико- или уреаплазмозах включает антибиотикотерапию, санацию влагалища различными антисептическими растворами, дезинтоксикационную терапию, витаминотерапию и противогрибковую терапию.

В таблице 4.3 представлены результаты микробиологических исследований, проведенных после традиционного лечения и био- и иммунокоррекции.

Бактериологические исследования показали, что после традиционного лечения количество анаэробных бактерий во влагалище еще больше уменьшается по сравнению с показателями до лечения. Лактобактерии составили у 55% больных  $Lg\ 2,97 \pm 0,62$  КОЕ/мл, количество бифидобактерий в 50% случаев  $Lg\ 2,49 \pm 0,58$  КОЕ/мл, бактериоиды у 40% женщин  $Lg\ 1,78 \pm 0,50$  КОЕ/мл, пептострептококки у 20% больных  $Lg\ 1,01 \pm 0,46$  КОЕ/мл (до лечения эти показатели были равны  $Lg\ 2,98 \pm 0,36$  КОЕ/мл,  $Lg\ 2,77 \pm 0,38$  КОЕ/мл,  $Lg\ 2,51 \pm 0,42$  КОЕ/мл,  $Lg\ 1,99 \pm 0,40$  КОЕ/мл соответственно).

Таблица 4.3

Состояние микрофлоры влагалища у женщин с микоплазмозом после биокоррекции ( $Lg\ M \pm m$  КОЕ/мл) (Нарине-плюс + Виферон-3)

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов в 1 мл влагалищных выделений		
	До лечения	После лечения	После коррекции
Lactobacillus spp.	$2,98 \pm 0,36$	$2,97 \pm 0,62$	$5,48 \pm 0,29^*$
Bifidobacterium spp.	$2,77 \pm 0,38$	$2,49 \pm 0,58$	$4,37 \pm 0,44^*$
Bacteroides spp.	$2,51 \pm 0,42$	$1,78 \pm 0,50$	$1,03 \pm 0,48^*$
Peptostreptococcus spp.	$1,99 \pm 0,40$	$1,01 \pm 0,46$	$0,80 \pm 0,37^*$
ЛП E. coli	$1,72 \pm 0,40$	$1,13 \pm 0,46$	$0,35 \pm 0,24^*$
ЛН E. coli	$1,09 \pm 0,33$	$0,77 \pm 0,42$	$0,45 \pm 0,31$
Staphylococcus aureus	$0,93 \pm 0,31$	0	0
Staphylococcus epidermidis	$1,59 \pm 0,32$	$0,34 \pm 0,24$	$1,72 \pm 0,42$
Staph.haemolyticus	$3,16 \pm 0,26$	$2,25 \pm 0,35^*$	$1,34 \pm 0,51^*$

Streptococcus gr.A	0,62±0,24	0,22±0,00	0
Streptococcus gr.D	2,09±0,32	0,94±0,43*	1,97±0,34*
Diphtheroides	0,73±0,21	0,79±0,43	0,97±0,35
Candida albicans	1,75±0,35	2,78±0,64	1,16±0,41
Gardnerella vaginalis	0,50±0,28	0,99±0,54	0,24±0,00
Mycoplasma hominis	5,85±0,16	2,00±0,56*	0,63±0,35*

Примечание: \*- P<0,05 статистически достоверные различия по сравнению с показателями до лечения.

Из факультативных анаэробных бактерий патогенный вид стрептококка был выделен у 5% обследуемых (Lg 0,22±0,00 КОЕ/мл). Количество грибов у 50% больных составило Lg 2,78±0,64 КОЕ/мл (в контрольной группе Lg 1,20±0,55 КОЕ/мл). Содержание G.vaginalis увеличилось до Lg 0,99±0,54 КОЕ/мл (в контрольной группе Lg 0,30±0,00 КОЕ/мл). Мико- и уреоплазмы, считающиеся основным этиологическим фактором, были выделены у 40% женщин в количестве Lg 2,00±0,56 КОЕ/мл.

После коррекции результаты изменились более заметно. После традиционного лечения состояние усугубленного дисбиоза, обусловленное дальнейшим снижением количества анаэробов во влагалище, после коррекции приблизилось к показателям нормы. Количество лакто- и бифидобактерий достоверно увеличилось (P<0,05), а количество бактериоидов и пептострептококков уменьшилось.

Показатели аэробной флоры также изменились в положительную сторону. Рост патогенных штаммов в исследуемом биологическом материале не наблюдался, а количество условно-патогенных микроорганизмов нормализовалось: лактозонегативная E. coli (Lg 0,45±0,31 КОЕ/мл), Staphylococcus haemolyticus (Lg 1,34±0,51 КОЕ/мл), Candida albicans (Lg 1,16±0,41 КОЕ/мл), Gardnerella vaginalis (Lg 0,24±0,00 КОЕ/мл), Mycoplasma hominis (Lg 0,63±0,35 КОЕ/мл). В результате местного применения эубиотика

"Нарине плюс" состав вагинальной микрофлоры был эффективно восстановлен как в количественном, так и в качественном отношении.

На рисунке 4.1 представлены показатели частоты обнаружения микроорганизмов, являющихся представителями генитальной микрофлоры, во влагалище в период после лечения и коррекции при микоплазмозе, по сравнению с результатами до лечения. Для оценки эффективности биокоррекции мы наблюдали динамику микроскопической картины первичных мазков у пациентов с генитальным герпесом и микоплазмозом. В таблицах 4.4 и 4.5 приведены результаты первичных мазков у этих пациентов. Как видно из данных таблиц, после проведения коррекции с применением эубиотиков и иммуномодуляторов показатели мазков нормализовались.

