

УНИВЕРЗИТЕТ “СВ.КИРИЛ И МЕТОДИЈ” СКОПЈЕ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Докторска дисертација

# Вагинален микробиом кај женска популација во репродуктивен период

---

М-р Д-р Корнелија Трајкова

Ментор: Проф. Д-р Милена Петровска

Скопје, 2019

## РЕЗИМЕ

Молекуларна анализа на вагиналниот микробиом (ВМ) е една од најактуелните теми од областа на репродуктивното здравје и перинаталната медицина, како основа за развој на нови стратегии за предикција, превенција и третман на генитални инфекции.

**ЦЕЛИ** Генетско детерминирање на видови на лактобацили во вагинален секрет и најчести предизвикувачи на бактериска вагиноза кај наша популација - молекуларна анализа на ВМ од аспект на видови на лактобацили кај испитанички со нормален наод, интермедиерна флора и бактериска вагиноза, потврдени со класични микробиолошки и клинички параметри. Компарација на клинички параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза со молекуларни тестови и докажување на можни причинители. Проценка за развој на едноставен метод за анализа на ВМ.

**МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ** Проспективна студија на 110 испитанички во репродуктивен период, кои се јавија за гинеколошки преглед во КБ Ацибадем Систина. Вагиналниот преглед вклучи одредување на рН вредноста и земање два примероци од вагиналните форниси со стерилно стапче за бактериолошка и молекуларна анализа. Од примерокот за бактериолошка анализа се направи проценка по Nugent (Нугент) скор и групирање во три групи: нормален наод (0-3); интермедиерна флора (4-6) и бактериска вагиноза (7-10). Примерокот за молекуларна анализа е веднаш замрзнат на  $-20^{\circ}\text{C}$  и така транспортиран во лабораторијата за молекуларна анализа во Македонска Академија на Науки и Уметности. По случаен избор се одбрани 93 примероци за молекуларна анализа, за докажување на видови на лактобацили, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma spp* и *Ureaplasma spp*. Идентификацијата е направена со амплификација на 16S rRNK гени. Комплетниот 16S rRNK ген (1,5кб) е амплифициран со PCR со употреба на прајмери и секвенционирани. За идентификација на изолатите се компарирани секвенците. Идентификацијата се смета за потврдена кај 99-100% хомологност на секвенцата со типизираниот вид.

**РЕЗУЛТАТИ** Колонизацијата со *Lactobacillus* сигнификантно асоцира со нормална вагинална флора во споредба со бактериска вагиноза. Докажани се 22 видови на лактобацили, од кои најчесто застапени се *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*. Колонизацијата со *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* сигнификантно асоцира со нормалната вагинална флора и ја намалува веројатноста за појава на бактериска вагиноза. Постои статистички сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на лактобацили во групата со нормална флора во споредба со бактериска вагиноза, како и во групата со интермедиерен наод наспроти бактериска вагиноза. Со молекуларна анализа се потврди присуство на причинители на бактериска вагиноза. Добиен е приказ за типовите на лактобацили и креирано генеолошко стебло. Се докажа сигнификантна корелација на клиничките параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза со молекуларните.

**Клучни зборови:** Вагинален микробиом, *Lactobacillus*, бактериска вагиноза, молекуларна анализа.

## SUMMARY

The molecular analysis of the vaginal microbiome (VM) is one of the most interesting current issues in the field of reproductive health and perinatal medicine, as a basis for developing new strategies for prediction, prevention and treatment of genital infections.

**OBJECTIVES:** Genetical determination of the *Lactobacillus Species* in vaginal discharge and the most common causes of bacterial vaginosis in our population, i.e. molecular analysis of the vaginal microbiome in terms of the types of *Lactobacillus*, among women with normal findings, intermediate flora and bacterial vaginosis, proved with standard microbiological and clinical parameters. To compare the clinical parameters and standard microbiological analysis for bacterial vaginosis with molecular tests and to determine the possible causes. To make an assessment for development of a simple method for analysis of the vaginal microbiome.

**MATERIAL AND METHODS:** Prospective study of 110 reproductive-age women who referred for gynecological examination at CH Acibadem Sistina. The vaginal examination included measurement of the vaginal pH and taking two samples, with sterile swab, from the vaginal fornices, for bacteriological and molecular analysis. The first sample was used for the Nugent score analysis and divided the women in three groups: normal finding (0-3); intermediate flora (4-6) and bacterial vaginosis (7-10). The sample for molecular analysis was immediately frozen at -20 ° C and thus transported to the Laboratory at the Academy of Sciences and Arts of Republic of North Macedonia. 93 samples were selected randomly for molecular analysis of *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma spp* and *Ureaplasma spp*. Identification was done by amplification of 16S rRNK genes. The complete 16S rRNK gene (1.5 kb) was amplified by PCR using primers and sequenced. Sequences were compared for identification of isolates. Based on the differences, a genealogical tree- dendrogram was created. Identification is considered to be confirmed at 99-100% homology to the type strain sequence.

**RESULTS:** Colonization with *Lactobacillus* significantly associates with normal vaginal flora compared with bacterial vaginosis. 22 Species of *Lactobacillus* have been detected, most commonly *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus casei*. Colonization with *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus casei* significantly associates with normal vaginal flora and reduces the chance of registration of bacterial vaginosis. The presence of *Lactobacilli* has been verified in all women with normal findings. There was a statistically significant difference in the percentage of *Lactobacilli* in the group with normal flora compared to bacterial vaginosis, as well as in the group with intermediate finding versus bacterial vaginosis. Molecular analysis confirmed the presence of causative agents of bacterial vaginosis. An overview of the types of lactobacilli was obtained, and a dendrogram was created. There was a significant correlation of clinical parameters and classical microbiological findings for bacterial vaginosis with molecular markers.

**Keywords:** Vaginal microbiome, *Lactobacillus*, bacterial vaginosis, molecular analysis.

## Листа на користени кратенки

ВМ - вагинален микробиом

СПИ - сексуално преносливи инфекции

PCR - Polimerase chain reaction Полимеразно верижна реакција

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

PAP / ПАП Папаниколау брис

PVU - portio vaginalis uteri

МАНУ - Академија на науките и уметностите на Република Северна Македонија

TRIS - trisaminomethane

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

FDA –Food and Drug Administration

РНК– рибонуклеинска киселина

НФ - нормална флора

ББВ - без бактериска вагиноза

ИМ - интермедиерна флора

ИМБВ - интермедиерен наод за бактериска вагиноза

БВ - бактериска вагиноза

МА - молекуларна анализа

ДИФ - директна имунофлуоресценција

CIN - Cervical intraepithelial neoplasia

ASCUS - Atypical squamous cells of undetermined significance

AGC - Atypical glandular cells

ВМІ – body mass index - телесна маса за обезитет

GBS - *Streptococcus agalactiae*, бета хемолитичен стрептокок од групата В

## Содржина

РЕЗИМЕ.....	2
SUMMARY .....	3
Листа на користени кратенки .....	4
1. ВОВЕД.....	8
1.1. Бактериска вагиноза.....	10
1.2. Дијагноза на бактериска вагиноза .....	11
1.2.1. Amsel критериуми: .....	11
1.2.2. Нану/Ison критериуми .....	11
1.2.3. Nugent-скор:.....	12
1.3. <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	12
1.4. <i>Mycoplasma spp</i> и <i>Ureaplasma spp</i> .....	12
1.5. Молекуларни методи во микробиологијата .....	13
1.5.1. Амплификација со полимераза верижна реакција .....	14
1.6. Пробиотици.....	14
2. МОТИВ И ЦЕЛИ .....	15
2.1. Мотив.....	15
2.2. Цели.....	16
2.3. Хипотеза.....	16
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	17
3.1. Протокол за работа.....	17
3.1.1. Постапка на работа:.....	18
3.2. ДНК изолирање и секвенционирање.....	20
3.2.1. Биолошки примероци .....	20
3.2.2. Екстракција на ДНК.....	20
3.2.3. Анализа на PCR амплифицираните фрагменти .....	22
3.3. Статистичка обработка .....	24
4. РЕЗУЛТАТИ .....	25
4.1. Молекуларна анализа на вагиналниот микробиом .....	27
4.2. Докажани видови на <i>Lactobacillus</i> .....	28
4.2.1. Дистрибуција на лактобацилите по групи на испитанички .....	34

4.2.2. Статистичка анализа за значењето на поединечни видови лактобацили и БВ ...	36
4.3. рН вредност на вагиналниот секрет .....	37
4.4. Брис од вагина – микробиолошка анализа .....	41
4.4.1. <i>Candida spp.</i> и <i>C. albicans</i> .....	42
4.5. <i>Gardnerella vaginalis</i> докажана со микробиолошки и молекуларни методи.....	43
4.6. <i>Ureaplasma urealyticum</i> докажана со микробиолошки и молекуларни.....	48
4.7. <i>Mycoplasma hominis</i> докажана со микробиолошки и молекуларни методи .....	51
4.8. Докажан антиген на <i>Chlamydia trachomatis</i> во цервикален брис .....	54
4.9. Наод од цитолошка анализа – брис по Papanicolau (РАР/ПАП).....	56
4.10. Наод од HPV скрининг .....	59
4.11. Фаза од менструален циклус при земање на брисевите .....	62
4.12. Субјективни симптоми .....	64
4.12.1. Поинтензивен вагинален секрет.....	64
4.12.2. Често мокрење или печење при мокрење.....	65
4.12.3. Пецкање во интимната регија.....	66
4.13. Животни навики .....	67
4.13.1. Внес на пробиотици секојдневно со храна .....	67
4.13.2. Внес на суплементи со пробиотици.....	69
4.13.3. Употреба на препарати за вагинална апликација со пробиотик и/или млечна киселина.....	70
4.13.4. Тоалета на надворешни гениталии .....	73
4.14. Орални контрацептивни хормонски препарати .....	74
4.15. Видови на лактобацили кај испитанички со два или повеќе позитивни наоди .....	75
4.16. Генеолошко стебло - дендрограм .....	77
5. ДИСКУСИЈА .....	79
5.1. Најчести видови на лактобацили .....	79
5.1.1. <i>Lactobacillus iners</i> .....	79
5.1.2. <i>Lactobacillus crispatus</i> .....	80
5.1.3. <i>Lactobacillus casei</i> група (LCG) .....	81
5.1.4. <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	81
5.1.5. <i>Lactobacillus jensenii</i> .....	81

5.2. Значење на најчестите видови на лактобацили за вагиналното миље .....	82
5.3. Карактеристики на групата со нормален наод .....	83
5.4. Улога на млечна киселина и H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	84
5.5. pH вредност на вагинален секрет .....	85
5.6. Карактеристики на групата со интермедиерен наод.....	87
5.7. Карактеристики на групата со бактериска вагиноза.....	88
5.8. Компарација на клиничките параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза со молекуларни тестови.....	90
5.9. Некултурелни методи за дијагноза на бактериска вагиноза.....	92
5.10. <i>Candida spp.</i> .....	94
5.11. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	94
5.12. <i>Ureaplasma spp.</i> .....	95
5.13. <i>Mycoplasma genitalium</i> .....	97
5.14. Вагинален микробиом, HPV, CIN и цервикален карцином .....	98
5.15. Бактериска вагиноза и инфекција со <i>Humanpapilloma virus (HPV)</i> .....	99
5.16. Субјективни симптоми .....	100
5.17. Навики, тоалета на надворешни гениталии.....	100
5.18. Пробиотици и пребиотици .....	101
5.19. Флукуацина вагиналниот микробиом во однос на хормонските промени во текот на менструелниот циклус .....	103
5.20. Дијагностички и терапевтски стратегии .....	104
6. ЗАКЛУЧОЦИ .....	108
Импликации во пракса .....	110
7. ЛИТЕРАТУРА.....	111

## 1. ВОВЕД

Хуманите микробиоми се агрегати на микроорганизми присутни во дефинирани делови на човечкото тело. Тие претставуваат еден вид заедници на микроорганизми од различни специеси кои ко-егзистираат и имаат пред се заштитна улога. Типот на микроорганизми во одреден микробиом зависи од различни фактори кои влијаат врз нив (Peterson J et al, 2009).

Концептот на „хуман микробиом“ за прв пат е предложен од Joshua Lederberg, кој го „измислил“ терминот микробиом како синоним за еколошка заедница на комменсали, симбиотски и патогени микроорганизми кои буквално го делат со нас нашиот телесен простор (Lederberg J et McCray AT, 2001).

Еден ваков агрегат е вагиналниот микробиом, кој претставува динамичен, балансиран систем на микроорганизми. Тоа е биосистем во хуманата вагина кој под нормални услови обезбедува баланс меѓу физиолошките лактобацили - *Lactobacillus species* и патогената бактериска флора, со што се овозможува добра заштита од ширење на патогени микроорганизми, вклучувајќи и асцендирање до шуплината на матката.

Лактобацилите продуцираат киселини (главно млечна киселина), водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) (кој ослободува кислород и има дезинфекциски ефект), бактериоцини (протеински токсини кои вршат инхибиција на растот на слични бактериски соеви), биосурфактант (кој ја покрива површината на сидот на вагината, со што се инхибира адхезијата на патогените микроорганизми), како и т.н. коагрегациони молекули (кои го блокираат ширењето на патогените микроорганизми). Нивната улога е докажана уште во 1892г од Döderlein (Reid G, 2001)

Преку овие функции лактобацилите се клучни во одржување на киселата средина во вагината. Како дел од нормалната флора, но помалкубројни од лактобацилите се среќаваат и дифтероидите, *Staphylococcus epidermidis*, повеќе различни аеробни, факултативно анаеробни и анаеробни бактерии, како и квасници. Сите видови лактобацили не ги продуцираат наведените фактори, затоа некои видови се поефикасни во заштита од специфични инфекции. Присуство на  $H_2O_2$  продуцирачки бацили значи помал ризик за развој на бактериска вагиноза (Hillier SL, 1992).

Историски, доминантен специес во хуманата вагина се сметал *Lactobacillus acidophilus*. Подоцна е откриено дека групата на организми претходно познати како *Lactobacillus acidophilus* е многу разновидна и вклучува минимум шест различни специеси (Antonio MA et al, 2005). Најчесто докажувани видови се *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus jensenii*. Улогата на *Lactobacillus iners* е нејасна, бидејќи се детектира и во нормални состојби, како и во состојба на вагинална дисбиоза и бактериска вагиноза. Се претпоставува дека може да придонесе за почеток и за

одржување на вагиналната дисбиоза и да биде фактор на ризик за негативен исход на бременоста. Спротивно на тоа, протективната улога на *Lactobacillus crispatus* е потврдена и докажана во многубројни студии (Yeruva T et al, 2017; Tabatabaei N et al, 2019).

Познавањето на нормалната флора и физиологијата на хуманата вагина се неопходни за предикција и превенција на гениталните инфекции. Хуманата вагина во репродуктивен период е метаболно и микробиолошки комплексна средина. Со менструалниот циклус, настануваат циклични квантитативни и квалитативни промени на микробиомот. Во тек на менструалното крварење рН вредноста се зголемува, бројот на лактобацили се намалува, а расте бројот на факултативно-анаеробни и анаеробни специеси, кои нормално се присутни како дел од вагиналниот микробиом. По прекин на менструалното крварење, рН вредноста во вагината опаѓа, а бројот на лактобацили расте, со конкомитантна редукција на бројот на други факултативно-анаеробни и анаеробни организми кои се присутни. Овие квантитативни промени во микробиомот се главно конзистентни од еден до друг циклус, и покрај тоа што има квалитативна варијабилност во составот на бактериската заедница (Onderdonk AB et al, 2016).

Редукција на концентрацијата на лактобацили значи дисрупција на нормалната вагиналната флора или т.н. вагинална дисбиоза, што е предуслов за раст на други, главно анаеробни бактерии. Оваа состојба доколку не се детектира и третира, преминува во бактериска вагиноза, што е предуслов за развој и асцендирање на гениталната инфекција. *Бактериска вагиноза* (БВ) или анаеробна дисбиоза е полимикробен синдром кој се карактеризира со промена на нормалната вагинална флора, односно редукција на концентрацијата на  $H_2O_2$  продуцирачки *Lactobacillus species* и замена со други, главно анаеробни бактерии, како *Prevotella species*, *Mobiluncus species*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Porphyromonas species*, *Bacteroides species*, анаеробен *Peptostreptococcus species*, *Fusobacterium species*, *Atopobium vaginae*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, како и неодамна генетски детерминирани организми од групата на *Clostridiales* (bacterial vaginosis associated bacterium 1, 2, 3 - BVAB1, BVAB2, BVAB3) итн (Eschenbach DA et al, 1989; Hill GB, 1993). Оваа состојба е честа кај испитанички во репродуктивна возраст и може да предизвика непријатен вагинален секрет, но кај голем процент е и асимптоматска.

Квалитативните студии изведени со примена на конвенционални културелни методи, покажале дека се изолираат повеќе од 100 различни фенотипови од вагиналниот микробиом, од кои некои се секогаш присутни, кај поголем или кај помал број испитаници, а некои само спорадично. Одредени специеси на лактобацили (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus iners*) се почесто изолирани кај здрави испитанички со нормален наод, додека анаеробните стапчести бактерии како *Atopobium*, *Prevotella*, *Mobiluncus* и *Sneathia* се почесто присутни кај испитанички со бактериска вагиноза. Последните испитувања со употреба на двете методи - молекуларни и културелни, покажуваат дека разликата меѓу нормално и абнормално, се

темели на комплексен биолошки спектар и поголема микробиолошка разновидност кај БВ од она што досега беше познато (Onderdonk AB et al, 2016; Lamont RF et al, 2011).

Според молекуларните испитувања на етиологијата, се смета дека бактериската вагиноза не е специфичен микробиолошки процес, туку спектар на промени во составот на микробиомот, што резултира со одредени клинички симптоми.

### **1.1. Бактериска вагиноза**

Факторите одговорни за нарушување на нормалната микрофлора не се потполно разјаснети, но факт е дека ваквата состојба е предуслов за развој и асцендирање на гениталните инфекции (Eckert LO et al, 2003). Бактериската вагиноза е најчест вагинален синдром и причина за интензивирани вагинална секреција кај испитаничките во репродуктивна возраст. Асоцирана е и со зголемен ризик за развој на сексуално преносливи инфекции (СПИ) вклучително и ХИВ (Pendharkar et al, 2013).

Етиопатогенезата на бактериската вагиноза е сеуште неразјаснета и е предмет на многу расправи. На промените на вагиналниот еко-состав може да влијаат возраста, менструалните циклуси, пропратни инфекции, хормонска контрацепција, анксиозност и стрес, неможност за елиминација на налетните микроорганизми, повторна инокулација на причинителите на инфекција од егзоген извор (на пример во тек на полов однос), хигенските навики, неуспехот на лактобацилите да ја реколонизираат или да ја одржат киселоста на вагината, како и присутноста на бактериофаги кои што ги напаѓаат лактобацилите. Некои дополнителни ризик фактори се: пушењето цигари, користењето на интраутерини влошки, црната раса, раното стапување во полови односи и големиот број на различни сексуални партнери (Ravel J et al, 2011). Според клиничките податоци, распространетоста на бактериската вагиноза, дијагностицирана според Амсел - критериумите и сексуално преносливите инфекции, се движи од 24 до 30% (Brotman RM et al 2007; Hallen A et al, 1987; Johnson HL et al, 2011). Според скорот по Нугент постојат разлики помеѓу одредени земји, така што во Велика Британија се движи од 9 до 18%, во САД и до 29%, додека во рурални делови од Уганда над 50% (Brotman RM, 2011).

Преваленцијата на БВ во бременост се движи и до 50% и носи релативен ризик за абортус или предвремено породување од 1,4-6,9% (McGregor JA et French JL, 2000). Асоцирана е со многу компликации во бременоста, како chorioamnionitis, предвремени контракции и породување, предвремена руптура на околуплодовите мембрани и спонтан абортус.

Резултатите од повеќе студии, вклучително и систематичниот преглед за епидемиологијата на губиток на бременост, ја потврдуваат улогата на БВ како ризик фактор (Ralph SG et al, 1999; Oakeshott P et al, 2002; Van Oostrum N et al, 2013; Delabaere A

et al, 2014). Според резултатите од мета-анализата од 2013 година, БВ е асоцирана со сигнификантно зголемен ризик за ран, предклинички губиток на бременост, но недостасуваат студии кои детално го анализираат губиток на бременоста во првиот триместар, од каде произлегува и потребата за спроведување на подетални анализи за улогата на БВ, а особено на вагиналниот микробиом на денот на ембрио-трансферот (Van Oostrum N et al, 2013; Ralph SG et al, 1999). Присуство на БВ при првата антенатална контрола е асоцирано со ран губиток на бременост (RR 5.4; 95% CI, 2.5-11) (Donders GG et al, 2000).

## 1.2. Дијагноза на бактериска вагиноза

Дијагнозата на БВ се заснова на два пристапи - (Clinical Effectiveness Group, 2012), а тоа се Amsel - критериум и Ison CA, од каде со комбинирање на податоците е формиран Nugent – скорот.

### 1.2.1. Amsel критериуми:

Присуство на три, а според некои модификации и два од следните критериуми значи сигурна дијагноза за БВ (Amsel R et al, 1983).

- зголемена рН вредност ( $\geq 4.5$ ) на вагиналниот секрет;
- хомоген, тенок сиво-белузлав, негрутчест секрет;
- непријатен мирис на риба на вагиналниот секрет, особено по додавање на 10% раствор на калиум хидроксид (KOH);
- присуство на Clue-клетки (вагинални епителни клетки со адхерентни Грам варијабилни бацили / кокобацили)

### 1.2.2. Hay/Ison критериуми (Ison CA et Hay PE, 2002):

Со анализа на директен вагинален микроскопски препарат обоен според Грам се одредува

- Степен 1 (нормален наод): преобладаваат морфотипови на *Lactobacillus spp.*
- Степен 2 (интермедиерен наод): мешана флора, присутни се *Lactobacillus spp.* морфотипови, но и *Gardnerella* или *Mobiluncus* морфотипови.
- Степен 3 (бактериска вагиноза): преобладаваат *Gardnerella* и/или *Mobiluncus* морфотипови. Ретки или отсутни *Lactobacillus spp.* морфотипови.

### 1.2.3. Nugent-скор:

Проценка на релативната пропорција на бактериските морфотипови, со формирање на нумерички скор (од 0 до 10) добиен со собирање на бодовите добиени од:

- Присуството на големи Грам-позитивни бацили (*Lactobacillus* морфотипови) и нивно количество (скор од 0 до 4)
- Присуство на мали Грам-варијабилни бацили (*Gardnerella vaginalis* и *Bacteroides* морфотипови) (скор од 0 до 4)
- Присуство на закривени Грам-варијабилни бацили (закривени Грам негативни бацили и *Mobiluncus spp.* морфотипови) (скор од 0 до 4)

Скор од 7 до 10 е во прилог на бактериска вагиноза (Nugent RP et al, 1991).

### 1.3. *Gardnerella vaginalis*

*Gardnerella vaginalis* е најчесто асоцирана со бактериска вагиноза и е специфичен префинет организам кој бара комплексен медиум за раст и размножување, како и атмосфера со присуство на поголемо количество јаглероден диоксид. Површината на бактериската клетка е препокриена со фимбрии, кои обезбедуваат адхерирање на вагиналните епителни клетки („Clue“ клетки) и формирање на биофилм, односно еден вид на скелет за врзување на другите бактерии кои учествуваат во развитокот на бактериската вагиноза. Продуцира амини, што резултира со зголемена рН вредност на вагиналниот секрет и фаворизира раст на други анаеороби. Пептидазите на *Gardnerella vaginalis* делуваат на вагиналниот секрет богат со протеини и ослободуваат пептиди и аминокиселини, кои пак се значајни нутритивни елементи за раст на други бактерии (Danielsson D et al, 2011).

