

РГГ ОД

20 ДЕК 2000

На правах рукописи

ОР 250147 2000

МАКАРОВА Людмила Николаевна

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГАРДНЕРЕЛЛЁЗА

03. 00. 07 – микробиология

03. 00. 15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2000

Работа выполнена на кафедре микробиологии Российского университета дружбы народов, отделении микробиологии Центрального научно-исследовательского кожно-венерологического института Министерства здравоохранения РФ, лаборатории биомедицинской технологии Московской Медицинской Академии им. И.М. Сеченова, лаборатории генно-инженерных систем «Лэгис».

Научные руководители:

кандидат медицинских наук, доцент Э.Г. Кравцов
кандидат медицинских наук, доцент Е.А. Васильева

Официальные оппоненты:

академик РАМН и РАЕН, доктор медицинских и биологических наук,
профессор И.В. Домарадский
доктор медицинских наук, профессор С.А. Дратвин

Ведущая организация:

Государственный институт стандартизации и контроля медицинских
биологических препаратов им. Л.А. Тарассевича

Защита состоится «15» ноября 2000г. в 15 часов
на заседании диссертационного совета К 053. 22. 16 в Российском университете
дружбы народов по адресу: 117198 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета
дружбы народов по адресу: 117198 г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

Автореферат разослан «14» октября 2000г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



О.Б. Гигани

Р59 - 3,0

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Проблема вагинальных инфекций в последние годы все чаще привлекает внимание исследователей. Одним из наиболее распространенных видов вагинальной инфекции является бактериальный вагиноз (БВ) – заболевание не передающиеся половым путем, не воспалительный синдром, связанный с дисбиозом вагинального биотопа. В 1984 году Всемирной организацией здравоохранения был выделен в самостоятельную клиническую нозологию.

В современном понимании БВ – это клинический синдром, характеризующийся обильными выделениями из влагалища, часто с неприятным запахом, зудом, дисурическими расстройствами и т.д. Клинические проявления обусловлены замещением нормальной микрофлоры влагалища аэробными, анаэробными микроорганизмами (*Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides* sp., *Mycoplasma hominis*, *Streptococcus* sp. и др.), резким снижением или отсутствием лактобацилл, без поражения субэпителиальных тканей стенки влагалища. По данным различных исследователей БВ обнаруживают у 21-33 % женщин детородного возраста, причем *G. vaginalis* от таких больных удается выделить более чем в 50 % случаев (Morse S.A. et al. 1990; Кубанова А.А. и соавт. 1991). Тем не менее, присутствие в вагинальном секрете *G. vaginalis* не всегда связано с клинически манифестным течением болезни (Палади Г.А. и соавт. 1991). Гарднереллез (БВ с преобладанием *G. vaginalis*) может явиться причиной восходящей инфекции, осложняющей беременность и послеродовое течение. Отмечаются воспалительные осложнения после хирургических вмешательств (Акопян Т.Е. 1996; Новикова Е.Г. и соавт. 1998; McCoy C.M. et al. 1995; Goldenberg R.L. et al 1996; Paige D.M. et al. 1998; Faro S. 1988; Senior C.C. et al. 1986; Strum A. et al. 1983; Kato N. et. al. 1996). Кроме того, при гарднереллезе отмечается увеличение частоты неопластических процессов шейки матки (Platz-Christensen J.J. et al. 1994; Rokita W. et al. 1997).

До настоящего времени, этиология и патогенез этого заболевания остаются во многом непонятными. Диагностика БВ основывается на критериях Amsel R. (1983), однако роль *G. vaginalis* при таком способе диагностики остаётся неясной. Бактериологические методы выделения и идентификации культуры *G. vaginalis* длительны и трудоемки и могут быть выполнены только в хорошо оснащенных лабораториях.

В последнее время разрабатываются современные методы выявления гарднереллезной инфекции. Разработаны новые способы детекции микроорганизмов – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ДНК-гибридизации, которые в настоящее время стали основой нового направления в диагностике инфекционных болезней. Применение ПЦР и ДНК-гибридизации остаются спорными вопросами в проблеме диагностики гарднереллезной инфекции. Результаты их не всегда оказываются адекватными клиническим данным.

Вышеизложенное свидетельствует об актуальности дальнейшего углубленного изучения проблемы микробиологической диагностики гарднереллезной инфекции.

Цель работы: Оценка диагностической значимости современных методов диагностики гарднереллеза.

Основные задачи исследования

1. Изучить морфолого-культуральные свойства референс-штамма *G. vaginalis* ATCC 14018;
2. Подобрать оптимальную селективную среду для выделения *G. vaginalis* из влагалищного отделяемого, определить оптимальные условия культивирования;
3. Создать иммунную сыворотку и оценить эффективность иммунодиагностики гарднереллеза;
4. Изучить диагностические возможности РИФ;
5. Определить диагностическую значимость детекции ДНК *G. vaginalis* в патологическом материале;
6. Сравнить чувствительность и специфичность генетических методов ПЦР и ДНК-гибридизации в сравнении с другими методами микробиологической диагностики.

Научная новизна

- ⇒ Впервые в нашей стране проведено комплексное морфолого-культуральное исследование референс-штамма *G. vaginalis* ATCC 14018 (Gardner H.L. и Dukes C.D).
- ⇒ Впервые получена иммунная сыворотка к референс-штамму, позволившая установить, что на территории России циркулируют штаммы *G. vaginalis*, подобные и отличающиеся по антигенным свойствам от референс-штамма.
- ⇒ Разработана модификация метода РИФ с использованием иммунной сыворотки.
- ⇒ Впервые проведена сравнительная оценка современных методов лабораторной диагностики гарднереллеза и рекомендовано комплексное клиничко-микробиологическое исследование.

