ATLAS MIKROSKOPOWY „ ”

PRAKTYCZNY PRZEWODNIK **ISSVD**

Styczeń 2026

ISBN: 978-989-36709-1-0

Egzemplarz obowiązkowy: 559204/26

DOI: https://doi.org/10.59153/adm.ma.001

Własność
ISSVD
www.issvd.org

Wydanie i paginacja Ad
Médic, Lda.
www.admedic.pt

INDEX

Mikroskopia z kontrastem fazowym wydzieliny z szyjki macicy i pochwy 09

ROZDZIAŁ 01 **Wprowadzenie** 11

ROZDZIAŁ 02 **Mikroskopia z kontrastem fazowym** 15

2.1 Zalety i wady 15

2.2 Fizyka, regulacja i konfiguracja mikroskopu z kontrastem fazowym 15

2.2.1 Zasada oświetlenia Köhlera 16

2.2.2 Czyszczenie mikroskopu 17

ROZDZIAŁ 03 **Przygotowanie preparatu z wymazu z pochwy** 19

3.1 Komórki w preparacie mokrym z wydzieliny z szyjki macicy i pochwy 19

3.1.1 Komórki nabłonka pochwy 19

3.1.2 Komórki nabłonka endometrium 20

3.1.3 Komórki niebędące komórkami nabłonkowymi 20

ROZDZIAŁ 04 **Kryteria diagnostyczne** 21

4.1 Jak zdiagnozować bakteryjne zapalenie pochwy? 21

4.2 Jak rozpoznać tlenowe zapalenie pochwy/łuszczące się zapalenie pochwy? 21

4.3 Obiecujące narzędzia diagnostyczne przyszłości 21

ROZDZIAŁ 05 **Przykłady kliniczne i mikroskopowe** 25

5.1 Wyniki prawidłowe 25

5.2 Cytolityczne zapalenie pochwy 30

5.3 Atrofia 31

5.4 Bakteryjne zapalenie pochwy/dysbioza 32

5.5 Kandydozowe zapalenie pochwy 35

5.6 Rzęsistkowica 41

5.7 Aerobowe zapalenie pochwy (AV)/łuszczące się zapalenie pochwy (DIV) 42

5.8 Różne 44

Bibliografia 49

MIKROSKOPIA KONTRASTOWA FAZOWA WYCIECZEK Z SZYJKI MACICY I POCHWY

Werner Mendling
Niemieckie Centrum Chorób Zakaźnych w Ginekologii i Położnictwie, Wuppertal, Niemcy

Caroline Oliveira
Federalny Uniwersytet Fluminense, Rio de Janeiro, Brazylia

Svitrigailé Grinceviciene
Instytut Biotechnologii, Katedra Biotermo-dynamiki i Projektowania Leków, Centrum Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wileński, Wilno, Litwa

Francesco de Seta
Katedra Położnictwa i Ginekologii, Instytut Naukowy IRCCS San Raffaele, Uniwersytet Vita e Salute, 20132 Mediolan, Włochy

Colleen K. Stockdale
University of Iowa Healthcare, Iowa City, Iowa, USA

Hans Verstraelen
Uniwersytet w Gandawie i Szpital Uniwersytecki w Gandawie, Gandawa, Belgia

Pedro Vieira-Baptista
Szpital Lusíadas Porto, Porto, Portugalia
Katedra Ginekologii, Położnictwa i Pediatrii, Wydział Medyczny Uniwersytetu w Porto, Porto, Portugalia
Uniwersytet w Gandawie, Gandawa, Belgia

1

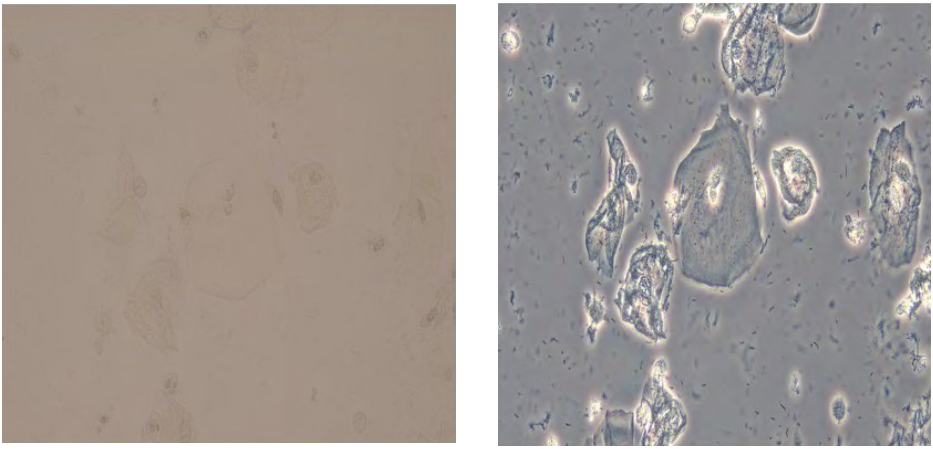
WPROWADZENIE

Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723), handlarz tkaninami, opracował i udoskonalił pierwszy prosty mikroskop o powiększeniu do 200x w Delft (Holandia). August Köhler (1866–1948) zrewolucjonizował oświetlenie mikroskopów w 1893 roku, jako pracownik firmy Carl Zeiss AG w Jenie (Niemcy), skupiając światło na przedniej aperturze kondensora, co pozwoliło na ogniskowanie go na preparacie. Technika ta jest stosowana do dziś. Frits Zernike (1888–1966) opracował technikę kontrastu fazowego w 1930 r. (Groningen, Holandia) i otrzymał za ten wynalazek Nagrodę Nobla w 1953 r.[1] Zauważył on, że wzór dyfrakcyjny w tylnej płaszczyźnie ogniskowej obiektywu wykazuje charakterystyczne różnice w przypadku obiektów niepochłaniających światła, co wpływa na fazę światła przechodzącego w porównaniu z obiektami pochłaniającymi światło. Światło staje się widoczne poprzez przesunięcie i osłabienie fazy niezałamanej „bezpośredniej" światła w przeciwieństwie do światła załamanej za pomocą „płytki fazowej".[2, 3] Praktyczne wdrożenie mikroskopii z kontrastem fazowym miało miejsce w 1941 roku w firmie Carl Zeiss w Jenie. Technika ta jest obecnie stosowana również, na przykład, w mikroskopii fluorescencyjnej i konfokalnej do kontrastowania optycznego. Kontrast interferencyjny różnicowy (DIC) lub metoda kontrastu Nomarskiego (wprowadzona przez wynalazcę Georgesa Nomarskiego z Paryża)[14] jest rzadko stosowana w praktyce.

W praktyce ginekologicznej stosuje się różne techniki mikroskopowe, w tym: mikroskopię w jasnym i ciemnym polu oraz kontrast fazowy. Rozmazy cytologiczne Papanicolaou, a także preparaty mikrobiologiczne barwione metodą Grama ocenia się przy użyciu konwencjonalnej mikroskopii w jasnym polu, przy czym ta ostatnia wymaga powiększenia x1000 i immersji olejowej.

W celu lepszej widoczności bakterii i komórek drożdżaków na tle o słabym kontraście próbki wydzieliny pochwowej są czasami badane przy użyciu barwienia 0,5% roztworem błękitu metylenowego. Należy pamiętać, że błękit metylenowy jest toksyczny dla rzęsistków, co utrudnia ich identyfikację. Większość autorów zaleca jednak stosowanie mikroskopii z kontrastem fazowym, bez barwienia, do oceny najlepiej świeżych próbek z pochwy.[4]

Dzięki tej technice można również zaobserwować komórki skóry i włosy (oprócz wydzieliny z szyjki macicy i pochwy). Ocena jest prosta i szybka, a dostarcza znacznie więcej informacji w porównaniu z prostą mikroskopią w jasnym polu. *(Rycina 1)*



RYCINA 1a i 1b Porównanie tego samego pola preparatu mikroskopowego wydzieliny z pochwy przy użyciu mikroskopii w świetle jasnym (a) i w kontrastach fazowych (b).

Mikroskopię z kontrastem fazowym można wykonać bezpośrednio po badaniu ginekologicznym i należy ją traktować jako jego podstawowy element. Możliwa jest jednak również odroczona obserwacja preparatu.[4]

W wielu wytycznych, w tym w *zaleceniach Międzynarodowego Towarzystwa Badań nad Chorobami Sromu i Pochwy dotyczących diagnostyki i leczenia zapalenia pochwy* (dostępnych do pobrania pod adresem https://www.issvd.org/guidelines), jako pierwszy krok w diagnostyce bakteryjnego zapalenia pochwy (BV), zakażeń sromu i pochwy *wywołanych przez Candida spp*. oraz rzęsistkowicy zaleca się mikroskopię preparatów mokrych (WMM).[4-8]

Należy jednak podkreślić kilka istotnych kwestii: 1) fakt, że mikroskopy nie zawsze są dostępne, 2) ośrodki akademickie często nie uczą odpowiednio stażystów korzystania z tego narzędzia diagnostycznego oraz 3) diagnoza zależy od przeszkolenia i doświadczenia lekarza.

Chociaż testy amplifikacji kwasu nukleinowego (NAAT) zostały już uznane za złoty standard w diagnostyce rzęsistkowicy, miejsce testów molekularnych, które skutecznie diagnozują BV i kandydozę (lub kandidozę*), nadal wymaga walidacji. Pomimo dobrych wyników klinicznych testy NAAT są drogie i mogą nie dać pełnego obrazu sytuacji. Inne najnowsze rozwiązania obejmują narzędzia do automatycznego odczytu preparatów mikroskopowych (GYNI™, GynTools, Izrael). [9, 10] Niemniej jednak stosowanie WMM nadal nie jest uważane za anachroniczne, biorąc pod uwagę jego prostotę, niski koszt, dobrą skuteczność kliniczną oraz możliwość oceny innych czynników, takich jak na przykład stan hormonalny i stan zapalny.[5]

Mikroskopia z kontrastem fazowym świeżej wydzieliny pozwala na ocenę funkcjonalną i hormonalną poprzez charakterystykę złuszczonych komórek nabłonka pochwy oraz rozróżnienie między eubiozą (normalną mikroflorą) *a* dysbiozą (nieprawidłową mikroflorą), BV, mieszanym zapaleniem pochwy, rzęsistkowicą, kandydozą, stanem zapalnym oraz identyfikację „toksycznych"/aktywowanych leukocytów, plemników lub leków stosowanych dopochwowo.

* Niektórzy autorzy preferują termin „kandydoza", ponieważ końcówka „-oza" jest zwykle stosowana w odniesieniu do zakażeń grzybiczych

Mikroskopia z kontrastem fazowym nie nadaje się do diagnozowania zakażeń przenoszonych drogą płciową wywołanych przez gonokoki, *Mycoplasma genitalium, Chlamydia trachomatis, Treponema pallidum* lub wirusy opryszczki pospolitej. Nie pozwala ona również na rozróżnienie między bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi, ani na diagnozowanie dysplazji szyjki macicy lub pochwy.

W przypadku grubszych próbek może dochodzić do efektu halo spowodowanego nakładaniem się struktur. Dlatego w mikroskopii z kontrastem fazowym konieczne jest stosowanie cienkich preparatów, co pozwoli zminimalizować nakładanie się obrazów.

W ginekologicznej mikroskopii z kontrastem fazowym zaleca się stosowanie powiększenia x400 (obiektyw x40 w połączeniu z okularem x10).

Przysłona aperturowa (jeśli występuje w kondensorze) musi pozostać całkowicie otwarta.

2

MIKROSKOPIA Z KONTRASTEM FAZOWYM

2.1 Zalety i wady

TABELA 1
Zalety i wady mikroskopii z kontrastem fazowym w ocenie wydzieliny z pochwy

Zalety	Wady
• Natychmiastowe • Nie wymaga barwienia • Szybkość • Niski koszt • Łatwe do wykonania • Stosunkowo szybkie opanowanie techniki • Dobra skuteczność z klinicznego punktu widzenia (z wyjątkiem *Trichomonas vaginalis*) • Umożliwia rozpoznanie „zakażeń mieszanych" • Dobra czułość i swoistość w przypadku cytolitycznego zapalenia pochwy oraz złuszczającego zapalenia pochwy/aerobowego zapalenia pochwy • Ocena stanu hormonalnego • Ocena stanu zapalnego	• Preparaty mogą ulec zniszczeniu • Konieczny jest doświadczony/przeszkolony osoba oceniająca • Niska czułość w przypadku rzęsistkowicy

2.2 Fizyka, regulacja i konfiguracja mikroskopu z kontrastem fazowym

Obiektywy z kontrastem fazowym są zazwyczaj oznaczone w następujący sposób:

- Obiektyw x20: Ph 1
- Obiektyw x40: Ph 2 *(rysunek 2)*

Otwór komunikacyjny w kondensorze/kondensatorze jest oznaczony tą samą liczbą (1 lub 2) i musi odpowiadać numerowi na obiektywie *(rysunki 3 a, b)*.

Konieczne jest upewnienie się, że pierścieniowa przysłona w kondensorze i pierścień fazowy w obiektywie są skoordynowane i idealnie wyrównane. Aby to sprawdzić, badający może zdjąć soczewkę okularową i spojrzeć do mikroskopu przez tubus: jeśli kondensor i obiektyw są wyrównane, widoczny będzie tylko jeden jasny pierścień; w przeciwnym razie zaobserwuje jasny i ciemny pierścień, które nie pokrywają się dokładnie.



RYSUNEK 2 Obiektyw z kontrastem fazowym o powiększeniu 40x z niebieskim pierścieniem i zielonymi literami „Ph 2".



RYSUNEK 3a Wyregulowany pierścień fazowy w kondensatorze.



RYSUNEK 3b Wyjęty pierścień fazowy w kondensatorze.