### 1.4. *Mycoplasma spp* и *Ureaplasma spp*

Родовите *Mycoplasma* и *Ureaplasma* се факултативно анаеоробни бактерии кои можат да се култивираат во лабораториски услови само на специфични хранителни подлоги. Немаат клеточен ѕид и не можат да бидат визуелизирани со боење по Грам. Тие се најмали слободни самореплицирачки бактерии, широко распространети во природата како паразити на човекот. Од гениталниот тракт на жената се изолирани само *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium* од вкупно седум специеси на родот *Mycoplasma*. *Mycoplasma genitalium* предизвикува симптоми на цервицит и уретрит, додека *Mycoplasma hominis* е асоцирана со присуството на бактериска вагиноза (Patel MA et Nyirjesy P, 2010). Родот *Ureaplasma* го населува урогениталниот тракт и пенетрира во субмукозата само во случај на имуно-супресија или инструментални интервенции кај луѓето. Се пренесува по

сексуален контакт, но може да се пренесе од мајката на плодот по вертикален пат *in utero* или преку инфицираните секрети во тек на породување (Schelonka RL et Waites KB, 2007). Познати се 14 серотипови поделени во два видови и тоа *Ureaplasma parvum* и *Ureaplasma urealyticum*. *Ureaplasma urealyticum* е најпревалентната микоплазма во урогениталниот тракт.

### 1.5. Молекуларни методи во микробиологијата

Микробиолошките методи се корисни за анализа на микроорганизмите во човечкото тело, вклучително и вагината, како и за разбирањето на болестите на гениталниот тракт, но култивацијата е комплексна и специфична, не успешна за извесен број некултивабилни бактерии и одзема многу време. Особен предизвик во современата микробиологија е прецизното одредување на улогата на секој микроорганизам во структурата на микробиомот. Равојот на не-културелни методи за детекција на не-култивабилни микроорганизми, преку анализа на секвенци на гени, како 16S rRNA ген, е огромен револуционерен напредок во биологијата и медицината. Особено значаен во оваа област е проектот на National Institutes of Health (NIH) – The Human Microbiome Project и формирањето на International Human Microbiome Consortium. Целите на Human Microbiome Project се да се искористат предностите на новите технологии за целосно детектирање на хуманиот микробиом, преку анализа на примероци од различни делови на човечкото тело, да се утврди дали постои поврзаност помеѓу промените во микробиомот и здравјето, односно болестите, преку проучување на неколку различни медицински состојби, како и обезбедување на стандардизиран извор на податоци и нови технолошки пристапи кои би овозможиле проширување на ваквите студии во научната заедница. Крајната цел на проектот е да се докаже дека постојат можности за подобрување на здравјето на луѓето преку следење или манипулирање со хуманиот микробиом. Целта на International Human Microbiome Consortium е дефинирање и унифицирање на принципи за проучување и разбирање на улогата на хуманиот микробиом во одржување и нарушување на здравјето, што би резултирало со подобрување на можностите за превенција и лекување на болестите. Напредокот во техниките за култивирање се базира на информации од резултатите од секвенционирањето (Turnbaugh PJ et al, 2007; Peterson J et al, 2009; Conlan SI et al, 2012; Cho I et Blaser MJ, 2012; Relman DA, 2012; Romero R et al, 2014). Филогенетската анализа подразбира креирање на генеолошки стебла-дендрограми, кои претставуваат приказ на структурата на микробиомот.

Употребата на молекуларни техники го подобри познавањето за комплексноста на микробиомските екосистеми на различни делови на човечкиот организам, вклучително и вагината (Romero R et al, 2014; Witkin SS et Ledger WJ, 2012; Yamamoto T et al, 2009; Pavlova SI et al, 2002).

### 1.5.1. Амплификација со полимераза верижна реакција (Polimerase chain reaction-PCR)

Полимеразно верижната реакција (Polimerase chain reaction-PCR) претставува *in vitro* метод со кој преку комплексна ензимска реакција се врши амплифицирање на ген, негов дел или било која ДНК секвенца во неограничен број копии (Saiki RK et al, 1985; Saiki RK et al, 1988; Mullis KB et Faloon FA, 1987).

PCR методот се базира на серија од инкубациони фази на различни температури. Еден сет од овие фази означува еден PCR циклус, кој вклучува: денатурација на двоверижна ДНК (на температура над 90°C); намалување на температурата на 50-65°C (што овозможува анилирање, односно поврзување на прајмерите за комплементарната ДНК нишка) и покачување на температурата на 72°C (со што се овозможува екстензија на прајмерите во присуство на термофилна ДНК полимераза и слободни нуклеотиди, односно синтеза на нови копии на саканата ДНК секвенца). PCR процесот претставува повеќекратно повторување на ваквиот циклус, што резултира со експоненцијално амплифицирање на секвенцата од интерес во неограничен број копии (Saiki RK et al, 1988; Erlich NA et al, 1989; Watson JD et al, 1992).

Со техниките на секвенционирање се детектираат специфични микроорганизми кои не се докажани со постарите техники. Со овие техники се дизајнираат клинички иследувања за одредување на улогата на вагиналниот микробиом во здравјето на жените.

### 1.6. Пробиотици

*Пробиотиците* според СЗО се „живи микроорганизми кои аплицирани во адекватни количини имаат бенефит за здравјето на домакилот“. Тие се употребуваат успешно како дополнување на традиционалната антибиотска терапија кај бактериска вагиноза, за подобрување на стапката на излекување, превенирање на повторна појава на болеста преку нивната можност за надополнување на намалената концентрација на соеви на лактобацили (Vujic G et al, 2013).

Потврдено е дека егзогено внесените лактобацили перзистираат на мукозните површина и помогнаат во воспоставувањето на нормалниот микробиом кај испитаничките со бактериска вагиноза (Martínez-Peña MD et al, 2013; Ravel J et Brotman RM, 2016).

Според досегашните анализи, се смета дека одредувањето, манипулацијата и обновувањето на вагиналниот микробиом има голем потенцијал за подобрување на репродуктивното женско здравје и превенирање на болести. Но неопходни се уште многу истражувања за развој на ефикасни стратегии (Ravel J et Brotman RM, 2016; Lewis FM et al, 2017).

## **2. МОТИВ И ЦЕЛИ**

### **2.1.Мотив**

До скоро беа познати само конвенционалните методи за култивирање на микроорганизмите, но во последно време молекуларната микробиологија односно молекуларната анализа на вагиналниот секрет добива сè поголемо значење во репродуктивното здравје и перинаталната медицина. Со примена на молекуларните методи се развиваат нови стратегии за предикција и превенција на генитални инфекции врз база на составот на вагиналниот микробиом.

Попрецизното и сеопфатното одредување на вагиналната флора, т.н. вагинален микробиом досега не е направено кај нас и во тој смисол не се познати видовите на лактобацили во вагиналниот микробиом кај нашата популација. Оваа ситуација е резултат на примената на класичните микробиолошки методи во анализата на вагиналната средина. Литературните податоци укажуваат на географски варијации и варијации кај различна популација, а исто така и различно значење на поединечните типови на лактобацили во одржувањето на балансот на вагиналната микрофлора. Затоа беше неопходна анализа и разбирање на составот на вагиналниот микробиом и видовите на лактобацили и кај нашата популација. Тоа беше и мотивот за изработка на оваа студија.

## 2.2. Цели

1. Молекуларна анализа на вагинален микробиом од аспект на генетско детерминирање на типовите на лактобацили и најчестите предизвикувачи на бактериска вагиноза кај наша популација, односно
  - Анализа за детектирање на видовите и типовите на лактобацили и други микроорганизми кај испитанички со нормален наод, потврден со класични микробиолошки и клинички-гинеколошки параметри
  - Анализа за детектирање на видовите и типовите на лактобацили и други микроорганизми кај популација со интермедиерна флора, потврдена со класични микробиолошки и клинички-гинеколошки параметри
  - Анализа за детектирање на видовите и типовите на лактобацили и други микроорганизми кај популација со бактериска вагиноза, потврдена со класични микробиолошки и клинички-гинеколошки параметри.
2. Компарација на наодите од клиничките параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза, со наодите добиени со молекуларните тестирања
3. Од добиените резултати да се процени дали може да се развие брз, евтин, едноставен тест / метода за одредување на вагинален микробиом.

## 2.3. Хипотеза

Главна работна хипотеза е дека постојат разлики во составот на вагиналниот микробиом кај испитанички со нормален клинички и микробиолошки наод (нормална флора) во однос на оние со интермедиерен наод или докажана бактериска вагиноза.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Спроведена е проспективна студија на 110 испитанички во репродуктивен период (од 18 до 49 години или менопауза), кои се јавија за гинеколошки преглед во КБ Ацибадем Систина, Скопје.

Од секоја испитаничка е добиена информирана согласност за вклучување во студијата, во писмена форма.

*Критериуми за вклучување:* потпишана информирана согласност за вклучување во студијата.

*Критериуми за исклучување:* бременост, менструално или друг тип на утерино или вагинално крварење, антибиотски третман во рамки на претходниот месец, сексуален однос во рамки на претходните три дена, употреба на вагинални таблети, капсули, гелови во рамки на претходните три дена, трансвагинални интервенции (конизација, биопсија, хистеросалпигографија, хистероскопија, инструментална ревизија, киретажа) во рамки на претходниот месец.

#### 3.1. Протокол за работа

За секоја пациентка е пополнет прашалник со следните податоци:

##### Општи податоци

- Возраст

##### Субјективни симптоми (во изминатите 7 дена):

- Пообилен вагинален секрет, особено со непријатен мирис
- Често мокрење или печење при мокрење
- Чувство на печење или пецкање во интимната регија

##### Гинеколошка анамнеза

- Менструален циклус
- последна менструација / ден од циклус
- ПАП Статус
- HPV Статус
- Интервенции на PVU (portio vaginalis uteri)

##### Животни навики

- Внес на пробиотици со исхрана

- Навики за тоалета на надворешни гениталии

### Фармаколошка анамнеза

- Внес на суплементи со пробиотици
- Употреба на вагинални таблети/гелови со млечна киселина и/или пробиотици
- Орални комбинирани хормонски препарати

На секоја испитаничка е направен гинеколошки - вагинален преглед со:

1. Мерење на рН вредноста на вагинален секрет со стик-хартиена лента, со индикатор за рН (1.09542.0001 рН-indicator strips рН 4.0 - 7.0 Special indicator – Merck KGaA)-лентата беше допирана на сидот на вагината, на околу 3cm над интроитус за време по неколку секунди; добиената боја беше споредувана со тест-скалата. За гранична вредност беше земена рН 4,5.
2. Екартирање на вагина со стерилен спекулум и земање два примероци брисеви, со стерилно стапче, од форниксите на вагината: едниот за бактериолошка, а другиот за молекуларна анализа. Кај дел од испитаничките, како дел од рутинскиот преглед беа земани цервикални брисеви за докажување на *Mycoplasma/Ureaplasma* и на *Chlamydia*.

### 3.1.1. Постапка на работа:

1. Од примерокот за *бактериолошка анализа* беше правен: директен микроскопски препарат, боен по Грам (за проценка по Нугент скорот, за присуство на лактобацили и други бактерии); инокулација на вештачки хранителни подлоги: крвен-Колумбија агар, Гарднерела агар, Сабуро-агар.

Врз основа на микроскопскиот препарат, се анализираа и оценуваа три параметри:

- Присуството на големи Грам-позитивни бацили (*Lactobacillus* морфотипови) (нумеричко вреднување според застапеноста од 0 до 4)
- Присуство на мали Грам-варијабилни бацили (*Gardnerella vaginalis* / *Bacteriudes* морфотипови), (нумеричко вреднување според застапеноста од 0 до 4)
- Присуство на закривени Грам-негативни бацили (*Mobiluncus spp.* морфотипови), (нумеричко вреднување според застапеноста од 0 до 4)

По проценка на релативната пропорција на бактериските морфотипови, според Нугент - скорот испитаничките беа групирани во три групи:

- Нормален наод (скор од 0-3)
- Интермедиерна флора (скор од 4-6)
- Бактериска вагиноза (скор од 7-10)

Табела бр. 1. Постапка за пресметување на скорот по Nugent

Број на <i>Lactobacillus</i>	Скор	Број на <i>Gardnerella</i> / <i>Bacteriudes</i>	Скор	Број на закривени Грам негативни бацили	Скор
>30	0	0	0	0	0
5-20	1	<1	1	<1	1
1-4	2	1-4	2	1-4	2
<1	3	5-20	3	5-20	3
0	4	>30	4	>30	4

Културелното испитување подразбираше инкубација на инокулираните хранителни подлоги со земениот брис, на соодветна температура (35-37<sup>0</sup>C), во соодветна атмосфера (аеробна за крвната Колумбија подлога и хромогената подлога за кандида; анаеробни услови во лонец, создадени со кесичка за постигнување на соодветна мешавина на гасови за подлогата за Гарднерела и други анаеробни бактерии). Според морфологијата на израснатите колонии беше вршена финалната идентификација, со употреба на дополнителни тестови, специфични за секој вид. Лактобацилите не беа идентифицирани до видови, заради тоа што за нив се потребни голем број биохемиски и физиолошки испитувања, а резултатите на крајот не се високо прецизни. Имено, идентификацијата на лактобацилите најдобро се врши со молекуларни испитувања.

2. Примерокот за молекуларна анализа беше веднаш замрзнуван на -20<sup>0</sup>C и транспортиран во Истражувачкиот центар за генетско инженерство и биотехнологија „Георги Д. Ефремов“, при МАНУ, каде до анализата (екстракција на ДНК, PCR амплификација, анализа на PCR амплифицираните продукти, секвенционирање) беа чувани на истата температура.

Според микробиолошкиот наод, по случаен избор, беа одбрани вкупно 93 примероци од сите три групи на испитанички, изведени врз база на скорот по Нугент, за молекуларна анализа за докажување на типовите на лактобацили, *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*.

## 3.2. ДНК изолирање и секвенционирање

### 3.2.1. Биолошки примероци

Примероците од вагина, земени за молекуларна анализа, беа веднаш замрзнати во стерилни микробиолошки епруветки на  $-20^{\circ}\text{C}$ , така транспортирани до лабораторијата во МАНУ и чувани на истата температура до употреба.

### 3.2.2. Екстракција на ДНК

Екстракцијата на ДНК беше извршена со примена на класичен метод на дигестија со протеиназа K-SDS, проследена со фенол-хлороформ екстракција и етанол преципитација (Efremov GD et al, 1999).

Биолошкиот материјал беше ресуспендиран во 2 mL фосфатен пуфер (Phosphate-buffered saline, PBS, pH 7,4) и вортексиран. Преципитатот по центрифугирање (5 минути на 12000 rpm) беше инкубиран со 360  $\mu\text{L}$  пуфер за дигестија (0,05M TRIS, 0,001 M EDTA, 1% Tween 20, 1% Nonidet 40, 0,8 mg/ml Proteinase K) во термо блок на  $56^{\circ}\text{C}$  преку ноќ. Како слепа проба беше користен пуфер за дигестија без биолошки материјал.

Депротеинизацијата на примероците беше извршена со примена на фенол/хлороформ/изоамил алкохол екстракција. Во првиот чекор примероците беа измешани со еднаков волумен на еквилибриран фенол (Phenol solution equilibrated with 10mM TRIS-HCl, pH 8,0 Cat No. P4557, Sigma Aldrich, Германија) за време од 5 минути на собна температура, проследено со центрифугирање за време од 5 минути на 12000 rpm на  $25^{\circ}\text{C}$ . По центрифугирањето водената фаза беше извлечена и префрлена во нов епандорф. На водениот слој беше додадено 180  $\mu\text{L}$  фенол и 180  $\mu\text{L}$  хлороформ-изоамил алкохол (24:1) во секој примерок и смесата по мешање 5 минути на  $25^{\circ}\text{C}$ , беше центрифугирана 5 минути на 12000 rpm на  $25^{\circ}\text{C}$ . ДНК од водената фаза по центрифугирање беше преципитирана со додавање на два волумена на леден апсолутен етанол и потоа примероците беа ставени на  $-20^{\circ}\text{C}$  најмалку 2 часа (или преку ноќ). Етанолот беше отстранет по центрифугирање 20 минути на 12000 rpm. Преципитатот беше промиен со 1 mL 70% етанол, кој потоа беше отстранет по центрифугирање 5 минути на 12000 rpm. Преципитираната ДНК беше исушена на собна температура за време од 15-20 минути и растворена во автоклавирана ddH<sub>2</sub>O, ослободена од нуклеази, со инкубација на  $37^{\circ}\text{C}$  преку ноќ. Растворената ДНК беше чувана на  $4^{\circ}\text{C}$  (Tamrakar R et al, 2007; Peerayeh NS et Sattari M, 2006).

PCR амплификацијата на 16S rRNA гените на *Lactobacillus sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* и уреаза генот на *Ureaplasma spp.* беше извршена со примена на методот предложен од Efremov и сор., 1999. Прајмерите што се употребени за амплификација на гените се наведени во табела 2.

PCR реакциите беа изведени во смеса од вкупен волумен од 25  $\mu$ L, која содржи 1xPCR пуфер, 1,5-2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 20pM од соодветните прајмери (реверзен и директен), 1U Hot Fire Polymerase (Solis BioDyne) и 0,1-0,5  $\mu$ g ДНК. Паралелно со секоја група на примероци, изведени беа PCR реакции и на слепата проба (PCR мешавина без ДНК).

Табела бр. 2. Секвенци на прајмери користени за амплификацијата

Таргетен ген	Прајмери	Секвенци на прајмери (5'-3')	Должина на ампликон
16S rRNA ген <i>Lactobacillus spp</i>	LactoF LactoR	TGGAAACAGRTGCTAATACCG GTCCATTGTGGAAGATTCCC	~230 bp
Уреаза ген <i>Ureaplasma spp</i>	U4 U5	ACGACGTCCATAAGCAACT CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC	344 bp
16S rRNA ген <i>Gardnerella vaginalis</i>	GV1-F GV3-R	TTACTGGTGTATCACTGTAAGG CCGTCACAGGCTGAACAGT	331 bp
16S rRNA ген <i>Mycoplasma hominis</i>	RNAH1 RNAH2	CAATGGCTAATGCCGGATACGC GGTACCGTCAGTCTGCAAT	429 bp

Примероците беа амплифицирани на Thermal Cycler (Applied Biosystems 2720) со примена на услови на циклус соодветни за секој таргетен ген (табела 3).

Табела бр. 3. Услови на циклус за амплификација на гените (температура/време/број на циклуси)

	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<b>Иницијална денатурација</b>	95°C/10'	95°C/10'	95°C/10'	95°C/10'
<b>Денатурација</b>	95°C/15"/x40	95°C/1'/x30	95°C/45"/x30	95°C/1'/x35
<b>Анилирање</b>	62°C/1' /x40	56°C/1'/x30	60°C/45"/x30	62°C/1'/x35
<b>Елонгација</b>	72°C/1' /x40	72°C/1'/x30	72°C/45"/x30	72°C/1'/x35
<b>Финална елонгација</b>	72°C/10'	72°C/10'	72°C/7'	72°C/10'
	4°C/	4°C/	4°C/	4°C/

### 3.2.3. Анализа на PCR амплифицираните фрагменти

#### 3.2.3.1. Агароза гел електрофореза

PCR амплифицираните фрагменти беа разделени на 1,5-2% агарозен гел, што содржи 5  $\mu\text{L}$  етидиум бромид, со примена на хоризонтален систем за електрофореза. Примероците (5-10  $\mu\text{L}$ ) беа разредени во 5  $\mu\text{L}$  пуфер за апликација (100 mg Orange G во 50 mL 55% глицерол/45%1xTE) и аплицирани на агарозниот гел. Разделувањето беше извршено со примена на TRIS-боратен EDTA пуфер, 1xTBE (90 mmol TRIS, 90 mmol борна киселина, 2 mmol EDTA, pH 8.3). По електрофоретското разделување, амплифицираните фрагменти беа визуелизирани со ултравиолетова светлина, и сликани со примена на соодветна камера.

#### 3.2.3.2. Секвенционирање на ДНК

Со цел да се отстранат неинкорпорираните прајмери и нуклеотиди од реакцијата на амплификација, примероците беа прочистени со примена на ензимски метод (CleanSweep), кој овозможува прочистување на фрагментите со големина од 100 bp до 20 kВ, без губиток на амплифицираниот продукт. Прочистувањето беше извршено со мешање на 1,2  $\mu\text{L}$  од ензимот (CleanSweep) со 2  $\mu\text{L}$  од амплифицираниот PCR продукт и инкубација на 37°C за време од 20 минути. Ензимот беше инактивиран на температура од 37°C за време од 15 минути.

Секвенционирањето во две насоки со примена на директен или реверзен прајмер беше извршено на автоматскиот генетски анализатор ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), со примена на Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Принципот на автоматското флуоресцентно секвенционирање се базира на Sanger-овиот метод на терминирање на инкорпорацијата на нуклеотидниот аналог кој не содржи место за продолжување на елонгацијата (Sanger F et Coulson AR, 1975). Терминациони места се 2'3'-дидеоксинуклеотид-5'-трифосфати (ddNTPs), каде што недостасува 3'-ОН групата потребна за ДНК верижната елонгација.

Реакцијата за секвенционирање беше изведена во смеса 3,5  $\mu\text{L}$  вода, 1  $\mu\text{L}$  пуфер за секвенционирање (5x), 2  $\mu\text{L}$  Terminator Ready Reaction mix, 0,5  $\mu\text{L}$  (5pmol) директен или реверзен прајмер (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ) и 3  $\mu\text{L}$  прочистен PCR продукт. Реакцијата беше изведена во Thermal Cycler под следните услови: иницијален чекор од 5 min на 95 °C, потоа 25 циклуси од 10 секунди/96 °C, 5 секунди/50 °C и 4 min/60°C.

По завршената реакција на секвенционирање беше извршена преципитација на реакционата смеса со додавање на смеса од 30  $\mu\text{L}$  апсолутен етанол, 1  $\mu\text{L}$  3M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,2 и инкубирање на -20°C за време од 2 часа. Супернатантот по центрифугирање (30 минути на 13000 rpm) беше отстранет, а талогот е промиен со 300  $\mu\text{L}$  70% етанол. Етанолот беше отстранет по центрифугирање (10 минути на 13000 rpm), а талогот беше

исушен на собна температура 15 минути. Примероците беа аплицирани на плочка по додавање на 12-25  $\mu\text{L}$  Hi Di Formamide, денатурација на 95°C за време од 5 минути и ладење на примероците на мраз.

Идентификацијата на лактобацили беше направена со амплификација на 16S rRNA гени. За идентификација на изолатите се компарираа секвенците од V1–V3 регионите на 16S rRNA на лактобацилите, кои се хиперваријабилни, со ДНК датабазата на BLAST алгоритмот ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Врз основа на разликите беше креирано генеолошко стебло. Идентификација на *Lactobacillus species* се сметаше за потврдена кога секвенцата покажуваше 99-100% хомологност со типизираниот вид.