Научно-практическое значение работы

- ⇒ Полученные данные морфо-функционального исследования референс-штамма позволяют адекватно оценивать практическому врачу результаты микроскопического исследования патологического материала.
- ⇒ Разработаны рекомендации по методам выделения и идентификации культуры *G. vaginalis*.
- ⇒ Работа выполнена в соответствии с программой Государственных испытаний «Тест-системы для выявления ДНК *G. vaginalis* методом полимеразной цепной реакции», утвержденной Федеральной комиссией по МИБП (Протокол № 4 от 29.04.99 г).

⇒ Доказано, что ПЦР является надежным методом для идентификации *G. vaginalis*, но как метод диагностики БВ не может быть использован.

⇒ Выявлены ограничения в диагностической оценке иммуноморфологических тестов.

Внедрение в практику

Федеральная комиссия МИБП рекомендовала внедрение в практику здравоохранения РФ препарат: «Тест-системы для выявления ДНК *G. vaginalis* методом полимеразной цепной реакции» ДиаГен-Gardnerella®, разработанный ЗАО «Лаборатория генно-инженерных систем «ЛАГИС» (Протокол № 4 от 29.04.00 г.).

Результаты работы и рекомендации используются в практической работе микробиологического отделения ЦНИКВИ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Комплексное морфолого-культуральное изучение референс-штамма *G. vaginalis* ATCC 14018, показало его вариабельность, зависящую от среды культивирования, условий обитания и стадии роста. Необходимым условием для выделения чистой культуры *G.vaginalis* является культивирование на селективной среде КА (с добавлением крови человека, гентамицина, амфотерицина В и налидиксовой кислоты) в атмосфере 5-10 % CO₂ в течение 48 ч и при температуре инкубирования 37 °С.
2. Доказано, что при исследовании влагалищного отделяемого больных женщин, ПЦР не может быть использована для диагностики БВ, т.к. при высокой ее чувствительности ДНК *G. vaginalis* определяется у здоровых женщин. Высокая специфичность ПЦР позволяет рекомендовать ее для видовой идентификации выделенной чистой культуры.
3. Верифицирующим методом следует признать иммуноморфологический, который позволяет сделать экспресс-анализ на наличие *G. vaginalis*. Однако существуют разные серотипы *G. vaginalis* и до настоящего времени антигенная структура микроба остается не достаточно изученной, в связи, с чем метод имеет ряд ограничений.

Апробация работы. Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на научно-практической конференции дерматологов, акушеров-гинекологов и педиатров (г. Екатеринбург 1999г.), 3-й Всероссийской научно-практической конференции (г. Москва 2000г.), научно-практической конференции НПО «Биомедицинские технологии» (г. Москва 2000г.), Международном хирургическом конгрессе (Tel-Aviv, Israel 2000г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, перечень которых прилагается.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, главы собственных исследований и обсуждения полученных результатов, вы-

водов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Материалы диссертации изложены на 112 страницах машинописного текста, включая 10 таблиц, 15 рисунков. Список литературы содержит 33 работ, из них 35 отечественных и 57 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач проведено углубленное изучение культурально-морфологических свойств *G. vaginalis*, включающие изучение культуральных свойств (метаболизма – потребности в кислороде, роста на средах, скорости роста, подбора оптимальных (накопительных) и селективных сред, формы колоний, температуры инкубирования и т.д.), морфологии, проведение светооптического и электронно-микроскопического исследований. В качестве референс-штамма был использован штамм *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 (выделенный Gardner H.L. и Dukes C.D. и депонированный в Американской национальной коллекции).

Иммунная сыворотка к штамму ATCC 14018 получена, путём четырёхкратной внутривенной иммунизации кроликов бактериальной взвесью *G. vaginalis*. Сыворотку использовали для серологического тестирования в реакциях агглютинации (РА) и иммунофлюоресценции (РИФ).

Клинические образцы были исследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) при помощи «Тест-системы для выявления ДНК *G. vaginalis* методом полимеразной цепной реакции» ДиаГен-*Gardnerella*®, разработанной ЗАО «Лаборатория генно-инженерных систем «ЛАГИС». Кроме того, был использован метод ДНК-гибридизации на аппарате Affirm VP III, предназначенном для обнаружения и идентификации нуклеиновых кислот *Candida sp.*, *G. vaginalis* и *Trichomonas vaginalis*. Параллельно проводилось бактериоскопическое исследование мазков (окрашенных по Граму и синькой Леффлера) и реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

При изучении видовой специфичности тест-системы ПЦР использовали: 18 музейных штаммов, 89 свежевыведенных клинических штаммов и геномная ДНК человека.

Выполнено клинико-лабораторное исследование 69 пациенток, которые были разделены на 4 клинические группы: - пациентки с диагнозом бактериальный вагиноз (БВ) $29 \pm 5,5$ %, - вагинальный кандидоз (ВК) $13 \pm 4,0$ %, - пациентки, имеющие гинекологические заболевания: миома матки, кисты яичников, эрозии и эктопии шейки матки, сальпингоофориты, аднекситы, гиперплазию эндометрия и другие (ДГП) $34,8 \pm 5,7$ %, - условно здоровые (УЗ) $23,2 \pm 5,0$ %.

Микробиологическая диагностика основывалась на результатах посева влагалищного содержимого, количественной и качественной оценке аэробных бактерий, микроаэрофилов (гарднерелл, лактобацилл), грибов. Посев производили на набор стандартных питательных

сред: среду Эндо, желточно-солевой агар, среду Сабуро, кровяной агар, МРС - 4. В процессе выбора сред и условий культивирования *G. vaginalis* были использованы Tryptone Soya Agar (TSA), питательный агар сухой (КД), Columbia agar base (КА), АГВ, три серии сред, представленных на испытание из Института питательных сред г. Махачкала, а также газогенерирующие пакеты GasPak Plus Anaerobic System Envelopes with Palladium Catalyst H_2CO_2 и GasPak CO_2 фирмы Becton Dickinson.