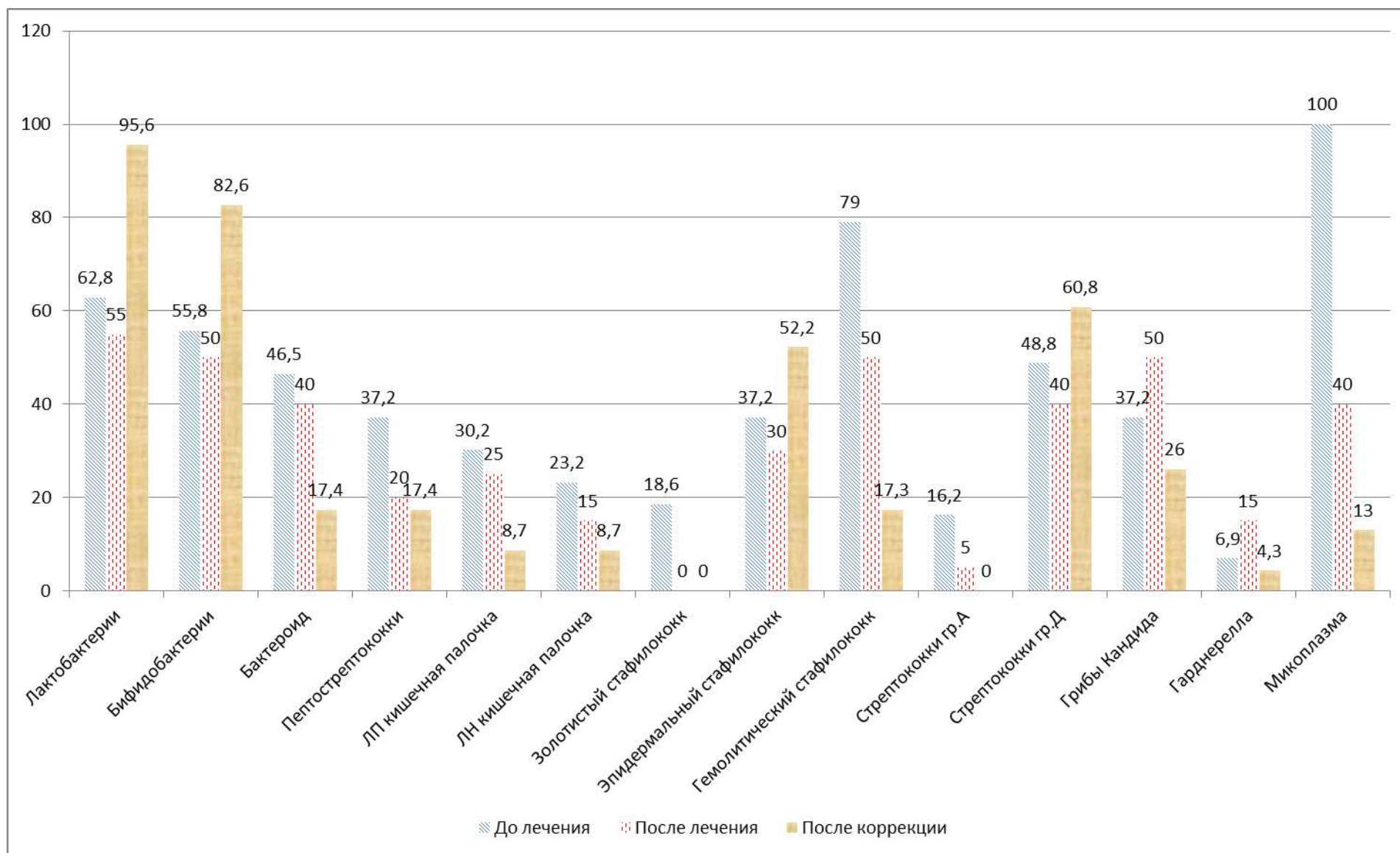


Рисунок 4.1. Влияние биокоррекции на вагинальную микрофлору у пациентов с микоплазмозом

Таблица 4.4

## Результаты микроскопии мазка у больных генитальным герпесом

Место взятия материала	До лечения			После лечения			После коррекции		
	Лейко- циты	Эпителиальн ые клетки	Состав флоры	Лейко- циты	Эпителиаль ные клетки	Состав флоры	Лейко- циты	Эпителиал ьные клетки	Состав флоры
Уретра	15-20	15-18	Смешанная, с большим количеством кокков и грибковых гиф, лактобактери и 15%	5-10	8-10	Смешанная , с меньшим содержание м грибковых гиф, лактобакте рии 45%	0-1	4-5	Палочков идные, кокки редкие, лактобакт ерии 65%
Цервикаль- ный канал	40-50	40-45		25-28	22-25		10-15	13-17	
Влагалище	50-60	35-40		25-30	22-28		8-12	14-18	

Таблица 4.5



### Результаты микроскопии мазков у больных мико-или уреаплазмозом

Место взятия материала	До лечения			После лечения			После коррекции		
	Лейко- циты	Эпителиаль- ные клетки	Состав флоры	Лейко- циты	Эпителиа- льные клетки	Состав флоры	Лейко- циты	Эпителиа- льные клетки	Состав флоры
Уретра	35-40	25-30	Смешанная, с большим количеством кокков и грибковых гиф, лактобактери- и 25%	12-15	8-10	Смешанная, с меньшим содержанием грибковых гиф, лактобакте- рии 50%	1-3	6-8	Палочки видные, кокки редкие, лактобак- терии 70%
Цервикал- ьный канал	60-70	40-45		20-22	12-14		6-8	5-8	
Влагалище	65-70	40-48		20-25	14-15		8-9	6-8	

Это играет важную роль в профилактике рецидивов, устранении симптомов заболевания и предотвращении передачи других инфекций. В результате комплексной биокоррекции микрофлоры гениталий и кишечника была достигнута качественная и количественная нормализация микробиоты влагалища, цервикального канала и кишечника. Для оценки продолжительности сохранения положительного эффекта через два месяца после традиционного лечения, а также био- и иммунокоррекции, были проведены повторные микробиологические исследования (см. табл.).