### 3.3. Статистичка обработка

Статистичката анализа е изработена во статистички програми: STATISTICA 10.0; SPSS 20.0;

Податоците се обработени со помош на следните статистички методи:

- Базите на податоците се формирани со примена на специфични компјутерски програми за таа намена. Нивната обработка се изврши со помош на стандардни дескриптивни и аналитички методи.
- Атрибутивните статистички серии се анализираат со одредување на коефициент на односи, пропорции, стапки и со утврдување на статистичката значајност меѓу откриените разлики- Тест на разлики-Difference тест.
- Нумеричките серии се анализирани со мерки на централна тенденција и со мерки на дисперзија на податоците (просек и стандардна девијација).
- Статистичката сигнификантност на повеќе од две варијабли, разликите се анализираани со Analysis of Variance –ANOVA. Постои голем избор на така наречени post hoc тестови кои се изведуваат после ANOVA-тестот кога тој дава статистички значајни резултати. Овие тестови се нарекуваат и тестови на повеќекратна споредба. Цел им е да откријат која разлика (помеѓу повеќето варијабли) е заслужна за вкупниот статистички значаен резултат. Во студијата е користен Post hoc Tukey HSD тест
- Корелативните-асоцијациони односи со помош на Pearson Chi square и Fisher exact 2-tailed test.
- За квантифицирање на сигнификантните фактори се одредуваше вкрстениот однос (на предимство/превага) Odds Ratio (OR)
- Со Shapiro-Wilk`s тест се испитуваше нормалната распределба на варијаблите
- За CI (confidence интервал  $\pm 95\%$  CI) е дефинирана статистичката значајност за ниво на грешка помало од 0,05 (p).
- Резултатите се прикажани табеларно и графички.

#### 4. РЕЗУЛТАТИ

Во проспективната студија беа вклучени 110 испитанички во репродуктивен период, поделени во три групи според Нугент скорот:

I. Прва група испитанички со нормална флора (НФ) / без бактериска вагиноза (ББВ) (скор од 0 – 3), ја сочинува 65 (59,1%) испитанички со просечна возраст  $32,3 \pm 6,1$  години, минимум 21 години, а максимум 52 години (табела 4,5 и графикон 1,2).

II. Втора група испитанички со интермедиерна флора (ИМ)/ интермедиерен наод за бактериска вагиноза (ИМБВ) (скор од 4 – 6), ја сочинува 24 (21,8%) испитанички, со просечна возраст  $29,7 \pm 6,6$  години, минимум 18 години, а максимум 43 години (табела 4,5 и графикон 1,2).

III. Трета група испитанички со бактериска вагиноза (БВ) (скор од 7 – 10), ја сочинува 21 (19,1%) испитанички со просечна возраст  $31,9 \pm 6,0$  години, минимум 23 години, а максимум 49 години (табела 4,5 и графикон 1,2)

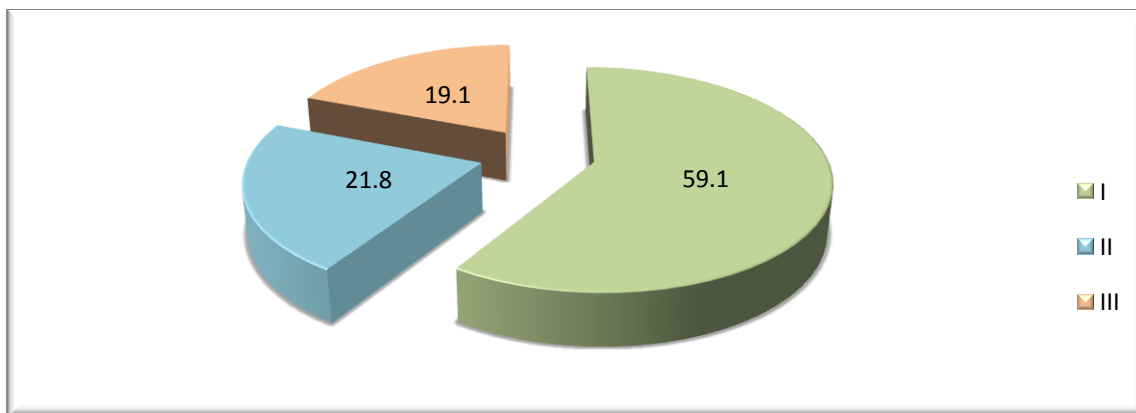
Застапеноста на испитаничките во трите групи според Нугент скорот е статистички сигнификантно различна, и тоа помеѓу првата група (со нормален наод - НФ/без бактериска вагиноза -ББВ) верзус втората група (со интермедиерна флора -ИМ/интермедиерен наод за бактериска вагиноза -ИМБВ) и третата група (бактериска вагиноза -(БВ) за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p = 0,0000$ ).

Разликата која се регистрира во однос на возраста помеѓу трите групи на испитанички е статистички несигнификантна за  $p > 0,05$  (Analysis of Variance,  $F = 1,581165$ ,  $p = 0,210504$ ), што значи се работи за хомогени групи во однос на возраста.

Табела бр. 4. Дистрибуција на испитаничките според Нугент скорот

група- Нугент скор /наод	број	%
I 0 -3/нормална флора (НФ) /без бактериска вагиноза (ББВ)	65	59,1
II 4 – 6/интермедиерен наод (ИМ) /интермедиерен за бактериска вагиноза (ИМБВ)	24	21,8
III 7 -10 /бактериска вагиноза (БВ)	21	19,1
<b>Вкупно</b>	110	100,0

\* Difference test,  $p = 0,0000$

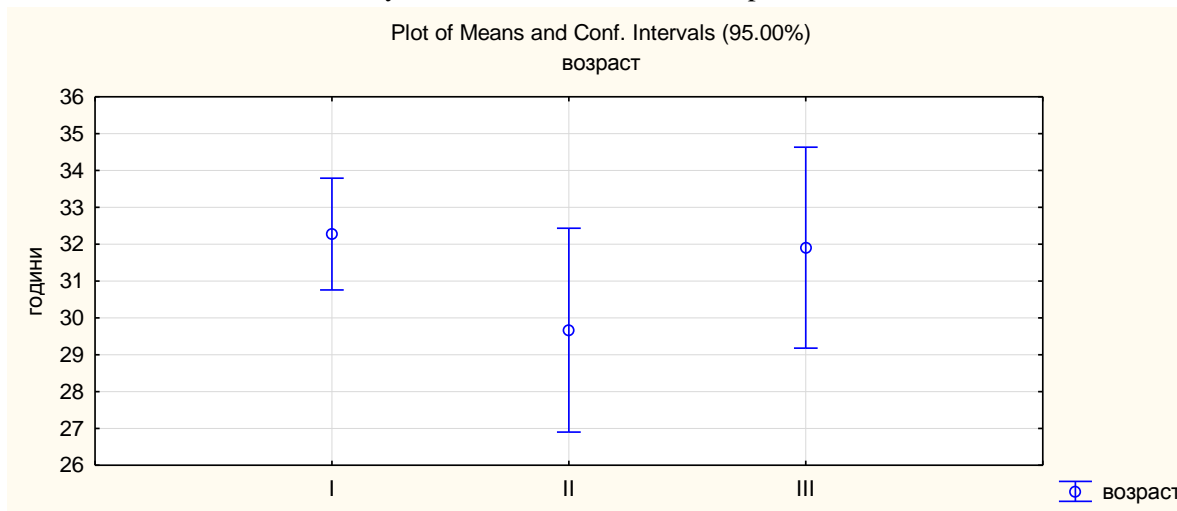


Графикон бр. 1. Дистрибуција на испитаничките во групи според Нугент скорот

Табела бр. 5. Возраст на испитаничките по групи

Група	Просек (години)	број	Стандардна девијација	минимум	максимум
I	32,3	65	6,122468	21,0	52,0
II	29,7	24	6,551911	18,0	43,0
III	31,9	21	5,990866	23,0	49,0
Вкупно	31,6	110	6,226206	18,0	52,0

\*Analysis of Variance,  $F=1,581165$ ,  $p=0,210504$



Графикон бр. 2. Возраст на испитаничките

#### 4.1. Молекуларна анализа на вагиналниот микробиом

Од вкупно 110 испитанички, кај 93 (84,5%) е направена молекуларна анализа (МА) на вагиналниот микробиом.

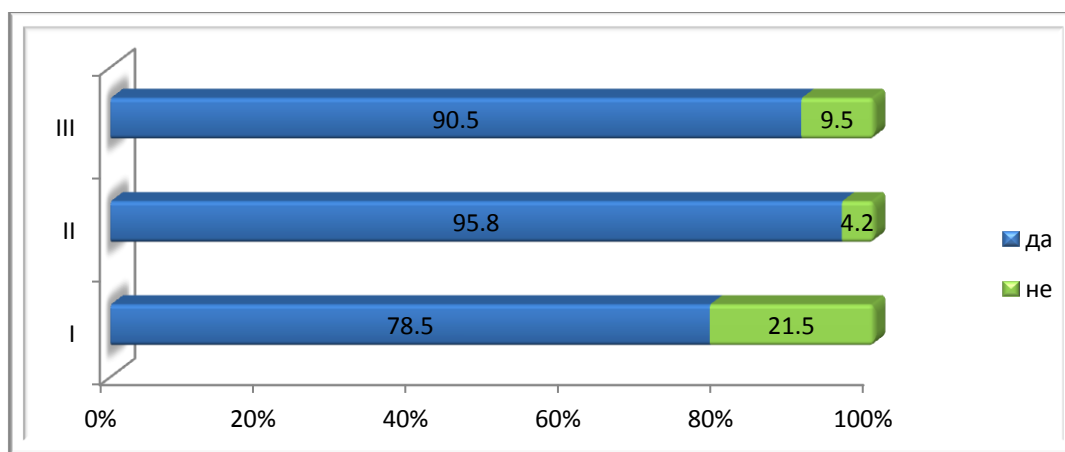
Во првата група (НФ/ББВ) од 65 испитанички кај 51 пациентка, односно 78,5% е направена молекуларна анализа. Во втората група (ИМ/ИМБВ) од 24 испитанички кај 23 испитанички односно 95,8% е направена молекуларна анализа. Во третата група (БВ) од 21 испитаничка кај 19 испитанички односно 90,5%, е направена молекуларна анализа (табела 6 и графикон 3).

Разликата во големината на групите е статистички несигнификантна за  $p > 0,05$ , што укажува на фактот дека се работеше со статистички хомогени групи и статистичката анализа на добиените резултати е релевантна.

Табела бр. 6. Дистрибуција на испитаничките кај кои е направена молекуларна анализа (МА) на вагиналниот микробиом (N=93) по групи.

Група / молекуларна анализа (МА)	има МА*		нема МА		вкупно
	број	%	број	%	
I / НФ/ББВ	51	78,5	14	21,5	65
II / ИМ/ИМБВ	23	95,8	1	4,2	24
III / БВ	19	90,5	2	9,5	21
Вкупно	93	84,5	17	15,5	110

\* Difference test,  $p > 0,05$

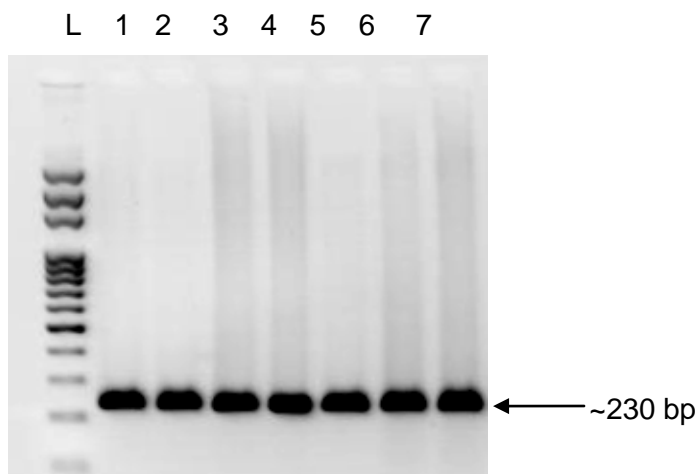


Графикон бр. 3. Дистрибуција на испитаничките кај кои е направена молекуларна анализа, по групи.

#### 4.2. Докажани видови на *Lactobacillus*

Со анализите на сите примероци, докажани се вкупно 22 различни видови на *Lactobacillus* (табела 7, 8, 9, 10).

Јасни видови на *Lactobacillus spp.* се докажани кај 86 (92,5%) испитанички. Од останатите седум, кај 4 е регистрирана мешана флора, односно не е добиен јасен сигнал за одреден вид на бактерија. Кај две е докажан *Aerococcus christensenii*, а кај една испитаничка се изолирани заедно *Paenivacillus sacheonensis*, некултивабилни *Streptococcus sp.* и некултивабилни *Firmicutes* (табела 9).



Слика бр.1 . PCR амплификација на дел од 16S rRNA генот на *Lactobacillus* (L - 100 bp DNA Ladder (Solis BioDyne), 1-7 амплифициран продукт на *Lactobacillus*)

Табела бр. 7. Докажани видови и комбинации на *Lactobacillus spp* кај испитаничките, вкупно и по групи.

<i>Lactobacillus</i> / група според Нугент скор	вкупно број на испитанички	I	II	III
		број	број	број
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1	1		
<i>Lactobacillus iners</i>	39	21*	9*	9
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	1		
<i>L. helveticus, L. gasseri L. johnsonii</i>	1	1		
<i>L. crispatus; L. casei</i>	26	20	4	2
<i>L. gallinarum; L. helveticus</i>	1	1		
<i>L. gallinarum; L. helveticus; L. crispatus; L. casei;</i>	1	1		
<i>L. gasseri; L. taiwanensis</i>	4	1	2	1
<i>L. iners; L. reuteri</i>	1	1		
<i>L. gasseri; L. paragasseri; L. taiwanensis</i>	1	1		
<i>L. helveticus; L. crispatus, L. plantarum; L. garvieae; L. casei</i>	1	1		
<i>L. gallinarum; L. crispatus; L. casei</i>	1	1		
<i>L. delbrueckii; L.delbrueckii subsp bulgaricus</i>	1		1	
<i>L. ruminis</i>	1		1	
<i>L. jensenii; L. psittacii; L. fornicalis; L. crispatus; L.casei;</i>	1		1	
<i>L. helveticus; L. crispatus, L. acidophilus; L. garvieae</i>	1		1	
<i>L. helveticus; L. acidophilus; L. gallinarum; L. crispatus</i>	1		1	
<i>L.delbrueckii subsp bulgaricus</i>	1		1	
<i>L. gallinarum; L. crispatus; L. johnsonii; L. vaginalis; L. caviae; L. oris; L. reuteri</i>	1		1	
<i>L. gasseri; L. johnsonii;L. apis</i>	1			1

\* I/II - Pearson Chi-square: 2,500, p=0,113846

Табела бр. 8. Докажани видови на *Lactobacillus* и други бактерии, поединечно и во комбинации, во вкупниот број испитанички и по групи.

Докажани видови на бактерии	од вкупен број на испитанички (N=93)	сама	со други	I (N=51)			II (N=23)			III (N=19)		
				вкупно	сама	со други	вкупно	сама	со други	вкупно	сама	со други
<b>Lactobacillus</b>												
<i>L. jensenii</i>	2	1	1	1	1		1		1			
<i>L. iners</i>	40	39	1	22	21	1	9	9		9	9	
<i>L. gasseri</i>	8	1	7	4	1	3	2		2	2		2
<i>L. helveticus,</i>	6		6	4		4	2		2			
<i>L. johnsonii</i>	3		3	1		1	1		1	1		1
<i>L. crispatus;</i>	33		33	23		23	8		8	2		2
<i>L. casei</i>	30		3	23		23	5		5	2		2
<i>L. gallinarum;</i>	5		5	3		3	2		2			
<i>L. taiwanensis</i>	5		5	2		2	2		2	1		1
<i>L. reuteri</i>	2		2	1		1	1		1			
<i>L. paragasseri;</i>	1		1	1		1						
<i>L. plantarum</i>	1		1	1		1						
<i>L. garvieae;</i>	2		2	1		1	1		1			
<i>L. delbrueckii</i>	1		1				1		1			
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	2	1	1				2	1	1			
<i>L. ruminis</i>	10	1					1	1				
<i>L. psittacii</i>	1		1				1		1			
<i>L. formicalis</i>	1		1				1		1			
<i>L. acidophilus</i>	2		2				2		2			
<i>L. vaginalis</i>	1		1				1		1			
<i>L. caviae</i>	1		1				1		1			
<i>L. oris;</i>	1		1				1		1			
<i>L. apis</i>	1		1							1		1
<b>Други бактерии</b>												
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија (Uncultured chicken coecal bacterium)	1		1	1		1						
<i>Aerococcus christensenii</i>	2	2								2	2	
<i>Paenivacillus sacheonensis</i>	1		1							1		1
некултивабилен <i>Firmicutes</i>	1		1							1		1
Мешана флора	4		4				1		1	3		3

Табела бр. 9. Дистрибуција на испитаничките и колонизацијата со секој вид лактобацили и други бактерии поединечно по групи

Бактерија / група	I (N=51)*		II (N=23)		III (N=19)*	
	број	%	број	%	број	%
<b>Lactobacillus</b>						
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1	2,0	1	4,3		
<i>Lactobacillus iners</i>	22'	43,1	9 <sup>c</sup>	39,1	9 <sup>c</sup>	47,4
<i>Lactobacillus gasseri</i>	4	7,8	2	8,7	2	10,5
<i>Lactobacillus helveticus</i> ,	4	7,8	2	8,7		
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	1	2,0	1	4,3	1	5,3
<i>Lactobacillus crispatus</i> ,	23'***	45,1	8 <sup>c, &amp;&amp;</sup>	34,8	2 <sup>**</sup> , &	10,5
<i>Lactobacillus gallinarum</i> ;	3	5,9	2	8,7		
<i>Lactobacillus taiwanensis</i>	2	3,9	2	8,7	1	5,3
<i>Lactobacillus reuteri</i>	1	2,0	1	4,3		
<i>Lactobacillus casei</i>	23'***	45,1	5 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	21,7	2 <sup>**</sup> , !	10,5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	2,0				
<i>Lactobacillus garvieae</i>	1	2,0	1	4,3		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>			2	8,7		
<i>Lactobacillus ruminis</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus psittacii</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus vaginalis</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus fornicalis</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>			2	8,7		
<i>Lactobacillus oris</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus caviae</i>			1	4,3		
<i>Lactobacillus apis</i>					1	5,3
<i>Lactobacillus paragasseri</i>	1	2,0				
<b>Други бактерии</b>						
<i>Streptococcus agalacticae</i>			1	4,3		
<i>Aerococcus christensenii</i>					2	10,5
<i>Paenivacillus sacheonensis</i>					1	5,3
некултивабилен <i>Streptococcus sp.</i>					1	5,3
некултивабилен <i>Firmicutes</i>					1	5,3

Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	1	2,0				
Мешана флора			1	4,3	3	15,8

<sup>7</sup>/други лактобацили p<0,05(Difference test, p=0,0001)

<sup>4</sup>/ други лактобацили p<0,05 (Difference test, p=0,0337)

<sup>44</sup>/ други лактобацили p<0,05 (Difference test, p=0,0145)

\* Сите лактобацили I/III p<0,05 (Fisher exact 2-tailed test, p=0,000206)

\*\* *L crispatus*+*L casei* I/III Fisher 2-Tailed test, p=0.010405

&/БВ - Pearson Chi-square:10,5840, p=0,001140; (OR=0,0870 (0,0167-0,4535))

&&/ИМ - Pearson Chi-square: 3,7993, p=0,051274

<sup>1</sup>/БВ - Pearson Chi-square: 11,0548, p=0,000884; (OR=0,0870 (0,0171-0,4411))

&&&/ИМ -. Pearson Chi-square: 6,4523, p=0,011080)

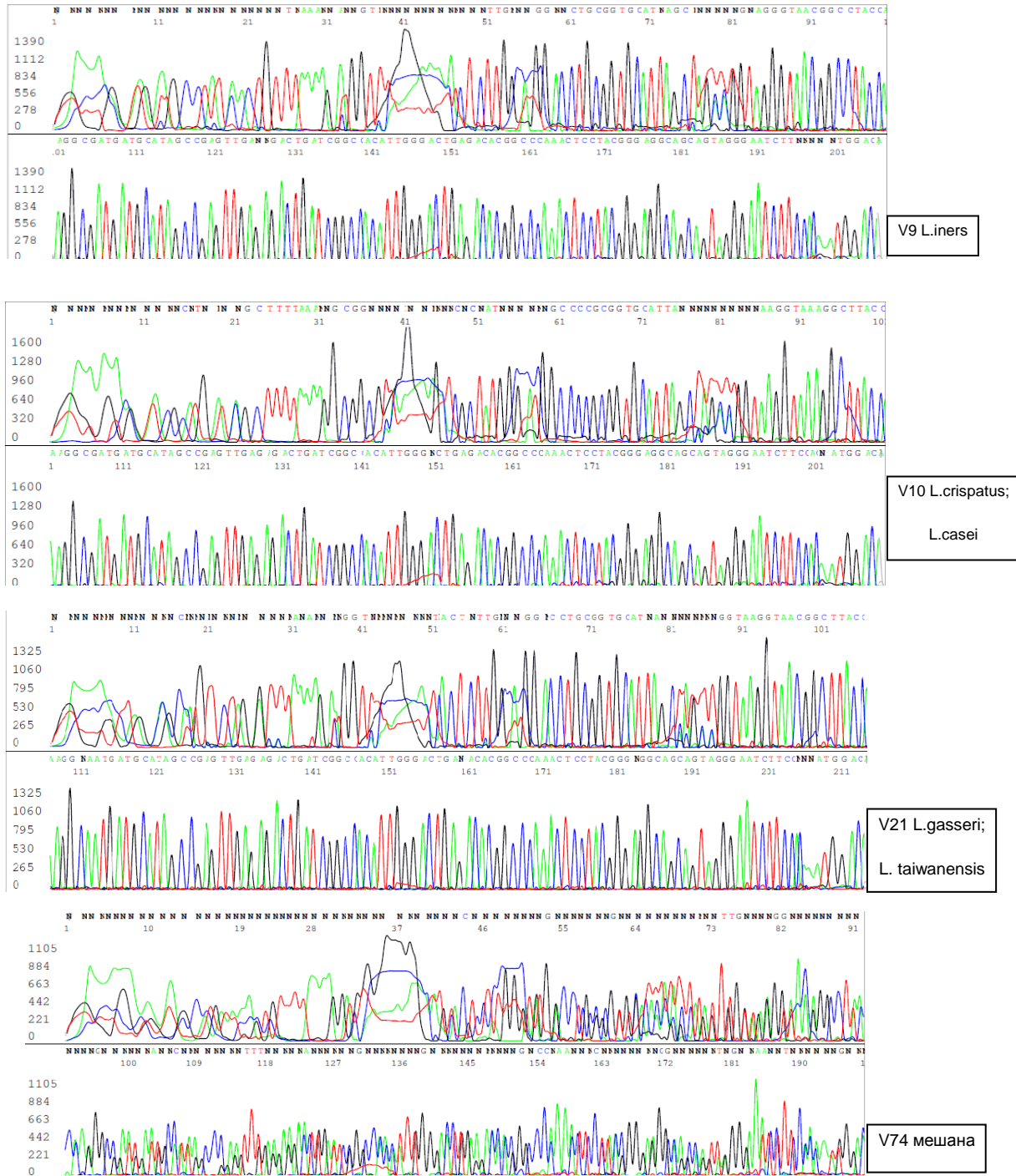
Табела бр. 10. Број на докажани видови на *Lactobacillus* во поединечен примерок кај испитанички, по групи и вкупно.