Fale świetlne są najpierw kierowane przez soczewkę skupiającą na pierścieniową przysłonę kondensora, co tworzy stożek światła. Następnie fale te przechodzą przez preparat i trafiają na soczewkę, gdzie napotykają pierścień fazowy. Gdy fale przechodzą przez preparat, część z nich ulega odchyleniu w wyniku dyfrakcji. Dyfrakcyjna wiązka światła przechodzi przez obiekt bez przesunięcia fazowego i nie uderza w pierścień fazowy w soczewce. Niezdyfrakcyjne promienie światła ulegają przesunięciu fazowemu o ¼ długości fali przechodząc przez przezroczysty preparat mikroskopowy i uderzają w pierścień fazowy, co powoduje ponowne opóźnienie promienia światła o ¼ długości fali. W tej chwili występuje różnica faz wynosząca połowę długości fali. W pośredniej płaszczyźnie obrazu grzbiety i doliny fal spotykają się ze sobą z powodu różnic faz. Konsekwencją tego jest znoszenie się przez interferencję, a wynikiem tego są kontrasty jasne i ciemne, które sprawiają, że przezroczysty obiekt jest widoczny dla oka. Szczegóły strukturalne obiektu wydają się ciemne na jaśniejszym tle lub odwrotnie, w zależności od różnych pierścieni fazowych, co pozwala uzyskać plastyczny obraz.

2.2.1 Zasada oświetlenia Köhlera

Jeśli oświetlenie preparatu nie jest idealnie ustawione, mikroskop będzie działał poniżej oczekiwanej wydajności. Wytyczne dotyczące optymalnego prowadzenia światła zostały po raz pierwszy opublikowane przez Augusta Köhlera w 1883 roku i pozostają podstawową zasadą mikroskopii świetlnej.

Ogólne zasady Köhlera są następujące:

1. Kondensor jest ustawiony blisko stolika preparatu, a wybarwiony preparat jest ustawiony w jasnym polu.
2. Przysłona pola świetlnego u podstawy mikroskopu powinna być teraz prawie całkowicie zamknięta, tak aby apertura była widoczna jako punkt. Jeśli punkt ten nie znajduje się w środku pola, należy go przesunąć do tej pozycji, regulując śruby centrujące kondensora lub przesuwając kolektor.
3. Wysokość kondensora reguluje się tak, aby krawędź przysłony polowej znajdowała się w ognisku.
4. Na koniec ponownie otwiera się przysłonę polową, aż oświetli się środkowa część pola.

Szczegółowa procedura kontrastu fazowego:

1. Próbkę barwioną należy zastąpić próbką niebarwioną (np. wydzieliną z pochwy). Przysłona pola świetlnego musi być całkowicie otwarta, a jasność ustawiona na maksimum.
2. Aperturę fazową należy ustawić tak, aby pasowała do obiektywu z kontrastem fazowym (Ph 1 dla powiększenia x20 lub Ph 2 dla powiększenia x40); sposób, w jaki się to robi, różni się w zależności od mikroskopu (zwykle za pomocą rewolweru lub, w wielu nowoczesnych mikroskopach, suwaka).
3. Po zdjęciu okularu i spojrzeniu do mikroskopu widoczne są jasny pierścień (obraz przysłony kondensora) oraz szary pierścień (obraz pierścienia fazowego w obiektywie); muszą one znajdować się w centrum i całkowicie zakrywać jasny pierścień.

2.2.2 Czyszczenie mikroskopu

Przednie soczewki obiektywów i okularów, a także wszystkie inne soczewki, mogą ulec zanieczyszczeniu przez kurz, tłuszcz (pochodzący ze skóry lub rzęs), kryształki soli z wyschniętego roztworu soli fizjologicznej, KOH oraz zaschnięte wydzieliny.

Nie zaleca się stosowania alkoholu ani środków dezynfekujących, ponieważ mogą one uszkodzić cementację soczewek.

Preferowaną opcją jest miękka ściereczka z mikrofibry z wodą lub specjalny środek czyszczący zalecany przez producenta.

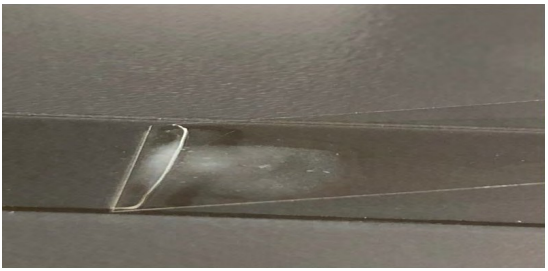
Gdy mikroskop nie jest używany, należy go przykryć osłoną.

3

PRZYGOTOWANIE PREPARATU Z WŁAGI PŁCIOWEJ



RYCINA 4 Przygotowanie próbki do badania mikroskopowego preparatu mokrego poprzez dodanie wydzieliny z pochwy z łopatki wziernika do kropli soli fizjologicznej.



RYCINA 5 Przed obserwacją należy nałożyć szkiełko nakrywkowe. Należy lekko docisnąć, aby uniknąć tworzenia się pęcherzyków powietrza. Nadmiar soli fizjologicznej/wydzieliny należy usunąć papierem chłonnym.



RYCINA 6 Widok preparatu z nakrywką, gotowego do oceny.

Do pobrania próbki nie ma potrzeby używania sterylnego wacika. Waciki mogą wchłonąć wydzielinę i zanieczyścić próbkę włóknami. Plastikowe szpatułki lub szczoteczki do pobierania próbek z szyjki macicy mogą być świetnymi narzędziami do pobierania wydzieliny. Alternatywnie można pobrać niewielką ilość wydzieliny z bocznej środkowej ściany pochwy za pomocą ostrza wziernika i zanurzyć je w kropli soli fizjologicznej (lub 10–15% KOH), która została wcześniej przygotowana na szkiełku mikroskopowym *(ryc. 4)*. Można również równomiernie rozprowadzić próbkę na szkiełku mikroskopowym, a następnie dodać kroplę roztworu soli fizjologicznej lub KOH. Następnie próbkę przykrywa się szkiełkiem nakrywkowym i dociska, aby uniknąć tworzenia się pęcherzyków powietrza. *(Ryc. 5 i 6)*

3.1 Komórki w preparacie mokrym z (szyjki macicy) wydzieliny z pochwy

3.1.1 Komórki nabłonka pochwy

Na proliferację komórek nabłonka pochwy wpływają poziomy estrogenów, które ulegają wahaniom w trakcie cyklu miesiączkowego, są niskie w okresie laktacji oraz w okresie przedpokwitaniowym
dzieci, oraz kobiety po menopauzie nie stosujących hormonalnej terapii menopauzalnej.

Komórki podstawowe to najmniejsze, okrągłe komórki warstwy podstawowej ściany pochwy o wielkości 12–20 µm, z dość dużym okrągłym jądrem i rzadką cytoplazmą wokół niego, często z ziarnistościami. Ich obecność jest oznaką ciężkiej atrofii pochwy lub nadżerek.

Komórki przypodstawnicze to okrągłe lub owalne komórki niedojrzałe, o wielkości 15–30 µm, z centralnym okrągłym jądrem o średnicy 9–10 µm. Komórki te dominują w atrofii pochwy i często występują również w pochwie młodych kobiet pod wpływem estrogenów, u których występuje aerobowe zapalenie pochwy (AV)/łuszczące się zapalenie pochwy (DIV) lub inne choroby zapalne, takie jak rzęsistkowica lub erozyjny liszaj płaski pochwy.

W pochwie dorosłych kobiet, charakteryzującej się wysokim poziomem estrogenu, dominują komórki pośrednie wraz z komórkami powierzchniowymi. W zależności od stopnia ich proliferacji wyróżnia się małe i duże komórki pośrednie. Małe komórki pośrednie występują w okresie okołomenopauzalnym lub pod silnym wpływem progesteronu (tj. w czasie ciąży, terapii progestagenowej lub androgenowej) i nazywane są komórkami łódeczkowatymi, ponieważ przypominają małą łódkę. Jądro komórek pośrednich jest okrągłe, pęcherzykowate, o wielkości 7–10 µm. Większe komórki pośrednie mają wielkość 40–60 µm.

Duże komórki powierzchniowe mają średnicę 50–60 µm, są wielokątne, przezroczyste i posiadają małe, gęste jądro piknotyczne o średnicy 5–7 µm. Dominują one w warstwie powierzchniowej nabłonka pochwy pod wpływem estrogenu.

3.1.2 Komórki nabłonka endometrium

Komórki endometrium można napotkać w pochwie w próbkach pobranych podczas miesiączki lub krwawienia międzymiesiączkowego. Rzadziej w próbkach z pochwy można zaobserwować komórki gruczołowe w kontekście endometriozy pochwowej lub adenozji pochwowej.

3.1.3 Komórki niebędące komórkami nabłonkowymi

Leukocyty dzielą się na granulocyty, limfocyty i monocyty. Mają one kształt od okrągłego do owalnego i wykazują wyraźne cechy komórkowe, a ich średnia średnica wynosi od 7 µm dla limfocytów do 20 µm dla monocytów. Charakterystyczne i łatwo obserwowalne w mikroskopii z kontrastem fazowym jest segmentowane jądro granulocytów, które nie jest aktywowane w zdrowym układzie płciowym.

Tak zwane „toksyczne" leukocyty to aktywowane granulocyty/neutrofile powstałe w wyniku infekcji lub stanu zapalnego. W takich przypadkach pierwotnie segmentowane jądro rozpada się na ziarnistą masę w centrum komórki, która teraz ma kształt kulisty.

Panuje zgoda co do tego, że obecność ponad 25 toksycznych leukocytów w polu widzenia przy powiększeniu x400 lub stosunek leukocytów do komórek nabłonkowych wyższy niż 1:1 wskazuje na proces zakaźny lub zapalny w dolnych drogach rodnych, co wymaga dalszej diagnostyki, na przykład w kierunku zapalenia szyjki macicy. W niektórych przypadkach może to jednak po prostu wystąpić w kontekście rozległej ektopii lub jeśli próbka została pobrana w pobliżu ujścia szyjki macicy (z długimi łańcuchami neutrofili polimorfojądrowych).

Erytrocyty rozpoznaje się po ich okrągłym kształcie, braku jądra oraz charakterystycznym wgłębieniu w środku, które w kontrastowej fazie wygląda jak ciemna plamka. Cechy te nie powinny być błędnie interpretowane jako jądro. Zniszczone erytrocyty mogą przypominać ciemne, czasem uszkodzone okrągłe „odcienie szarości".

4

KRYTERIA DIAGNOSTYCZNE

Kryteria rozpoznania dysbiozy pochwy lub infekcji:

- Objawy
- Objawy kliniczne
- pH
- WMM
- Barwienie metodą Grama i skala Nugenta
- Identyfikacja organizmów przenoszonych drogą płciową metodami bezhodowlowymi
- W niektórych szczególnych przypadkach przydatne może być wykonanie posiewu z pochwy/szyjki macicy (np. w przypadku gonokoków, paciorkowców grupy A)

TABELA 2
Objawy kliniczne i mikroskopowe dysbiozy pochwy i infekcji

	Pochwa	Wydzielina	pH	Mikroskopia z kontrastem fazowym
Zdrowe pochwy	normalne	normalne	3,8–4,7	dominacja pałeczek kwasu mlekowego, brak ciężkiego zapalenia i brak komórek przypodstawnych
Bakteryjne zapalenie pochwy	normalne	szara, kremowa	>4,5	dysbioza, komórki wskazówkowe
Kandydoza	czerwona lub normalna	Białe lub żółte, „twarogowe"	Dowolne	blastospory, pseudomielec
Rzęsistkowica	czerwone lub prawidłowe, często zapalenie sromu	może być żółta, płynna, z pęcherzykami powietrza lub wyglądać normalnie	>4,5	rzęsistki (lub ich brak) często zapalenie sromu, dysbioza, toksyczne leukocyty
AV/DIV	stan zapalny, złuszczanie parabasalne	mniej lub bardziej żółte	5–7	leukocyty toksyczne, komórki, komórki bez cech charakterystycznych, dysbioza, ale mniej bakterii niż w BV
Cytolityczne zapalenie pochwy	normalne	podobne do tego, co obserwuje się w przypadku kandydozy	<4,1	duża ilość pałeczek kwasu mlekowego, gołe jądra, fragmenty cytoplazmy, brak stanu zapalnego

4.1 Jak rozpoznać bakteryjne zapalenie pochwy? [6,11]

- Kryteria Amsela – obecność co najmniej 3 z 4 kryteriów (pH > 4,5, rybny zapach, kremowa wydzielina, obecność komórek wskazówkowych)
- WMM
- Skala Nugenta (barwienie metodą Grama, powiększenie mikroskopowe x1000)
- BV Blue Test (Gryphus Diagnostics, USA; Sekisui Diagnostics, Wielka Brytania) (ocena aktywności sialidazy)
- Affirm VP III (BD Diagnostics, Sparks, USA) i inne (test z sondą DNA)
- GYNI (Gyn Tools, Izrael) (automatyczny odczyt preparatu mokrego i pH)
- NAAT/PCR (Allplex Vaginitis Screening Assay [Seegene Inc., Korea Południowa], BD Max [Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA], Aptima Vaginal Panel (Hologic, Malborough/Massachusetts, USA), Xpert Xpress MVP [Cepheid, Sunnyvale, CA, USA])

4.2 Jak zdiagnozować AV/DIV? [11,12]

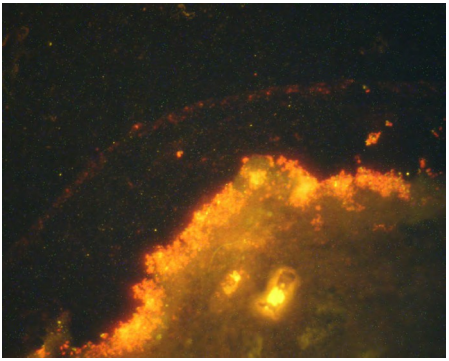
- Żółta, ropna wydzielina utrzymująca się przez tygodnie lub miesiące
- Znacznie podwyższone pH
- Zapalenie pochwy (w przypadku DIV również złuszczanie), objawiające się zaczerwienieniem, leukocytozą („toksyczne" leukocyty), ale bez oznak infekcji
- Pacjentki mogą cierpieć na współistniejące choroby autoimmunologiczne lub przyjmować rytuksymab[12]
- Mikroskopia z kontrastem fazowym: leukocyty toksyczne, komórki parabasalne, brak komórek typu clue, silnie zaburzona, ale rzadka mikroflora
- Barwienie metodą Grama: wyniki podobne do tych obserwowanych przy użyciu WMM (z wyjątkiem leukocytów toksycznych)
- Hodowle nie są pomocne
- GYNI (Gyn-tools, Izrael)

4.3 Obiecujące narzędzie diagnostyczne przyszłości

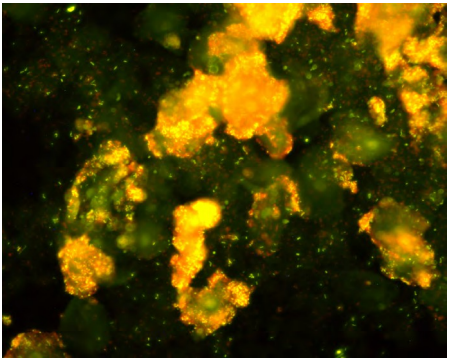
Hybrydyzacja *in situ* z użyciem fluorescencji (FISH) umożliwia jednoczesną, jednoznaczną pod względem taksonomicznym identyfikację mikroorganizmów, ocenę ich rozmieszczenia przestrzennego oraz cech morfologicznych w badanym materiale. Dzięki zastosowaniu panelu zawierającego różnorodne sondy znakowane fluorescencyjnie, obejmujące istotne patogeny i grupy patogenów, możliwe jest uwidocznienie złożonych kultur mieszanych, a także biofilmów wielobakteryjnych w ich pierwotnym składzie.