Таблица 4.6

Состояние микрофлоры влагалища у женщин с генитальным герпесом через 2 месяца после биокоррекции ( $Lg M \pm m$  КОЕ/мл)  
("Ором" лактобактерин + Виферон-3)

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов в 1мл выделения		
	Контрольная группа	После лечения	После коррекции
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,46 $\pm$ 0,33	4,19 $\pm$ 0,72	6,42 $\pm$ 0,13
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4,60 $\pm$ 0,47	2,58 $\pm$ 0,71*	4,14 $\pm$ 0,47**
<i>Bacteroides</i> spp.	1,01 $\pm$ 0,55	1,12 $\pm$ 0,74	0,88 $\pm$ 0,59
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	1,37 $\pm$ 0,54	1,84 $\pm$ 0,76	0,68 $\pm$ 0,45*
ЛП <i>E. coli</i>	1,63 $\pm$ 0,65	1,62 $\pm$ 0,83	0,20 $\pm$ 0,00
ЛН <i>E. coli</i>	0,76 $\pm$ 0,52	1,17 $\pm$ 0,59	0,66 $\pm$ 0,44
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0,25 $\pm$ 0,00	0
<i>Staph. epidermidis</i>	2,16 $\pm$ 0,43	1,12 $\pm$ 0,46	1,48 $\pm$ 0,62
<i>Staph. haemolyticus</i>	1,34 $\pm$ 0,61	1,99 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,62**
<i>Streptococcus</i> gr.A	-	1,20 $\pm$ 0,80	0
<i>Streptococcus</i> gr.D	2,87 $\pm$ 0,66	1,30 $\pm$ 0,52*	1,25 $\pm$ 0,53*
<i>Diphtheroides</i>	1,35 $\pm$ 0,54	1,06 $\pm$ 0,54	1,24 $\pm$ 0,63
<i>Candida albicans</i>	1,65 $\pm$ 0,58	2,57 $\pm$ 0,55*	0,52 $\pm$ 0,35*,**
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,30 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,00	0

Примечание: \* -  $P < 0,05$  статистически достоверные различия относительно показателей контрольной группы. \*\* -  $P < 0,001$  достоверность по отношению к показателям после традиционного лечения.

Установлено, что показатели после биокоррекции сохранялись в течение периода наблюдения, при этом количество лакто- и бифидобактерий ( $Lg\ 6,42 \pm 0,13$  КОЕ/мл и  $Lg\ 4,14 \pm 0,47$  КОЕ/мл соответственно) достоверно отличалось от результатов после традиционного лечения ( $Lg\ 4,19 \pm 0,72$  КОЕ/мл и  $Lg\ 2,58 \pm 0,71$  КОЕ/мл соответственно) ( $P < 0,001$ ).

Таблица 4.7.

Состояние микрофлоры влагалища у женщин с микоплазмозом через 2 месяца после биокоррекции ( $Lg\ M \pm m$  КОЕ/мл)  
(Нарине-плюс + Виферон-3)

Микроорганизмы	Количество микроорганизмов в 1мл выделения		
	Контрольная группа	После лечения	После коррекции
Lactobacillus spp.	$5,46 \pm 0,33$	$3,28 \pm 0,55^*$	$5,42 \pm 0,17^{**}$
Bifidobacterium spp.	$4,60 \pm 0,47$	$2,78 \pm 0,48^*$	$4,31 \pm 0,19^{**}$
Bacteroides spp.	$1,01 \pm 0,55$	$1,64 \pm 0,67$	$1,00 \pm 0,66$
Peptostreptococcus spp.	$1,37 \pm 0,54$	$3,03 \pm 0,83^*$	$2,46 \pm 0,67$
ЛП E. coli	$1,63 \pm 0,65$	$1,64 \pm 0,67$	$1,56 \pm 0,66$
ЛН E. coli	$0,76 \pm 0,52$	$1,10 \pm 0,56$	$0,65 \pm 0,43^{**}$
Staphylococcus aureus	0	$0,36 \pm 0,00$	0
Staphylococcus epidermidis	$2,16 \pm 0,43$	$2,16 \pm 0,48$	$2,04 \pm 0,46$
Staph.haemolyticus	$1,34 \pm 0,61$	$1,30 \pm 0,56$	$1,13 \pm 0,58$
Streptococcus gr.A	-	$0,22 \pm 0,00$	0
Streptococcus gr.D	$2,87 \pm 0,66$	$1,40 \pm 0,72$	$1,63 \pm 0,70^*$
Diphtheroides	$1,35 \pm 0,54$	$1,00 \pm 0,66$	$1,43 \pm 0,73$
Candida albicans	$1,65 \pm 0,58$	$2,93 \pm 0,80$	$1,37 \pm 0,56^{**}$
Gardnerella vaginalis	$0,30 \pm 0,00$	$0,85 \pm 0,57$	$0,36 \pm 0,00$
Mycoplasma hominis	0	$1,85 \pm 0,76$	0

Примечание: \* -  $P < 0,05$  статистически достоверные различия по отношению к показателям контрольной группы.\*\* -  $P < 0,001$  достоверные различия по отношению к показателям после традиционного лечения.