Видовую идентификацию микроорганизмов выделенных из влагалищного отделяемого проводили общепринятыми методами, используя номенклатуру Берджи и Руководство по клинической микробиологии. Всего было выделено и идентифицировано - 178 штаммов. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы, разработанной НИЦ биоавтоматика (г. Нижний Новгород). Были определены следующие показатели: критерий Стьюдента (t) и критическое значение t на уровне значимости 0,05; сравнение средних величин; значение сигмы для всех изучаемых показателей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение *G. vaginalis* имеет определенные сложности, так как данный микроорганизм плохо культивируется и трудно поддается идентификации. Для выбора селективной среды и оптимизации культивирования *G. vaginalis* были апробированы среды: TSA, КА, КД, АГВ и три серии сред из НИИ питательных сред. Проведенные исследования показали, что ни одна из испытанных сред не могла конкурировать со средой КА, только АГВ-среда по ростовым качествам приближается КА. На основании проведенных исследований мы пришли к заключению, что селективная среда для выделения культуры *G. vaginalis* из патологического материала должна быть основана на КА с добавлением 5-10 % крови человека и антибиотиков гентамицина, амфотерицина-В и налидиксовой кислоты в концентрациях 4,0 мг/л; 2,0 мг/л; 30,0 мг/л соответственно, а культивирование должно проводится в анаэробе с 5-10 % CO_2 . Было показано, что введение ростовой добавки "Polyvitex" может компенсировать угнетение роста *G. vaginalis*, вызванное антибактериальными препаратами в микроанаэробных условиях. При глубоком анаэробии введение добавки наоборот задерживает рост культуры. Таким образом, рост культуры *G. vaginalis* зависит не только от среды, но и от газового состава атмосферы, в котором выращивается микроб.

Светооптические и электронно-микроскопические исследования *G. vaginalis* показали, что культура, выращенная на КА с добавлением крови человека в условиях анаэробии, обладает полиморфизмом и грамвариабельностью. При электронно-микроскопическом исследовании, показано, что в первые сутки культура имеет вид полиморфных палочек, с характерным для грамотрицательных бактерий строением клеточной стенки толщиной 10-15 нм. Отмечено типичное поперечное деление с помощью центральной перегородки, вблизи

которой обнаруживались мезосомы имеющие ламелярное строение присущее преимущественно грамотрицательным бактериям. В двухсуточной культуре наблюдалось изменение клеточных стенок некоторых бактерий, которые представляли собой чередование электронноплотных и прозрачных структур в виде гребней располагавшихся перпендикулярно цитоплазматической мембране, занимавших от $\frac{1}{4}$ до $\frac{1}{2}$ окружности клеточной стенки. Выявленный полиморфизм и грамвариабельность определялись до 3^х, 4^х суток. Ультроструктурное исследование в эти сроки показало, преобладание овальных микроорганизмов с клеточной стенкой, характерной для грамположительных кокков; толщина ее была в 2-3 раза больше по сравнению с вышеописанной, содержались элементы микрокапсулы. Деление отмечалось значительно реже, по типу перетяжки с неравномерным распределением материала, а также формирование в цитоплазме почкующихся элементов микроба. При дальнейшем культивировании мелкие, грамположительные кожнобактерии исчезали и 7-суточная культура в окрашенных препаратах была почти полностью представлена грамотрицательными палочками. Выявленные изменения ультроструктуры клеточной стенки *G. vaginalis* совпадали с результатами тинкториальных свойств культуры. На электронограммах культура на этом сроке была представлена бациллярными формами с тонкими клеточными стенками. Таким образом, можно предположить, что грамвариабельность *G. vaginalis* зависит от сроков культивирования и стадий развития микроорганизма. Учитывая полиморфизм и грамвариабельность *G. vaginalis* бактериоскопический метод можно отнести к ориентировочному тесту, не позволяющему однозначно идентифицировать этот микроб в мазке.

До настоящего времени принято считать основным диагностическим признаком БВ обнаружение "ключевых" клеток. Предполагается, что они образуются в результате активной адгезии *G. vaginalis* на поверхности влажной эпителии. Проведенные электронномикроскопические исследования продемонстрировали возможности фиксации на эпителии кроме *G. vaginalis* различных, других видов микробов (бактерондов, кокков, микоплазм и др.). Для уточнения видов микроорганизмов адгезированных на "ключевых" клетках, мы использовали в своих исследованиях иммуноморфологический метод. Применялась иммунная сыворотка к референс-штамму ATCC 14018, которая оттестирована по гомологичной и гетерологичным культурам в реакции бактериальной агглютинации (РА) и РИФ. Титр сыворотки по гомологичной культуре в РА составлял 1:3200. Эта же сыворотка не агглютинировала гетерологичные культуры, за исключением некоторых штаммов лактобацилл (табл. 1) Из приведенных в таблице данных следует, что максимальный титр РА, с гетерологичными культурами не превышал 1:80, таким образом, культуры, агглютинирующие с данной сывороткой в титре 1:160 и выше, могут быть идентифицированы как *G. vaginalis*.

