

Назирова М.Б. УДК: 618.15-022-616.34-097-036.22-616.9

**СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БИОЛОГИИ ГЕНИТАЛЬНЫХ
ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ЖЕНЩИН ФЕРТИЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

Ташкентская медицинская академия

Проблема инфекционных заболеваний и дисбиоза влагалища приобретает в наши дни всё большую значимость, что связано с действием различных неблагоприятных факторов, влияющих как на иммунный статус в целом, так и на микробиоценозы человеческого организма [5,7,3].

Установлено, что патологические сдвиги в вагинальном микробиоценозе происходят при лечении антибиотиками, гормонами, цитостатиками, рентгенотерапии и возникают на фоне эндокринопатий, анемии, при врождённых пороках развития половых органов, использовании контрацептивов [1].

Микробы - симбионты в организме человека представлены сотнями видов с общим количеством 10^{12} - 10^{14} клеток и формируют относительно стабильную структуру микробного пейзажа. Нормальная микрофлора, как совокупность микробиоценозов разных областей организма, играет важную роль и включает представителей облигатной (индигенной), факультативной и транзиторной флоры. Индигенная микрофлора принимает участие в регулировании оптимального уровня метаболических процессов организма хозяина, создании высокой колонизационной резистентности к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам [2,4,9].

У здоровых женщин фертильного возраста доминирующими бактериями влагалищной среды

являются *Lactobacillus* spp (95-98%). Меньшую долю составляют бифидобактерии [4,8,10]. Среди транзиторных микроорганизмов влагалища чаще других удаётся выделить коагулазоотрицательные стафилококки, в первую очередь *St. epidermidis*, кроме того, *Corynebacterium* spp., *Bacteroides* - *Prevotella* spp. и *Mycoplasma hominis*, которые обычно присутствуют в умеренном количестве. Столь же часто, но в меньшем количестве встречаются *Micrococcus* spp., *Propionibacterium* spp. Сравнительно редко обнаруживают *Clostridium* spp., *Actinomyces* spp, *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp и др. [6].

Видовое разнообразие вагинальной микрофлоры велико, и возможные сочетания микроорганизмов очень многочисленны, поэтому, в целях изучения чистоты влагалища необходима разработка методик микробиологических и иммунологических исследований.

Для проведения микробиологических исследований по определению количественного и качественного состава выделений из влагалища и цервикального канала. Забор материала проводится стерильной ложкой Фолькмана, из полученного материала готовится ряд серийных разведений. В последствие из соответствующих разведений производится посев на высокоселективные дифференциально-диагностические питательные среды (табл. 1).

Таблица 1

Микробиологические методы исследования			
№	Питательные среды	Выделено	
		Условия культивирования	
1	Агар для бифидобактерий «Блаурок-ко»	Анаэроб	Бифидобактерии
2	МРС-4	Анаэроб	Лактобактерии
3	Кровяной агар	Аэроб	Общее количество аэробов, стрептококки
4	Желточно-солевой агар, агар для стафилококков	Аэроб	Стафилококки
5	Среда Эндо	Аэроб	Энтеробактерии, эшерихии
6	Среда Сабуро	Аэроб	Грибы
7	Эскулиновый агар	Аэроб	Стрептококки гр D
8	Агар для вагиналис	Аэроб	Гарднерелла

Учёт результатов посева проводится путём подсчёта количества выросших колоний каждого вида. Идентификацию выделенных микроорганизмов до рода и вида проводят на основании морфологических, тинкториальных, культуральных и биологических свойств, в соответствии с определителем микроорганизмов Берги (15)97). Количество бактерий каждого вида выражают в $\lg M \pm m$ КОЕ/мл.

Способность микроорганизмов прикрепляться к

эпителиальным клеткам генитального тракта, то есть: адгезивный процесс чаще всего изучают по методу ВфЕ.Брилиса (1984). Где объектом адгезии служат эритроциты крови человека 1-ой группы. В качестве тест-микробов используют штаммы *St. aureus*, *St. haemolyticus*, *E.coli*, *C.albicans* и др. Готовится исходная взвесь тест-культур в концентрации 10^9 , а взвесь эритроцитов в концентрации 10^5 . В пробирки объединяют по 0,5 мл взвесей и инкубируют в течение 30 минут на

встряхивателе при температуре 37°C. После чего готовят мазок и смотрят под световым микроскопом, определяют признак адгезивности микроорганизмов. Существенные различия считаются при > 20% адгезированных микробов.

Активность лизоцима в вагинальном отделяемом в настоящее время определяется при помощи способа, предложенного Алиевым Ш.Р. (1994), который включал использование стерильных бумажных дисков. Эти диски (схожие с антибиотиковыми дисками) берут пинцетом и тщательно пропитывают в выделениях из влагалища. Затем их укладывают на поверхность питательного агара (агар Диф- ко) в чашках Петри, засеянных газоном суточной культурой *M. luteus* (штамм 003596M26, национальная коллекция микроорганизмов инфекций человека НИИЭМИЗ МЗ РУз), посеы инкубируются в термостате при температуре 37°C, активность лизоцима определяется по методу диффузии в агаре.

Антагонистическую активность лактобацилл в отношении условно патогенных бактерий чаще изучают по методу отсроченного антагонизма (А.Ю. Лихачёва, 1992). С этой целью 2-х суточную культуру лактобацилл, выращенную на среде МРС-4 засевают совместно с 0,1 мл односуточной тест - культурой. Об антагонистической активности судят по зоне отсутствия роста тест штаммов, выдержанных 24 часа при температуре 37°C.