Metodę FISH można stosować do badania rozmazów w płynnym podłożu transportowym (wymazy), a także próbek biopsyjnych, np. z pochwy lub materiału poronieniowego, osadu moczu, ejakulatu i innych próbek.[12]

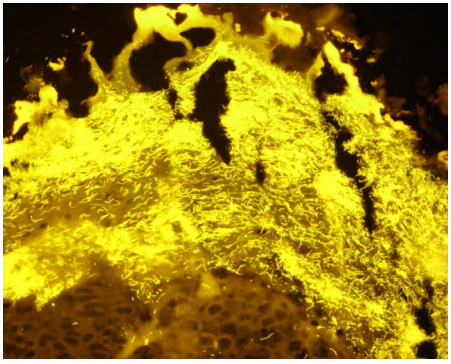
Ryciny 7–9 i ich opisy zostały udostępnione dzięki uprzejmości prof. Alexandra Swidsinskiego z Berlina.



RYCINA 7 Wielobarwna *hybrydyzacja* in *situ* pojedynczych komórek (sc-FISH) próbek z biopsji pochwy pobranych od kobiety z bakteryjnym zapaleniem pochwy, pokazująca wielobakteryjny charakter przylegających biofilmów. *Gardnerella spp.* jest zaznaczona na czerwono (barwnikiem Gard 664-Cy5), a *Fannyhessea spp.* na żółto (barwnikiem Arto 124-Cy3). *Gardnerella spp.* tworzy strukturę biofilmu, podczas gdy *Fannyhessea spp.* rozpuszcza się w jego strukturze (szczegóły patrz powyżej Swidsinski et al. 2019)[14] .



RYCINA 8 Wielobarwne obrazowanie metodą single-sc-FISH wymazu z pochwy kobiety z bakteryjnym zapaleniem pochwy. *Bakterie z rodzaju Gardnerella spp.* są zaznaczone na czerwono (Gard 664-Cy5), a *Lactobacillus (L.) iners* na żółto (Liners Cy5). Wyraźnie widać, że komórki nie są pokryte nadmiernie rozrostem bakterii pochwowych, ale przede wszystkim tworzą biofilm na powierzchni złuszczonych komórek nabłonkowych. Stężenia w wydzielinach pochwowych szybko spadają wraz z odległością od powierzchni komórek nabłonkowych. Najwyraźniej komórki wskazówkowe nie są pokryte nadmiernym rozrostem bakterii w wydzielinie pochwowej; raczej pierwotnie tworzący się biofilm szybko zmniejsza się od powierzchni komórek nabłonkowych. *L. iners* łączy się z *Gardnerella spp.* bez oznak antagonizmu między tymi dwoma gatunkami.



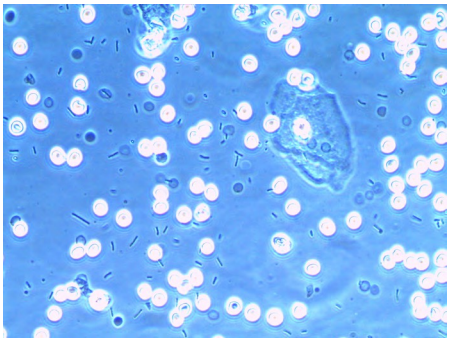
RYCINA 9 Badanie Sc-FisH próbki pobranej podczas biopsji od kobiety z nawracającą kandydozą sromu i pochwy; żółta fluorescencja (Caal Cy3). Wyraźnie widać inwazyjny charakter *gatunków Candida*. Na tej samej powierzchni biopsyjnej nie stwierdzono obecności biofilmu. Inwazji *Candida spp.* zawsze towarzyszy współinwazja szczepów mikroorganizmów, głównie pałeczek kwasu mlekowego. Rzadziej towarzyszy jej kolonizacja przez *Gardnerella spp.* lub Enterobacteriaceae.

5

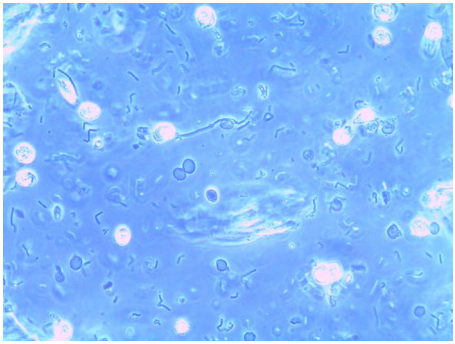
PRZYKŁADY KLINICZNE I MIKROSKOPOWE

Wszystkie przedstawione mikrofotografie zostały wykonane przy powiększeniu 400x, przy użyciu mikroskopii z kontrastem fazowym. O ile nie zaznaczono inaczej, preparaty przygotowano przy użyciu soli fizjologicznej (w niektórych przypadkach zastosowano 10% roztwór KOH).

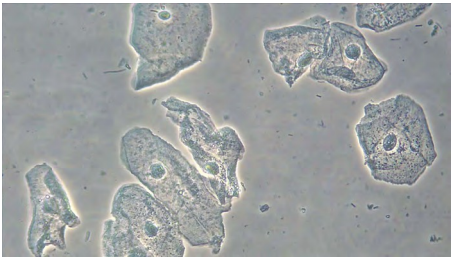
5.1 Wyniki prawidłowe



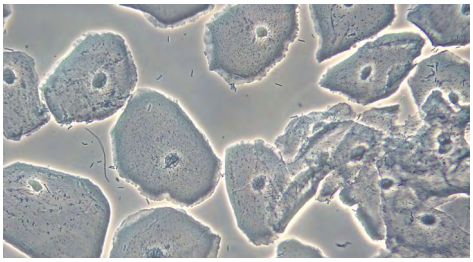
RYCINA 10 Miesiączka. Erytrocyty (niektóre częściowo pęknięte), pałeczki kwasu mlekowego.



RYCINA 11 Miesiączka. Pałeczki kwasu mlekowego, erytrocyty (ciemne), leukocyty.



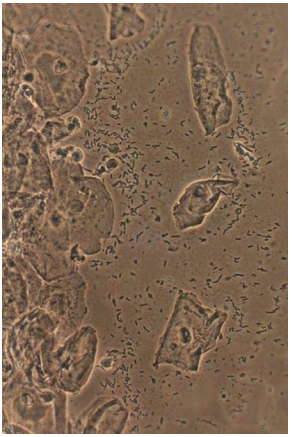
RYCINA 12 Próbka pobrana tuż po menstruacji – pałeczki kwasu mlekowego występują w bardzo niewielkiej ilości.



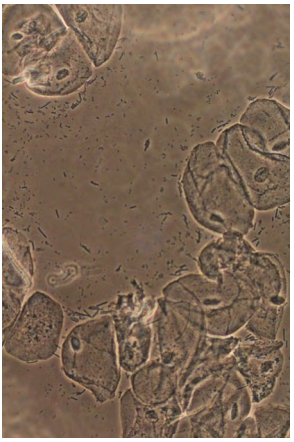
RYCINA 13 Próbka pobrana po kuracji antybiotykowej; pałeczki kwasu mlekowego prawie nieobecne.



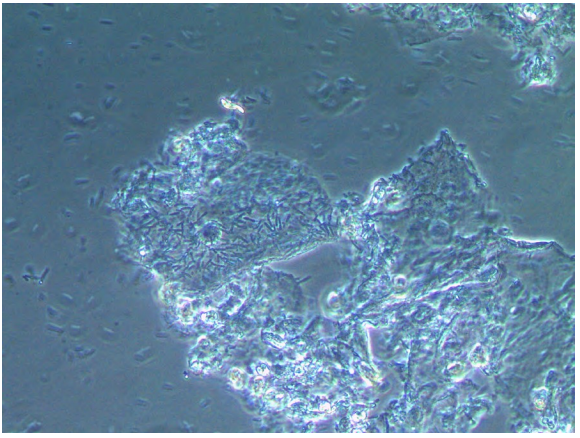
RYCINA 14 Kobieta przed menopauzą leczona ampicyliną: pałeczki kwasu mlekowego praktycznie nieobecne.



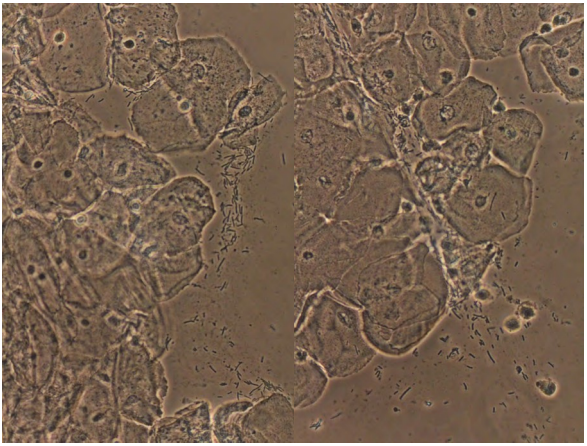
RYCINA 15 Próbka prawidłowa: pałeczki kwasu mlekowego, komórki powierzchniowe.

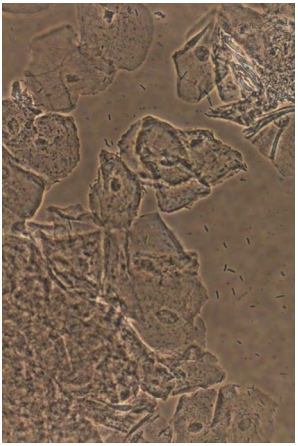


RYCINA 16 Różne pałeczki kwasu mlekowego, niektóre inne bakterie.

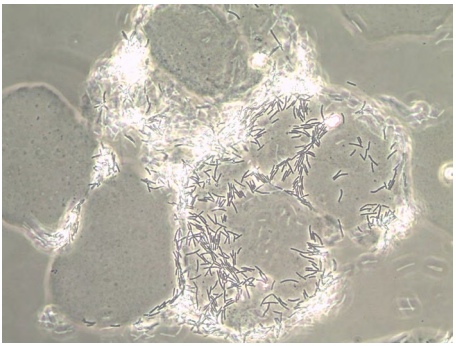


RYCINA 17 Przyleganie pałeczek kwasu mlekowego przed miesiączką do komórki powierzchniowej pochwy, niektóre granulocyty.

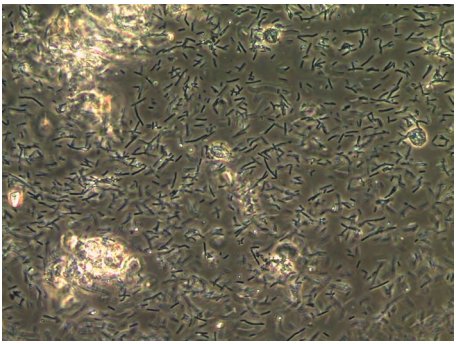




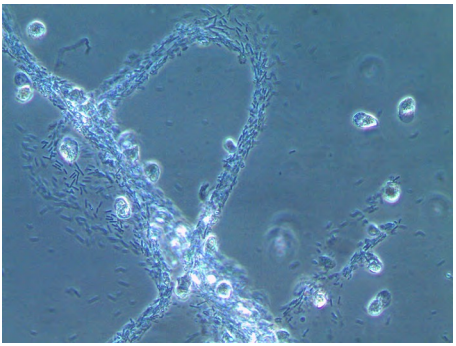
RYCINA 18 Normalne bakterie z rodzaju Lactobacillus. RYCINA 19 Normalne bakterie z rodzaju Lactobacillus. RYCINA 20 Normalne bakterie z rodzaju Lactobacillus.



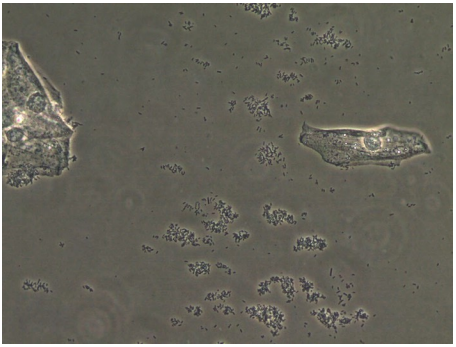
RYCINA 21 Roztwór KOH, pałeczki kwasu mlekowego, komórki nabłonkowe zaczynające się rozpuszczać.