Количество условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) после биокоррекции оказалось ниже по сравнению с уровнем, зафиксированным после лечения. Это можно проследить на примере лактозонегативных *E. coli* ( $\text{Lg } 1,17 \pm 0,59$  КОЕ/мл против  $\text{Lg } 0,66 \pm 0,44$  КОЕ/мл) и *Candida albicans* ( $\text{Lg } 2,57 \pm 0,55$  КОЕ/мл против  $\text{Lg } 0,52 \pm 0,35$  КОЕ/мл).

Схожая динамика наблюдалась и у пациентов с микоплазмозом. Несмотря на некоторое восстановление лактобацилл и бифидобактерий в течение двух месяцев после лечения (в период наблюдения), их уровни оставались значительно ниже нормативных значений ( $\text{Lg } 3,28 \pm 0,55$  КОЕ/мл и  $\text{Lg } 2,78 \pm 0,48$  КОЕ/мл соответственно), и эти показатели статистически достоверно отличались от данных, полученных после коррекции (см. табл.).

Таким образом, применение эубиотиков как *per os*, так и *per vaginum* у пациентов с генитальным герпесом, а также с мико- или уреоплазмозом способствует нормализации качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника наряду с микрофлорой влагалища и цервикального канала, обеспечивая при этом устойчивость достигнутых результатов на протяжении всего периода наблюдения.

Согласно данным ряда авторов, между иммунной системой и нормальной микрофлорой существует тесная взаимосвязь: изменения в одной из них вызывают определённые сдвиги в состоянии макроорганизма (Жуков И.А., 1980; Мухамедов И.М., 1991; Шаманек Т.П., 1996; Тургунова Ю.А., 1997).

Нарушение местного иммунитета способствует развитию хронических заболеваний, сопровождающихся дефицитом локально синтезируемых иммуноглобулинов, особенно секреторного IgA (Кира Е.Ф., 1999).

Для усиления местного иммунитета, как уже упоминалось ранее, у пациенток с генитальным герпесом применялись ректальные суппозитории «Виферон-3» по 1 суппозиторию 2 раза в день в течение 10 дней (всего 20 суппозиториев), а затем — по 1 суппозиторию 2 раза в день в течение одной недели (еще 10 суппозиториев). У пациенток с мико- или уреоплазмозом

препарат «Виферон-3» также назначался по 1 суппозиторию 2 раза в день в течение 10 дней (20 суппозитория), после чего — через день в течение 5 дней (дополнительно 10 суппозитория).

После проведённой иммунокоррекции показатели факторов местной иммунной защиты продемонстрировали положительную динамику. Как видно из таблицы 4.8, после курса иммунокоррекции наблюдалось выраженное повышение всех ключевых показателей местного иммунного ответа. Значения большинства из них приблизились к нормальному уровню.

**Таблица 4.8**

**Показатели местного иммунитета репродуктивного тракта у женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом после иммунокоррекции**

№	Показатели	Норма	Генитальный герпес	Микоплазмоз
1	Фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН), %	$76,5 \pm 0,94$	$71,0 \pm 1,07$	$73,2 \pm 1,06$
2	Секреторный иммуноглобулин А (S IgA), г/л	$0,165 \pm 0,002$	$0,161 \pm 0,002$	$0,162 \pm 0,002$
3	Титр лизоцима, г/л	$25,2 \pm 0,83$	$24,1 \pm 0,98$	$24,5 \pm 1,02$

Мониторинг показателей в течение последующих двух месяцев зафиксировал прогрессирующее восстановление локального иммунитета генитального тракта у пациенток с микоплазмозом. У пациенток с генитальным герпесом отмечалась стабильная и высокая положительная динамика иммунологических маркеров. Эти данные детализированы в таблице 4.9.

В заключение, следует подчеркнуть, что исследованные нами параметры местного иммунного ответа — фагоцитарная активность

нейтрофилов, содержание лизоцима и уровень секреторного иммуноглобулина А – при генитальном герпесе и микоплазмозе демонстрируют реставрацию и поддержание на уровне, приближенном к физиологической норме, в течение двух месяцев после проведенной терапевтической коррекции

Таблица 4.9

Факторы местного иммунитета репродуктивного тракта у женщин с генитальным герпесом и микоплазмозом в период наблюдения

№	Показатели	Норма	Генитальный герпес	Микоплазмоз
1	Фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН), %	$76,5 \pm 0,94$	$70,8 \pm 1,23$	$75,3 \pm 0,93$
2	Секреторный иммуноглобулин А (S IgA), г/л	$0,165 \pm 0,002$	$0,160 \pm 0,002$	$0,165 \pm 0,001$
3	Титр лизоцима, г/л	$25,2 \pm 0,83$	$22,0 \pm 0,71$	$25,2 \pm 1,10$

Разработанный нами подход к био- и иммунокоррекции демонстрирует полную нормализацию качественных и количественных характеристик микрофлоры влагалища и кишечника, а также восстановление защитных сил местного иммунитета влагалища. Это приводит к полному устранению дисбиотических состояний и иммунодефицита.

Положительные результаты исследования послужили основанием для создания информационного письма "Пути коррекции нарушений микрофлоры влагалища и кишечника, а также местной иммунной системы у больных урогенитальным микоплазмозом и генитальным герпесом" (№ 1028). Документ, утверждённый Министерством здравоохранения Республики Узбекистан 29 апреля 2008 года, содержит рекомендации для врачей-практиков, акушеров-гинекологов и специалистов в области репродуктивного здоровья

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инфекции женских половых органов связаны с угрозой возникновения бесплодия, осложнений в беременности, нарушений плода, а также послеродовых проблем, что делает их одной из основных задач в акушерстве и гинекологии.