Број на докажани видови лактобацили / група	I (N=51) *	II (N=22) **	III (N=13) *, **	ВКУПНО (N=86)
1	23	12	9	44
2	23	6	3	32
3	3		1	4
4	1	2		3
5	1	1		2
7		1		1
Вкупно докажани видови (N=22)	13 <sup>4</sup> , <sup>7</sup>	19 <sup>4</sup> , <sup>4</sup>	7 <sup>4</sup> , <sup>7</sup>	
Видови кои се појавуваат само во одредена група	2 ( <i>L. paragasseri</i> , <i>L. plantarum</i> )	8 ( <i>L. caviae</i> , <i>L. delbrueckii</i> <i>subsp bulgaricus</i> , <i>L. fornicalis</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. psittacii</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. acidophilus</i> )	1 ( <i>L. apis</i> )	

p<0,05 (Diference test, \*p=0,0000, \*\*p=0,0187)

p<0,05 (Difference test, <sup>4</sup>p=0,0420, <sup>44</sup>p=0,0002)

p>0,05 (Difference test, <sup>7</sup>p=0,0690).



Слика бр. 2. Секвенци на различни соеви на *Lactobacillus*

Во првата група е докажан *Lactobacillus* кај сите 51 испитанички, во втората кај 22 (95,6%), а во третата кај 13 (68,4%) испитанички (табела 10).

Разликата на застапеноста на *Lactobacillus* во трите групи е статистички сигнификантна помеѓу првата верзус третата и втората верзус третата група за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p=0,0000$ ,  $p=0,0187$ ).

Кај 44 испитанички се докажани само по еден вид лактобацили, а кај останатите 42 се докажани по 2 видови (32 испитанички), по 3 видови (4 испитанички), 4 видови (3 испитанички), 5 видови (2 испитанички) и само кај 1 испитаничка се докажани 7 видови лактобацили (табела 10).

Најголем број испитанички (39) имаа само *Lactobacillus iners* како единствен докажан вид. Кај 26 испитанички беа докажани *L. crispatus* и *L. casei* во комбинација, а кај 4 испитанички беа докажани други два видови - *L. gasseri* и *L. taiwanensis* во комбинација. Останатите видови лактобацили се регистрираат поединечно или во комбинација по 2, 3, 4, 5 и дури 7 (табела 7).

#### 4.2.1. Дистрибуција на лактобацилите по групи на испитанички

Во текот на истражувањето се докажани вкупно 22 видови на *Lactobacillus*, од кои во првата група се регистрираат 13 (59,1%), во втората група се регистрираат најголем број – 19 видови (86,4%) и во третата група се регистрираат 7 видови на *Lactobacillus* (31,8%) (табела 10).

Разликата во бројот на различни видови лактобацили во втората група верзус првата и третата група е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p=0,0420$ ,  $p=0,0002$ ). Разликата на број на видови на *Lactobacillus* во првата група верзус третата група е статистички несигнификантна за  $p > 0,05$  (Difference test,  $p=0,0690$ ) (табела 10)

Во **ПРВАТА ГРУПА** (N=51 испитанички), најчесто се докажани само еден или два видови во комбинација (по 23 испитанички), 3 видови во комбинација (3 испитанички) и 5 и 7 видови во комбинација (по 1 испитаничка) (табела 9). Најчести лактобацили кои се докажани како единечен вид се *Lactobacillus iners* (22 случаи) и *Lactobacillus gasseri* (само во 1 случај) (табела 7). Најчеста комбинација од два видови лактобацили е *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* (20 случаи) (табела 7).

Разликата која е регистрирана помеѓу *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus casei* верзус останатите видови е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p=0,0001$ ) (табела 9).

Двата видови - *L. paragasseri*, *L. plantarum* се докажани само во оваа група, секогаш во комбинација со други лактобацили (табела 10).

Кај 22 од вкупно 23 испитанички (95,6%) од **ВТОРАТА ГРУПА** се докажани 19 видови лактобацили, најчесто како еден вид (12 испитанички - 52,2%) или 2 видови (6 испитанички) (табела 10). Една испитаничка е со наод за мешана флора, без јасно докажан вид на *Lactobacillus* (табела 8).

Меѓу докажаните 19 видови лактобацили во оваа група, осум се докажани само во оваа група испитанички (*L. caviae*, *L. delbrueckii subsp bulgaricus*, *L. fornicalis*, *L. oris*, *L. psittacii*, *L. ruminis*, *L. vaginalis*, *L. acidophilus*). Од нив само *L. delbrueckii subsp bulgaricus* е докажан сам, а останатите се секогаш во комбинација со други лактобацили (табела 10).

Кај најголем број испитанички од втората група се регистрира *Lactobacillus iners*, како единечен вид (9 испитанички, односно 39,1%). Следува *Lactobacillus crispatus*, секогаш со барем уште еден вид (8 испитанички -34,8%, од нив 4 со два видови), потоа *Lactobacillus casei* (5 испитанички - 21,7%, од нив 4 со два видови), а останатите видови се регистрираат кај една, две или три испитанички (табела 8, 9). Разликата која се регистрира помеѓу *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus iners* верзус останатите соеви на *Lactobacillus* е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p = 0,0337$ ) (табела 9).

Кај една испитаничка се регистрира мешана флора и кај една испитаничка *Streptococcus agalacticae* во комбинација со *Lactobacillus* (табела 9).

Кај 13 од вкупно 19 испитанички (68,4%) од **ТРЕТАТА ГРУПА**, докажани се 7 видови лактобацили, најчесто како еден вид (9 испитанички), 2 видови (3 испитанички) и 3 видови (една испитаничка) (табела 6, 9). Кај 6 испитанички нема јасно докажан вид на лактобацили. Најчест вид е *Lactobacillus iners*, регистриран кај 9 (47,4%) испитанички, во сите случаи сам (табела 8, 9). Видот *L. apis* е докажани само во оваа група испитанички и тоа во комбинација со други лактобацили (табела 7, 10).

Од другите бактерии, кај 2 испитанички се регистрира *Aerococcus christensenii*, кај по една *Paenivacillus sacheonensis*, некултивабилен *Streptococcus sp.* и некултивабилен *Firmicutes* (табела 8).

Регистрираната разлика помеѓу *Lactobacillus iners* верзус останатите видови на *Lactobacillus* е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p = 0,0145$ ) (табела 9).

#### 4.2.2. Статистичка анализа за значењето на поединечни видови лактобацили и бактериска вагиноза

Колонизацијата со било кој *Lactobacillus* сигнификантно асоцира со нормална вагинална флора (прва група) верзус трета група (бактериска вагиноза) за  $p < 0,05$  (Fisher exact 2-tailed test,  $p = 0,000206$ ) (табела 9).

Колонизацијата со *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* сигнификантно асоцира со нормална вагинална флора (прва група) верзус трета група (бактериска вагиноза) за  $p < 0,05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p = 0,010405$ ) (табела 9).

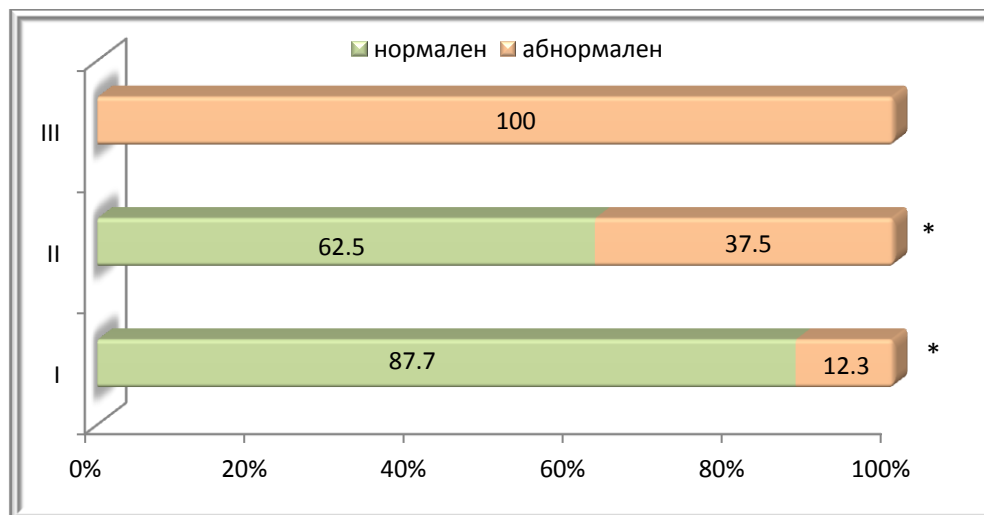
Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу *Lactobacillus iners* и бактериската вагиноза, како и помеѓу *Lactobacillus iners* и интермедиерна бактериска вагиноза (Pearson Chi-square: 2,500,  $p = 0,113846$ ) (табела 7).

Се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу *Lactobacillus crispatus* и бактериската вагиноза (Pearson Chi-square: 10,5840,  $p = 0,001140$ ). Според стапката на предимство (вкрстениот однос) *Lactobacillus crispatus* ја намалува веројатноста (делува протективно) за регистрацијата на бактериската вагиноза (OR=0,0870 (0,0167-0,4535)). Не се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу *Lactobacillus crispatus* и интермедиерна бактериска вагиноза (Pearson Chi-square: 3,7993,  $p = 0,051274$ ) (табела 9).

Се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу *Lactobacillus casei* и бактериската вагиноза (Pearson Chi-square: 11,0548,  $p = 0,000884$ ). Според стапката на предимство (вкрстениот однос) *Lactobacillus casei* ја намалува веројатноста (делува протективно) за бактериската вагиноза (OR=0,0870 (0,0171-0,4411)). Се регистрира статистички сигнификантна асоцијација помеѓу *Lactobacillus casei* и интермедиерна бактериска вагиноза (Pearson Chi-square: 6,4523,  $p = 0,011080$ ) (табела 9).

Според стапката на предимство (вкрстениот однос) *Lactobacillus casei* ја намалува веројатноста (делува протективно) за појава на интермедиерна бактериска вагиноза (OR=0,2174 (0,0643-0,7351)).

### 4.3. pH вредност на вагиналниот секрет



Графикон бр. 4. pH на вагиналниот секрет на испитаничките (cut off =4,5)

\* - Difference test,  $p=0,0079$

Нормален наод на pH, односно вредност под 4,5 е регистрирана кај 87,7% од испитаничките од првата група и кај 62,5% од втората група.

Нарушена / абнормална вредност на pH на вагиналниот секрет е регистрирана кај 12,3% од првата група, кај 37,5% од втората група и кај сите (100%) од третата група (графикон 4).

Разликата помеѓу абнормалноста на наодот на pH на вагинален секрет кај испитаничките од прва верзус втора група е статистички сигнификантен за  $p<0,05$  (Difference test,  $p=0,0079$ ).

Табела бр. 11. рН вредност на вагиналниот секрет кај испитаничките со направена молекуларна анализа на вагиналниот микробиом

рН / група		I		II		III		вкупно
		број	%	број	%	број	%	
нормален	вкупно (N=110)	57**	79,2	15**	20,8	0		72
	молекуларна анализа (N=93)	43***	75,4	14***	24,6	0		57
абнормален	вкупно (N=110)	8*, <sup>!</sup>	21,1	9*, <sup>!!</sup>	23,7	21 <sup>!,!!</sup>	55,2	38
	молекуларна анализа (N=93)	8 <sup>!m</sup>	22,2	9 <sup>!,!m</sup>	25,0	19 <sup>!,!m</sup>	52,8	36

\* - Difference test,  $p=0,0079$

\*\* - Difference test,  $p=0,0000$

\*\*\* - Difference test,  $p=0,0000$

<sup>!</sup>III/I - Difference test,  $p=0,0022$ ,

<sup>!m</sup>III/I - Difference test,  $p=0,0073$ ,

<sup>!!</sup>III/II - Difference test,  $p=0,0050$

<sup>!,!m</sup>III/I - Difference test,  $p=0,0156$

**Нормална вредност на рН** на вагинален секрет од вкупниот број на испитанички (N=110), се регистрира кај вкупно 72, од кои 79,2% се од првата група, 20,8% од втората група, а во третата не се регистрира нормална вредност. Процентуалниот наод е статистички сигнификантен за  $p<0,05$  (Difference test,  $p=0,0000$ )

Нормалана вредност на рН на вагинален секрет од групата на испитанички со молекуларна анализа (N=93) се регистрира кај вкупно 57 испитанички, од кои 75,4% се од првата група, 24,6% во втората група, а во третата не се регистрира нормална вредност. Процентуалниот наод е статистички сигнификантен за  $p<0,05$  (Difference test,  $p=0,0000$ ) (табела 11).

**Нарушена вредност на рН** на вагинален секрет од вкупниот број на испитанички (N=110), се регистрира кај вкупно 38 испитанички, од кои 21,1% се од првата група, 23,7% од втората група, а 55,2% од третата група. Процентуалниот наод е статистички сигнификантен помеѓу третата група верзус првата и третата група верзус втората за  $p<0,05$  (Difference test,  $p=0,0022$ ,  $p=0,0050$ )

Нарушена вредност на рН на вагинален секрет во групата со молекуларна анализа (N=93), се регистрира кај вкупно 36 испитанички, од кои 21,1% се од првата група, кај 23,7% во втората група, а 55,2% од третата група. Процентуалниот наод е статистички сигнификантен помеѓу третата група верзус првата и третата група верзус втората за  $p<0,05$  (Difference test,  $p=0,0073$ ,  $p=0,0156$ ) (табела 11).

Табела бр. 12. Видови на лактобацили и други бактерии кај нормална и нарушена рН вредност на вагиналниот секрет

Бактерија	Група со нормално рН N=57			Група со нарушено рН N=36		
	вкупно	сам	Со други видови	вкупно	сам	Со други видови
<b>Lactobacillus</b>						
<i>L. crispatus</i>	26		26	7		7
<i>L. casei</i>	24		24	6		6
<i>L. iners</i>	23	23		17	16	1
<i>L. gasseri</i>	5	1	4	3		3
<i>L. helveticus</i>	5		5	1		1
<i>L. gallinarum</i>	3		3	2		2
<i>L. taiwanensis</i>	3		3	2		2
<i>L. jensenii</i>	2	1	1			
<i>L. paragsseri</i>	1		1			
<i>L. johnsonii</i>	1		1	1		1
<i>L. reuteri</i>				2		2
<i>L. garvieae</i>	2		2			
<i>L. plantarum</i>	1		1			
<i>L. delbrueckii</i>				1		1
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	1	1		1		1
<i>L. ruminis</i>				1	1	
<i>L. psittacii</i>	1		1			
<i>L. fornicalis</i>	1		1			
<i>L. acidophilus</i>	2		2			
<i>L. apis</i>				1		1
<i>L. vaginalis</i>				1		1
<i>L. caviae</i>				1		1
<i>L. oris</i>				1		1
<b>Други бактерии</b>						
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1		1			
<i>Aerococcus christensenii</i>				2	2	
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија				1		
<i>Paenibacillus sacheonensis</i> ; некултивабилен <i>Streptococcus sp.</i> ; некултивабилен <i>Firmicutes</i>				1		1

Кај испитаничките со нормална рН вредност на вагинален секрет во најголем број е застапен *Lactobacillus crispatus* (во комбинација со други видови, кај 26 - 45,6% испитанички), потоа *Lactobacillus casei* (во комбинација, кај 24 - 42,1%), *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus gasseri* (кај по 5 - 8,8%). Останатите соеви во комбинација се под 5,0% (табела 12).

Разликата на застапеност на *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* во комбинација кај испитаничките со нормалната рН вредност на вагинален секрет е статистички сигнификантна во однос на останатите докажани лактобацили ( $p < 0.05$ ).

Кај испитаничките со нарушена рН вредност на вагинален секрет во најголем број е застапен *Lactobacillus iners* (докажан сам кај 16 - 44,4% испитанички); *Lactobacillus crispatus* е докажан во комбинација кај 7 испитанички (19,4%), потоа *Lactobacillus casei* (во комбинација) кај 6 (16,7%), и останатите видови, сами или во комбинација се застапени кај по една до три испитанички (табела 12).

#### 4.4. Брис од вагина – микробиолошка анализа

Во првата група (65 испитанички), кај 96,9% е докажано присуство на нормална флора, и само кај по една се докажани *Candida spp.* и *Streptococcus agalactiae* (GBS).

Во втората група (24 испитанички), кај 66,7% е докажано присуство на нормална флора, кај 58,3% *Candida spp.*, кај 16,7% *Enterococcus*, *Escherichia coli* и други бактерии и кај една испитаничка *Streptococcus agalactiae* (GBS).

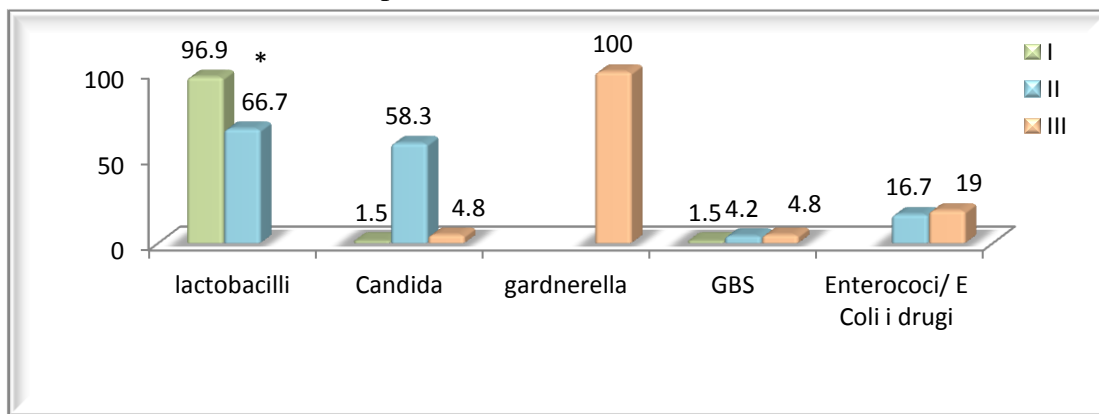
Во третата група, кај сите испитанички (100,0%) се докажани Clue клетки и *Gardnerella vaginalis*, кај 19,0% се изолирани *Enterococcus*, *Escherichia coli* и други бактерии (*Peptostreptococcus*, *Prevotella*) и во по еден примерок *Streptococcus agalactiae* (GBS) и *Candida spp.* (табела 13 и графикон 5).

Разликата на докажани лактобацили помеѓу првата верзус втората група е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p = 0,0001$ ).

Табела бр. 13. Микробиолошки наод во вагинален брис кај испитаничките, по групи

наод во вагина/ група	I (N=65)		II (N=24)		III (N=21)	
	број	%	Број	%	број	%
лактобацили	63*	96.9	16*	66.7	0	
<i>Candida</i>	1	1.5	14	58.3	1	4.8
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0		0		21	100.0
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	1	1.5	1	4.2	1	4.8
<i>Enterococi/ E. coli</i> и други бактерии	0		4	16.7	4	19.0

\* лактобацили I/II- Difference test,  $p = 0,0001$



\* лактобацили I/II- Difference test,  $p = 0,0001$

Графикон бр. 5. Микробиолошки наод од вагинален брис кај испитаничките

4.4.1. *Candida spp.* и *C. albicans*Табела бр. 14. Видови на лактобацили во однос на микробиолошки докажана *Candida* (само од група на испитанички со направена молекуларна анализа N=93)

Докажани видови на <i>Lactobacillus</i>	Културелно изолирана <i>Candida</i> (од група со молекуларна анализа)		
	Вкупно (N=12)	сама	со други соеви
<i>L. iners</i>	4	4	
<i>L. gasseri</i>	1		1
<i>L. johnsonii</i>	1		1
<i>L. crispatus;</i>	3		3
<i>L. casei</i>	2		2
<i>L. gallinarum;</i>	1		1
<i>L. taiwanensis</i>	1		1
<i>L. reuteri</i>	1		1
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	1	1	
<i>L. vaginalis</i>	1		1
<i>L. caviae</i>	1		1
<i>L. oris;</i>	1		1

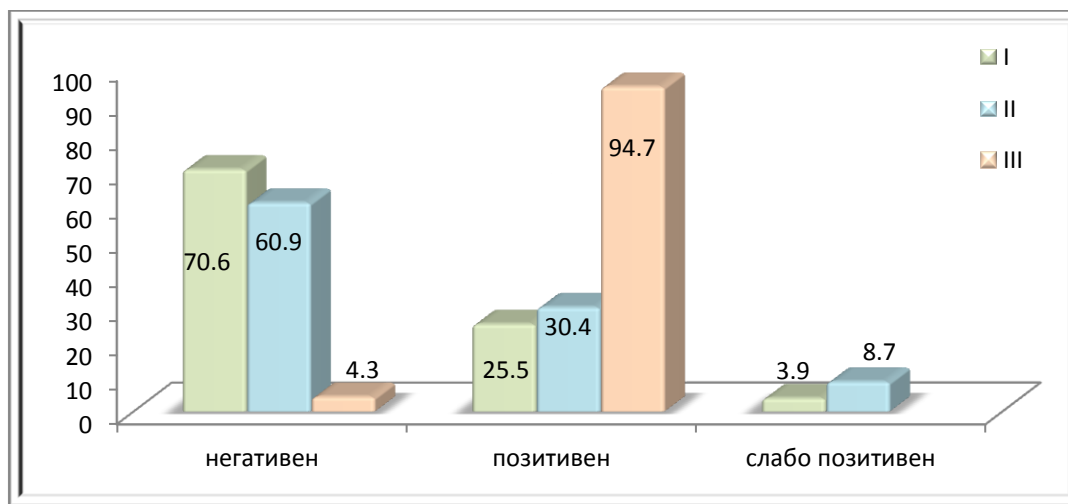
Од вкупниот број на испитанички со направена молекуларна анализа (N=93), кај 12 е културелно изолирана *Candida spp.* Од нив, кај 4 е регистриран сам *Lactobacillus iners*. Следи *Lactobacillus crispatus*, кај 3 испитанички, во комбинација со други видови лактобацили, како и *Lactobacillus casei*, регистриран кај 2 испитанички (табела 14).

#### 4.5. *Gardnerella vaginalis* докажана со микробиолошки и молекуларни методи

Од вкупниот број на испитанички вклучени во студијата (N=110), *Gardnerella vaginalis* микробиолошки е докажана кај вкупно 21 испитаничка, сите од третата група.