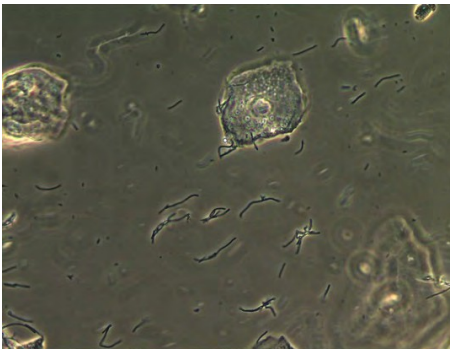
RYCINA 22 Cytoliza wywołana przedmiesiączkowym progesteronem. Odsłonięte jądra rozpadłych komórek nabłonkowych i obfite bakterie z rodzaju Lactobacillus.



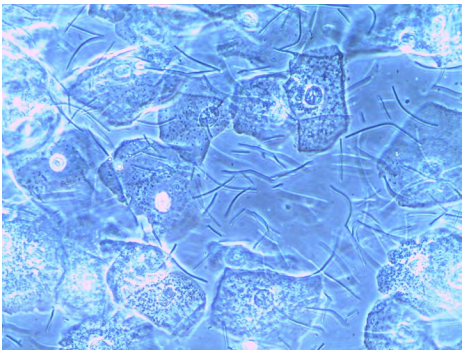
RYCINA 23 Pałeczki kwasu mlekowego, nienaruszające komórek krwi białych. *Lactobacillus iners*.



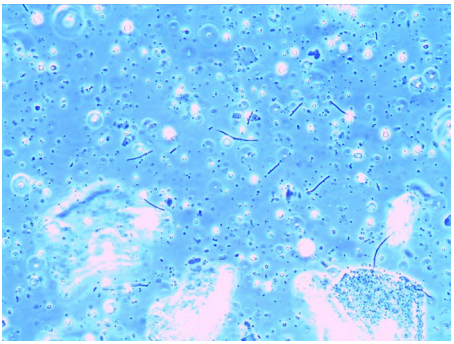
RYCINA 24 Krótkie bakterie z rodzaju Lactobacillus, prawdopodobnie



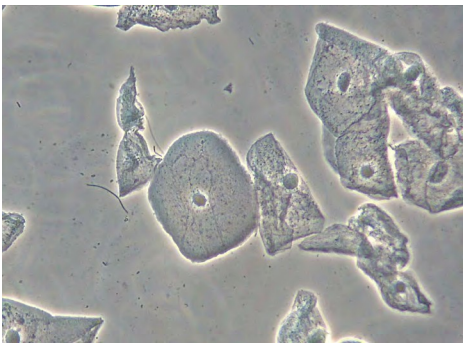
RYCINA 25 Pałeczki kwasu mlekowego z tabletki dopochwowej.



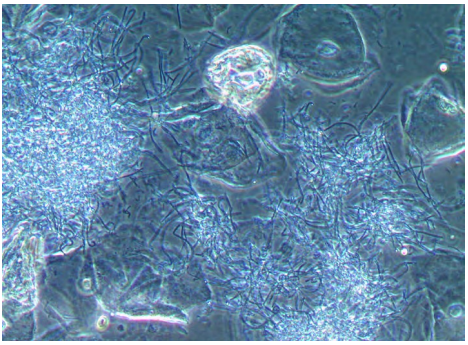
RYCINA 26 Dość długie pałeczki kwasu mlekowego („leptothrix").



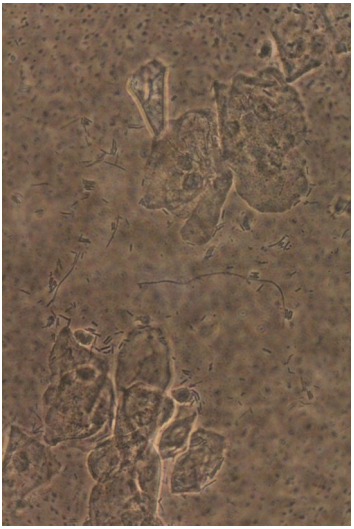
RYCINA 27 Długie pałeczki kwasu mlekowego, w tle dysbioza i liczne kropelki kremu dopochwowego.



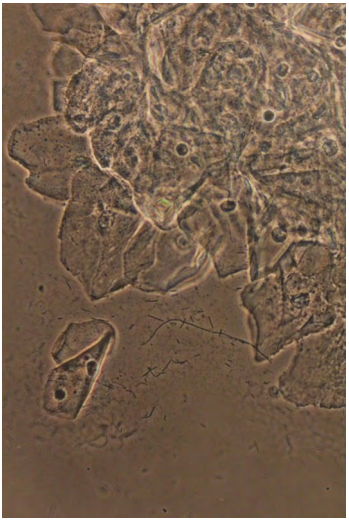
RYCINA 28 Dość długie pałeczki kwasu mlekowego („leptothrix") po antybiotykach.



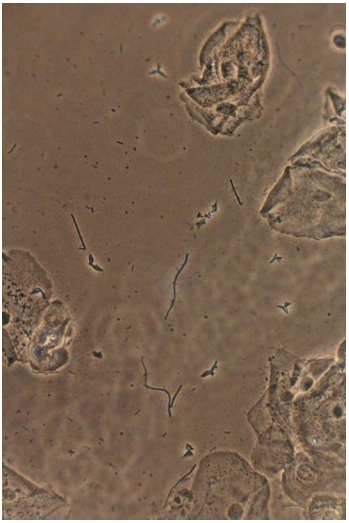
RYCINA 29 Długie pałeczki kwasu mlekowego („leptothrix").



RYCINA 30 „Leptothrix".

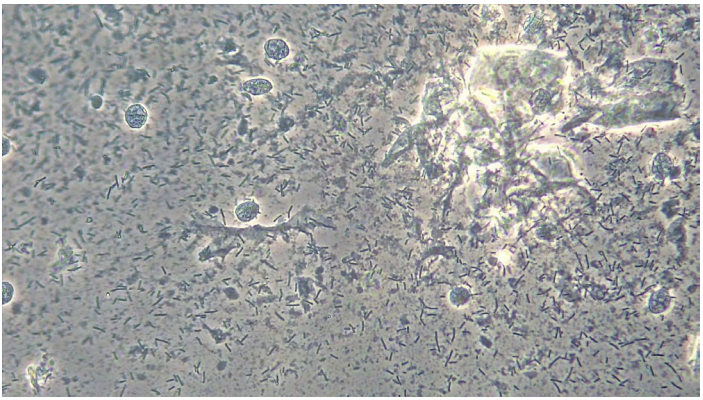


RYCINA 31 „Leptothrix".

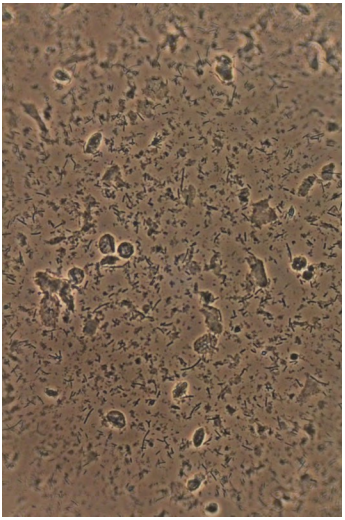


RYCINA 32 „Leptothrix".

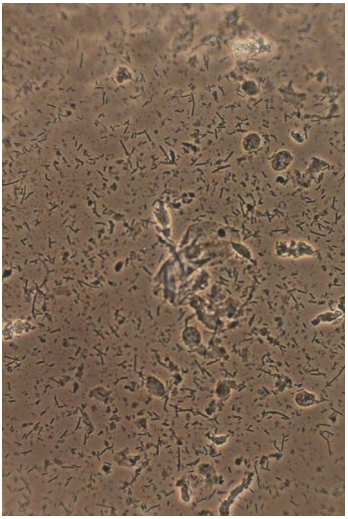
5.2 Cytolityczne zapalenie pochwy



RYCINA 33 Cytoliza, odsłonięte jądra komórkowe, pałeczki kwasu mlekowego.



RYCINA 34 Cytoliza, odsłonięte jądra komórkowe, pałeczki kwasu mlekowego.

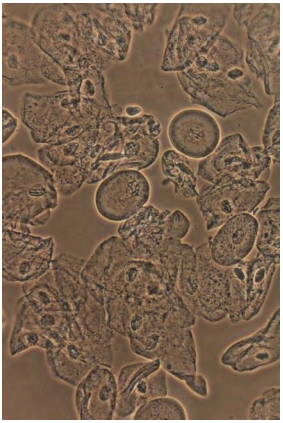


RYCINA 35 Cytoliza, odsłonięte jądra komórkowe, pałeczki.

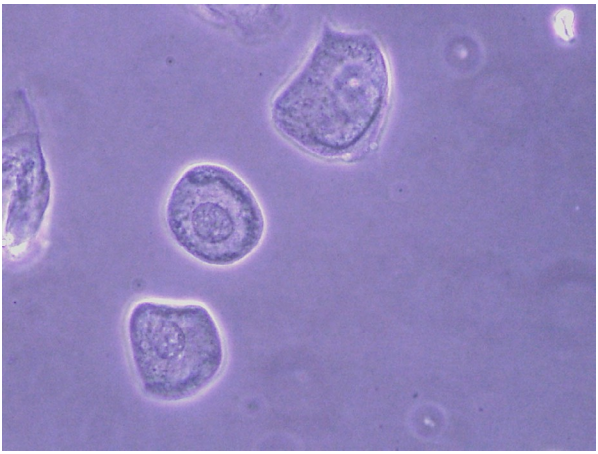
5.3 Atrofia



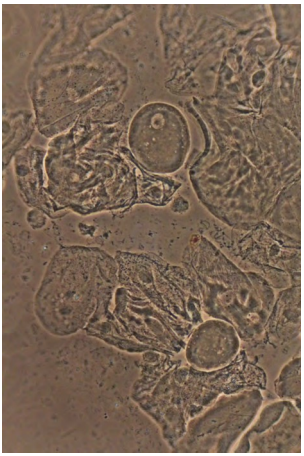
RYCINA 36 Kobieta w wieku 65 lat, wartość pH 6, zanik pochwy.



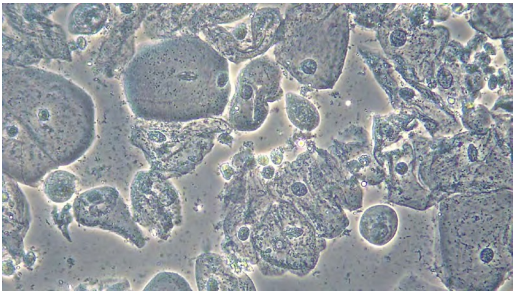
RYCINA 37 Przewaga komórek pośrednich i 3 komórek przypodstawnych w okresie laktacji, brak pałeczek kwasu mlekowego.



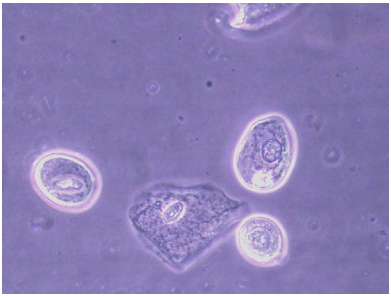
RYCINA 38 32-letnia kobieta w okresie laktacji z objawami atrofii: komórki przypodstawnikowe i małe komórki pośrednie, brak pałeczek kwasu mlekowego.



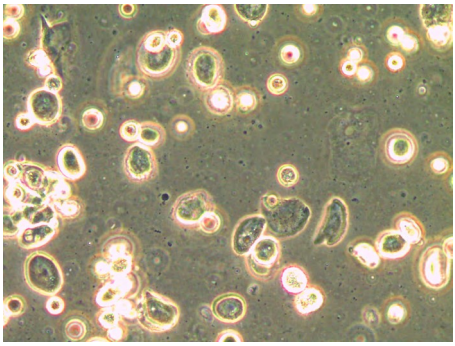
RYCINA 39 Zanik pochwy spowodowany niską dawką estrogenu w tabletkach antykoncepcyjnych.



RYCINA 40 Komórki powierzchniowe, pośrednie i przypodstawnikowe, toksyczne leukocyty, dysbioza u kobiety w okresie okołomenopauzalnym/pomenopauzalnym z atrofią.

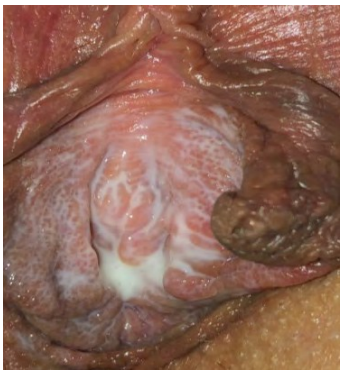


RYCINA 41 75-latka, bez terapii hormonalnej, zanik. Komórki przypodstawnikowe.

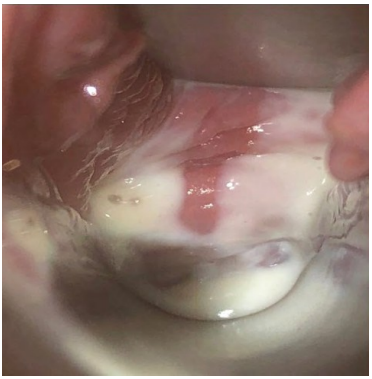


RYCINA 42. 80-letnia pacjentka, zanik pochwy po menopauzie. Komórki przypodstawnicze i podstawnicze, toksyczne leukocyty, dysbioza.

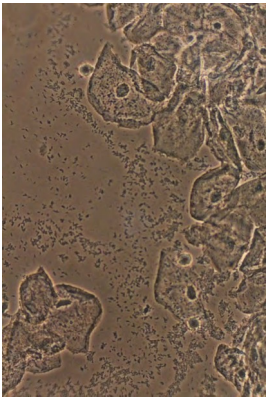
5.4 Bakteryjne zapalenie pochwy/dysbioza



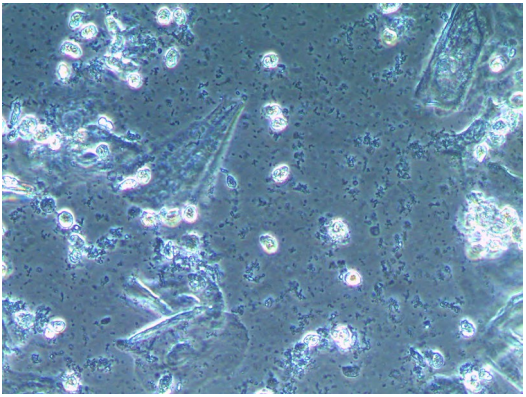
RYCINA 43 Bakteryjne zapalenie pochwy: szara, kremowa i pienista wydzielina. Pęcherzyki gazu powstają w wyniku produkcji gazu/amin przez bakterie.