Значение половой микрофлоры на разных этапах жизни женщины очень трудно переоценить. Нарушение её баланса — дисбиоз вагинальной флоры — может приводить к инфекционным процессам как у матери, так и у плода, естественным выкидышам, преждевременным родам и росту неонатальной смертности. В связи с этим проблема дисбиоза важна не только в акушерстве и гинекологии, но и в неонатологии и педиатрии.

Эта монография посвящена изучению микрофлоры влагалища в норме, способам ее анализа, а также исследованию бактериального состава и иммунитета в области влагалища и шейки матки у женщин с инфекциями TORCH-группы: микоплазмозом, уреаплазмозом и генитальным герпесом.

Выбор этих заболеваний был обусловлен результатами ретроспективного анализа медицинских карт пациенток, лечившихся в нашем гинекологическом отделении с 2001 по 2005 год. Анализ показал, что вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) встречался у женщин с TORCH-инфекциями в 33% случаев, а мико- и уреаплазмозы – в 16%. Эти данные послужили основой для данного исследования.

Анализ результатов показывает, что у женщин с микоплазмозом и генитальным герпесом часто наблюдаются нарушения микрофлоры влагалища (дисбактериоз) и ослабление местного иммунитета. После стандартного лечения состояние при герпесе немного улучшается, но полностью не нормализуется. При микоплазмозе или уреаплазмозе, напротив, наблюдается ухудшение этих показателей.

Антибиотики, часто используемые для лечения микоплазмоза, не только уничтожают болезнетворные бактерии, но и негативно влияют на полезные бактерии, такие как лактобактерии, бифидобактерии, некоторые

стафилококки и кишечная палочка, которые являются частью нормальной микрофлоры. Это приводит к уменьшению количества полезных бактерий во влагалище и шейке матки, а также к снижению местного иммунитета. В результате создаются благоприятные условия для размножения условно-патогенных микроорганизмов.

Современная медицина располагает широким спектром биопрепаратов для терапии дисбиоза, включая такие известные, как бифидумбактерин, лактобактерин, колибактерин, ацелакт, нормазе, бифидок, виталакт, хилак-форте и линекс. После обретения независимости Республика Узбекистан переживает бум биотерапевтических препаратов на своем рынке. Важно подчеркнуть, что кафедра микробиологии уже около двух десятилетий активно изучает состояние микрофлоры человека и влияние на нее различных биопрепаратов, что позволило собрать значительный объем научных данных. Результатом этой работы стало успешное завершение 5 докторских и более 20 кандидатских диссертаций, посвященных вопросам биокоррекции дисбиоза.

Результаты наших изысканий позволяют сделать вывод о том, что применение эубиотиков любого типа оказывает благоприятное воздействие на процессы нормализации микробных сообществ в различных компартментах организма человека. На основании полученных данных, перед специалистами в области микробиологии выдвигается приоритетная задача по созданию нового биотерапевтического средства, направленного на поддержание здоровья населения и обеспечение пролонгированного позитивного эффекта.



## ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алекшеева Л.Ж. Нарушения микробиоценоза влагалища, кишечника у женщин с бактериальным вагинозом и вагинитом, пути их коррекции //Дис. ... канд. мед. наук. – Т., 2002. – 137 с.
2. Алешкин В.А., Макаров О.В. Состояние местного иммунитета при воспалительных заболеваниях женских половых органов и влияние на него иммуномодулятора кипферона. // Иммунопатология и клиническая иммунология. – 2000. – № 5. – С.41–44.
3. Амбарцумян К.Ф., Саркисян Б.Г., Элоян Д.В. Влияние кисломолочной смеси “Нарине” на микрофлору кишечника у больных с функциональными и воспалительными заболеваниями толстой кишки //Клин. медицина. – 1989. – № 7. – С. 72-74.
4. Анкирская А.С. Достижения и задачи клинической микробиологии в акушерстве и неонатологии //Клинич. лаб. диагностика. – 1996. – №1. – С.23–26.
5. Антонова Л.В., Прозоровская К.Н., Дуб Н.В. Иммуноглобулины в секрете желез цервикального канала при воспалительных заболеваниях внутренних половых органов // Акушер. и гинекол. – 1977. – № 4. – С.8–11.
6. Бактериальный вагиноз: основные проявления, диагностика, лечение /Кубанова А.А., Аковбян А.В., Федоров С.М. и др.//Вестник дерм. – 1996. – № 2. – С.76-77.
7. Бактериофаги и комплексные бактериопрепараты в терапии инфекционных больных /Лобзин Ю.В., Захаренко С.М., Байгузина Ф.А. и др.// Тез. докл. VI Росс.- Итал. науч. конф. «Инфекционные болезни: диагностика, лечение, профилактика». – СПб., 2000. – С.136-137.
8. Барзашка-Попова С.Н. Коррекция микрофлоры и местного иммунитета кишечника при дисбактериозах с помощью лактобацилл //Автореф. дис. .. канд. мед. наук. – М., 1990. – 24 с.

9. Бифацид – новый отечественный биологический препарат / Ганина В.И., Семенихина В.Ф., Иноземцова В.Ф., Сундукова М.Б. // Дисбактериозы и эубиотики. – М., 1996. - 12 с.

10. Бифилиз в комплексном лечении и профилактике дисбактериоза кишечника /Щербакова Э.Г., Баранов А.А., Дорофейчук В.Г. и др. // Пособие для врачей. – М., 2000. - 44 с.

11. Бредихина Н.А., Митрохин С.Д., Орловский А.А. Современные подходы к лечению и профилактике дисбактериоза кишечника //Рос. гастроэнтерол. журнал. – 1998. – №2. –С.18-27.