Табела бр. 15. *Gardnerella vaginalis* докажана со молекуларна анализа и со микробиолошко испитување на вагиналниот брис

наод / анализа-групи	<i>Gardnerella vaginalis</i> –молекуларна анализа								<i>Gardnerella vaginalis</i> - микробиолошки методи							
	I		II		III		вкупно		I		II		III		вкупно	
	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
негативен	36	70,6	14	60,9	1	4,3	51	54,8	65	100,0	24	100,0			89	80,9
позитивен	13	25,5	7	30,4	18	94,7	38	40,9					21	100,0	21	19,1
слабо позитивен	2	3,9	2	8,7			4	4,3								
<b>Вкупно</b>	<b>51</b>	<b>100,0</b>	<b>23</b>	<b>100,0</b>	<b>19</b>	<b>100,0</b>	<b>93</b>	<b>100,0</b>	<b>65</b>	<b>100,0</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>100,0</b>	<b>110</b>	<b>100,0</b>



Графикон бр. 6. *Gardnerella vaginalis* докажана со молекуларни и со микробиолошки методи (N=93)

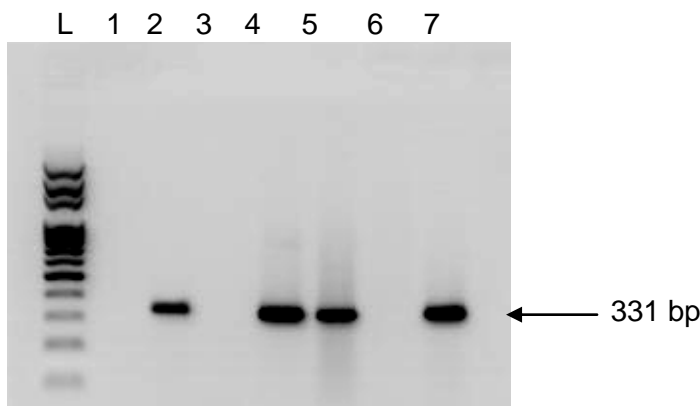
Од вкупниот број на испитанички кај кои е направена молекуларна анализа, наодот на *Gardnerella vaginalis* е позитивен кај 40,9%. Наодот е статистички сигнификантно (за  $p < 0,05$ ) во третата група (94,7%) во однос на втората (30,4 %) и во однос на првата група (25,5%).

Слабо позитивен резултат од молекуларна анализа се регистрира кај две испитанички во првата и втората група.

Негативен резултат се регистрира кај вкупно 51 испитаничка (54,8% од сите), од кои 36 (70,6%) се од првата група, 14 (60,9%) од втората група и само една од третата група (табела 15 и графикон 6).

Со молекуларната анализа *Gardnerella vaginalis* се регистрира кај 13 (25,5%) од испитаничките во првата група и кај 7 (30,4%) од испитаничките во втората група. Според микробиолошките критериуми за микроскопска и културелна идентификација на *Gardnerella vaginalis* во вагинални примероци, таа кај сите овие испитанички не беше значајна.

Со молекуларната анализа *Gardnerella vaginalis* се регистрира кај 18 од 19 испитанички во третата група, иако според микроскопските критериуми за дијагноза на бактериска вагиноза беше регистрирана кај 100,0%.



Слика бр. 3. PCR амплификација на *Gardnerella vaginalis* (L - 100 bp DNA Ladder, 1,3 и 6 - негативни примероци, 2, 4, 5 и 7 –позитивни примероци за *Gardnerella vaginalis*)

Табела бр 16. Видови на лактобацили и други бактерии со однос на микробиолошки и молекуларно докажана *Gardnerella vaginalis*

докажани видови на бактерии	вкупен број на испитанички N=93	сама	Со други видови	<i>Gardnerella vaginalis</i> + Молекуларна анализа			<i>Gardnerella vaginalis</i> +/- Молекуларна анализа			<i>Gardnerella vaginalis</i> + Микробиолошки наод		
				Вкупно N=38	сама	Со други видови	Вкупно N=4	сама	Со други видови	Вкупно N=21	сама	Со други видови
<b>Lactobacillus</b>												
<i>L. iners</i>	40	39	1	19	18	1	2	2		9	9	
<i>L. gasseri</i>	8	1	7	4		4				2		2
<i>L. helveticus,</i>	6		6	2		2						
<i>L. johnsonii</i>	3		3	2		2				1		1
<i>L. crispatus;</i>	33		33	7		7	1		1	2		2
<i>L. casei</i>	30		30	6		6	1		1	2		2
<i>L. gallinarum;</i>	5		5	2		2						
<i>L. taiwanensis</i>	5		5	2		2				1		1
<i>L. reuteri</i>	2		2	2		2						
<i>L. paragasseri;</i>	1		1	1		1						
<i>L. plantarum</i>	1		1	1		1						
<i>L. garvieae;</i>	2		2	1		1						
<i>L. delbrueckii</i>	1		1	1		1						
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	2	1	1	2	1	1						
<i>L. vaginalis</i>	1		1	1		1						
<i>L. caviae</i>	1		1	1		1						
<i>L. oris;</i>	1		1	1		1						
<i>L. apis</i>	1		1	1		1				1		1
<b>Други бактерии</b>												
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	1		1	1		1						
<i>Aerococcus christensenii</i>	2	2		2	2					2	2	
<i>Paenivacillus sacheonensis;</i>	1		1	1		1				1		1

Табела бр. 17. Видови на *Lactobacillus* кај испитанички со докажана *Gardnerella vaginalis*, од групата со нормален наод/флора.

НОРМАЛНА ФЛОРА		
Видови и комбинации на <i>Lactobacillus</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i> (молекуларна анализа)	
	Позитивни (H=13)	Слабо позитивни (H=2)
<i>Lactobacillus iners</i>	<b>5</b> (3 UUm+; 2UUб+; 3↑pH 1MНм+)	<b>2</b>
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i>	<b>3</b> (2UUm+, 2↑pH)	
<i>L. iners</i> ; <i>L. reuteri</i>	<b>1</b> (MНм+↑pH)	
<i>L. gallinarum</i> ; <i>L. helveticus</i> ; <i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> ; Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	<b>1</b> (UUб,м+; MНм+, ↑pH)	
<i>L. gasseri</i> ; <i>L. taiwanensis</i>	<b>1</b> (UUбм+; ↑pH)	
<i>L. gasseri</i> ; <i>L. paragasseri</i> ; <i>L. taiwanensis</i>	<b>1</b>	
<i>L. helveticus</i> ; <i>L. crispatus</i> , <i>L. plantarum</i> ; <i>L. garvieae</i> ; <i>L. casei</i>	<b>1</b> (UUm+)	

Легенда: UUб -*Ureaplasma urealyticum* изолирана од брис; UUm -*Ureaplasma urealyticum* докажана со молекуларна анализа; MНм *Mycoplasma hominis* докажана со молекуларна анализа

Табела бр. 18. Видови на *Lactobacillus* кај испитанички со докажана *Gardnerella vaginalis*, од групата со интермедиерна флора.

ИНТЕРМЕДИЕРНА ФЛОРА		
Видови и комбинации на <i>Lactobacillus</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i> (молекуларна анализа)	
	Позитивни (n=7)	Слабо позитивни (n=2)
<i>Lactobacillus iners</i>	<b>4</b> (1E.Coli +; 2 <i>Candida spp.</i> +; 4UUm+; 3UUб+; 2MНм+; 1MНб+; 4↑pH)	
<i>L. delbrueckii</i> ; <i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	<b>2</b> (1 <i>Chlamydia trachomatis</i> +; 2UUm+; 1UUб+; 1 ↑pH)	
<i>L. gallinarum</i> ; <i>L. crispatus</i> ; <i>L. johnsonii</i> ; <i>L. vaginalis</i> ; <i>L. caviae</i> ; <i>L. oris</i> ; <i>L. reuteri</i>	<b>1</b> ( <i>Candida spp.</i> +; UUбм+; ↑pH)	
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i>		<b>2</b> (1 <i>Candida spp.</i> +; UUm±)

Легенда: UUб -*Ureaplasma urealyticum* изолирана од брис; UUm -*Ureaplasma urealyticum* докажана со молекуларна анализа; MНб - *Mycoplasma hominis* изолирана од брис; MНм *Mycoplasma hominis* докажана со молекуларна анализа

Според молекуларната анализа, *Gardnerella vaginalis* истовремено се регистрира со *L.iners* (кај 18 од 38 испитанички - 47,4%), односно со *Lactobacillus crispatus* (кај 7 - 18,4%) и *Lactobacillus casei* (кај 6 - 15,8%) секогаш во комбинација со други видови лактобацили (табела 16).

Според микробиолошките наоди, со *Gardnerella vaginalis* истовремено се регистрирани: само *L.iners* (кај 9 од 21 испитаничка - 42,9%), *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus gasseri* (кај 2 - 9,5%) (табела 16).

#### 4.6. *Ureaplasma urealyticum* докажана со микробиолошки и молекуларни методи

Табела бр. 19. Наод на *Ureaplasma urealyticum* со микробиолошка изолација и со молекуларни методи

<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Вкупно земени брисеви N=102		Молекуларна анализа N= 93		Вкупен број каде се направени двете анализи N= 90	
	број	%	број	%	број	%
позитивен наод	23*	21,6	40	43,0	20	22,2
слабо позитивен			1	1,1		

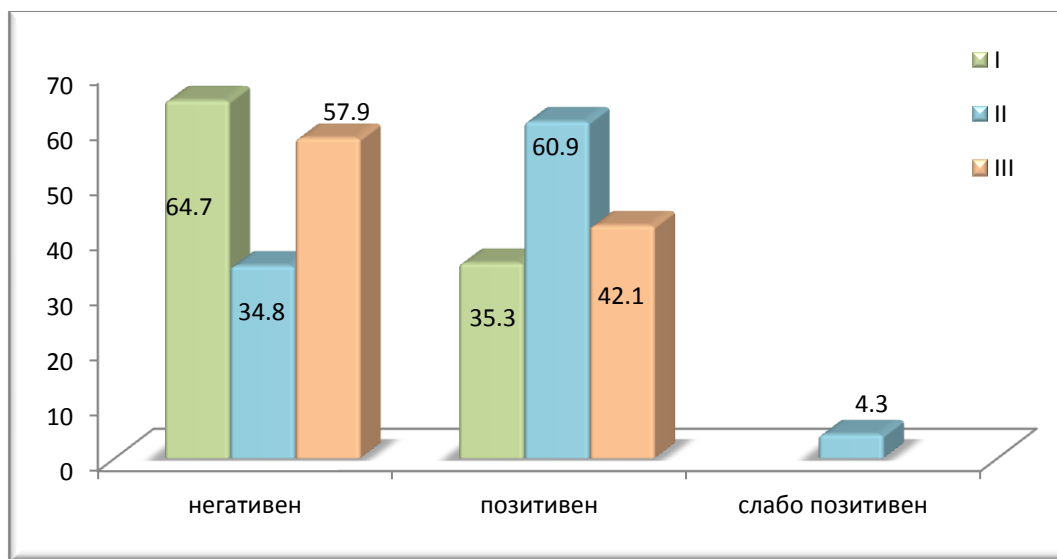
\*3 се од група каде не е направена молекуларна анализа

*Ureaplasma urealyticum* е изолирана кај 23 од 102 испитанички (21,6%), а молекуларно е докажана кај 40 од 93 испитанички (43,0%). Кај 90 испитанички се направени и двете анализи и докажана е *Ureaplasma urealyticum* кај 20 од нив (22,2%) (табела 19). Со молекуларна анализа се потврди присуство на *Ureaplasma urealyticum* кај сите позитивни брисеви, но со молекуларните методи е докажана кај поголем број испитанички.

Табела бр. 20. *Ureaplasma urealyticum* докажана молекуларно и микробиолошки културелно, по групи на испитанички

Резултат од <i>Ureaplasma urealyticum</i> / група	Молекуларна анализа (N=93)						Културелна изолација (N=102)					
	I		II		III		I		II		III	
	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
негативен	33	64,7	8	34,8	11	57,9	50	84,7	17	70,8	12	63,2
позитивен	18*	35,3	14*	60,9	8*	42,1	9	15,3	7	29,2	7	36,8
слабо позитивен			1	4,3								
вкупно	51	100,0	23	100,0	19	100,0	59	100,0	24	100,0	19	100,0

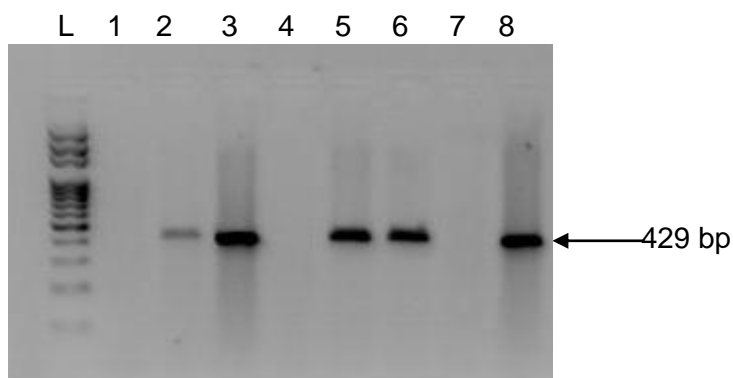
\* II/I ; II/III- p=0,0397

Графикон бр. 7. Молекуларен наод на *Ureaplasma urealyticum* по групи

Според молекуларната анализа, негативен наод за *Ureaplasma urealyticum* се регистрира кај 64,7% во првата група, 34,8% од втората група и кај 57,9% од третата група (табела 20 и графикон 7). Позитивниот наод е најчест во втората група (60,9%), следено со третата група (42,1%) и најмалку во првата група (35,3%).

Постојат разлики во молекуларното и културелното докажување на *Ureaplasma urealyticum*. Позитивниот наод е значајно понизок во првата група (35,3% молекуларно и 15,3% културелно) и во втората група (60,9% молекуларно и 29,2% културелно), а во третата група разликите се помалечки (42,1% молекуларно и 36,8% културелно).

Разликите се статистички сигнификантни (за  $p < 0,05$ ,  $p = 0,0397$ ) и тоа во втората група (60,9%) во однос на првата (35,3%), и третата група (42,1 %) (табела 20).

Слика бр. 4. PCR амплификација на *Ureaplasma* (L - 100 bp DNA Ladder, 1,4 и 7 - негативни примероци, 2, 3, 5, 6 и 8 – позитивни примероци за *Ureaplasma*)

Табела бр. 21. Видови на лактобацили и други докажани бактерии со молекуларна анализа, кај испитанички со молекуларно и културелно докажана *Ureaplasma urealyticum*

Докажани видови на бактерии	вкупен број на испитанички (N=93)	сама	Со други	<i>Ureaplasma urealyticum</i> + Молекуларна анализа			<i>Ureaplasma urealyticum</i> +/- Молекуларна анализа			<i>Ureaplasma urealyticum</i> + културелно		
				Вкупно (N=40)	сама	Со други	Вкупно (N=1)	сама	Со други	Вкупно (N=23)	сама	Со други
<b>Lactobacillus</b>												
<i>Lactobacillus jensenii</i>	2	1	1	1		1						
<i>L. iners</i>	40	39	1	19	19					13	13	
<i>L. gasseri</i>	8	1	7	3	1	2				1		1
<i>L. helveticus,</i>	6		6	2		2				1		1
<i>L. johnsonii</i>	3		3	1		1				1		1
<i>L. crispatus;</i>	33		33	13		13	1		1	4		4
<i>L. casei</i>	30		30	13		13	1		1	3		3
<i>L. gallinarum;</i>	5		5	3		3				2		2
<i>L. taiwanensis</i>	5		5	2		2				1		1
<i>L. reuteri</i>	2		2	1		1				1		1
<i>L. plantarum</i>	1		1	1		1						
<i>L. garvieae;</i>	2		2	1		1						
<i>L. delbrueckii</i>	1		1							1		1
<i>L.delbrueckii subsp bulgaricus</i>	2	1	1	2	1	1				1		1
<i>L. ruminis</i>	1	1		1	1							
<i>L. psittacii</i>	1		1	1		1						
<i>L. formicilis</i>	1		1	1		1						
<i>L. vaginalis</i>	1		1	1		1				1		1
<i>L. caviae</i>	1		1	1		1				1		1
<i>L. oris</i>	1		1	1		1				1		1
<b>Други бактерии</b>												
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	1		1	1		1				1		1
<i>Aerococcus christensenii</i>	2	2		1	1					1	1	

Кај позитивен наод на *U. urealyticum* со молекуларна анализа истовремено се регистрира само *L.iners* (19 од 40 испитанички -47,5%), а *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* во комбинација (13 испитанички - 32,5%) (табела 21).

Кај позитивен наод на *U. urealyticum* со култивирање истовремено се регистрира *L.iners* (13 од 23 испитанички -56,5%), односно *Lactobacillus crispatus* (4 испитанички) и *Lactobacillus casei* (3 испитанички) во комбинација со други лактобацили (табела 21).

#### 4.7. *Mycoplasma hominis* докажана со микробиолошки и молекуларни методи

Табела бр. 22. Позитивен наод за *Mycoplasma hominis*

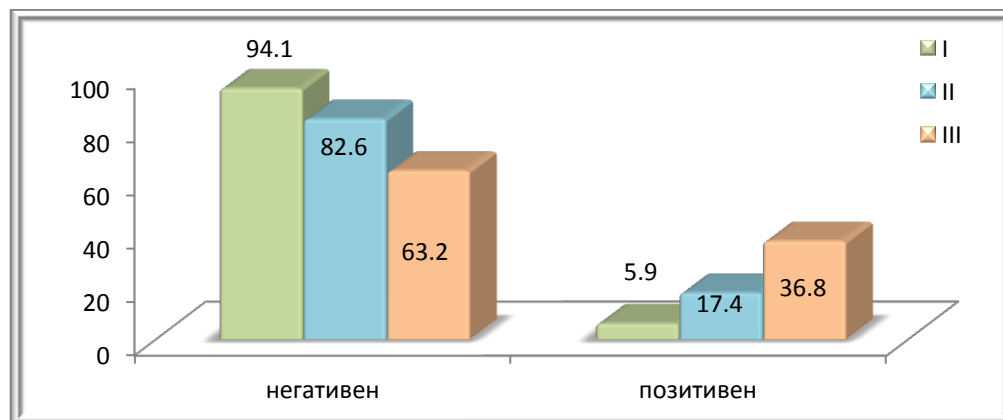
<i>Mycoplasma hominis</i>	Вкупно земени брисеви N=102		Молекуларна анализа N= 93		Вкупен број каде се направени двете анализи N= 90	
	број	%	број	%	број	%
Позитивен наод	4	3,9	14	15,1	3	3,3

Двојна анализа за *Mycoplasma hominis* (со култивација и молекуларна анализа) е направена кај вкупно 90 испитанички, од кои наодот со двете методи е позитивен само кај 3 испитанички.

Со културелно изолирање *Mycoplasma hominis* е докажана кај 4, а со молекуларна анализа кај 14 испитанички (табела 22)

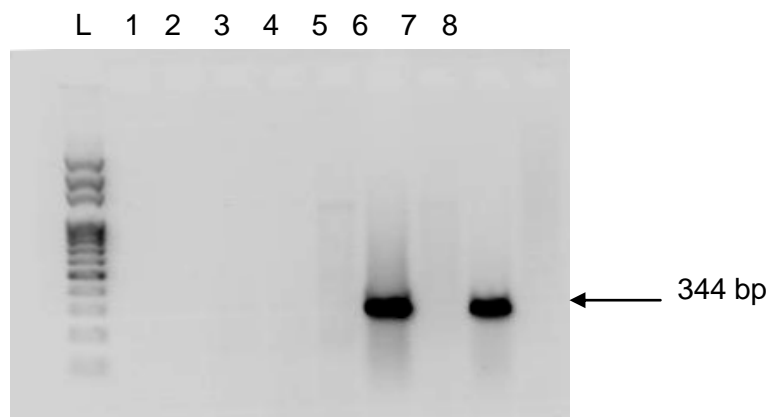
Табела бр. 23. Дистрибуција на позитивните и негативните наоди на *Mycoplasma hominis* според методот на докажување и групите на испитанички

Резултат за <i>Mycoplasma hominis</i> / група	Молекуларна анализа						Културелно докажување					
	I		II		III		I		II		III	
	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%	број	%
негативен	48	94,1	19	82,6	12	63,2	59	100,0	23	95,8	16	84,2
позитивен	3	5,9	4	17,4	7	36,8			1	4,2	3	15,8
вкупно	51	100,0	23	100,0	19	100,0	59	100,0	24	100,0	19	100,0

Графикон бр. 8. Резултати од молекуларна анализа за *Mycoplasma hominis* по групи на испитанички

Според молекуларната анализа, *Mycoplasma hominis* е најчесто докажана во третата група (7 испитанички), следи втората (4 испитанички) и најретко во првата група (3 испитанички) (табела 23 и графикон 8).

Постојат разлики во молекуларното и културелното докажување на *Mycoplasma hominis*. Во првата група, во која со молекуларна анализа е докажана *Mycoplasma hominis* кај 3 од 51 испитаничка, микробиолошкиот културелен наод е кај сите негативен. Во втората група молекуларно е докажана кај 4 од 23 испитанички, а културелно само кај 1 од 24 испитанички, при што разликата е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$ . Во третата група молекуларно *Mycoplasma hominis* се регистрира кај 7 од 19 испитанички (36,8%) а културелно кај 3 од 19 испитанички, при што разликата е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (табела 23).



Слика бр. 5. PCR амплификација на *Mycoplasma hominis* (L - 100 bp DNA Ladder, 1-5, 7 - негативни примероци, 6 и 8 – позитивни примероци за *Mycoplasma hominis*)

Табела бр. 24. Видови на лактобацили и други докажани бактерии со молекуларна анализа, кај испитанички со молекуларно и културелно докажана *Mycoplasma hominis*.

Докажани видови на бактерии	Кај вкупен број испитанички			<i>Mycoplasma hominis</i> + Молекуларна анализа			<i>Mycoplasma hominis</i> + културелно		
	(N=93)	сама	Со други соеви	Вкупно (N=14)	сама	Со други соеви	Вкупно (N=4)	сама	Со други соеви
<b>Lactobacillus</b>									
<i>L. iners</i>	40	39	1	8	7	1	3	3	0
<i>L. gasseri</i>	8	1	7	1		1			
<i>L. crispatus;</i>	33		33	1		1			
<i>L. casei</i>	30		30	1		1			
<i>L. taiwanensis</i>	5		5	1		1			
<i>L. reuteri</i>	2		2	1		1			
<i>L. ruminis</i>	1	1		1		1			
<b>Други бактерии</b>									
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	1		1						
<i>Aerococcus christensenii</i>	2	2		1	1		1	1	

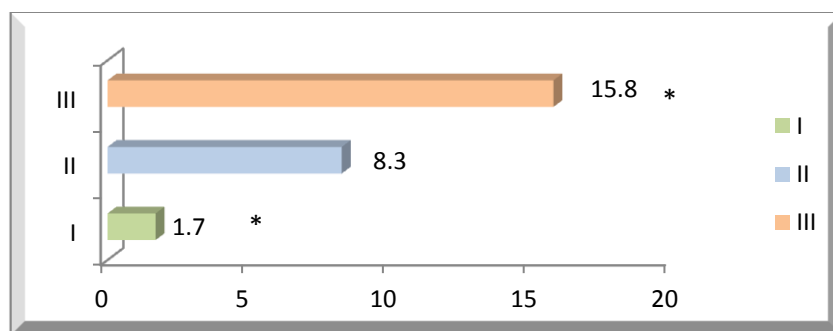
Кај 7 од 14 испитанички кај кои е молекуларно докажана *Mycoplasma hominis* се регистрира само *Lactobacillus iners*, а кај една тој лактобацил е во комбинација со други видови. Кај вкупно 4 испитанички со културелно изолирана *Mycoplasma hominis*, во три случаи е докажан *Lactobacillus iners* и во еден *Aerococcus christensenii* (табела 24).