Результаты РА культур с сывороткой к штамму ATCC 14018

Штаммы	Кол-во штаммов (в %)	Титр	Штаммы	Кол-во штаммов (в %)	Титр
<i>Gardnella vaginalis</i> ATCC 14018	100	1:3200	<i>L. casei</i> NCDO-152	100	0
<i>Gardnella vaginalis</i> *	35,71	1:160	<i>L. bulgaricus</i> NYZO-3501	100	0
<i>Gardnella vaginalis</i> **	21,43	1:50	<i>L. acidophilus</i>	100	0
П+(негемолит.)	42,86	1:50	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	100	0
<i>L. fermentum</i> B-7 59 TA-4	100	0	<i>Micrococcus</i> sp.	100	0
<i>L. fermentum</i> 90 TS-4 (21)	100	1:80	<i>Enterococcus</i> sp.	100	0
<i>L. fermentum</i> 90 TS-4 (10)	100	0	<i>Proteus vulgaris</i>	100	0
<i>L. plantarum</i> B6 77 TA-2	100	1:80	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	0
<i>L. plantarum</i> 8RA-3	100	0	П+ П-(полиморфн. гемолит.)	100	0
<i>L. plantarum</i> ATCC 1024	100	1:40	K+	100	0
<i>L. brevis</i> B-1309	100	1:40	K+ (гемолит.)	100	0

Примечание: (K+) неидентифицированные грамположительные кокки
 (П+) неидентифицированные грамположительные палочки
 (П-) неидентифицированные грамотрицательные палочки
*Gardnella vaginalis**- взаимодействует с сывороткой на референс-штамм
*Gardnella vaginalis*** - не взаимодействует с сывороткой на референс-штамм
 П+ (негемолит.) - неидентифицированные грамположительные палочки.

Штамм ATCC 14018 и указанные выше гетерологичные культуры, исследованы в РИФ. Свечение референс-штамма наблюдалось в предельном разведении иммунной сыворотки 1:320, а с гетерологичными агглютинирующимися культурами лактобацилл в разведении 1:10. За диагностический титр в РИФ было принято разведение 1:20.

По полисахаридному антигену Edmunds P.N. (1962) описал 7 серогрупп *G. vaginalis*. Необходим был критерий, по которому мы могли судить о видовой принадлежности, при этом исключить внутривидовые вариации микроба. Такими критериями могли оказаться генетические методы. В качестве последних, были использованы ПЦР и ДНК-гибридизация. Чувствительность метода ПЦР была дважды проверена в реакциях с серийными разведениями штамма *G. vaginalis* ATCC 14018 при восьмикратном тестировании и составляла $7,8 \times 10^3$ бактериальных кл/мл. Установлено, что все культуры, идентифицированные нами как *G. vaginalis*, в ПЦР давали положительный результат. Гетерологичные культуры, в том числе и идентифицируемые до вида изоляты от больных давали в этом тесте отрицательный результат. Проведенные исследования свидетельствовали о высокой специфичности и чувствительности используемой нами тест-системы «Тест-системы для выявления ДНК *G. vaginalis* методом полимеразной цепной реакции» ДиаГен – Gardnerella®. При этом исключались внутривидовые вариации *G. vaginalis*.

При анализе культур, выделенных из секрета влагалища, идентифицируемых как *G. vaginalis*, было выявлено, что некоторые из них в 10 % (РИФ) и в 21,43 % (РА) случаев не взаимодействовали с иммунной сывороткой. Это указывает на то, что ряд штаммов, циркулирующих у больных женщин, не соответствует серотипу референс-штамма. Используемая сыворотка обладала узкой специфичностью. Следовательно, иммуноморфологический метод имеет определенные ограничения, связанные с вариабельностью серотипов клинических штаммов *G. vaginalis*. Таким образом, иммунологические методы можно расценивать, как дополнительные к морфологическому, позволяющие уточнить вид и серотип возбудителя в вагинальном секрете.

Наиболее достоверным подтверждением этиологического диагноза при инфекционном процессе считается выделение возбудителя. Представлялось целесообразным уделить внимание выделению культуры *G. vaginalis* и ее идентификации по антигенной структуре, биохимическим признакам и строению ДНК.

Вышеизложенное позволяет прийти к заключению, что этиологическая диагностика БВ возможна на основании лишь комплекса методов выделения и идентификации *G. vaginalis*. С целью повышения информативности различных методов мы провели бактериологическое исследование 69 пациенток. Изучен качественный состав микробного ценоза влагалища (табл. 2).

Таблица 2

Частота обнаружения микроорганизмов в секрете влагалища женщин

Вид микроорганизма	Группы исследуемых женщин			
	БВ n=20	ДПП n=24	БК n=9	УЗ n=16
<i>Gardnerella vaginalis</i>	80%	20,83%	11,11%	18,75%
<i>Lactobacillus</i> sp.	35%	87,5%	66,67%	100%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	65%	54,17%	44,44%	43,75%
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	5%	8,33%	22,22%	6,25%
<i>Staphylococcus aureus</i>	5%	4,17%	-	-
<i>Streptococcus</i> sp.	20%	16,67%	22,22%	6,25%
<i>Candida</i> sp.	30%	8,33%	100%	6,25%
<i>Corynebacterium</i> sp.	10%	4,17%	-	-
<i>Escherichia coli</i>	15%	12,5%	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	5%	-	-	-
<i>Salmonella arizonae</i>	5%	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	11,11%	-
<i>Mobiluncus</i> sp.	20%	-	-	-
ПГ аэробные	10%	8,33%	-	-
K ⁺ анаэробные	25%	4,17%	-	6,25%
ПГ анаэробные	-	-	22,22%	-

Как видно из представленной таблицы, микрофлора влагалища в группе УЗ представлена меньшим числом видов микроорганизмов, чем в других исследуемых группах. *Lactobacillus* sp. были выявлены в 100 % случаях, а *G. vaginalis* 18,75 %. При ВК и у пациенток с ДГП отмечалось присутствие *G. vaginalis* в 11,11 % и 20,83 % соответственно. Наиболее разнообразен видовой состав микробного ценоза отмечался в группе БВ, где *G. vaginalis* является доминирующим видом и была выявлена в 80 % случаев. Частота выделяемых *Lactobacillus* sp. резко снижена.