12. Виферон. /Малиновская В.В., Деленян Н.В., Ариненко Р.Ю., Мешкова Е.Н. //Руководство для врачей. – М., РАМН НИИ эпид. и микроб. им. Гамалеи. – 2006. – 56 с.

13. Влияние лактобактерина “Ором” на показатели иммунной системы при беременности, осложненной бактериальном вагинозом. /Каттаходжаева М.Х. и др. //Съезд акушер гинекологов республики Узбекистан. Вестник врача общей практики. – 2003, 23.10.

14. Воробьев А.А. и др. Дисбактериозы – актуальная проблема медицины //Вестн. РАМН. – 1997. – № 3. – С.4-7.

15. Воробьев А.А., Лыкова Е.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции //Журн. микробиол. – 1999, № 6. – С.102-105.

16. Говалло В.И. Иммунология репродукции. //Медицина: – М., 1987.– 304 с.

17. Грищенко В.И., Дахно Ф.В., Набиль Сейфеин Мохариб. Роль цервикального фактора в репродукции человека // Акушер. и гинекол. – 1981. –№ 10. – С.3-6.

18. Гусева О.И., Каткова Н.Ю. Клиника, диагностика и лечения TORCH –инфекций во время беременности //Учеб. метод. пособие. Нижний Новгород, 2002. – 46 с.

19. Давуров А.М. Новая питательная среда для выращивания урогенитальных микоплазм //Автор. дис. ... канд. мед. наук. – Т., 2000. –18 с.
20. Долгушина В.Ф. Диагностика, лечение воспал. забол. нижнего отдела половых органов, прогн. и проф. их осложнений у беременных (клинико-иммунол. исследование) //Дис. ...док. мед. наук. – Челябинск, 1991. –276 с.
21. Долгушина В.Ф., Телешева Л.Ф., Ремесленникова И.В. Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиол. и патол. состояниях //Тез. докл. науч. конф. – Челябинск, 1997. – С.40-41.
22. Еропкина Е.М., Афиногенов Г.Е. Антиадгезивная активность белковых комплексов биологических жидкостей и секретов. // Журн.микробиол., эпид. и иммунобиол. – 1994. – №2. – С.110-114.
23. Закопаева Е.С., Литьяева Л.А. Корректирующее действие пробиотических продуктов у беременных // Тез. докл. V Рос. съезда врачей-инфекционистов. – М., 1997. – 28 с.
24. Значение некоторых показателей периферического и местного иммунитета в ранней диагностике эндометрита после кесарева сечения / Уткин В.М., Глуховец Б.И., Авдеев Ю.В. и др. // Акушер. и гинекол. – 1985. – № 8. – С.38-41.
25. Изучение влияния «Солхотриховака» на вагинальную микрофлору у больных с папилломавирусной инфекцией в ассоциации с цервикальной интраэпителиальной неоплазией /Коршунов А.М., Кафарская Л.И. и др. // Журн. микроб., эпид. и иммуноб. – 1994. – № 5. – С.13-17.
26. Изучение бифидофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста /Коршунов В.М., Гудиева Б.А., Ефимов Б.А. и др. //Журн. Микробиол. – 1999. – № 4. – С.74-78.
27. Каттаходжаева М.Х., Сабирзянова Л.Г., Кейнова Л.Е. Диагностика и коррекция бактериального вагиноза у беременных. //Педиатрия. Спец. выпуск. – 1999. С.266-267.

28. Кира Е.Ф. Бактериальный вагиноз (клиника, диагностика, лечение). // Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Санкт-Петербург, 1995. – 30 с.
29. Кира Е.Ф. Клиника и диагностика бактериального вагиноза. //Акушер. гинекол. – 1994, – № 2. – С.32-35.
30. Кира Е.Ф. Пути повышения эффективности диагностики и лечения сексуально-трансмиссивных заболеваний в гинекологической практике //ЗППП. – 1996. –№ 2. – С.33-38.
31. Коджаева М.Х., Подзолкова Н.М., Кулаков А.В. Полиоксидоний в комплексной терапии рецидивирующих инфекций урогенитального тракта. //Иммунология. – 2002. – № 6. – С.376-379.
32. Куперт А.Ф. Иммуноглобулины в цервикальной слизи при эндоцервикозах //Акушер. и гинекол. – 1983. – №11. – С.65–67.
33. Ларсен Б. Микрофлора родовых путей в норме. Репродуктивное здоровье. Общие инфекции // Медицина: – М., 1988. – С.41–45.
34. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. //Наука: Сибирское отделение АМН СССР. – Новосибирск, 1989. – 340 с.
35. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза // – Казань, Магариф, 1993.
36. Микроэкология влагалища. Коррекция микрофлоры при вагинальных дисбактериозах /Коршунов В.М., Володин Н.Н., Ефимов Б.А., Саркисов С.Э. // Медицина: – М., 1999. – 80 с.
37. Микробная экология кишечника в норме и патологии. /Гончарова Г.И., Дорофейчук В.Г., Смолянская А.З., Соколова К.П. // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. – Т.34. – №6. – С.462-466.
38. Микробиологические исследования при хронических неспецифических воспалительных заболеваниях половых органов женщин, леченных комбинацией лазеров /Каттаходжаева М.Х., Махмудов М.А., Мадрахимов Т., Баженов Л.Г. //Актуальные вопросы акушерства и гинекологии. – 1994. С.60-63.