#### 4.8. Доказан антиген на *Chlamydia trachomatis* во цервикален брис

Табела бр. 25. Испитанички со докажан антиген на *Chlamydia trachomatis* со директна имунофлуоресценција (ДИФ)

Наод / број на испитанички каде е направена анализа по групи (N=102)	I (N = 59)		II (N = 24)		III (N=19)	
	број	%	број	%	број	%
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1*	1,7	2	8,3	3*	15,8

\* - Difference test, p=0,0154



\* - Difference test, p=0,0154

Графикон бр. 9. Наод на *Chlamydia trachomatis* според групата на испитанички

Од вкупно 102 испитанички кај кои е направена анализа, *Chlamydia trachomatis* се регистрира кај вкупно 6 испитанички, односно кај една од првата група, кај две од втората група и кај три од третата група, при што застапеноста е статистички несигнификантна за  $p > 0,05$  помеѓу првата и втората група, но застапеноста е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  помеѓу третата и првата група (Difference test,  $p=0,0154$ ) (табела 25 и графикон 9).

Табела бр. 26. Видови на лактобацили и други докажани бактерии со молекуларна анализа, кај испитанички со позитивен наод за *Chlamydia trachomatis*

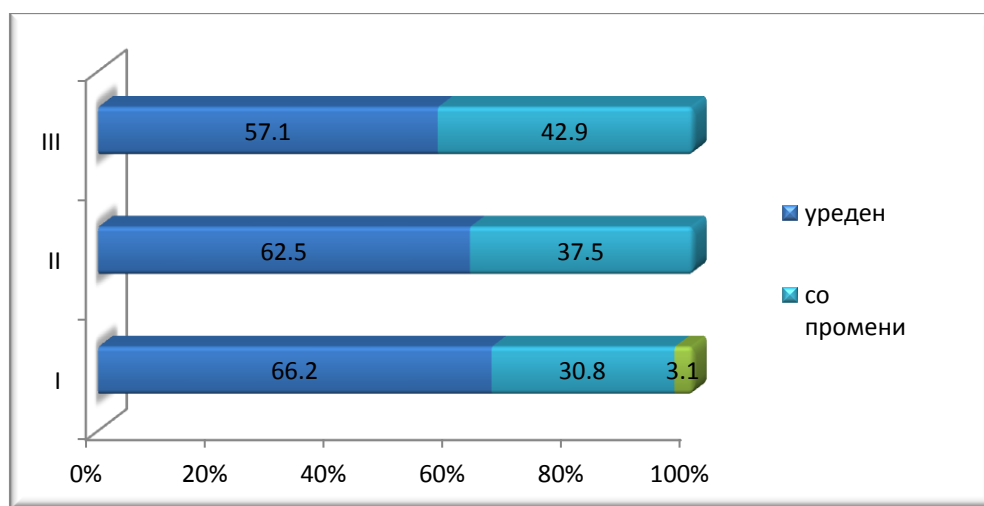
Докажан вид на бактерии	Вкупен број на испитанички (N=93)	сама	Со други видови	<i>Chlamydia trachomatis</i> + (од група со молекуларна анализа)		
				Вкупно (N=6)	сама	Со други видови
<b>Lactobacillus</b>						
<i>L. helveticus</i> ,	6		6	1		1
<i>L. crispatus</i> ;	33		33	2		2
<i>L. casei</i>	30		30	1		1
<i>L. garvieae</i> ;	2		2	1		1
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i>	2	1	1	1	1	
<i>L. acidophilus</i>	2		2	1		1
<b>Други бактерии</b>						
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	1		1			
<i>Aerococcus christensenii</i>	2	2		1	1	
<i>Paenivacillus sacheonensis</i> ;	1		1	1		1
некултивабилен <i>Firmicutes</i>	1		1	1		1

Кај испитаничките со наод на *Chlamydia trachomatis* молекуларно се регистрираат: поединечно *L. delbrueckii subsp bulgaricus* и *Aerococcus christensenii* (кај по една испитаничка), и *Lactobacillus crispatus* (кај две испитанички, заедно со друг вид лактобацил). Другите 4 видови лактобацили се регистрирани само по еднаш и кај по една испитаничка (табела 26).

#### 4.9. Наод од цитолошка анализа – брис по Papanicolaou (PAP/ПАП)

Табела бр. 27. ПАП статус на испитаничките по групи

ПАП статус/ група според Нугент скорот	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
уреден	43	66,2	15	62,5	12	57,1
регистрали промени	20	30,8	9	37,5	9	42,9
недостасува	2	3,1				



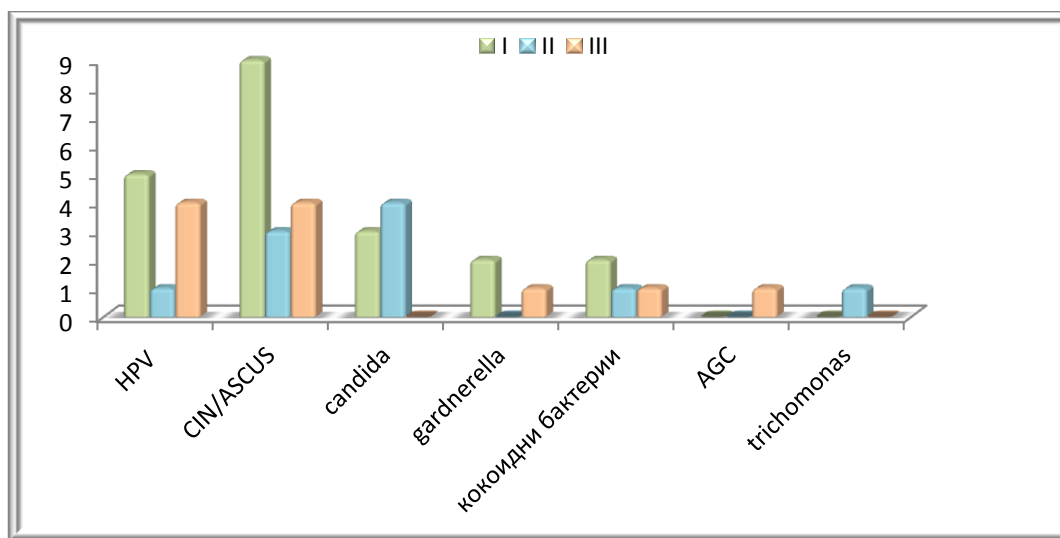
Графикон бр. 10. ПАП статус на испитаничките по групи

Уреден ПАП статус се регистрира кај поголем дел од испитаничките во трите групи (66,2%-I; 62,5%-II; 57,1%-III ) (табела 27 и графикон 10).

Табела бр. 28. Промени регистрирани на ПАП брисот, по групи

ПАП промени/ група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
HPV или промени што асоцираат со вирусни инфекции	5	7,7	1	4,2	4	19,0
CIN/ASCUS	9	13,8	3	12,5	4	19,0
<i>Candida spp.</i>	3	4,6	4	16,7	0	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	3,1	0		1	4,8
кокоидни бактерии	2	3,1	1	4,2	1	4,8
AGC	0		0		1	4,8
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0		1	4,2	0	

Легенда: CIN (Cervical intraepithelial neoplasia); ASCUS (Atypical squamous cells of undetermined significance); AGC (atypical glandular cells)



Графикон бр. 11. Промени регистрирани на ПАП брисот по групи

Промените кои се регистрирани на ПАП тестот се изолирани или во комбинација, односно кај некои од испитаничките се регистрирани и повеќе од една промена.

Во првата група промени во наодот од ПАП тестот се регистрира кај 30,8%, во втората група кај 37,5% и во третата група кај 42,9% од испитаничките (табела 28 и графикон 11).

Во првата група најчесто е регистриран CIN/ASCUS (кај 9), HPV или промени што асоцираат на вирусни инфекции (кај 5), *Candida spp.* (кај 3) и *Gardnerella vaginalis* и кокоидни бактерии (кај две испитанички).

Кај испитаничките од втората група е добиен наод за *Candida spp.* (кај 4), CIN/ASCUS (кај 3), и HPV или промени што асоцираат со вирусни инфекции, како и *Trichomonas vaginalis* и кокоидни бактерии кај по една пациентка.

Кај испитаничките од третата група се регистрирани: HPV или промени што асоцираат со вирусни инфекции (кај 4), CIN/ASCUS (кај 4), и AGC, *Gardnerella vaginalis* и кокоидни бактерии (кај по една пациентка). (табела 28 и графикон 11).

Табела бр. 29. ПАП статус кај сите испитанички и испитанички со направена молекуларна анализа на вагиналниот секрет

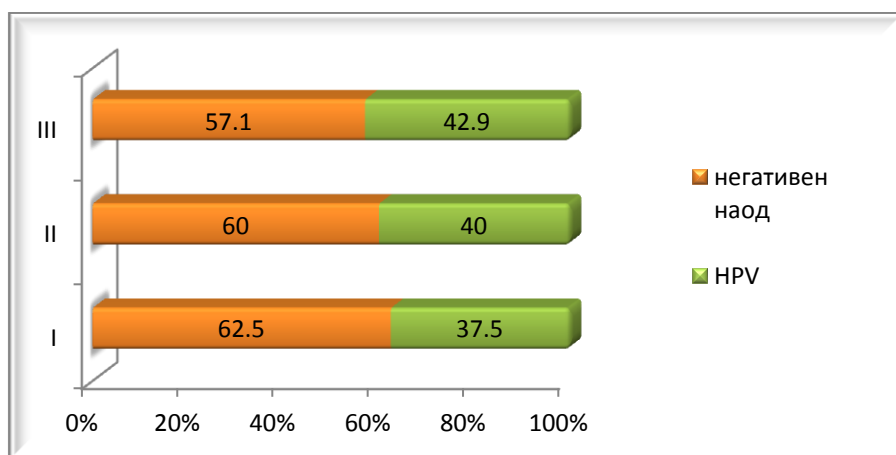
ПАП	вкупно N=110		молекуларна анализа N=93	
	број	%	број	%
Уреден	70	63,7	63	67,7
Со промени	38	34,5	30	32,3
Недостасуваат	2	1,8		

Уреден наод од ПАП се регистрира кај 63,7% од вкупниот број на испитанички, односно кај 67,7% од групата на испитанички со извршена молекуларна анализа на вагиналниот секрет за докажување на микроорганизми (вагинален микробиом). (табела 29).

## 4.10. Наод од HPV скрининг

Табела бр. 30. HPV статус кај испитанички по групи

HPV статус / група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Негативен наод	5	62,5	3	60,0	4	57,1
Позитивен наод (високо ризичен тип)	3	37,5	2	40,0	3	42,9
Вкупно	8	100,0	5	100,0	7	100,0



Графикон бр. 12. HPV статус на испитаничките

HPV статусот е одреден кај 8 испитанички од првата група, кај 5 испитанички од втората и кај 7 испитанички од третата група. Високоризичен тип на HPV е докажан кај 3 испитанички од првата група, кај 2 испитанички од втората и кај 3 испитанички од третата група (табела 30 и графикон 12).

Табела бр. 31. Видови на лактобацили според ПАП статусот и HPV скринингот

доказани видови на бактерии	Група со уреден ПАПстатус (N=63)			Група со наод од ПАП за HPV/промени што асоцираат на вирусни инфекции (N=10 од 30)			Група со наод од ПАП за CIN/ASCUS (N=16 од 30)			Група со докажан високо ризичен HPV (N= 8 од 20)		
	вкупно	сам	Со други соеви	вкупно	сам	Со други соеви	вкупно	сам	Со други соеви	вкупно	сам	Со други соеви
<b>Lactobacillus</b>												
<i>L. crispatus</i>	24		24	2		2	4		4			
<i>L. casei</i>	22		22	2		2	4		4			
<i>L. iners</i>	25	24	1	6	6		6	6		6	6	
<i>L. gasseri</i>	5		5									
<i>L. helveticus</i>	4		4				1		1			
<i>L. gallinarum</i>	3		3				1		1			
<i>L. taiwanensis</i>	4		4									
<i>L. jensenii</i>	1	1										
<i>L. paragsseri</i>	1		1									
<i>L. johnsonii</i>												
<i>L. reuteri</i>	1		1									
<i>L. garvieae</i>	2		2									
<i>L. plantarum</i>	1	1										
<i>L. delbrueckii</i>							1		1	1		1
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	1		1				1		1	1		1
<i>L. ruminis</i>	1	1										
<i>L. psittacii</i>												
<i>L. fornicalis</i>												
<i>L. acidophilus</i>	2		2									
<b>Други бактерии</b>												
<i>Aerococcus christensenii</i>	1	1		1	1					1	1	
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија							1		1			
<i>Paenivacillus sacheonensis</i> ;	1		1									
некултивабилен Firmicutes	1		1									

Помеѓу 10 испитанички со наод од ПАП тестот за HPV/промени што асоцираат на вирусни инфекции, *Lactobacillus iners* се регистрира кај 6 и тоа секогаш сам, што во однос на останатите докажани лактобацили е сигнификантно за  $p < 0,05$ . Видовите *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* се докажани кај по две испитанички, секогаш во комбинација со други видови лактобацили.

Помеѓу 16 испитанички со наод за CIN/ASCUS од ПАП тестот, *Lactobacillus iners* се регистрира кај 6, секогаш сам. Видовите *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* се докажани кај по 4 испитанички, секогаш во комбинација со други видови на лактобацили.

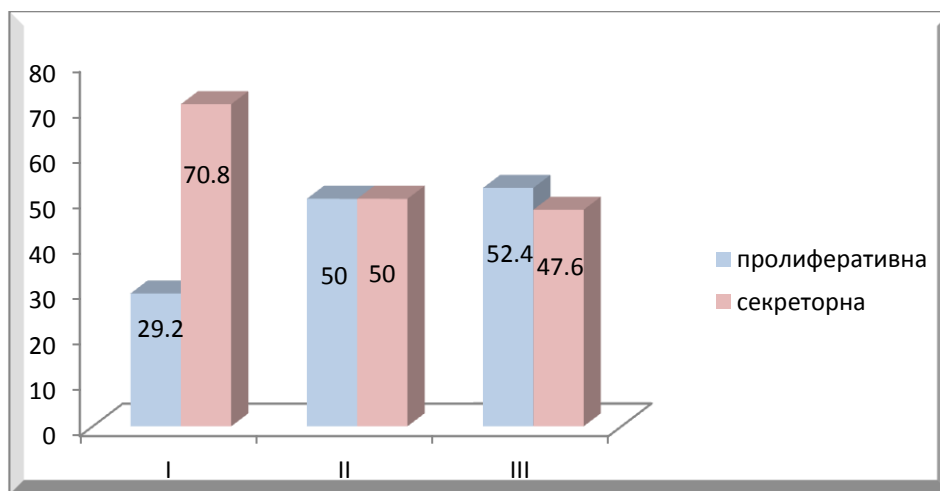
Помеѓу 8 испитанички со докажан високо ризичен HPV, *Lactobacillus iners* се регистрира кај 6, и тоа секогаш сам (табела 31).

#### 4.11. Фаза од менструален циклус при земање на брисевите

Табела бр. 32. Фаза на менструалниот циклус во моментот на земање на примероците за испитување

Фаза од циклус / група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
прва/ пролиферативна *	19	29,2	12	50,0	11	52,4
втора /секреторна *	46	70,8	12	50,0	10	47,6
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0

\* - Pearson Chi-square: 5,42037, p=0,066524



Графикон бр. 13. Фаза на менструалниот циклус во моментот на испитувањето

Сите испитанички дадоа податок за редовен менструален циклус со траење од 26 до 30 дена.

Во прва половина (пролиферативна фаза) од циклусот беа 29,2% од испитаничките од првата група, 50,0% од испитаничките од втората група и 52,4% од третата група.

Во втора половина (секреторна фаза) од циклусот беа 70,8% од испитаничките од првата група, 50,0% од испитаничките од втората група и 47,6% од третата група (табела 32 и графикон 13).

Фазата од циклусот статистички не асоцира со микробиолошкиот наод за статусот на вагиналното милје (нормалната вагинална флора, интермедиерна флора и бактериска вагиноза) односно поделбата на испитаничките во групи според Нугент скорот, за  $p > 0,05$  (Pearson Chi-square: 5,42037,  $p = 0,066524$ ).

## 4.12. Субјективни симптоми

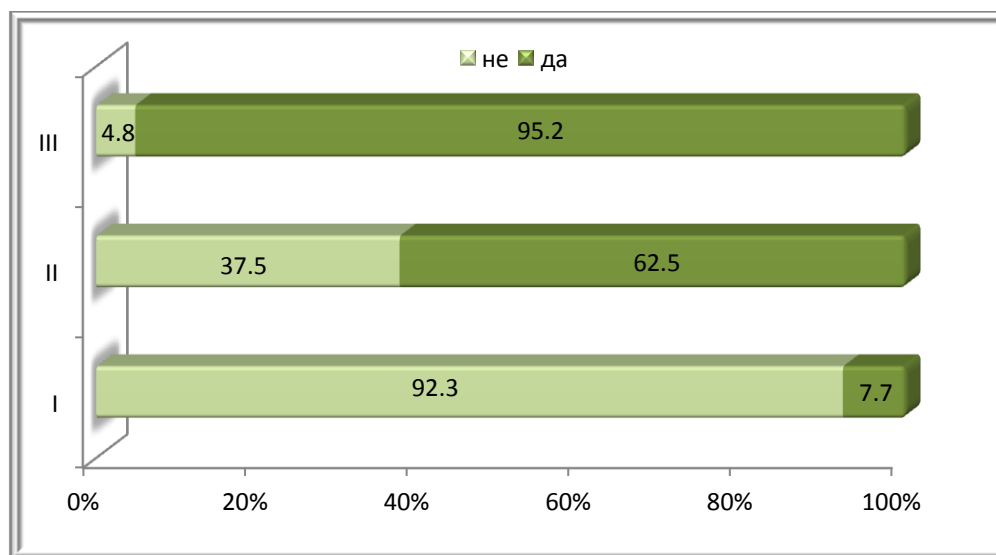
### 4.12.1. Поинтензивен вагинален секрет

Табела бр. 33. Поинтензивен вагинален секрет кај испитаничките по групи

Поинтензивен вагинален секрет / Група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	60	92,3	9	37,5	1	4,8
Да	5*, **	7,7	15*	62,5	20**	95,2
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0

\* I/II - Pearson Chi-square: 30,2217,  $p=0,000000$

\*\* I/III - Fisher 2-Tailed test,  $p=0,000000$



Графикон бр. 14. Поинтензивен вагинален секрет кај испитаничките по групи

Податок за поинтензивен вагинален секрет дадоа само 5 од испитаничките од првата група, 15 - 62,5% од втората и 20 - 95,2% од испитаничките од третата група (табела 33 и графикон 14).

Отсуство на поинтензивен вагинален секрет сигнификантно асоцира со првата група верзус втората група, за  $p<0,05$  (Pearson Chi-square: 30,2217,  $p=0,000000$ ) и првата верзус трета група, за  $p<0,05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p=0,000000$ ).

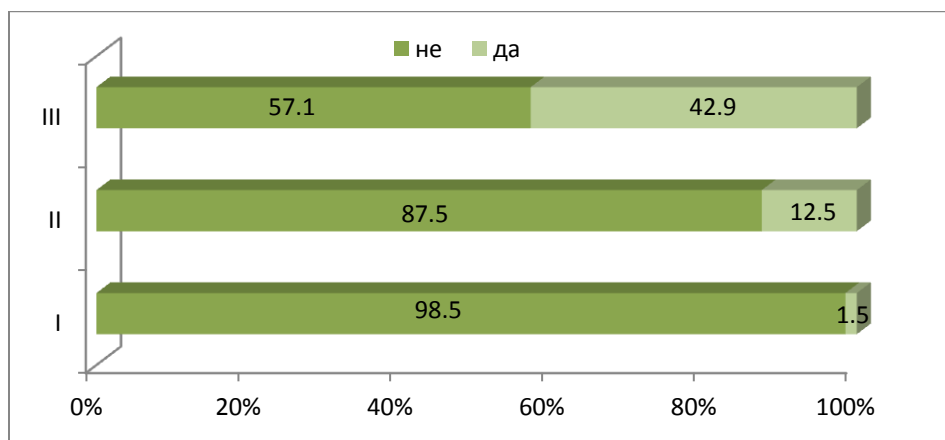
#### 4.12.2. Често мокрење или печење при мокрење

Табела бр. 34. Симптом на често мокрење и/или печење при мокрење кај испитаничките по групи

Често мокрење, печење при мокрење / Група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	64	98,5	21	87,5	12	57,1
Да	1*,**	1,5	3*	12,5	9**	42,9
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0

\* I/II - Fisher 2-Tailed test,  $p=0,058234$

\*\* I/III - Fisher 2-Tailed test,  $p=0,000005$



Графикон бр. 15. Симптом на често мокрење или печење при мокрење кај испитаничките

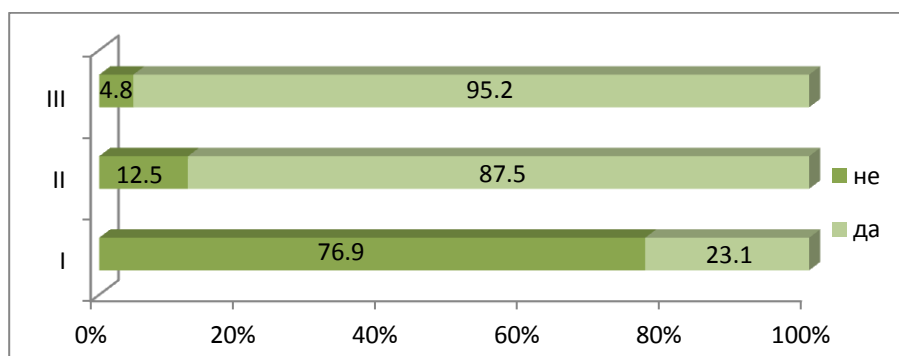
Често мокрење или печење при мокрењето беше регистрирано кај само една испитаничка од првата група, кај 3 од втората група и дури кај 9 - 42,9% испитанички од третата група (табела 34 и графикон 15).

Присуството на симптом на често мокрење или печење при мокрењето не е сигнификантно во прва група (со нормална вагинална флора) верзус втората група, за  $p>0,05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p=0,058234$ ), но сигнификантно асоцира со трета група (бактериска вагиноза) верзус нормалната вагинална флора (прва група) за  $p<0,05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p=0,000005$ ).

## 4.12.3. Пецкање во интимната регија

Табела бр. 35. Симптом на пецкање во интимната регија кај испитаничките по групи

Пецкање кај интимната регија / Група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	50	76,9	3	12,5	1	4,8
Да	15*,**	23,1	21*	87,5	20**	95,2
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0

\* I/II - Fisher 2-Tailed test,  $p=0,00000$ \*\* I/III - Fisher 2-Tailed test,  $p=0,000000$ 

Графикон бр. 16. Симптом на пецкање во интимната регија кај испитаничките по групи

Податок за пецкање во интимната регија се регистрира кај 23,1% од испитаничките од првата група, кај 87,5.% од втората и 95,2% од третата група (табела 35 и графикон 16).

Отсуство на симптом на пецкање во интимната регија сигнификантно асоцира со нормалната вагинална флора (прва група) верзус втората група (интермедиерна флора) за  $p<0,05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p=0,00000$ ) и меѓу првата група со нормалната вагинална флора верзус трета група (бактериска вагиноза) за  $p<0,05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p=0,000000$ ).