Следует отметить, что БВ характеризуется снижением лейкоцитарной реакции. Нами обнаружено, что это справедливо лишь в том случае, если гарднереллез не сочетается с высоким титром *Candida* sp. В том случае, когда количество микроорганизмов *Candida* sp., в титре превышает 1×10^5 КОЕ/мл в секрете, увеличивается число лейкоцитов.

Представляла интерес топография микробных популяций в секрете вагины и взаимодействие различных видов микробов с эпителием. С этой целью были проведены морфологические исследования патологического материала путем электронной микроскопии. На ультратонких срезах отделяемого влагалища больных БВ наблюдались разнообразные микроорганизмы (стафилококки, гарднереллы, микрококки, микоплазмы, бактериоды) расположенные на или вблизи поверхности эпителиальных клеток. Изучение качественного состава микрофлоры влагалища свидетельствует о перераспределении микроорганизмов при БВ, ведущих к дисбалансу вагинальной микрофлоры. Таким образом, в результате сравнительного анализа микроскопического и бактериологического методов исследования материала от пациенток страдающих БВ, установлен качественный состав наиболее часто встречающихся во влагалище микробов, особенности их структурной организации и взаимоотношения с клетками макроорганизма.

Под нашим наблюдением было 69 женщин обратившихся за гинекологической помощью, у 20 из них диагноз БВ подтвержден по критериям Amsel R. et al. (1983). В данном исследовании влагалищные мазки окрашивали по Граму и обрабатывали сывороткой, полученной к референс-штамму *G. vaginalis* ATCC 14018 в нашей модификации (табл. 3).

В мазке из влагалищного содержимого наблюдалась специфическая флюоресценция микробов желто-зеленого цвета. Выявляемые объекты представляли собой коккобактерии овальной формы с периферическим свечением.

Результаты РИФ и бактериоскопического методов при БВ совпадали в $65 \pm 10,9$ %. В группе УЗ, четырехкестовое свечение было отмечено только в 12,5 % случаев. При изучении культур с низкой степенью флюоресценции, выделенных на селективной среде оказалось, что по морфологическим свойствам микробы были сходны с *Lactobacillus*. Некоторые из них в РИФ давали слабое свечение с сывороткой, разведенной 1:10. Мы считаем,

что низкая степень флюоресценции культур *G.vaginalis* в данном случае может быть связана с тем, что выделенные штаммы отличаются от референс-штамма по антигенным свойствам.

Таблица 3

Частота выявления *G. vaginalis* бактериоскопическим и иммуноморфологическим методами

Группы	Окраска по Граму	РИФ		
	“ключевые” клетки	“ключевые” клетки	Внеклеточная локализация	Отсутствие специфического свечения или степень интенсивности 2+ и ниже
БВ n=20	100 %	65±10,9 %	5,0±5,0 %	30,0±10,5 %
ВК n=9	0	0	33,33±16,7 %	66,67±16,7 %
ДГП n=23	0	0	47,83±10,6 %	52,17±10,6 %
УЗ n=16	0	0	12,5±8,5 %	87,5±8,5 %

Как уже было отмечено в группе БВ “ключевые” клетки с использованием специфической сыворотки идентифицированы нами в 65±10,9 %, в остальных случаях микроорганизмы, адгезированные на “ключевых” клетках не взаимодействовали с иммунной сывороткой к референс-штамму или отмечалась слабая их флюоресценция, по всей вероятности, обусловленная принадлежностью данных микроорганизмов к другим серотипам.

Таким образом, использование непрямого метода иммунофлюоресценции показало, что *G. vaginalis* с высокой частотой выявляется во всех исследуемых нами группах, однако при БВ этот микроб присутствует в большом количестве и адгезируется на “ключевых” клетках. Приведенные данные электронной микроскопии показали, что к эпителиальным клеткам адгезированы разнообразные виды микробов. Световая микроскопия не позволяет морфологически идентифицировать микроорганизмы, адгезированные на “ключевых” клетках, в то время как иммунофлюоресцентный метод при положительном его результате позволяет не только идентифицировать *G. vaginalis*, но и определить ее локализацию во влагалищном секрете.

Оценивая диагностическую значимость иммуноморфологического, генетического и бактериологического методов мы провели сравнение частоты выявления *G. vaginalis* в различных клинических группах. Учитывая, что БВ рассматривается, как дисбиоз, мы считали целесообразным включить в такой анализ и количественную характеристику популяции *G. vaginalis*. Результаты этого исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты детекции *G. vaginalis* в различных клинических группах в зависимости от плотности популяции возбудителя

Группы обследованных пациенток	Частота обнаружения <i>G. vaginalis</i> различными методами				
	Выделение <i>G.vaginalis</i> (%)	КОЕ/мл 1×10^8	РИФ (%)	ПЦР (%)	ДНК-гибридизации (%)
А. Бактериальный вагиноз n=20	80 ± 9,2	6,259 ± 1,8	70 ± 10,5	100	92,3 ± 7,8
Б. Вагинальный кандидоз n=9	11,1 ± 11,1	0,022 ± 0,02	33,33 ± 16,7	55,6 ± 17,6	0
В. Больные с другой гинекологической патологией n=24	22,7 ± 8,9	1,00 ± 0,63	47,83 ± 10,6	58,3 ± 10,3	16,7 ± 11,2
Г. Условно здоровые n=16	18,8 ± 10,1	0,7 ± 0,60	12,5 ± 8,5	46,7 ± 13,3	0

При БВ культура *G. vaginalis* была выделена в 80±9,2 % случаев. В других группах этот показатель был значительно ниже, различия в частоте высева *G. vaginalis* у лиц в группах Б, В, Г были статистически не значимы.