39. Мухамедов И.М. ва бошқалар. Микробиология, иммунология, вирусология. //Ўқув дарслик. – Тошкент, 2002. – 519 б.
40. Мухамедов И.М., Махкамова Д.Э., Мухамедов Б.И. Микроэкология влагалища, её нарушения и пути их коррекции //Учебное пособие. – Ташкент, 2004. – 119 с.
41. Мухамедов И.М., Неъматов А.С., Рахмонов Х.Ш. Микроэкология важнейших биотопов тела человека //Монография. – Ташкент, 2007. – 462 с.
42. Опыт клинического применения споровых пробиотиков в лечении бактериального вагиноза /Созаева Л.Г., Сорокулова И.Б., Осипова И.Г., Назарова Е.К. // Перспективы использования эубиотика «Биоспорин» в практике здравоохранения и военно-медицинской службы: Сбор. матер. науч.-практ. конф. центра ВТП БЗ. – Екатеринбург, 1997. – С.25-26.
43. Пауков В.С., Кауфман О.Я. Взаимоотношения «общего» и «местного» в воспалении // Архив патол. – 1988. – №7. – С.7-16.
44. Пигаревский В.Е. Зернистые лейкоциты и их семейства //Медицина: – М., 1978. –127 с.
45. Рахимов М.Р., Каттаходжаева М.Х., Исламова Н.А. Вобэнзим и папаин в лечении и реабилитации больных с воспалительными заболеваниями органов гениталий // Инфекция, иммунитет и фармакология. – 2006. – №1. – С.80-85.
46. Репродуктивное здоровье / Кейт Л.Г., Бергер Г.С., Эдельман Д.А. и др. //Медицина: – М., 1988. – 398 с.
47. Сабирзянова Л.Г. Профилактика и лечение бактериального вагиноза и вагинита с учетом микробиоценоза влагалища //Авто.реф. дис.... канд. мед. наук. - Т., 2001. - 17 с.
48. Сапаева Ш.А. Жанубий Орол бўйидаги ҳомиладор аёллар репродуктив йўли маҳаллий иммунитет омиллари ва сийдик-таносил тизими микрофлораси //Тибб. фан. номз. дисс. – Урганч, 2006. – 131 б.

49. Саркисов С.Э., Кафарская Л.И., Коршунов В.М. Применение биотерапевтического агента «Жлемик» для коррекции при бактериальных вагинозах // Журн.микробиол., эпид. и иммунобиол. –2000. – №1. – С.88-90.
50. Сидорова И.С., Боровкова Е.И. Микрофлора половых путей у женщин репродуктивного возраста. Практическая медицина, Москва, 2007. – 79 стр.
51. Система иммунокоррекции при хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях у беременных. /Краснопольский В.И. и др. //Пособие для врачей. МЗ РФ, Московская область: НИИ акуш. и гинекологии. – М., 2002. – 28 с.
52. Соловьева И.В. Характеристика влагалища женщин в норме и патологии //Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – М., 1987. – 13 с.
53. Состояние проблемы бактериального вагиноза /Кубанова А.А., Аковбян В.А., Федоров С.М. и др. //Вестн. дерматол. и венерол. – 1996. – №3. – С.22-26.
54. Состояние местного и системного иммунитета у больных с папилломавирусной инфекцией шейки матки и влияние на него иммуномодулятора солкотриховака. /Пинегин Б.В., Минкина Г.Н., Коршунова О.В. и др. //Иммунология. – 1997. – №4. – С.45-48.
55. Телешева Л.Ф., Долгушина В.Ф., Долгушин И.И. Механизмы противoinфекционной защиты репродуктивного тракта женщин //Журн. микробиол., эпид. и иммунобиол. – 1998. – №4. – С.85-90.
56. Теплякова М.В., Радионченко А.А., Рыжова И.А. Секреторный иммунитет влагалища при остром неспецифическом сальпингите //Акуш. и гинекол. – 1990. – № 6. – С.56-57.
57. TORCH-инфекции и беременность. /Саидкариев Б.К., Худайбердиев Я.К., Саидкариев У.Б., Мирзаева У.Н. // «ООО ARNAPRINT»: – Т., 2005. – 47 с.

58. Туляганов Т.Е., Бабаджанова Г.С. Сурункали TORCH–инфекцияси бор аёлларда ҳомиланинг ой-куни етилмай тушиши билан иммун боғлиқлиги муаммолари //Патология. – 2000. – №2. – Б.67-69.

59. Тургунова Ю.А. Нарушение микробиоценоза кишечника, кожи и системы иммунитета у больных экземой и псориазом и их коррекция //Дис. ... канд. мед. наук. – 1997. – 167 с.

60. Уровень колонизации уреоплазмами определенных биоваров в группах женщин с различными клиническими симптомами. /Рар В.А., Максимова Т.Г. и др. //Журн. микроб., эпид. и иммуноб. – 2004. – № 4. – С.12-17.

61. Хужаева Ш.А. Айрим TORCH–инфекцияларда кин, ичак микрофлораси ва маҳаллий иммунитет тизими ҳолати, уларни коррекциялаш йўллари //Тибб. фан. номз. дисс. – Тошкент, 2008. – 150 б.

62. Цвелев Ю.В., Кира Е.Ф. Бесспорное и спорное в проблеме гнойновоспалительных заболеваний придатков матки. //Акушер. и гинекол. – 1990. – №9. – С.72-76.

63. Шварцман Я.С., Хазенсон Л.Б. Местный иммунитет. //Медицина: – Л., 1978. – 223 с.

64. Яковишина В.Л. Бесплодный брак при хламидийной и микоплазменной инфекции //Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Киев, 1991. – 22 с.

65. Adherence of bacteria to vaginal epithelial cells at various times in the menstrual cycle. /Sobei J.D., Schneider J., Kaye D., Levison M.E. // Infect. Immun. –1981. – №31. – P.194–197.

66. Bartlett J.G., Polk B.F. Bacterial flora of the vagina: quantitative study. //Rev. Infect. Dis. –1984. – №6. – P. 67-72.