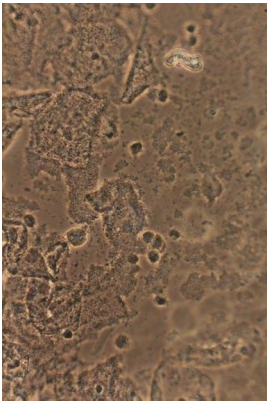
RYCINA 44 Bakteryjne zapalenie pochwy: szara, kremowa i pienista wydzielina z pochwy.



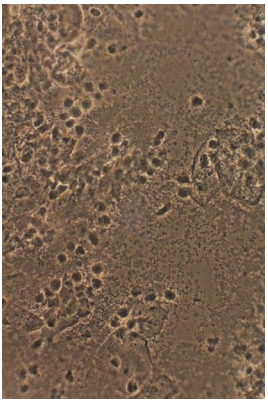
RYCINA 45 Ciężka dysbioza.



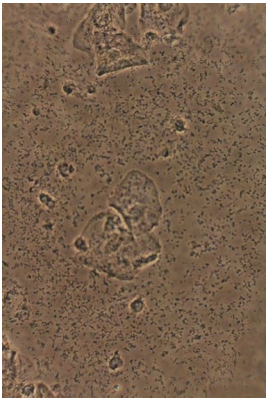
RYCINA 46 Ciężka dysbioza, brak komórek wskazówkowych. Klinicznie bakteryjne zapalenie pochwy z elementem zapalnym.



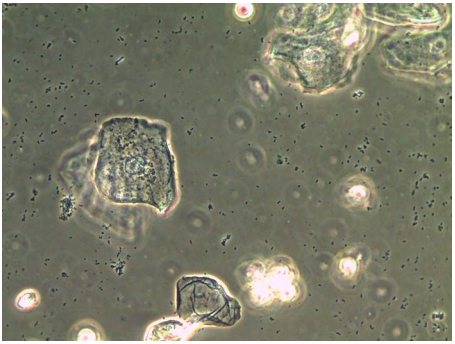
RYCINA 47 Ciężka dysbioza, komórki wskazówkowe, komórki pseudowskazówkowe (bakteryjne zapalenie pochwy).



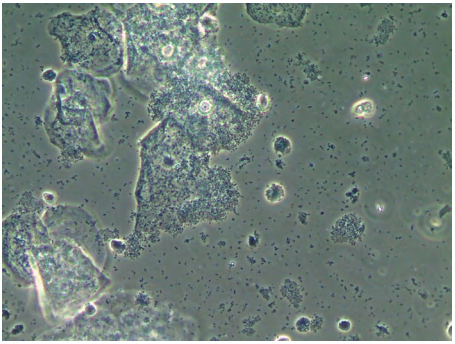
RYCINA 48 Dysbioza, brak komórek wskazówkowych, toksyczne leukocyty.



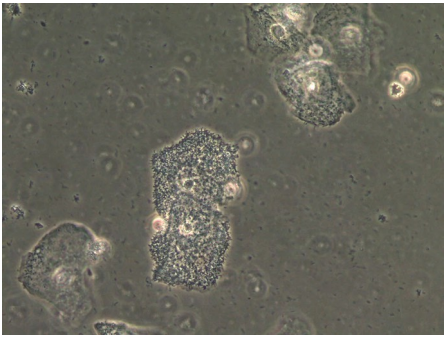
RYCINA 49 Dysbioza, brak komórek wskazujących (bakteryjne zapalenie pochwy).



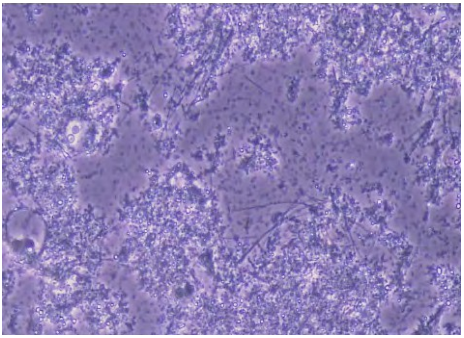
RYCINA 50 Dysbioza, kilka krótkich pałeczek kwasu mlekowego, prawdopodobnie *L. iners*, brak bakteryjnego zapalenia pochwy.



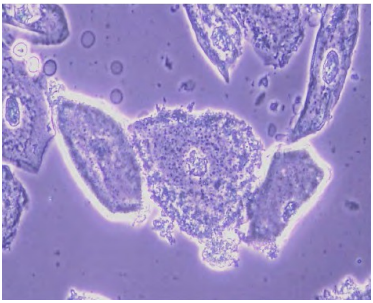
RYCINA 51 Bakteryjne zapalenie pochwy. Komórki wskazówkowe i pseudokomórki wskazówkowe, nieliczne nietoksyczne leukocyty.



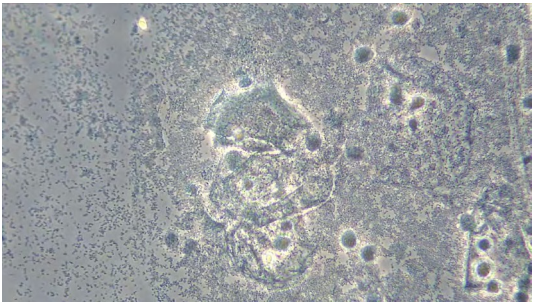
RYCINA 52 Komórki wskazówkowe.



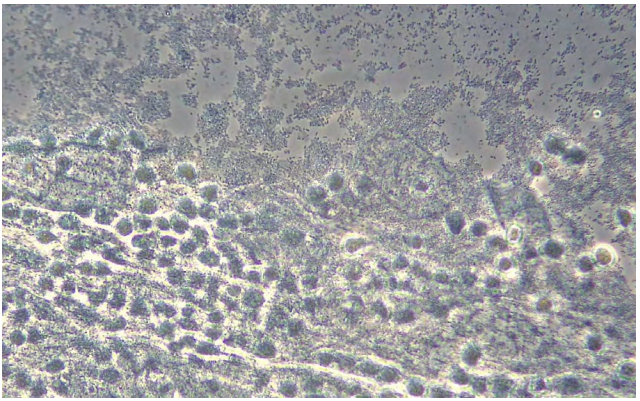
RYCINA 53 Bakteryjne zapalenie pochwy: „chmury" bakterii/komórek wskazujących oraz długie bakterie.



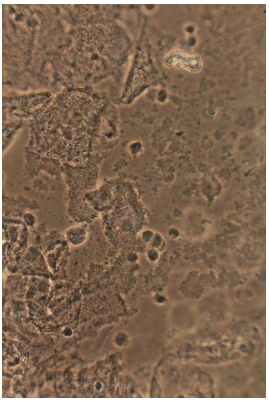
RYCINA 54 Bakteryjne zapalenie pochwy: komórka wskazówkowa, w trakcie menstruacji.



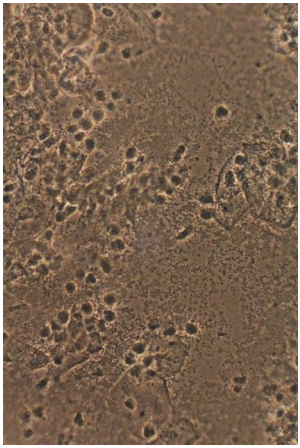
RYCINA 55 Bakteryjne zapalenie pochwy i stan zapalny: skupiska bakterii, brak komórek typu clue, toksyczne leukocyty.



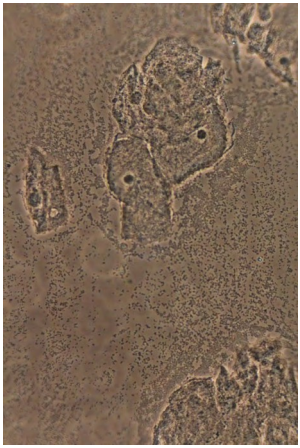
RYCINA 56 Bakteryjne zapalenie pochwy i zapalenie szyjki macicy. Komórki wskazówkowe, komórki pseudowskazówkowe, toksyczne leukocyty w skupiskach ze śluzem szyjki macicy.



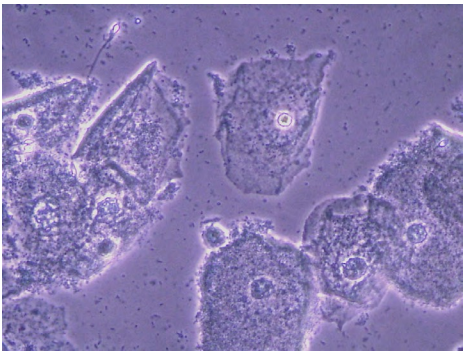
RYCINA 57 Bakteryjne zapalenie pochwy. Obecność komórek wskazujących



RYCINA 58 Bakteryjne zapalenie pochwy, w tym przypadku z towarzyszącym stanem zapalnym.

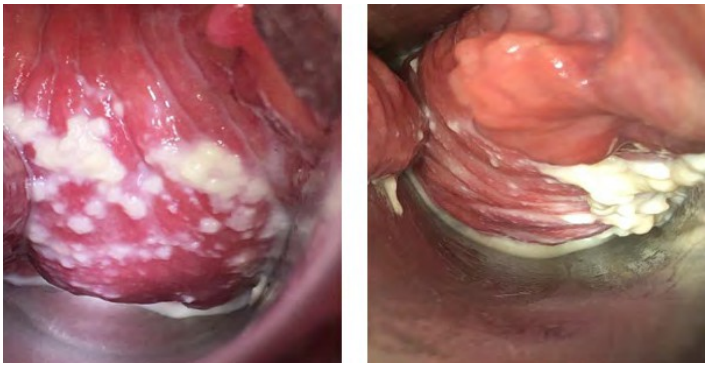


RYCINA 59 Ciężka dysbioza.

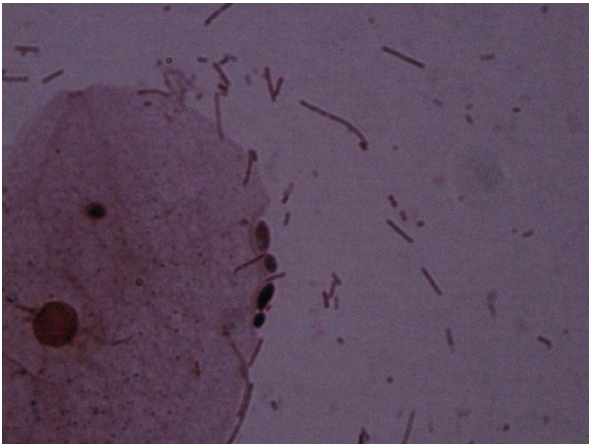


RYCINA 60 Komórki wskazówkowe, dysbioza, bakteryjne zapalenie pochwy i plemniki.

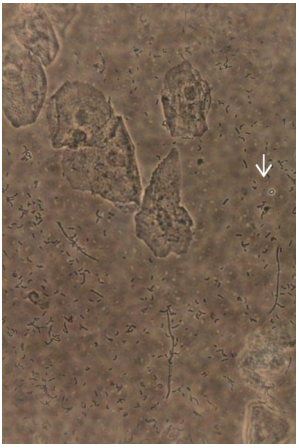
5.5 Zapalenie pochwy wywołane przez Candida



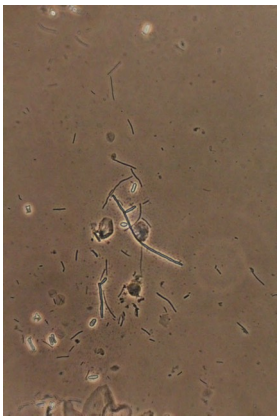
RYCINA 61 a+b *Zapalenie pochwy wywołane przez Candida albicans.*



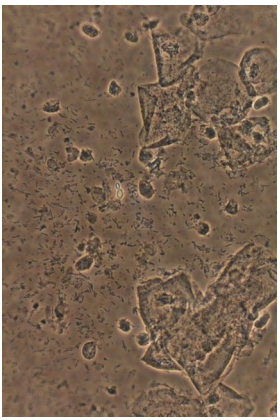
RYC. 62 Barwienie metodą Grama, powiększenie 1000x (olej). Przyleganie komórek Candida do komórek nabłonka pochwy na początku zapalenia pochwy wywołanego przez Candida. Blastospory są formami kolonizującymi Candida spp. W przypadku zakażenia zaczynają przylegać do nabłonka pochwy, tworząc strzępki zarodkowe i pseudohyfy; wiele pseudohyf nazywanych jest pseudomielicą (prawdziwe strzępki tworzą dermatofity i pleśnie, ale *C. albicans* w niektórych przypadkach jest również zdolna do tworzenia prawdziwej grzybni, a także chlamydospor).



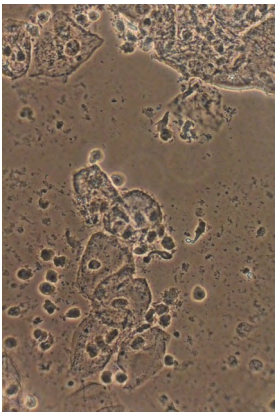
RYCINA 63 Normalne i wydłużone pałeczki kwasu mlekowego, jedna mała blastospora (strzałka), prawdopodobnie *C. (Nakaseomyces) glabrata*. Obecnie gatunek ten nosi nazwę *Nakaseomyces (N.) glabrata* (niektórzy nazywają go *N. glabratus*). Dla większej przejrzystości używamy nazwy *C. glabrata*.