Генетическими методами в группе БВ *G. vaginalis* определялась в 100 % методом ПЦР и в 92,3±7,8 % методом ДНК – гибридизации. В группах ВК, ДГП, УЗ показатель частоты позитивной ПЦР находится в пределах от 46,7±13,3 % до 58,3±10,3 %. Таким образом, ДНК *G. vaginalis* присутствует во влагалищном отделяемом женщин этих групп и выявляется с одинаково высокой частотой. При ДНК – гибридизации *G. vaginalis* была выявлена только у пациенток в группах БВ и ДГП с частотой 92,3±7,8 % и 16,7±11,2 % и отсутствовала в группах ВК и УЗ. Полученные данные могут интерпретироваться в зависимости от степени обсемененности влагалищного секрета.

По нашим данным в группе ВК обсемененность *G. vaginalis* влагалищного секрета ниже, чем в группе УЗ и составляет $2,2 \times 10^6 \pm 0,02$ КОЕ/мл; $7 \times 10^7 \pm 0,60$ КОЕ/мл соответственно. В то же время, частота выявления *G. vaginalis* методом ПЦР одинакова как у женщин с ВК, так и у здоровых. Поскольку данный генетический метод способен улавливать ДНК *G. vaginalis* как жизнеспособных, так и погибших бактерий, то разница в результатах бактериологического и генетического методов, очевидно, связана с тем, что с увеличением численности *Candida* sp., гарднереллы гибнут, а ДНК их некоторое время сохраняется. Cano R.J. с соавт. (1983) в своих исследованиях также констатировали снижение количества *G. vaginalis* у больных с кандидозным вагинитом до $1,9 \times 10^5$ флуоресцирующих клеток/см²,

в сравнении с УЗ, где обсемененность материала *G. vaginalis* составляла $3,1 \times 10^5$ флюоресцирующих клеток/см².

Высеваемость *G. vaginalis* и частота определения ее ДНК методом ПЦР в группах ВК, ДГП, УЗ существенно не отличаются, но все эти показатели резко возрастают при БВ, что свидетельствует об увеличении плотности популяции *G. vaginalis*. Заслуживает внимания тот факт, что *G. vaginalis* выявляется во всех группах пациенток, у которых БВ не диагностируется, из этого следует, что данный микроорганизм широко распространен и включается в нормальный микробный ценоз. Это доказывается тем, что в группе УЗ *G. vaginalis* определяется бактериологически в $18,8 \pm 10,1$ % случаев, а методом ПЦР еще более часто $46,7 \pm 13,3$ % случаев. Как было отмечено ранее, *G. vaginalis* присутствует во влагалищном секрете женщин разных групп, не вызывая при этом БВ, однако ДНК *G. vaginalis* методом ПЦР была обнаружена в 100 % при БВ, следовательно, данный микроорганизм является неотъемлемым фактором в этиологии заболевания БВ.

Количество микробных клеток *G. vaginalis* во влагалищном отделяемом по нашим данным составляет $6,259 \times 10^8 \pm 1,8$ КОЕ/мл при БВ, а в группе УЗ $0,7 \times 10^8 \pm 0,60$ КОЕ/мл. Это согласуется с данными литературы, где *G. vaginalis* была выделена у больных с БВ от 95 до 100 % и 40-50 % у здоровых женщин с концентрацией *G. vaginalis* в 3-4 раза ниже по сравнению с больными, кроме того, *G. vaginalis* была выделена и у женщин с цервицитом (Totten P.A. et al. 1982). По данным Mors S.A. (1990) обсемененность влагалищного секрета здоровых женщин этим микробом 10^1 КОЕ/мл секрета, а по данным Ovetmann В.А. (1998) и Муравьевой В.В. (1997), этот показатель не превышает 10^5 КОЕ/мл. В случае же БВ он возрастает от 10^6 КОЕ/мл Mors S.A. (1990), до 10^9 КОЕ/мл Муравьева В.В. (1997), Коршунов М.В. (1999). Традиционно диагностическую ценность методов оценивают при инфекционном процессе по их чувствительности, то есть частоте выявления возбудителя в том случае, когда диагноз подтвержден. Другим показателем диагностической значимости метода является его специфичность, то есть частота отрицательных результатов в случае, если обследуемые лица здоровы или у них диагностировано другое заболевание. Эти характеристики позволяют правильно идентифицировать лиц с заболеванием или без него и должны быть применимы к любому диагностическому тесту. Исходя из этого, нами были проанализированы результаты исследования различных клинических групп, и дана оценка диагностической информативности пяти методов. Результаты оценки методов диагностики БВ по их чувствительности и специфичности представлены в таблице 5.

Из таблицы следует, что наиболее чувствительным и специфичным методом диагностики БВ достигающим 100 %, в нашем исследовании является микроскопия влагалищных

мазков, окрашенных по Граму. Это объясняется тем, что выявление “ключевых” клеток было выбрано как абсолютный критерий диагноза при формировании групп сравнения.

Таблица 5

Чувствительность и специфичность методов диагностики БВ

Методы диагностики БВ	Чувствительность	Специфичность
“ключевые” клетки, окрашенные по Граму	100 %	100 %
бактериологический метод	80 %	81,6 %
РИФ “ключевые” клетки	65 %	100 %
ПЦР	100 %	45,8 %
ДНК-гибридизация	92,3 %	92,3 %

По показателям чувствительности и специфичности (92,3 %) приближался к абсолютному критерию метод ДНК-гибридизации.