Антагонистическая активность лактобактерий в отношении ряда патогенных и условно патогенных микроорганизмов связана с их высоким биологическим потенциалом; лиганд- рецепторным взаимодействием с эпителиальными клетками; конкуренцией за источник питания, путём изменения рН, а также секрецией лизоцима, перекиси водорода и бактериоцинов.

Фагоцитарная активность определяется по методу Темурбаева (1984), в модификации А.В. Антонова (1996). Для этого отобранный материал очищают, промывают забуферным раствором и центрифугируют при 1000 об/мин, надосадочную жидкость сливают, а к осадку добавляют 0,5 мл физиологического раствора. К 0,2 мл полученной смеси, в пробирке прибавляют 0,1 мл взвеси частиц латекса диаметром 0,8 мкм. Смесь инкубируется во влажной камере 30 мин при 37°C постоянно встряхивается. В последующем из этой смеси готовятся мазки по типу мазка крови, окрашиваются по Романовскому-Гимзе. Подсчитываются под микроскопом не менее 100 нейтрофилов с Латексом и без него в каждом препарате и определяется показатель уровня фагоцитоза.

Определение секреторного иммуноглобулина класса А (sIgA) основан на методе Map- chini (1984), который заключается в измерении диаметра кольца преципитации, образующего при внесении исследуемой сыворотки в лунки, вырезанные в слое агара, в котором предварительно диспергированная моноспецифическая антисыворотка. В стандартных условиях опыта диаметр кольца преципитации прямо пропорционален концентрации иммуноглобулина. Содержание иммуноглобулина определяли

относительно стандартной сыворотке человека с известной концентрацией иммуноглобулинов.

Для оценки состояния микрофлоры влагалища чаще всего используют Amsel test, именуемый в литературе «золотым диагностическим стандартом», предложенный Amsel. В. В 1983 г., и включает в себя следующие простые, диагностические тесты:

1. Характер выделений.
2. Наличие «ключевых клеток» в мазках, окрашенных по Грамму.
3. Положительный аминный тест с 10% КОН.
4. Определение рН отделяемого.

Эти тесты могут быть выполнены в кабинете лечащего врача.

1. Выделения у женщин с бактериальным вагинозом (БВ) пенистые, обильные, с неприятным запахом, тягучие, равномерно распределяются по стенкам влагалища. Количество выделений примерно составляет 20 мл в сутки, тогда как в норме не более 2 мл.
2. Значение рН вагинального выделяемого при БВ превышает нормативные показатели (> 4,5), что определяется элиминацией лактофлоры или резким снижением её содержания. Чувствительность и специфичность теста относительно высока (89 и 95% соответственно).

3. Появление неприятного запаха обусловлено выработкой диаминов (путресцин, кадаверин, триметиламин) в процессе реакции декарбоксилирования аминокислот облигатными анаэробами. Соли этих соединений превращаются в летучие амины при Щелочном значении рН. Чувствительность и специфичность этого диагностического теста 79 и 97% соответственно. Для постановки аминного теста в равных количествах смешивают выделения из влагилица и 10% раствор гидроокиси калия.
4. Наиболее информативным лабораторным методом диагностики БВ является обнаружение в мазках, окрашенных по Грамму, ключевых клеток с адгезированными на „ них микроорганизмами, ассоциированными с БВ. Чувствительность и специфичность данного метода близка к 100%. По-видимому, между организмом и индигенной микрофлорой влагилица, ведущими представителями которой являются бактерии рода *Lactobacillus*, складывается сложная система взаимоотношений. В связи с этим изучение механизмов их действия требует более глубокого подхода. Вышеперечисленные микробиологические и иммунологические методы на данный момент являются наиболее современными, практичными, специфичными и высоко чувствительными, а полученные результаты могут быть использованы в клинической практике микробиологов.

Литература

1. Анкирская А.С. Инфекция и антимикробная терапия - 1999. - № 3. - с. 89-91.
2. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дизбиозы и препараты с пробиотической функцией. Журнал микробиол. 2004, 1:84-92.
3. Бондаренко В.М., Рубакова Э.И., Лаврова В.А. Иммуностимулирующее действие лактобактерий, используемых в качестве препаратов пробиотиков. Журнал микробиол. 1998,5: 107 -1 12.
4. Бр'илис В.И., Брилене Т.А., Ланцнер Х.П., Ланцнер А.А. - Открытия, 1984, №8
5. Забилова Т.М. Биологические свойства лактобацилл биотопов человека в норме и при дисбиозах. Дисс. канд.мез.наук. Оренбург, 2001.
6. Ланцнер А.А., Ланцнер Х.П., Тоом М.А. Особенности лактобацилл микрофлоры человека продуцировать лизоцим. «Журнал микробиологии». 1987, 8: 77-81.
7. Лихачёва А.Ю., Поспелова В.В. Биологическая характеристика некоторых лактобацилл. Медицинские аспекты микробной экологии. М., 1992.
8. Муравьёва В.В. Лабораторная диагностика урогенитальных инфекций. «Акушер, и гинек»., 1987, №2 стр.61. Определитель бактерий Берги. Дж. Хоулт и др. изд № 9. М., 1997.
9. Сгибнёв А.В. Регуляция активности бактериальной каталазы в межмикробных взаимодействиях. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Оренбург, 2002.