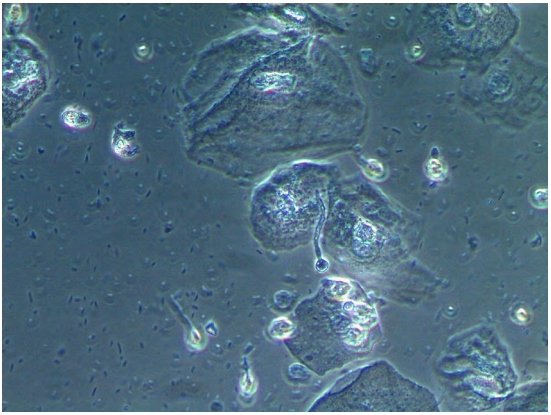
RYCINA 64 Zapalenie pochwy wywołane przez Candida. Pseudogrzybnia, blastospory, pałeczki kwasu mlekowego.



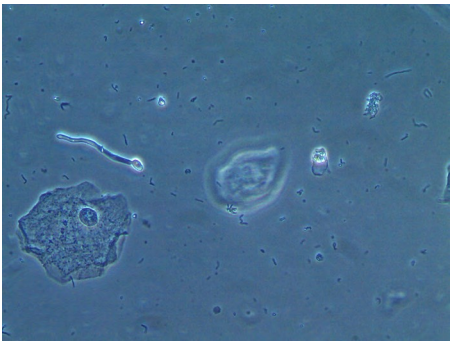
RYCINA 65 Cytoliza przedmiesiączkowa, blastospory.



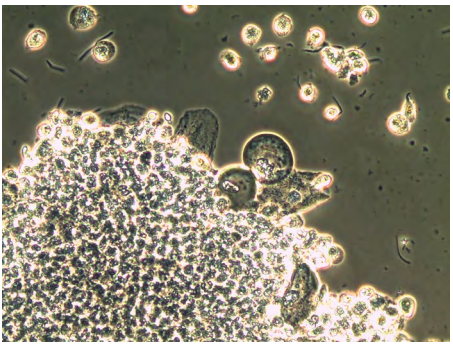
RYCINA 66 Cytoliza przedmiesiączkowa, dwie małe blastospory, prawdopodobnie *C. glabrata*.



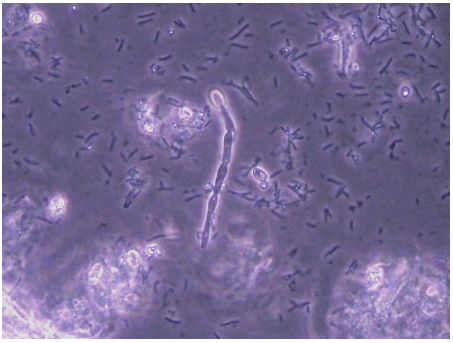
RYCINA 67 Krótkie pałeczki kwasu mlekowego, blastospora z rurką zarodkową/pseudomielcjum, nietoksyczne leukocyty.



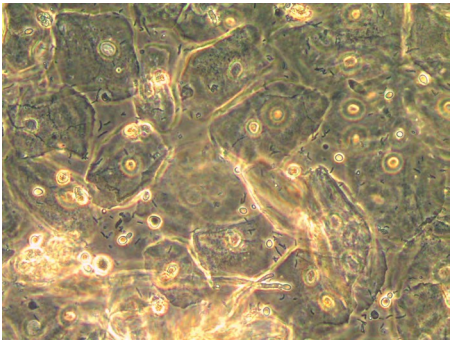
RYCINA 68 Blastospora i blastospora z wyrostkiem zarodkowym/pseudomielą.



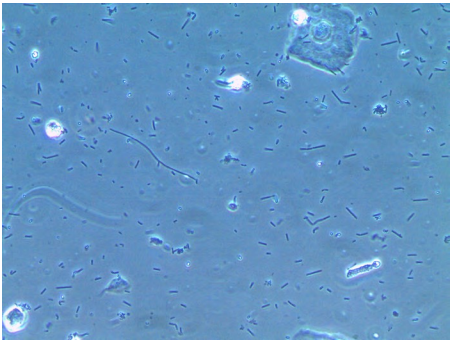
RYCINA 69 Bardzo gęste warstwy nietoksycznych leukocytów, pałeczek kwasu mlekowego i blastospor.



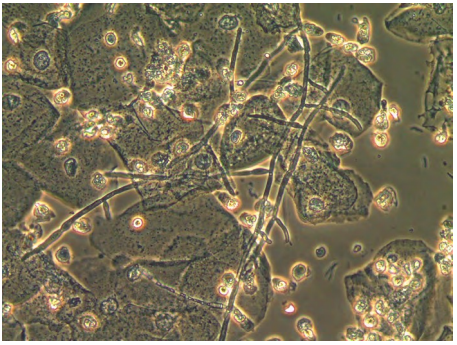
RYCINA 70 Zapalenie pochwy wywołane przez *Candida albicans* (potwierdzone badaniem hodowlanym): pałeczki kwasu mlekowego, blastospory, pseudomielecje. W prawej górnej części widoczna jest główka plemnika.



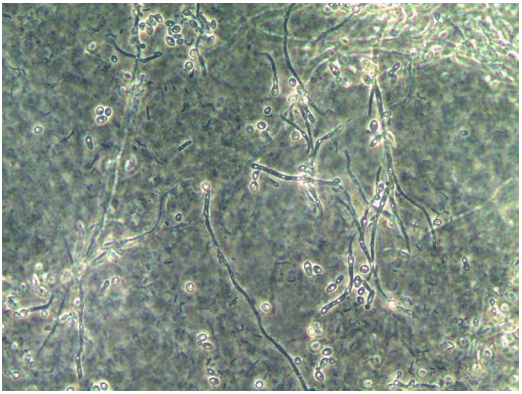
RYCINA 71 Zbyt gęsta warstwa preparatu na mokro. Jednak nadal można zidentyfikować blastospory i pseudomielecje!



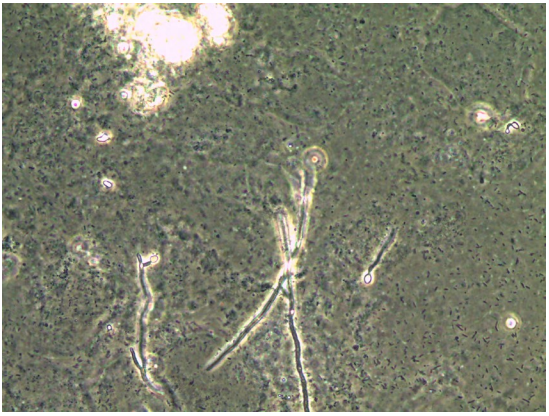
RYCINA 72 Krótkie i długie pałeczki *(L. vaginalis)* oraz pseudohyfy/blastospory *C. albicans* (potwierdzone hodowlą).



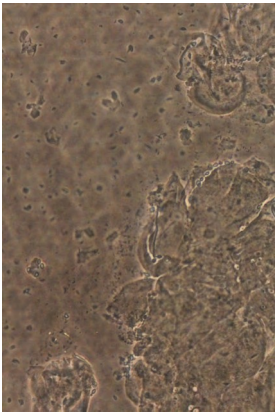
RYCINA 73 Kandydoza sromu i pochwy, pseudomielecje.



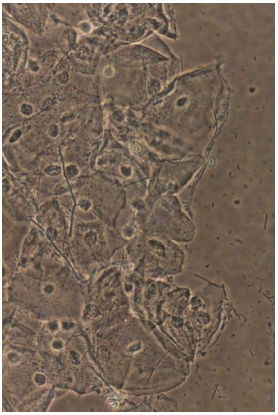
RYCINA 74 KOH 15%, rozpuszczone komórki nabłonka pochwy, skupiska blastospor i pseudomielii *Candida spp*.



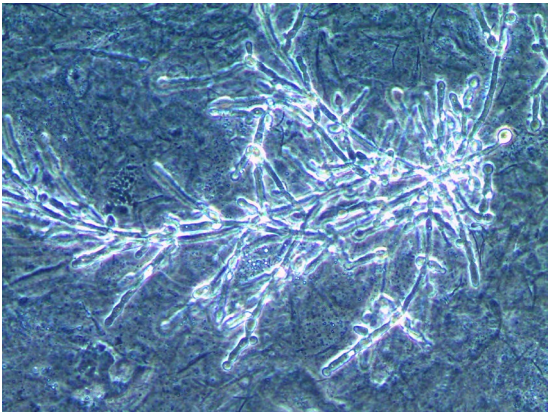
RYCINA 75 Preparat mokry wykonany przy użyciu KOH – roztwór spowodował rozpuszczenie komórek nabłonkowych. Blastospory i pseudomielec.



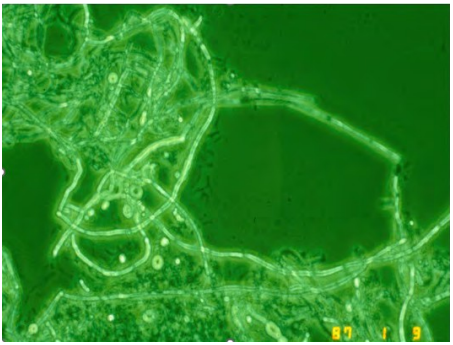
RYCINA 76 Pseudomielec i blastospory.



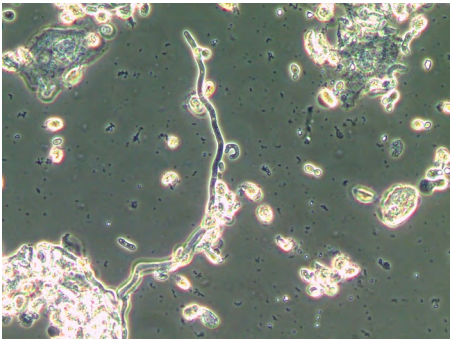
RYCINA 77 Długie pałeczki kwasu mlekowego („lepto-thrix"), pseudomielec.



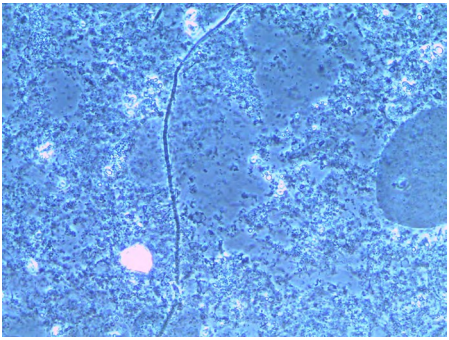
RYCINA 78 Pseudomielec.



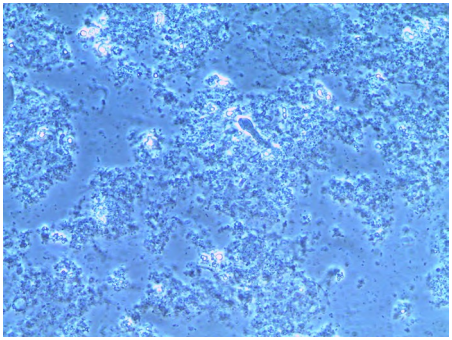
RYCINA 79 Włókna tamponu, brak drożdżaków! Zielone tło. Kolor uzyskany dzięki zielonemu filtrowi, który chroni oczy podczas długich sesji mikroskopowych.



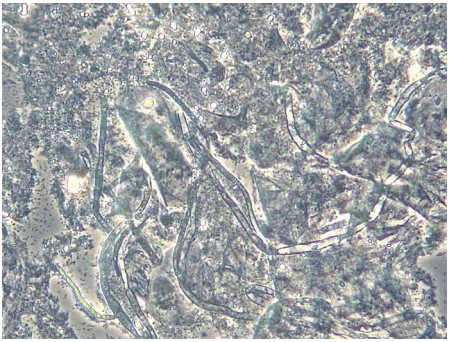
RYCINA 80 Dysbioza, pseudomielec, blastospory, nietoksyczne leukocyty, cytoliza.



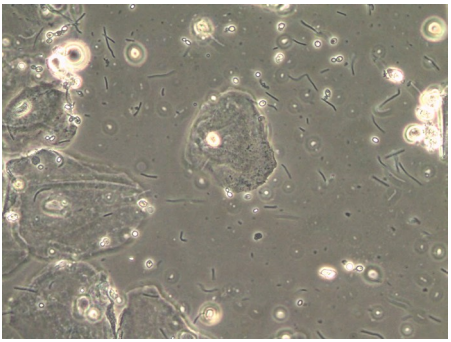
RYCINA 81 Ciężka dysbioza (BV), długie pseudomielecje, niektóre blastospory.



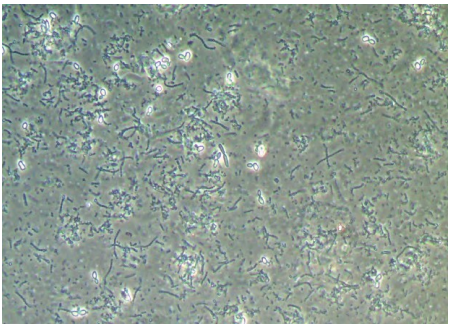
RYCINA 82 Ciężka dysbioza/BV, blastospora i duża pseudohyfa.



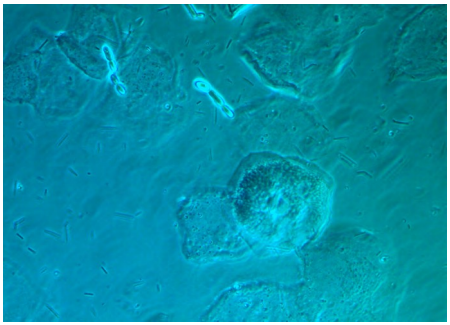
RYCINA 83 Dysbioza i pseudomielecje.