Меньшая чувствительность и специфичность отмечена для бактериологического метода 80 % и 81,6 % соответственно.

Высокая специфичность 100 % но низкая чувствительность 65 % наблюдалась в РИФ, при жестком учете степени интенсивности флюоресценции (3+; 4+).

Высокая чувствительность 100 % и минимальная специфичность 45,8 % отличает генетический метод ПЦР от всех остальных диагностических тестов. Низкая специфичность теста объясняется тем, что *G. vaginalis* была детектирована не только от больных с установленным диагнозом БВ, но и от больных с другой урогенитальной патологией и условно здоровых женщин. Следует отметить, что в ПЦР определяют не живого микроорганизма, а только его ДНК, именно этим объясняется несоответствие данных бактериологического и генетического методов. Можно заключить, что прямая детекция ДНК методом ПЦР не является диагностической. К такому же выводу приходят и эксперты ВОЗ.

В наших исследованиях показано, что в большей степени диагностическую ценность имеет ДНК-гибридизация. Этот метод менее чувствителен, чем ПЦР и дает положительный результат только при высоком уровне обсемененности материала свыше 2×10^5 КОЕ/мл, что имеет место при выраженном, дисбиотическом сдвиге. Но и в этом случае утверждать, что происходит увеличение жизнеспособных гарднерелл в микробном ценозе нет достаточных оснований. Поэтому мы считаем, что этот метод также нельзя признать как диагностический.

Анализ полученных данных показал, что лабораторная диагностика БВ может быть основана на морфологическом изучении влагалищного секрета, при этом исследование морфотипов и выявление “ключевых” клеток является скрининговым. Верифицирующим методом следует признать иммуноморфологический, однако он недостаточно совершенен и

имеет ряд ограничений, поскольку антигенная структура *G. vaginalis* до настоящего времени остается плохо изученной.

Несмотря на то, что бактериологический метод является наиболее трудоемким, он в большей степени, чем другие методы может быть признан диагностическим. Именно бактериологическое исследование дает наиболее полное представление о состоянии микробного ценоза влагалища и определяет патологическое ядро БВ.

На основании наших исследований можно предположить, что перспективным направлением в диагностике гарднереллезной инфекции, являются серологические методы. Предпосылкой этому может служить установленный факт, что видоспецифические антигены *G. vaginalis* относятся к полисахаридам и локализованы в клеточной стенке. Эти антигены были получены нами путем солянокислой экстракции и иммобилизованы на эритроцитах. Это дает возможность создать антигенные диагностикумы, что в свою очередь является методологическим подходом к изучению иммунного ответа на *G. vaginalis*.

Таким образом, наши исследования показали целесообразность комплексного применения современных методов лабораторной диагностики и критического анализа полученных результатов, так например РИФ позволяет не только выявить возбудителя, установить доминирующий вид микроорганизмов, но и охарактеризовать его численность и локализацию. В зависимости от применяемой в этом методе сыворотки возможна идентификация *G. vaginalis* до вида и серотипа. Это открывает возможности более детального изучения эпидемиологии гарднереллеза.

Генетические методы детекции ДНК *G. vaginalis*, являются высокоспецифичными, что было продемонстрировано нами при изучении штаммов, полученных из влагалищного отделяемого. В диагностическом отношении генетические методы оказались непригодными, так как из-за их высокой чувствительности *G. vaginalis* может быть определена в вагинальном секрете, при низкой плотности популяции, характерной здоровых женщин. Тем не менее, эти методы оказались ключевыми при видовой идентификации выделяемой культуры. Результаты проведенных исследований позволили расширить наши представления о роли *G. vaginalis* в патогенезе БВ и показали необходимость применения комплексного подхода к этиологической диагностике этого заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Комплексное морфолого-культуральное, светооптическое и электронно-микроскопическое исследование референс-штамма *G. vaginalis* ATCC 14018 позволило выявить выраженный полиморфизм, грамвариабельность, наличие элементов микрокапсулы. Изменение морфологических свойств зависит от условий культивирования, среды накопления и стадии развития микроорганизма.

2. Рекомендована оптимальная среда для выделения культуры *G.vaginalis* из патологического материала, состоящая из КА с добавлением 5-10 % крови человека и гентамицина, амфотерицина-В, налидиксовой кислоты (в концентрациях 4,0 мг/л; 2,0 мг/л; 30,0 мг/л соответственно), а культивирование должно проводиться в анаэробных условиях (в анаэростатах с газогенерирующими пакетами GasPak Plus Anaerobic System Envelopes with Palladium Catalyst H₂CO₂ или GasPak CO₂ фирмы Becton Dickinson).
3. Иммуноморфологический метод следует признать верифицирующим, так как позволяет определить вид микроорганизма, доминирующего в микробиоценозе влагалища и выполнить экспресс-анализ на наличие *G. vaginalis*.
4. Авторская иммунная сыворотка к референс-штамму, использованная для модификации метода РИФ, позволила выявить на территории России циркуляцию разных серотипов штаммов *G.vaginalis*, подобных и отличающихся по антигенным свойствам.
5. Государственные испытания тест системы: «Тест-системы для выявления ДНК *G. vaginalis* методом полимеразной цепной реакции» ДиаГен-Gardnerella®, разработанной ЗАО Лаборатория гено-инженерных систем «ЛАГИС», показали высокую чувствительность ($7,8 \times 10^3$ кл/мл), специфичность (100 %) при идентификации культуры *G. vaginalis*.
6. Прямая детекция ДНК по ПЦР не может быть использована как диагностический критерий бактериального вагиноза (чувствительность 100 %, специфичность 45,8 %), ибо критериями постановки диагноза бактериального вагиноза следует считать высокую степень обсемененности патологического материала (более 10^7 КОЕ/мл). Необходимо учитывать, что у условно здоровых женщин жизнеспособные гарднереллы обнаруживаются в концентрации менее 10^7 КОЕ/мл.
7. При постановке этиологического диагноза бактериального вагиноза рекомендовано комплексное клинико-микробиологическое исследование с использованием современных методов лабораторной диагностики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В диагностике БВ рекомендуется применение бактериологического метода.