#### 4.13. Животни навики

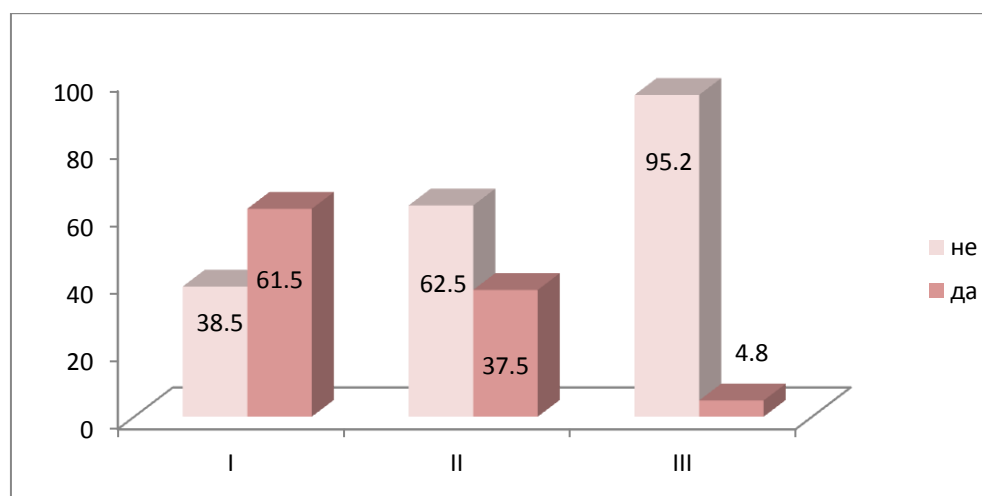
##### 4.13.1. Внес на пробиотици секојдневно со храна

Под секојдневен внес на пробиотици со храна се подбразбира употреба на ферментирани млечни производи.

Табела бр. 36. Секојдневен внес на пробиотици кај испитаничките по групи

Внес на пробиотици со храна / група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	25	38,5	15	62,5	20	95,2
Да	40	61,5 <sup>'</sup>	9	37,5 <sup>‘</sup> , <sup>!</sup>	1	4,8 <sup>‘</sup> , <sup>‘</sup>
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0

Difference test, <sup>'</sup> - p=0,0000, <sup>‘</sup> - p=0,0085, <sup>!</sup> - p=0,0434



Графикон бр. 17. Внес на пробиотици со храна

Најголем број испитанички од првата група (40 - 61,5%) секојдневно конзумираат пробиотици со храната, следат 9 испитанички од втората група и само една од третата група (табела 36 и графикон 17).

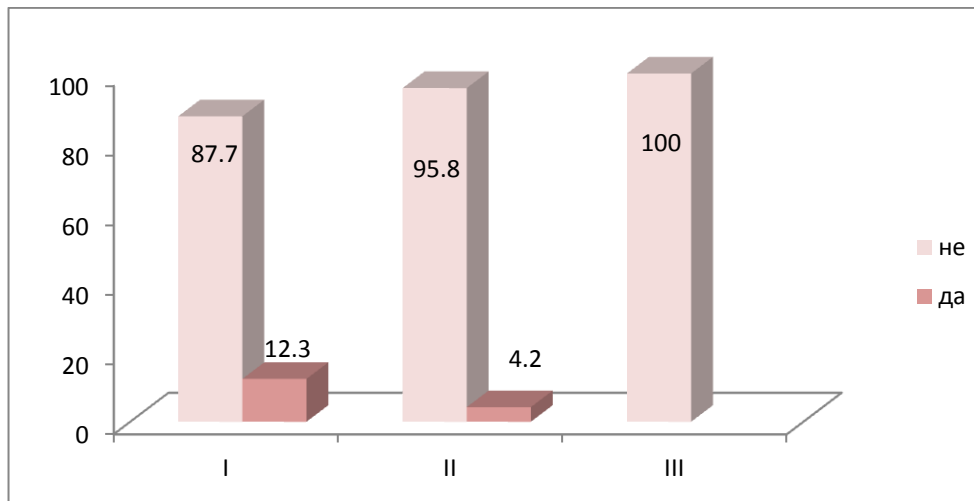
Разликата која се регистрира помеѓу групите во однос на внес на пробиотици со храна е статистички сигнификантна, и тоа помеѓу првата и третата група (61,5% vs 4,8%), втората и третата група (37,5% vs 4,8%), и првата и втората група (61,5% vs 37,5%) за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p = 0,0000$ ,  $p = 0,0085$ ,  $p = 0,0434$ ).

#### 4.13.2. Внес на суплементи со пробиотици

Под внес на суплементи со пробиотици се подразбира употреба на фармацевтски производи со пробиотици и пребиотици, како додатоци во исхраната.

Табела бр. 37. Дистрибуција на испитаничките по групи според внес на суплементи со пробиотици

внес на пробиотици со суплементи / група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	57	87,7	23	95,8	21	100,0
Да	8	12,3	1	4,2		
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0



Графикон бр. 18. Дистрибуција на испитаничките по групи според внес на суплементи со пробиотици

Најголем број испитанички кои внесуваат пробиотици преку суплементи се од првата група (8 од 65), само една од втората група и ниту една од третата група (табела 37 и графикон 16).

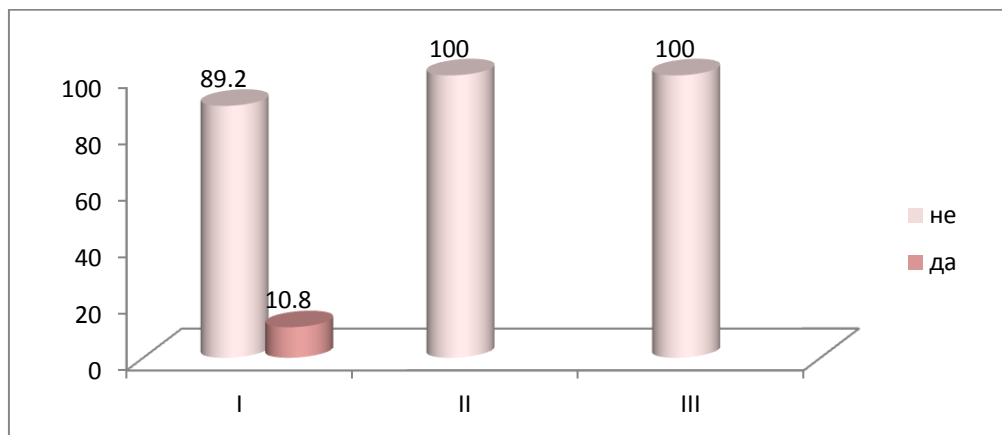
Разликата која се регистрира помеѓу групите во однос на внес на пробиотици преку суплементи е статистички не сигнификантна за  $p > 0,05$ .

#### 4.13.3. Употреба на препарати за вагинална апликација со пробиотик и/или млечна киселина

Препарати за вагинална употреба со млечна киселина и/или пробиотици користат 7 испитанички од првата група, а во останатите групи не се регистрираат такви навики (табела 38).

Табела бр. 38. Употреба на вагинални препарати со млечна киселина и/или пробиотици по групи

Препарати за вагинална употреба/ група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	58	89,2	24	100,0	21	100,0
Да	7	10,8				
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0



Графикон бр. 19. Употребата вагинални препарати со млечна киселина и/или пробиотици кај испитаничките по групи

Табела бр. 39. Доказани видови на лактобацили според внес на пробиотици со храна, со суплементи и со вагинална апликација

Доказани видови на бактерии	вкупен број на испитанички (N=93)	сама	Со други видови	Внес на пробиотик со храна (од група со молекуларна анализа N=93)			Внес на суплементи со пробиотик			Вагинален гел/пробиотик		
				Вкупно (N=50)	сама	Со други видови	Вкупно (N=9)	сама	Со други видови	Вкупно (N=7)	сама	Со други видови
<b>Lactobacillus</b>												
<i>L. jensenii</i>	2	1	1	1		1						
<i>L.iners</i>	40	39	1	21	20	1	3		3	1		1
<i>L.gasseri</i>	8	1	7	1		1						
<i>L.helveticus,</i>	6		6	4		4						
<i>L.johnsonii</i>	3		3	3		3						
<i>L.crispatus;</i>	33		33	16		16	5		5	4		4
<i>L.casei</i>	30		30	15		15	5		5	4		4
<i>L.gallinarum;</i>	5		5	3		3	1		1			
<i>L.reuteri</i>	2		2	2		2						
<i>L.plantarum</i>	1		1	1		1						
<i>L.garvieae</i>	2		2	2		2						
<i>L.delbrueckii subsp bulgaricus</i>	2	1	1	1	1							
<i>L.acidophilus</i>	2		2	1		1						
<i>L.vaginalis</i>	1		1	1		1						
<i>L.caviae</i>	1		1	1		1						
<i>L.oris</i>	1		1	1		1						
<i>L.apis</i>	1		1	1		1						
<b>Други бактерии</b>												
Некултивабилна кокошкина цекална бактерија	1		1	1		1						

Кај испитаничките кои внесуваат пробиотици со храна, со молекуларна анализа се регистрира *L.iners* (кај 21 - 42,0%) испитанички, а *Lactobacillus crispatus* (кај 16 - 32,0%) и *L.casei* (кај 15 -30,0%) се регистрирани во комбинација со други лактобацили (табела 39).

Кај испитанички кои внесуваат пробиотици преку суплументи, со молекуларна анализа се регистрира *L.iners* (кај 3 испитанички), а *Lactobacillus crispatus* и *L. casei* во комбинација кај 5 испитанички (табела 39).

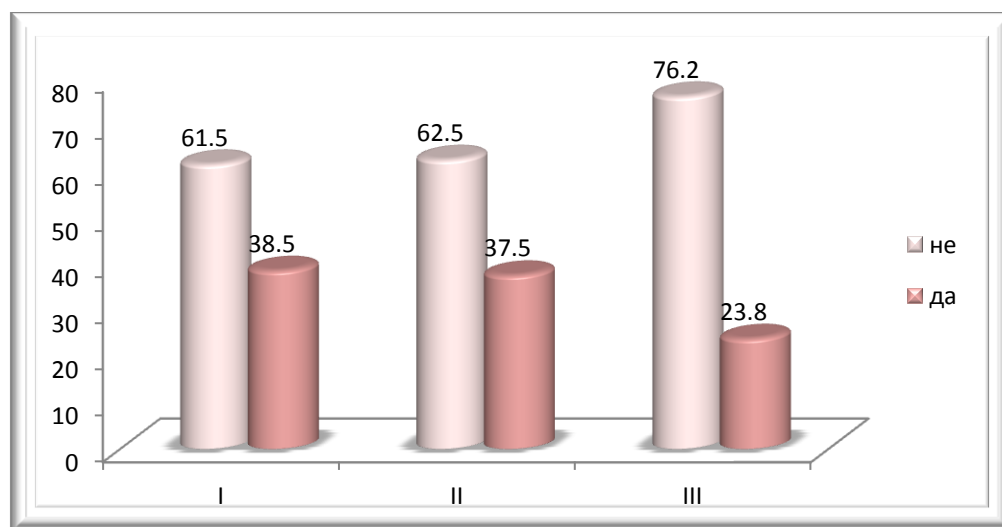
Кај испитанички кои аплицираат пробиотици вагинално, со молекуларна анализа се регистрира *L.iners* кај една пациентка, а *Lactobacillus crispatus* и *L. casei* во комбинација кај 4 испитанички (табела 39).

#### 4.13.4. Тоалета на надворешни гениталии

Под тоалета на надворешни гениталии се подразбира миење со вода најмалку еднаш дневно.

Табела бр. 40. Навики за тоалета на надворешните гениталии кај испитаничките по групи

тоалета на надворешните гениталии/ група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	40	61,5	15	62,5	16	76,2
Да	25	38,5	9	37,5	5	23,8
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0



Графикон бр. 20. Навики за тоалета на надворешните гениталии кај испитаничките по групи

Поголемиот број испитанички немаа навика за тоалета на надворешните гениталии, сигнификантно почесто во третата група (16 од 21 испитанички) и во првата група (40 од 65 испитанички) за  $p < 0,05$  (Difference test,  $p = 0,0087$ ,  $p = 0,0007$ ) (табела 40 и графикон 20).

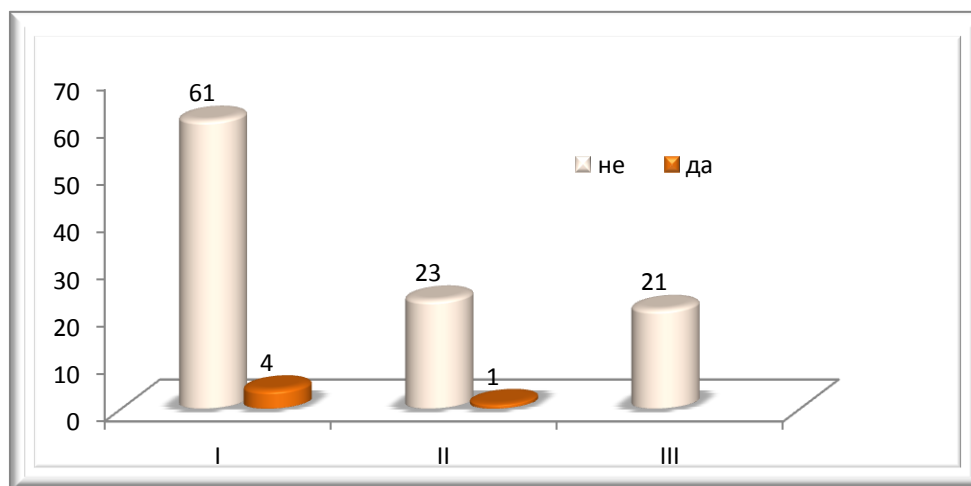
Разликата која се регистрира помеѓу групите во однос на тоалетата на надворешните гениталии е статистички не сигнификантна  $p > 0,05$ .

#### 4.14. Орални контрацептивни хормонски препарати

Орални комбинирани контрацептивни хормонски препарати не употребува ниту една пациентка од третата група, а употребува само една од втората и 4 испитанички од првата група (табела 41 и графикон 21).

Табела бр. 41. Употреба на орални комбинирани контрацептивни хормонски препарати кај испитаничките по групи

хормонски контрацептивни препарати /група	I		II		III	
	број	%	број	%	број	%
Не	61	93,8	23	95,8	21	100,0
Да	4	6,2	1	4,2		
Вкупно	65	100,0	24	100,0	21	100,0



Графикон бр. 21. Употреба на орални комбинирани контрацептивни хормонски препарати кај испитаничките по групи

## 4.15. Видови на лактобацили кај испитанички со два или повеќе позитивни наоди

Табела бр. 42. Видови на лактобацили кај испитаничките со два или повеќе микроорганизми

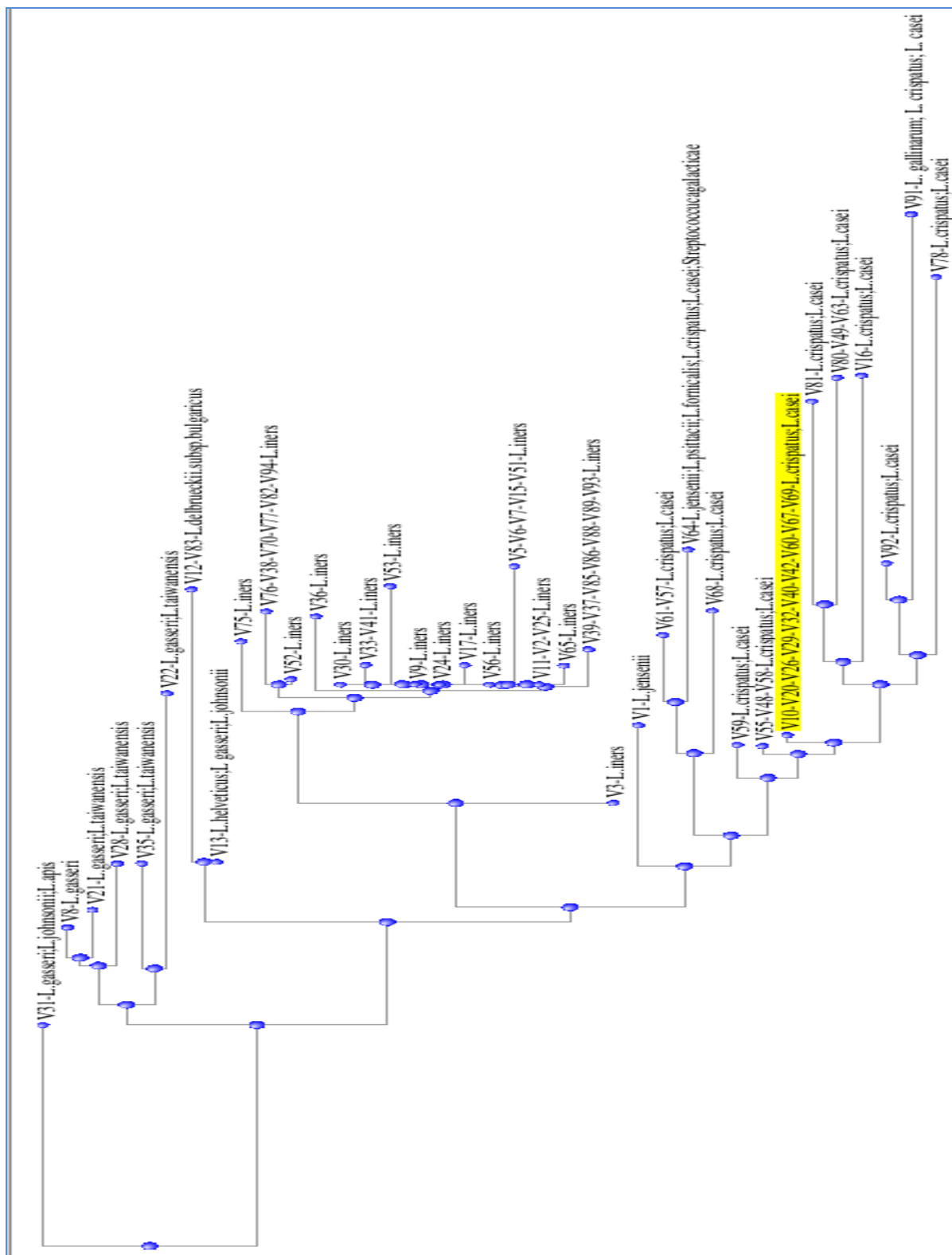
	<i>Candida spp.</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	GBS	<i>Enterococcus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Peptost. Prevotella</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i> MA	<i>Ureaplasma urealyticum</i> брис	<i>Ureaplasma urealyticum</i> MA	<i>Mycoplasma hominis</i> брис	<i>Mycoplasma hominis</i> MA	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<i>Lactobacillus iners</i> (ИМ)	+							+	+			
Мешана (БВ)		+	+				+		+		+	
<i>Lactobacillus iners</i> (БВ)		+					+	+	+		+	
<i>Lactobacillus iners</i> (ИМ)	+						+		+		+	
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> (ИМ)	+							+	+			
<i>L. delbrueckii</i> ; <i>L. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> (ИМ)							+	+	+			
<i>L. ruminis</i> (ИМ)			+						+		+	
<i>L. iners</i> (БВ)		+					+	+	+			
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> (НФ)							+		+			
<i>L. gallinarum</i> ; <i>L. helveticus</i> ; <i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> ; Некултивабилна кокошкина цекална бактерија (НФ)							+	+	+			
<i>L. iners</i> ; <i>L. reuteri</i> (НФ)							+				+	
<i>L. iners</i> (НФ)							+		+			
<i>L. iners</i> (БВ)		+					+	+	+	+	+	
<i>L. taiwanensis</i> ; <i>L. gasseri</i> (ИМ)	+								+			
<i>L. iners</i> (НФ)							+	+	+		+	
<i>L. iners</i> (ИМ)	+						+	+	+			
<i>L. gasseri</i> ; <i>L. taiwanensis</i> (НФ)							+	+	+			
<i>L. iners</i> (БВ)		+					+	+	+	+		
<i>L. iners</i> (ИМ)					+		+	+	+	+	+	
<i>Aerococcus christensenii</i> (БВ)		+					+	+	+	+	+	+
Мешана (ИМ)	+				+							
<i>L. iners</i> (НФ)							+	+	+			
<i>L. iners</i> (БВ)		+		+	+		+					
<i>L. iners</i> (ИМ)				+					+			
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> (НФ)							+		+			

<i>L. jensenii</i> ; <i>L. psittacii</i> ; <i>L. fornicalis</i> ; <i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> ; <i>Streptococcus agalacticae</i> (ИМ)	+								+			
<i>L. helveticus</i> ; <i>L. crispatus</i> , <i>L. acidophilus</i> ; <i>L. Garvieae</i> (ИМ)					+							+
<i>L. helveticus</i> ; <i>L. crispatus</i> , <i>L. plantarum</i> ; <i>L. garvieae</i> ; <i>L. Casei</i> (НФ)							+		+			
<i>Paenivacillus sacheonensis</i> , некултивабилен <i>Firmicutes</i> (БВ)		+			+		+					+
Мешана (БВ)		+			+		+				+	
<i>L. iners</i> (ИМ)							+	+	+			
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> (НФ)									+		+	+
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> (ИМ)	+						±					
<i>L. delbrueckii subsp bulgaricus</i> (ИМ)	+						+		+			+
<i>L. gallinarum</i> ; <i>L. crispatus</i> ; <i>L. johnsonii</i> ; <i>L. vaginalis</i> ; <i>L. caviae</i> ; <i>L. oris</i> ; <i>L. reuteri</i> (ИМ)	+						+	+	+			
<i>L. iners</i> (БВ)		+					+		+		+	
<i>Aerococcus christensenii</i> (БВ)		+					+					
Мешана (БВ)	+	+				+	+					
<i>L. crispatus</i> ; <i>L. casei</i> (ИМ)							±		±			
<i>L. iners</i> (БВ)		+					+		+		+	

(НМ) Нормална флора, (ИМ) интермедиерна флора, (БВ) бактериска вагиноза

#### 4.16. Генеолошко стебло - дендрограм

Со цел да се види сродноста на видовите на *Lactobacillus* најдени во нашата студија, беше изработен дендрограм базиран на 16S rRNA секвенците кои ги детерминиравме. Може да се забележи тенденцијата на поблиско групирање на видовите на *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* со *Lactobacillus iners*, додека има сепарација на *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus taiwanensis* во друга гранка, што упатува на заклучок дека *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus iners* имаат послични секвенци наспроти *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus taiwanensis*.



Слика бр 6. Дендрограм базиран на 16sRNA секвенци на видови на *Lactobacillus* докажани во нашата студија

## 5. ДИСКУСИЈА

Во согласност со актуелните трендови за анализа на хуманиот микробиом, а особено вагиналниот, од аспект на репродуктивно здравје, се направија напори за изработка на оваа студија со цел детерминирање на видовите на лактобацили во вагина и најчестите предизвикувачи на бактериска вагиноза кај наша популација. Истите врдија со резултати кои се специфични и даваат слика за испитуваната популација.

Студијата ја потврди хипотезата дека постојат разлики во составот на вагиналниот микробиом кај испитанички со нормален клинички и микробиолошки наод, во однос на оние со интермедиерен наод или со бактериска вагиноза.

Со молекуларната анализа, кај нашата група на испитанички, се докажаа 22 видови на *Lactobacillus*, од кои неколку се сигнификантно почести.