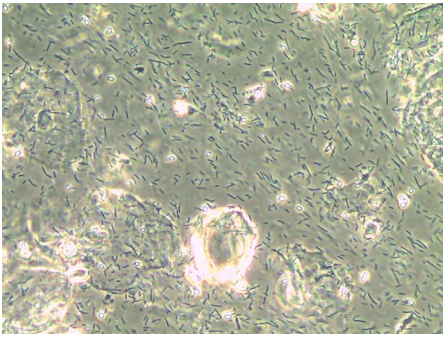
RYCINA 84 Pałeczki kwasu mlekowego i wiele małych blastospor (potwierdzonych hodowlą) *C. glabrata*, które mają średnią wielkość 3–6 µm, podczas gdy *C. albicans* mają średnią wielkość 7–10 µm i wydają się większe w polu mikroskopowym



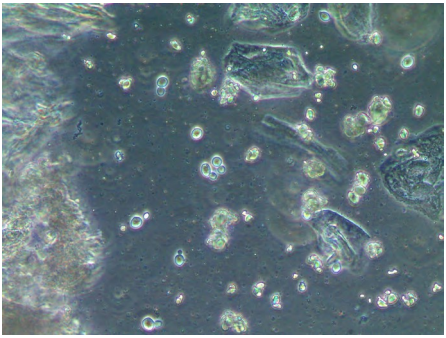
RYCINA 85 Roztwór KOH 15%. Zbiory małych blastospor (potwierdzone hodowlą *C. glabrata*) oraz zbiory paciorkowców, prawdopodobnie *Streptococcus agalactiae*. Pacjent nie miał żadnych objawów i nie był leczony.



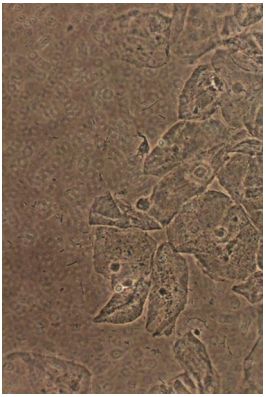
RYCINA 86 Blastospory (potwierdzone hodowlą) *Pichia kudri-avzevii* (dawniej *C. krusei*). Drożdżaki te (podobnie jak *N. glabrata*) są bliżej spokrewnione z rodzajem *Saccharomyces* i są mniej patogenne w pochwie kobiet z prawidłową odpornością. Dla lepszego zrozumienia nadal używamy *nazwy C. krusei*.



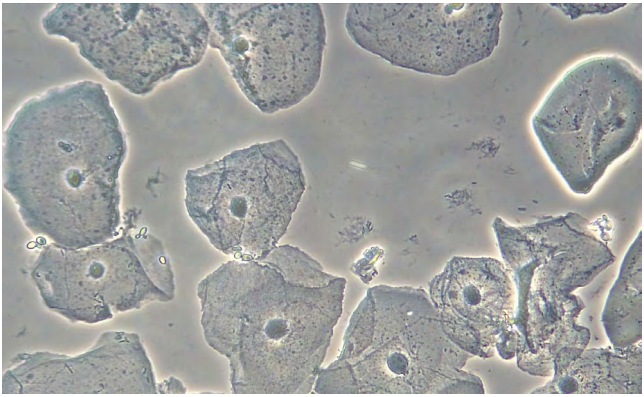
RYCINA 87 Liczne małe blastospory *C. glabrata* (potwierdzone hodowlą), pałeczki kwasu mlekowego. Brak objawów (kolonizacja), brak leczenia!



RYCINA 88 Duże blastospory *Saccharomyces cerevisiae* (potwierdzone hodowlą), pałeczki kwasu mlekowego, niektóre leukocyty (nieostre).



RYCINA 89 Blastospory *S. cerevisiae* (potwierdzone w hodowli).

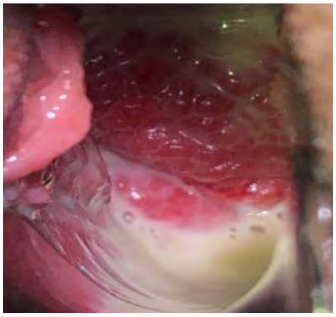


RYCINA 90 Blastospory *C. lusitaniae* (potwierdzone hodowlą). Gatunek ten przebiega bezobjawowo u kobiet bez obniżonej odporności.

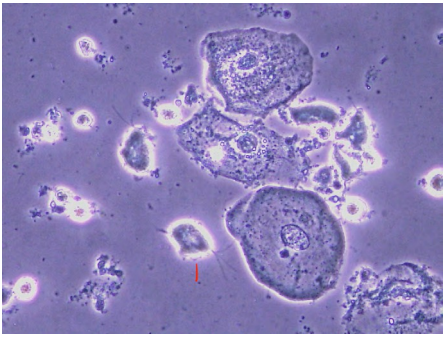
5.6 Rzęsistkowica



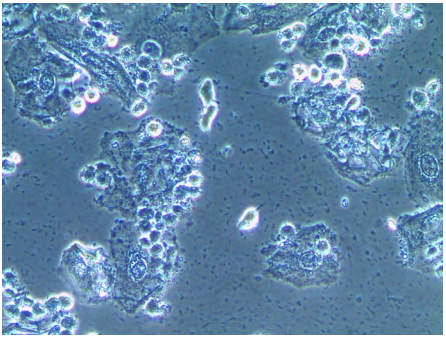
RYCINA 91 Ciężkie zapalenie sromu u pacjentki z rzęsistkowicą.



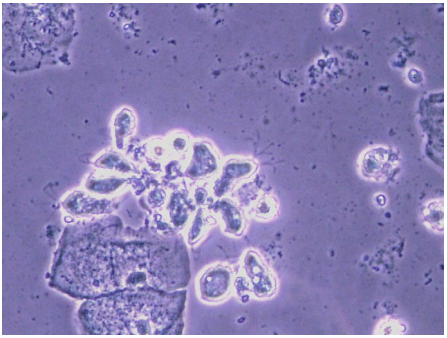
RYCINA 92 Rzęsistkowica.



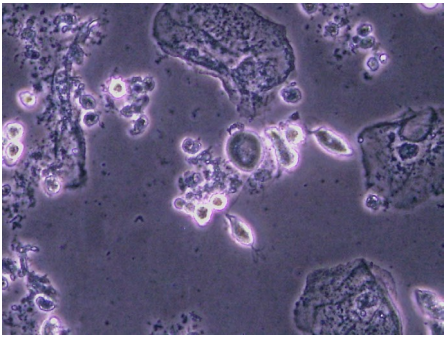
RYCINA 93 Rzęsistkowica. Trichomonas vaginalis z wiciami, typowym „szczupakiem" na drugim biegunie, falistą błoną w pobliżu bieguna wici (czerwony znak). Poważnie zaburzona mikroflora pochwy, ale brak komórek wskazówkowych, brak BV, toksyczne leukocyty.



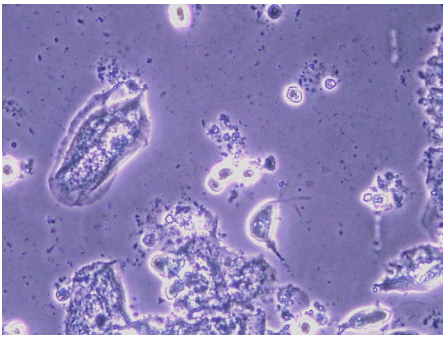
RYCINA 94 Rzęsistkowica i poważnie zaburzona mikroflora, brak typowych komórek wskazówkowych, obecność toksycznych leukocytów.



RYCINA 95 Rzęsistkowica.



RYCINA 96 Rzęsistkowica.

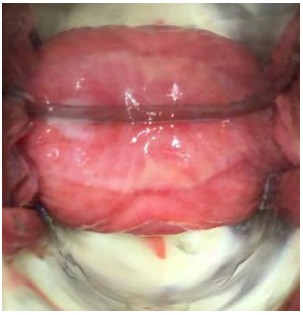


RYCINA 97 Rzęsistkowica. Rzęsistki i wiciowce.

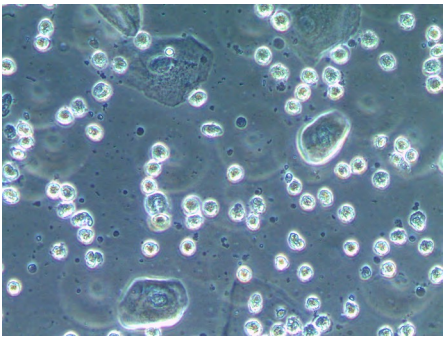
5.7 Aerobowe zapalenie pochwy (AV)/łuszczące się zapalenie pochwy (DIV)



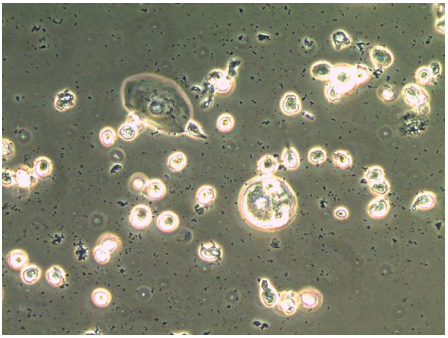
RYCINA 98 AV: zapalenie pochwy o wartości pH 5,5 i żółtej wydzielinie (niewidocznej na zdjęciu).



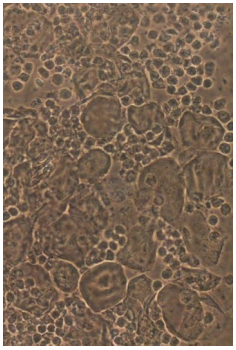
RYCINA 99 DIV: ciężkie zapalenie pochwy, pH 6 i objawy złuszczania z obfitymi żółtymi wydzielinami.



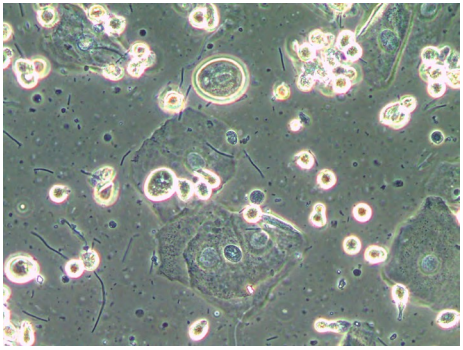
RYCINA 100 AV/DIV. Leukocyty toksyczne, nieliczna mikroflora kokowata, brak komórek typu clue, małe komórki pośrednie/duże komórki parabasalne, jedna komórka pośrednia. Wartość pH wydzieliny na rycinach 100–104 jest znacznie podwyższona. W hodowli często identyfikuje się S. agalactiae lub S. anginosis.



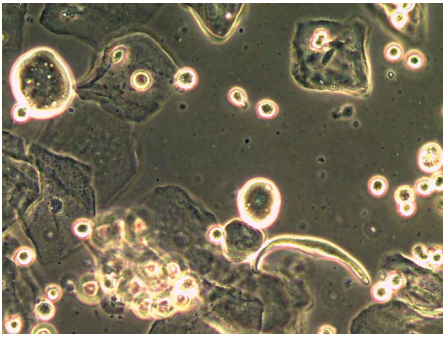
RYCINA 101 Ciężki AV/DIV.



RYCINA 102 Ciężki AV/DIV. Wiele toksycznych leukocytów, komórek parabasowych, komórek pośrednich, rzadka mikroflora.



RYCINA 103 Świetlna AV: komórki pośrednie, trzy komórki parabasalne, mikroflora kokowata, ale nadal dużo pałeczek kwasu mlekowego.



RYCINA 104 DIV: komórki powierzchniowe i pośrednie, komórki parabasalne, toksyczne leukocyty, rzadka mikroflora kokowata.

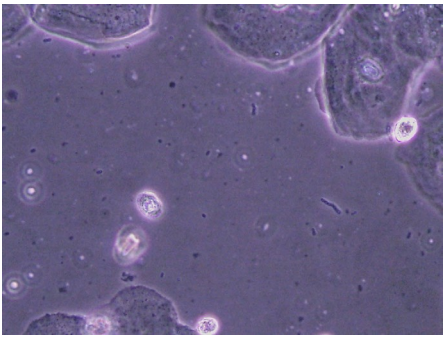
5.8 Różnorodne



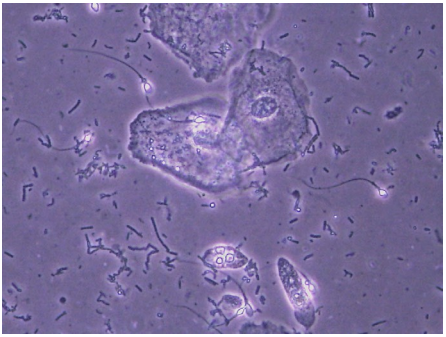
RYCINA 105 *Streptococcus pyogenes* /Grupa A
S. zapalenie sromu i pochwy – 6-latka.



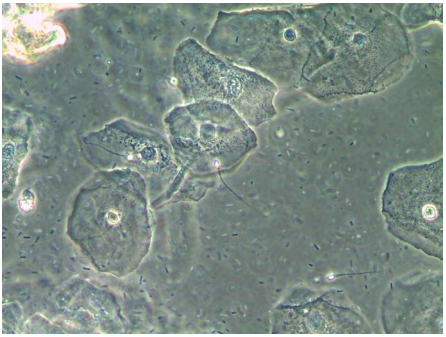
RYCINA 106 Zapalenie sromu i pochwy wywołane przez paciorkowce grupy A – 32-latka. Karmiąca piersią. Zanik.



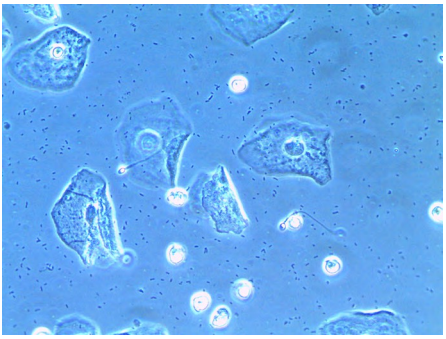
RYCINA 107 Łańcuch paciorkowców u pacjentki z zapaleniem sromu i pochwy wywołanym przez *S.* pyogenes.



RYCINA 108 Plemniki, pałeczki kwasu mlekowego, niektóre nietoksyczne leukocyty.