Иммуноморфологический метод является необходимым как дополнительный при уточнении этиологического диагноза.

ПЦР и ДНК-гибридизация не рекомендуется использовать как диагностические методы при диагностике БВ.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ

1. Структурная организация *Gardnerella vaginalis* (штамм ATCC 14018) // Научно-практическая конференция «Современные аспекты клиннки, диагностики и лечения инфекций, передаваемых половым путем, наиболее распространенных дерматозов и микозов.

- Эпидемиологические подходы к анализу заболеваемости и деятельности ЛПУ”: Тез.докл. –М. -1999. –С. 36-38 (соавт. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., Бармина Г.В., Вахнина Т.Е., Коликова Т.Г., Далин М.В.).
2. Условия культивирования и морфологические особенности *Gardnerella vaginalis* // “Актуальные вопросы инфекций, передаваемых половым путем, у детей, подростков и беременных”: Тез. докл. научн. конф. дерматовенерологов, акушеров-гинекологов и педиатров. – Екатеринбург -1999. – С. 53-55 (соавт. Дмитриев Г.А., Далин М.В., Коликова Т.Г., Вахнина Т.Е., Брагина Е.Е., Бармина Г.В., Николайчук Н.В., Газарян И.Ю.).
3. Оптимизация детекции *Gardnerella vaginalis*// “Актуальные вопросы инфекций, передаваемых половым путем, у детей, подростков и беременных”: Тез. докл. научн. конф. дерматовенерологов, акушеров-гинекологов и педиатров. –Екатеринбург -1999. – С. 55-56 (соавт. Дмитриев Г.А., Кравцов Э.Г., Вахнина Т.Е., Коликова Т.Г., Васильева Е.А., Бакалова Л.А.).
4. Предварительные испытания ПЦР - тест - системы для полуколичественного определения ДНК *Gardnerella vaginalis* в клиническом материале// “Генодиагностика в современной медицине”: Сб. тез. докл. III - й Всеросс. научно-практической конференции. –М. -2000. –С. 30-32 (соавт. Кириллов М.Ю., Спирина Г.В., Пикина А.П., Ефимов Б.А., Смеянов В.В., Коршунов В.М., Кравцов Э.Г.)
5. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бактериального вагиноза// “Актуальные проблемы дерматологии и венерологии ”: Сб. науч. тр. –М. -2000. – С. 69-72 (соавт. Бочарова Е.Н., Вахнина Т.Е., Коликова Т.Г., Латыпова М.Ф., Дмитриев Г.А.)
6. Проблемы лабораторной диагностики бактериального вагиноза. Структурная организация *Gardnerella vaginalis*// Вестн. дерматологии и венерологии. –1999. –№ 6. –С. 4-8. (соавт. Дмитриев Г.А., Брагина Е.Е., Бармина Г.В., Вахнина Т.Е., Коликова Т.Г., Халатов А.О.)
7. Опыт использования современных методов диагностики гарднереллеза// Бюл. эксперим. биологии и медицины. –2000. –Т. 130. –№ 8. –С. 196-199. (соавт. Кравцов Э.Г., Васильева Е.А., Дмитриев Г.А., Медведева Е.А., Кириллов М.Ю., Спирина Г.В.)
8. Оценка современных методов диагностики гарднереллезной инфекции// Международный хирургический конгресс: РАНЫ ОЖОГИ ПОВЯЗКИ. –2000. –С. 34. (соавт. Кравцов Э.Г., Васильева Е.А., Медведева Е.А., Спирина Г.В., Кириллов М.Ю.)

Макарова Людмила Николаевна (Россия)

“Микробиологическая диагностика гарднереллеза”

Комплексное светооптическое и электронномикроскопическое исследование референс-штамма *Gardnerella vaginalis* (G. vaginalis) ATCC 14018, показало полиморфизм и грамвариабельность культуры, зависящую от среды и стадии развития этого микроорганизма. Рекомендованы оптимальные условия культивирования G. vaginalis. Сравнительная оценка диагностической значимости методов, применяемых для диагностики бактериального вагиноза (БВ), выявила ограничения морфологических критериев, при этом реакция иммунофлюоресценции была наиболее информативна. Бактериологическое исследование позволяет выделить патологическое ядро БВ. Генетические методы ПЦР и ДНК-гибридизация не могут быть рекомендованы для диагностики БВ, но они высокоинформативны при видовой идентификации культуры.

Ludmila N. Makarova (Russia)

“Microbiologic diagnostics of Gardnerellosis”

The combined light microscopy and electronmicroscopy analysis of *Gardnerella vaginalis* (G. vaginalis) ATCC 14018 demonstrated the polymorphism and gram-stain variability of the culture. These properties depended on the medium and growth stage of the microorganism. The optimal growth conditions of G. vaginalis have been recommended. Comparative evaluation of significance of diagnostic methods used for bacterial vaginosis (BV) revealed the restricted abilities of morphological criteria. Direct immunofluorescence test appeared to be the most informative. Bacteriological analysis enables to isolate pathological nucleus in BV. The genetic methods such as PCR and DNA-hybridization can not be recommended for BV diagnosis, however they are highly effective in species identification.

Макара

12.10.2000 Общед. ин.с. Тир. 100. Зак. 653
г. Москва, ул. Бродяжниковская, 3. Тел. 4176 9404