67. Belyakov I.M., Ahlers J.D., Clements J.D. Interplay of cytokines and adjuvants in the regulation of mucosal and systemic HIV-specific CTL. // [J. Immunol.](#) – 2000. – Vol. 165 (11). – P.6454-6462.

68. Bouvet J. P., Belec L., Pires R. Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination. *Immunoglobulin //Infect. Immun.* – 1994. – Vol.62. - №9. – P. 3957-3961.
69. Coffman R.L., Lebman D.A., Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide - stimulated murine B lymphocytes // *J.Exp. Med.* – 1989. – Vol. 170 (3). – P. 1039-1044.
70. Doderlein A. Die Scheidensekretunterchugen // *Zefftralbl. Gyflakol.* – 1894. – Bd.18. – P.10-14.
71. Doric Miljenko, Kinsky Radslav G., Voisin Guy A. Alogeneic reactivity of maternal lymphoid cells during the course of gestation. Modufications and sex differences in a local GVH assay // *J. Reprod. Immunol.* – 1984. – V. 6. - №3 – P.187–195.
72. Eschenbach D.A., Hiller S.L. Histori and review of bacterial vaginosis // *Am. J. Obstet. Gynecol.* –1993. –169 (2). – P.441– 445.
73. Furr P.M., Taylor-Robinson D. Prevalence and significance of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealuticum* in the uries of non-venereal disease population. // *Epidemiol. Infect.* –1987, 98: -P.353–359.
74. Gardner H., Dukes C.D. *Haemophilus vaginalis* a new defined specific infection previously classified “non-specific” vaginitis. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1995, 69. – P.962–976.
75. Giorgi A., Torrani S., Dellaglio F. Identification of vaginal lactobacillus: from asymptomatic woman // *Microbiol. Rev.* – 1987. – Vol.94. – P.399–403.
76. Hill J.A., Haimovici F., Politch J.A. Effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters // *Fertil. Steril.* – 1987. – V.47(3). – P.460–465.
77. Hiller S.L. Case control study of chorioamniotic infection in prematurerity // *New Engl. J. Med.* – 1988. – Vol.319. – P.972.



78. Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. / Beagley K.W., Eldridge J.H., Lee F. et al. // J.Exp. Med. – 1989. – Vol. 169. – P.2133-2148.
79. Jalanti R., Isliker N. Immunoglobulins in human cervico-vaginal secretions. //Int. Arch. Allergy. – 1977. – Vol. 53. – P.402–408.
80. Jolly J. Minimal criteria for the identification of *Gardnerella vaginalis* isolated from the vagina. //J. Clin. Pathol. – 1983. – Vol 36 (4). – P.476-478.
81. Klebanoff S.J., Hillier S.L., Eschenbach D.A. Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating lactobacilli. //J.Infect. Dis. – 1991. – Vol 169. – P.94–109.
82. Larsen B. Vaginal flora in health and disease. //Clin. Obstet. Gynecol. – 1993. – Vol.36. – P.1–10.
83. Larson R.A., Mick R. Dose-escalation trial of cladribine with five daily intravenous infusions in patients with advanced hematologic malignancies //Gut. –1995 – Vol.37. – № 5. – P.708–711.
84. Microbial flora of the vagina / Mehta A., Talwalkar J., Shetty C.V. et al. // Microecology and Therapy. –1995. –Vol.23. – P.1–7.
85. Minkoff H., Mead Ph. An obstetric approach to the prevention of early-onset group B beta-hemolytic streptococcal sepsis. //Am. J. Obstet. Gynecol. – 1986. – V.25. - №6. – P.973–977.
86. Ohashi A. Clinicobacteriological study on microbial flora in vaginal microbial flora according to the menstrual cycle //J. Jap. Ass. Infect. Dis. – 1980. – Vol.54. – P.321–330.
87. Paavonen J. Physiology and ecology of the vagina. //Scand. J. Infect. Dis. –1983. –Vol. –P. 31 – 35.
88. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. / Eschenbach D.A., Davick P.R., Williams B.L. et al. //J. Clin. Microbiol. – 1989. - №27. – P.251–256.

89. Production of broad spectrum antimicrobial substance bu *Lactobacillus reuteri*. /Axelsson L.T., Chung T.C., Dobrogosz W. J. et al. //Microb. Ecology Health Dis. – 1989. – №2. – P.131–136.
90. Redondo-Lopez V., Cook R.L., Sobel J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. //Rev. Infect. Dis. –1990. – №12. – P.856–872.
91. Skarin A. Sylwan J. Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. //Acta. Pathol. Microbiol. Immun. –1987. –Vol.94. – P.399–403.
92. Tourville D.R. et al. The human female reproductive tract: immunohistological localization of gamma A, gamma G, gamma M, secretory “piece”, and lactoferrin. //Am. J. Obstet. Gynecol. – 1970. – V.108. – P.1102–1109.
93. Vandenberg P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic product and interference with microbial growth. //FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – №12. – P.221–238.
94. Waldman R.H., Ganguly R. Immunity to infections on secretory surfaces //J. Infect. Dis. – 1974. V.130. – №4. – P.419–440.
95. Yonekura M.L. Treatment of postcesarean endomyometritis. // Clin. Obstet. Gynecol. – 1988 . – Vol.31. – №2. – P.488-500.
96. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Viridi J.S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 2025;16:1254.
97. Kostrzewa M., Maier T., Schubert S., Sauer S. Clinical use of MALDI-TOF mass spectrometry in microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 2025;63(4):e01234-24.
98. Lavigne J.-P., Becker S.L. Future trends of MALDI-TOF MS in infectious diseases diagnosis. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2025;11:45.