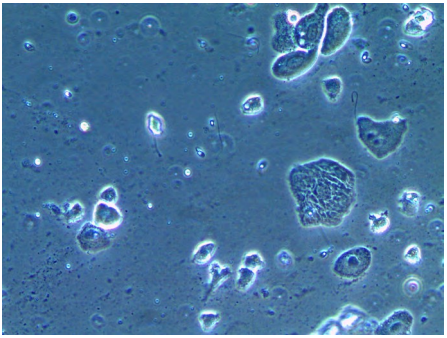


RYCINA 109 Nieruchome plemniki, krótkie bakterie z rodzaju Lactobacillus. Lactobacillus *(L. iners?),*

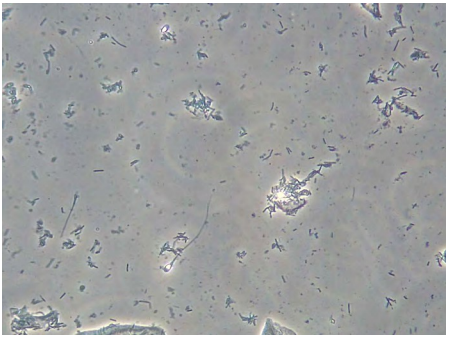


RYCINA 110 Nieruchome plemniki, krótkie bakterie z rodzaju

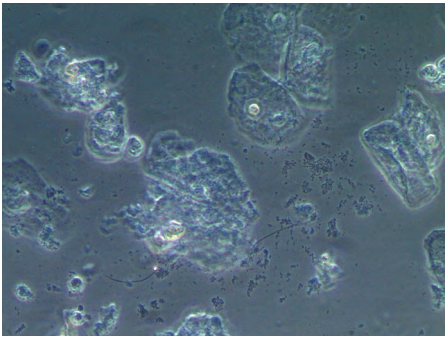
niektóre inne, między normalną a nieprawidłową mikroflorą, niektóre nietoksyczne leukocyty.



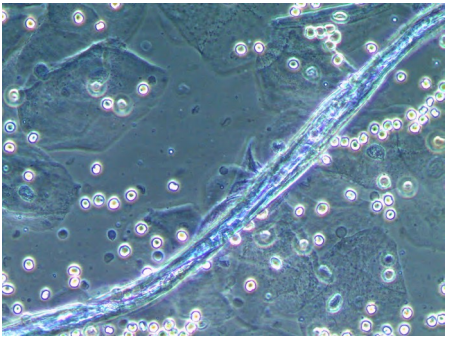
RYCINA 111 Nieruchome plemniki, główki i ogonki plemników, zaburzona mikroflora bez pałeczek kwasu mlekowego, komórki parabasalne (po menopauzie).



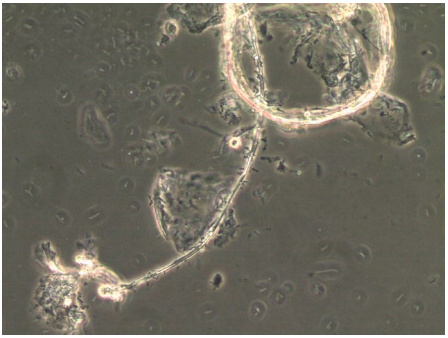
RYCINA 112 Główki i ogonki plemników, pałeczki kwasu mlekowego, cytoliza.



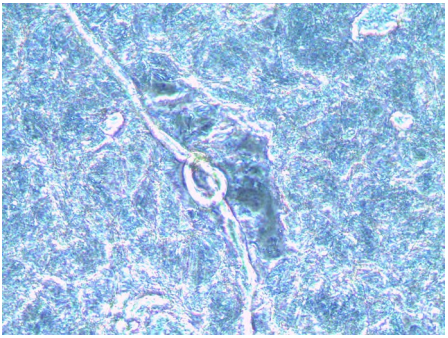
RYCINA 113 Dysbioza, ogonki plemników.



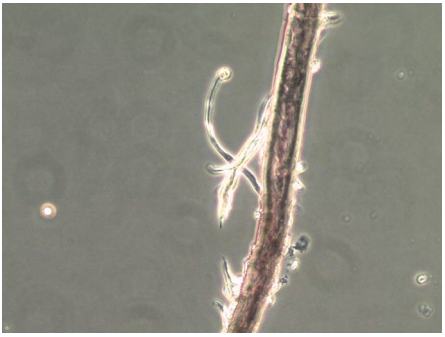
RYCINA 114 Miesiączka, erytrocyty, włókno tamponu.



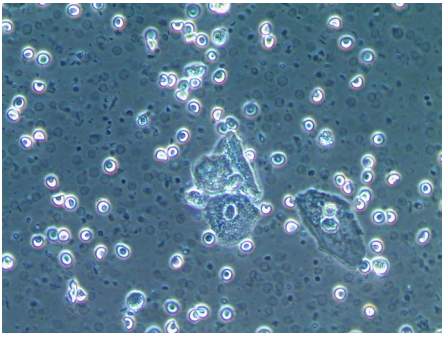
RYCINA 115 Włókno.



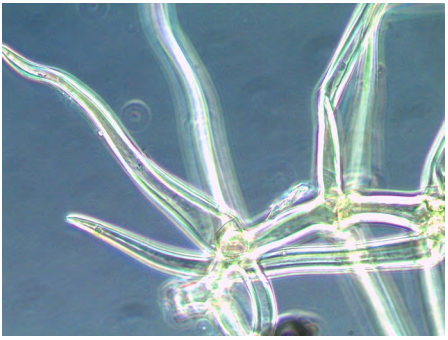
RYCINA 116 Węzeł włókna w grubych warstwach komórek nabłonkowych.



RYCINA 117 Rozszczepiony włos.



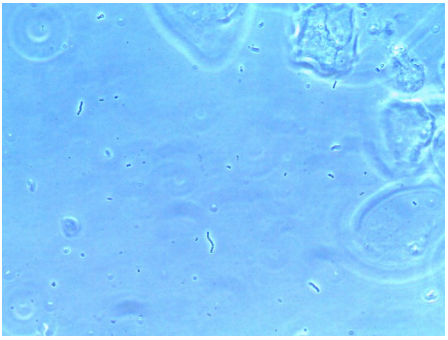
RYCINA 118 Krwinki czerwone.



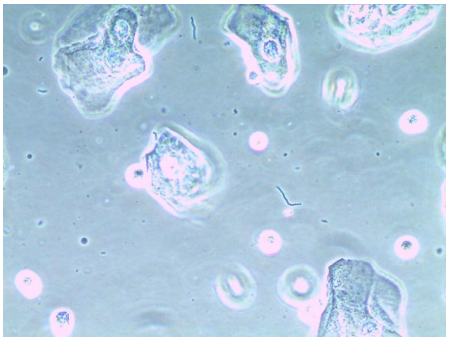
RYSUNEK 119 Nieznany obiekt.



RYCINA 120 Brak drożdży, prawdopodobnie włókno.



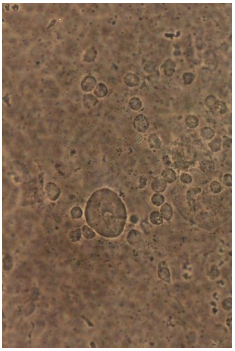
RYCINA 121 Paciorkowce, łatwo odróżnialne od pałeczek kwasu mlekowego dzięki wyglądowi przypominającemu łańcuch pereł.



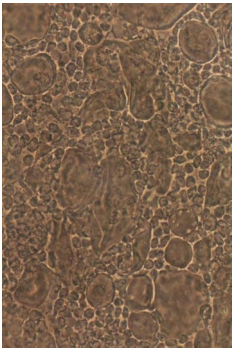
RYCINA 122 Paciorkowce, brak pałeczek kwasu mlekowego, komórki pośrednie. Zobacz również komentarz do rysunku 121!



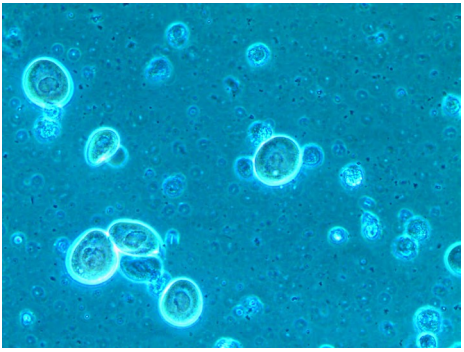
RYCINA 123 Śluz, zjawisko paprociowe.



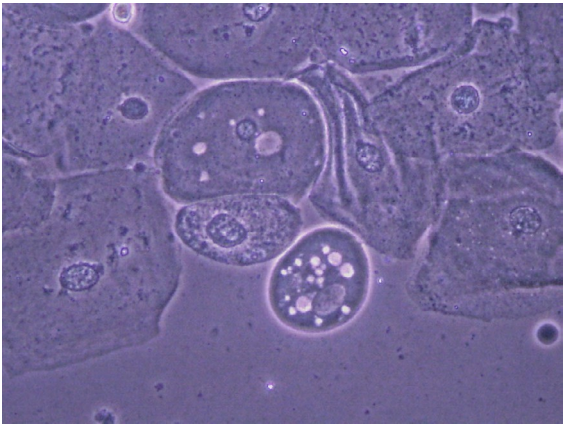
RYCINA 124 41 lat, erozyjny liszaj płaski pochwy: komórka parabasowa, toksyczne leukocyty.



RYCINA 125 Erozja pochwy wywołana liszajem płaskim: komórki parabasalne, toksyczne leukocyty.



RYCINA 126 Erozja wywołana liszajem płaskim pochwy u kobiety przed menopauzą: przewaga komórek przypodstawnych, toksyczne leukocyty, poważnie zaburzona mikroflora, pH 7.



RYCINA 127 Nieprawidłowa mikroflora bez pałeczek kwasu mlekowego, komórki pośrednie i poważnie nieprawidłowe komórki nabłonkowe z wakuolami u pacjenta zakażonego wirusem HIV.

BIBLIOGRAFIA

1. Zernike F. Jak odkryłem kontrast fazowy. Science. 11 marca 1955 r.; 121(3141):345-9.
2. Gerlach D. Historia mikroskopii: Harri Deutsch Verlag; 2009.
3. Neumann G, Schäfer A, Mendling W. Mikroskopia z kontrastem fazowym w praktyce ginekologicznej: Springer-Verlag; 2014.
4. Vieira-Baptista P, Grincevičienė Š, Oliveira C, Fonseca-Moutinho J, Cherey F, Stockdale CK. Wytyczne Międzynarodowego Towarzystwa Badań nad Chorobami Sromu i Pochwy dotyczące mikroskopii preparatów mokrych z pochwy: sposób wykonywania, zastosowania i interpretacja. J Low Genit Tract Dis. 1 kwietnia 2021 r.; 25(2):172-80.
5. Vieira-Baptista P, Stockdale CK, Sobel JD. Zalecenia Międzynarodowego Towarzystwa Badań nad Chorobami Sromu i Pochwy dotyczące diagnostyki i leczenia zapalenia pochwy. Lizbona: Admedic; 2023.
6. Sherrard J, Wilson J, Donders G, Mendling W, Jensen JS. Wytyczne Europejskiej Międzynarodowej Unii ds. Zakażeń Przenoszonych Drogą Płciową (IUSTI) i Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) z 2018 r. dotyczące postępowania w przypadku upławów. Int J STD AIDS. Listopad 2018; 29(13):1258-72.
7. Workowski KA, Bachmann LH, Chan PA, Johnston CM, Muzny CA, Park I i in. Wytyczne dotyczące leczenia chorób przenoszonych drogą płciową, 2021. MMWR Recomm Rep. 23 lipca 2021 r.; 70(4):1-187.
8. Nyirjesy P, Banker WM, Bonus TM. Świadomość lekarzy i przestrzeganie wytycznych dotyczących praktyki klinicznej w diagnostyce pacjentek z zapaleniem pochwy: retrospektywny przegląd kart pacjentek. Popul Health Manag. Październik 2020; 23(S1):S13-s21.
9. Lev-Sagie A, Strauss D, Ben Chetrit A. Skuteczność diagnostyczna automatycznego badania mikroskopowego i testu pH w rozpoznawaniu zapalenia pochwy. NPJ Digit Med. 13 kwietnia 2023 r.; 6(1):66.
10. Sobel JD. Zautomatyzowana mikroskopia i test pH w diagnostyce zapalenia pochwy – koniec empiryzmu? NPJ Digit Med. 6 września 2023 r.; 6(1):167.
11. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definicja typu nieprawidłowej flory pochwy, który różni się od bakteryjnego zapalenia pochwy: tlenowe zapalenie pochwy. Bjog. Styczeń 2002; 109(1):34-43.
12. Vieira-Baptista P, Ventolini G, Mendling W. Inne postacie zapalenia pochwy (aerobowe zapalenie pochwy/łuszczące się zapalenie pochwy, cytolityczne zapalenie pochwy, Leptothrix). W: Vieira-Baptista P, de Seta F, red. Infekcje w ginekologii: FIGO; 2023.
13. Lang W. Mikroskopia z kontrastem interferencyjnym Nomarskiego. Zeiss Information nr 70, rok 16 (1968), str. 114-120
14. Swidsinki A., Guschin A., Tang Q., Dörffel Y., Verstraelen H., Tertychnyy A., Khayrullina G., Luo X., Sobel JD., Jiang X., Kandydoza sromu i pochwy: zmiany histologiczne mają charakter przede wszystkim polimikrobiologiczny i inwazyjny oraz nie zawierają biofilmów – Am J Obstet Gynecol styczeń 2019; 220(1): 91e1-91e8. Doi: 10.1016/j.ajog.2018.10.023. Epub 25 października 2018 r. PMID: 30595144

Źródło zdjęć

Wszystkie zdjęcia zostały zebrane przez autorów, chyba że zaznaczono inaczej.
Ryciny 7–9 oraz podpisy do nich zostały udostępnione dzięki uprzejmości prof. Alexandra Swidsinskiego z Berlina.