*Lactobacillus iners* е видот кој најчесто се регистрира во трите групи на испитанички. Следат *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*.

Кај многу помал процент се докажани *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus taiwanensis* и тн. Резултатите се во согласност со досега објавените податоци од слични иследувања на различна популација (Tamrakar R et al, 2007; Zhou X et al, 2010; Damelin LH et al, 2011; Martínez-Peña MD et al, 2013; Pendharkar S et al, 2013 ).

### 5.1. Најчести видови на лактобацили

#### 5.1.1. *Lactobacillus iners*

*Lactobacillus iners* е релативно скоро откриен специес кој е многу често присутен во вагината (Falsen E et al, 1999; Zhou X et al, 2004; Fredricks DN et al, 2005; Wilks M et al, 2004; Vásquez A et al, 2002; Burton JP et al, 2003; Antonio MA et al, 2005; Tamrakar R et al, 2007). Според некои студии, присутен е кај околу 40-50% од испитаничките независно од Нугент скорот (Tamrakar R et al, 2007; Fredricks DN et al, 2005). Неговата улога во одржувањето на здрава вагина е нејасна, бидејќи се детектира и во нормални состојби, како и во состојба на вагинална дисбиоза и бактериска вагиноза. Според резултатите од студија спроведена во Јапонија на 132 бремени жени, нема сигнификантна разлика во преваленцата на *L. iners* во трите групи по Нугент скор, со претпоставка дека неговото присуство може да корелира со колонизација со бактерии кои се причинители на бактериска вагиноза (Tamrakar R et al, 2007). Се претпоставува дека може да се појавува во различни варијанти и клонови, кои во некои случаи поромовираат здрава вагина а во други случаи се асоцирани со дисбиоза и болест. Неколку податоци укажуваат дека *L.*

*iners* всушност може да придонесе за почеток и за одржување на вагиналната дисбиоза и да биде ризик фактор за негативен исход на бременоста (Vaneeschoutte M, 2017).

*Lactobacillus iners* има невообичаено мал геном во споредба со другите специеси, што може да биде индикативно за симбиотски или паразитски животен стил.

Во споредба со другите специеси, *Lactobacillus iners* има многу покомплексни нутритивни својства и има Грам варијабилна морфологија. Не расте на De Man Rogosa Sharpe agar, не продуцира Д-изомер на млечна киселина, а не продуцира или продуцира само ограничени количини на водороден пероксид. Водородниот пероксид ( $H_2O_2$ ) има докажани антибактериски и антивирусни способности (Klebanoff SJ et al 1991; Clark RA et al Klebanoff SJ, 1979; O'Hanlon DE et al, 2011; Mitra A et al, 2016). *Lactobacillus iners* продуцира цитолизин инеролизин (INY), што е невообичаено за лактобацилите. Токму инеролизинот е нов таргет за истражувања во врска со улогата на *L. iners*, и се смета дека тој има ограничена заштита од вагинална дисбиоза, од сексуално преносливи инфекции и претставува ризик за негативен исход на бременоста.

### 5.1.2. *Lactobacillus crispatus*

*Lactobacillus crispatus* најчесто се изолира кај испитанички во репродуктивна возраст со нормална вагинална флора. Присутен е во интестиналниот и вагиналниот тракт кај лугето. Од гинеколошки аспект, се смета за еден од клучните лактобацили кои имаат протективна улога за одржување на вагинален баланс и превенција од појава на бактериска вагиноза. Се евидентира како еден од најсилните  $H_2O_2$  продуцирачки лактобацили (Hawes SE et al, 1996; Pendharkar S et al, 2013). Во цревната флора обезбедува здрава дигестија преку продукција на ензими. Колонизацијата на гастроинтестиналниот тракт со лактобацили е еден од начините за колонизација и на вагината. Промените на имунолошкиот систем, хормонските флукуации, употреба на антибиотици, се само некои од факторите кои значително може да влијаат на концентрацијата на *L. crispatus*, како и на другите специеси на лактобацили (Ma L al, 2013).

*Lactobacillus crispatus* ретко се наоѓа во коегзистенција со други бактериски специеси што значи дека веројатно има тенденција да биде силно доминантен или отсутен. Ова води до заклучок дека е силно резистентен на ко-колонизација со други бактерии и неговото присуство е најчесто асоцирано со здрава вагина. Испитаничките со ваков микробиом во кој што доминира *Lactobacillus crispatus* не само што имаат најниска рН вредност, туку се и најретко инфицирани со бактериски сексуално преносливи инфекции, *Herpes simplex virus u* HIV како и HPV (Ravel J et al, 2011; Borgdorff H et al, 2014, Mitra A et al, 2016). Затоа и не е чудно што присуството на *Lactobacillus crispatus* е во негативна корелација со CIN (Oh NY et al, 2015; Mitra A et al, 2016).

*Lactobacillus crispatus* покажува генетски варијации со различна големина на геномот. Расте оптимално на температура од 30-40°C. Тоа е еден од 122-та идентификувани специеси од родот на лактобацили.

### **5.1.3. *Lactobacillus casei* група (LCG)**

*Lactobacillus casei*, задено со *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus rhamnosus*, се дел од *Lactobacillus casei* групата (LCG). Препарати што содржат *L. casei rhamnosus* се користат подолг период. Се смета дека продуцира бактериоцин лактоцин, кој врши инхибиција на растот на *Gardnerella vaginalis* (Petricevic L et al, 2008).

### **5.1.4. *Lactobacillus gasseri***

*Lactobacillus gasseri* е откриен 1980 година и неговиот геном е комплетно секвенциониран. Тој е еден од видовите во нормалната вагинална флора на здрави жени. Продуцира лактоцилин (тиопептиден антибиотик), како и гасерицин А и бактериоцини (токсини кои го инхибираат растот на слични или скоро исти бактериски видови). Има силна ферментативна способност и главно е присутен во гастроинтестиналниот тракт на луѓето и животните, но и на други места низ организмот.

*Lactobacillus gasseri* заедно со *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii* и *L. iners* се најчесто изолирани од вагиналниот секрет кај жените. Тие се константно присутни кај здрав вагинален еко систем и обезбедуваат дополнителна заштита (Zhou X et al, 2007; Ravel J et al, 2011; Pavlova SI et al, 2002; Zhou X et al, 2010; Fredricks DN et al 2005) Спротивно на студиите кои ја потенцираат протективната улога на *Lactobacillus gasseri*, една лонгитудинална студија на бремени испитанички покажала дека тие што се колонизирани со *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus iners* се почувствителни на бактериска вагиноза во споредба со колонизираниите со *Lactobacillus crispatus* (Verstraelen H et al, 2009).

### **5.1.5. *Lactobacillus jensenii***

*Lactobacillus jensenii* е дел од нормалната флора на репродуктивниот тракт на жената со застапеност дури до 23%. Заедно со другите соеви на лактобацили кои продуцираат водороден пероксид го намалуваат ризикот од гонореја, бактериска вагиноза и HIV (Antonio MA et al, 1999). Откриен е во 1969 година. Според некои анализи, *Lactobacillus jensenii* се смета дека е втор по важност и по застапеност во гениталниот тракт на жената.

Нашите резултати, во основа, се во согласност со литературните податоци за видовите на лактобацили. Еден од клучните резултати до кои се дојде при изработка на оваа студија е дека *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* ја намалуваат веројатноста (делуваат протективно) за појава на бактериска вагиноза (OR=0,0870(0,0167-0,4535, односно OR=0,0870(0,0171-0,4411)). Тоа се видовите чија протективна улога е докажана и реферирана во многу студии.

Според стапката на предимство (вкрстениот однос) *Lactobacillus casei* ја намалува веројатноста (делува протективно) за регистрацијата на интермедиерна флора (OR=0,2174(0,0643-0,7351)).

Најчестиот вид, *Lactobacillus iners*, не покажува статистички сигнификантна асоцијација со бактериската вагиноза, ниту интермедиерната флора (Pearson Chi-square: 2.500, p=0.113846).

## 5.2. Значење на најчестите видови на лактобацили за вагиналното миље

Една од целите на нашата студија беше да се направи молекуларна анализа на вагиналниот микробиом од аспект на видови и типови на лактобацили кај испитанички со нормален наод, интермедиерна флора и бактериска вагиноза, потврдени со класични микробиолошки и клинички-гинеколошки параметри

Од вкупниот број на испитанички со јасно докажани видови на *Lactobacillus* (N=86), кај 51,2% е докажан само по еден вид во примерокот, а кај останатите испитанички се докажани два или повеќе, па дури до седум видови на *Lactobacillus* кои коегзистираат истовремено. Најголем број различни видови лактобацили се регистрирани во групата со интермедиерна флора (N=19), а најмал во групата со бактериска вагиноза (N=7). Во групата со нормална флора се докажани 13 различни видови на *Lactobacillus*.

Кај сите испитанички од групата со нормална флора се добиени јасни видови на *Lactobacillus*, во споредба со ИМ и БВ група каде јасни видови се докажани кај 95,6%, односно 68,4%. Слични се резултатите од студијата на Pendharkar и соработници од 2013 година, во која од вкупно анализирани 40 испитанички, јасни видови на *Lactobacillus* се докажани кај 19 од 21 испитаничка (90,5%) без бактериска вагиноза, кај 3 од 5 (60%) со интермедиерен наод и кај 8 од 14 (57,1%) со бактериска вагиноза. (Pendharkar S et al, 2013).

### 5.3. Карактеристики на групата со нормален наод

Најчести видови во нашата студија во **првата група** се *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*, докажани кај 45,1% и тоа секогаш во комбинација заедно. Потоа следи *Lactobacillus iners* кај 43,1%, *L. gasseri* и *L. helveticus* кај 7,8%, а останатите се со застапеност под 6%. Процентуалната разлика која се регистрира помеѓу *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners* и *Lactobacillus casei* наспроти останатите видови на *Lactobacillus* е статистички сигнификантна за  $p < 0.05$  (Difference test,  $p = 0.0001$ ).

Нашите резултати се во согласност со резултати од публикувани студии спроведени низ различни региони во светот, според кои доминантни соеви на *Lactobacillus* во вагиналниот микробиом се *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensenii* (Smith SB et al, 2017; Ravel J et al, 2011; Song YL et al, 1999; Vallor AC et al, 2001; Pavlova SI et al, 2002; Vásquez A et al, 2002).

Една од студите е спроведена во Шведска, на 202 примероци од вагина на испитанички со нормален наод по Нугент скор (Vásquez A et al 2002). Слични резултати се добиени и од американска студија на Antonio MA од 1999 во која се вклучени 302 испитанички без бактериска вагиноза (Antonio MA et al, 1999). Според резултатите од јужноафричка студија од 2011 година, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus vaginalis* се доминантни видови со застапеност од 24, 22, 10, 10 и 9 % (Damelin LH et al, 2011). Според резултатите на студија од Нигерија, спроведена на 241 пациентка, 64% од испитаничките биле колонизирани со *L. iners*, 7,3% со *L. gasseri*, следат *L. plantarum*, *L. suntoryeus*, *L. crispatus* и *L. rhamnosus*. Овие резултати потврдуваат дека покрај географските, расните и етничките разлики, доминантните видови на лактобацили се слични на оние со испитаничките од северните земји (Anukam KC et al, 2006). Студијата на Wilks и сор. од 2004г, во која биле анализирани примероци од 73 бремени жени, земено во 20та гестациска недела, доминантни видови се *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. vaginalis* и *L. jensenii* (Wilks M et al, 2004).

Според студијата на Tamrakar од 2007 година спроведена во Јапонија во која биле вклучени 132 бремени жени, најчести докажани видови на лактобацили кај испитаничките со нормална вагинална флора биле *Lactobacillus crispatus*, *gasseri* и *jensenii*. Овие три видови биле многу поретко застапени кај испитаничките со бактериска вагиноза. (Tamrakar R et al, 2007).

Според студијата на Pendharkar S и сор., присуство на *Lactobacillus crispatus* е јасно асоцирано со нормална вагинална флора, односно микробиом, кај испитанички во репродуктивна возраст. Според оваа студија, ниту една од испитаничките колонизирани со *Lactobacillus crispatus* немала бактериска вагиноза или интермедиерен микробиом (Pendharkar S et al, 2013). Резултатите се во согласност и со претходните студии кои

покажуваат асоцијација помеѓу отсуство на бактериска вагиноза и присуство на *Lactobacillus crispatus* (Antonio MA et al, 1999; Vázquez A et al 2002; Wilks M et al, 2004).

*Lactobacillus crispatus* практично претставува и еден од клучните соеви на лактобацили што обезбедува стабилност на вагиналниот микробиом, додека *L. gasseri* и *L. iners* донекаде имаат предиспозиција за абнормална вагинална флора (Verstraelen H et al 2009).

#### 5.4. Улога на млечна киселина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Млечната киселина е соединение со D- и L- изомер со тоа што D-изомерот преодминантно се продуцира од *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus jensenii* додека продукцијата на L-изомерот е од вагиналниот епител, *Lactobacillus iners* и различните анеороби кои се асоцирани со дизбиоза (Witkin SS et al, 2013; Mitra A et al, 2016). Од четирите најчести соеви на *Lactobacillus* само *L. iners* не синтетизира D-изомер на млечна киселина, а наместо тоа продуцира L-изомер, за кој се смета дека нема протективна улога (Witkin SS et Linhares IM, 2016). *Lactobacillus iners* има мал геном и не е способен да продуцира ниту D-изомер на млечна киселина ниту H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> кои се неопходни за промовирање на еубиоза, што е спротивно од другите соеви на лактобацили (Witkin SS et Linhares IM, 2016; Petrova MI et al, 2015).

D-изомерот ја зголемува вискозноста на цервиковагиналниот мукус, штити од урогенитални инфекции и од лош репродуктивен исход, ги зајакнува потенцијалните способности за уништување и на вирусните партикли на HPV, што значи дека има протективна улога (Clarke MA et al 2012; Mitra A et al, 2016; Kindinger LM et al, 2017). Концентрацијата е повисока кај микробиомот каде доминантен специес е *L. crispatus*, а најниска кога доминираат *L. iners*, *Gardnerella vaginalis* или *Streptococcus* (Witkin SS et al, 2013).

Последните истражувања покажуваат и дека вагинална средина во која доминира *Lactobacillus jensenii* кој продуцира само D-изомер на млечна киселина има помала заштитна улога во споредба со *Lactobacillus crispatus* и е асоциран со намалување на лактат, сукцинат и со зголемен ризик за предвремено породување (Witkin SS et al, 2013; Witkin SS, 2015; Stafford GP et al, 2017).

Млечната киселина во физиолошки концентрации го закиселува вагиналниот секрет до pH вредности под 4, ја зајакнува заштитната улога на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и бактериоцините и ги инхибира опортунистичките инфекции како што се инфекции со *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex virus*, HPV, HIV и т.н. (Cadieux P et al, 2009; Thoma ME et al, 2011; Aldunate M et al, 2015).

Се проценува дека речиси сите соеви на *Lactobacillus crispatus* и *jensenii* продуцираат  $H_2O_2$  додека само 9% од соевите на *Lactobacillus iners* продуцираат  $H_2O_2$  (Antonio MA et al, 1999).

*Lactobacillus gasseri* спаѓа во групата на соеви на лактобацили кои послабо продуцираат  $H_2O_2$  во споредба со *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* и *Lactobacillus vaginalis* (Wilkis M et al, 2004; Zheng HY et al 1994; Antonio MA et al, 2005; Song YL et al, 1999).

И покрај тоа што е јасно дека способноста на лактобацилите да создаваат  $H_2O_2$  е многу важна за заштитата на вагиналниот еко систем од бактериска вагиноза, сепак останува нејасно, дали тоа зависи само од способноста на само овие лактобацили да продуцираат  $H_2O_2$ . Претходно спроведените студии покажале висока стапка на бактериска вагиноза кај испитанички со ниски нивоа на водороден пероксид (Eschenbach DA et al, 1989; Mitra A et al, 2016). Но, има и студии кои покажуваат дека во хипоксични состојби на вагината, бактериите не се способни да продуцираат сигнификантни количества на  $H_2O_2$ , што резултира со ниски нивоа на водороден пероксид во хуманата вагина, кои не се доволни да го инхибираат растот на бактериите кои учествуваат во етиологијата на бактериска вагиноза ин витро (O'Hanlon DE et al, 2010, 2011).

*Lactobacillus iners* често доминира во присуство на *HPV* инфекција и *CIN* (Brotman RM et al, 2014; Oh HY et al, 2015; Piyathilake CJ et al, 2016). Релативно често во асоцијација со цервикалната дисплазија се регистрира и раст на стриктни анаероби, кој резултира со транзиција во друга група на вагинален микробиом, каде доминираат други типови (Mitra A et al, 2015; Audirac-Chalifour A et al, 2016; Oh HY et al, 2015).

Сите досегашни иследувања, сугерираат дека *L. iners* има многу карактеристики кои се разликуваат од другите специеси на *Lactobacillus*, што претставува и објаснување зошто овој специес нема најдобра улога во превенција на стриктно анеоробен раст на анаеробни бактерии. Ова индиректно значи дека постојат дополнителни или алтернативни протективни механизми против дисплазија од страна на другите специеси на лактобацили.

## 5.5. рН вредност на вагинален секрет

За *Lactobacillus crispatus* се смета дека има важна улога во вагиналното т.н. самопочистување и превенција на инфекции. Интересен е фактот дека т.н. заедници во кои доминираат специеси на *Lactobacillus* поинакви од *Lactobacillus crispatus*, имаат повисока рН вредност на вагина, која што се движи од 4,4 до 5, што значи дека овие заедници можеби не продуцираат доволно млечна киселина како оние во случај кога доминира *Lactobacillus crispatus* (Ravel J et al, 2011).

Вагиналните соеви на лактобацили превенираат колонизација од бактериски специеси кои што се асоцирани со бактериска вагиноза преку одржување на ниска рН вредност на вагина и продукција на бактериоцин (Mastromarino P et al, 2014; Breshears LM et al, 2015; Gong Z et al, 2014; Graver MA et Wade JJ, 2011; Stoyancheva G et al, 2014; Kawai Y et al, 2000; Kabuki T et al, 1997). Ова е важно за одржување на бариера на цервикалниот епител што инхибира влез и на *HPV* до базалните кератиноцити (Borgdorff H et al, 2014). Анеробните бактерии кои се стрикно анеоробни и поврзани со бактериска вагиноза, кога колонизираат, продуцираат ензими и метаболити кои може да ја компромитираат оваа бариера и го олеснуваат влезот на *HPV*. Тие делуваат и како клеточни патеки кои ја овозможуваат и олеснуваат перзистентноста и прогресијата на вирусната инфекција (Anderson BL et al, 2011; Hedges SR et al, 2006; Uren A et al, 2005; Cheriyan VT, 2009). Овие видови лактобацили продуцираат ензими кои се способни за ферментација на гликогенот кој е присутен во големи концентрации кај естрогенизираниот цервикален и вагинален епител така што се продуцираат големи количини на млечна киселина (Wylie JG et Henderson A, 1969).

Ниската рН вредност на вагиналниот секрет е резултат на јасна и силна корелација помеѓу високата концентрација на соеви на лактобацили. Киселата средина може да инхибира раст на многу потенцијално патогени микроорганизми, како што се *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardenerella Vaginalis* и да овозможни оптимална поддршка за целуларната метаболна функција на цервиксот и на вагината (Mastromarino P et al, 2014; Breshears LM et al, 2015; Gong Z et al, 2014).

Во студија спроведена во Коста Рика на 9165 жени, вредност на рН на вагиналниот секрет повисока од 5 е сигнификантно асоцирана со 10-20% зголемен ризик за *HPV* позитивност кај испитанички пред менопауза, односно во репродуктивен период. Протеинот Е 5 од *HPV* кој е одговорен за вирусна трансформација е особено осетлив на ниска вредност на рН, што претставува и еден од можните механизми за ваквата состојба (Clarke MA et al, 2012).

Резултатите од нашата студија се во согласност со овие податоци. *Lactobacillus crispatus* е докажан кај 45,6% од испитаничките со нормална вредност на рН, наспроти 19,4% од испитаничките со нарушена вредност. *Lactobacillus iners* е најчесто застапен кај групата со нарушена вредност на рН.

Во една од првите студии за идентификација на соеви на лактобацили, која е објавена во 1999 година, Antonio MA ја потенцира протективната улога на *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus jensenii*. Од испитаните 302 жени, околу една третина биле колонизирани со *Lactobacillus crispatus* а една четвртина со *Lactobacillus jensenii*. Во студијата, зголемената фреквенција на *Lactobacillus crispatus* и *jensenii* е сигнификантно поврзана со ниска преваленца на бактериска вагиноза. Од овде произлегува и заклучокот дека *Lactobacillus crispatus* и *jensenii* може да имаат заштитна улога од развој на

бактериска вагиноза, преку инхибиција на растот на микроорганизмите кои се поврзани со бактериска вагиноза. *Gardnerella vaginalis*, анеоробни грам негативни коки и *Mycoplasma hominis* се многу поретко изолирани од испитаничките колонизирани со овие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> продуцирачки лактобацили во споредба со оние кои не се. Колонизираната вагина со *Lactobacillus crispatus* има значење во превенција и третирање на рекурентна бактериска вагиноза и други вагинални нфекции (Ma L et al, 2013; Antonio MA et al, 1999).

Превлаенцијата на *Lactobacillus crispatus u jensenii* е сигнификантно повисока кај групата со нормална флора отколку кај групата со бактериска вагиноза. Стапката на детекција на сите бактерии поврзани со бактериска вагиноза е значително повисока кај испитанички со докажано присуство на *Lactobacillus iners*, во споредба кај оние кај кои не е докажан (Tamrakar R et al 2007, Pendharcар S et al 2013).

Според студијата на Marcos Daniel Martínez-Peña на мексичка популација на испитанички во репродуктивна возраст, кај примероци земено од 105 испитанички, докажани се вкупно 31 различни видови на *Lactobacillus*. Најчесто е изолиран *Lactobacillus gasseri* следи *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus rhamnosus u Lactobacillus brevis*. Генерално, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus crispatus* почесто се детектирани кај нормална флора, отколку кај оние со интермедиерна или бактериска вагиноза (Martínez-Peña MD et al, 2013).

## 5.6. Карактеристики на групата со интермедиерен наод

Во групата со интермедиерен наод, само кај една испитаничка не е докажан *Lactobacillus*. Кај 11(47,8%) испитанички се регистрира само еден вид на *Lactobacillus* во земено примерок, а кај 11 (47.8%) комбинација на повеќе видови. Во најголем процент се регистрира *Lactobacillus iners* со 39,1%, следат *Lactobacillus crispatus* со 34,8%, *Lactobacillus casei* со 21,7%, а останатите соеви се регистрираат кај една или две пациенки. *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus iners* се значително почести од останатите видови. Ова значи дека резултатите покажуваат релативно честа застапеност на овие соеви и кај интермедиерниот наод. Присуството на *Lactobacillus crispatus*, може да се толкува во улога на т.н. заздравување на нарушената средина со тенденција за премин кон нормална флора.

Според некои податоци, *Lactobacillus iners* е најверојатно доминантен дел на вагиналната флора кога флората е во фаза на транзиција помеѓу абнормална и нормална, како резултат на третман или на физиолошки промени, како што се варирање на нивоата на естрогени (Jakobsson T et al 2007). Фазата на транзиција се карактеризира и со поголема разноликост во застапеноста на видовите. Од тој аспект и нашите анализи покажаа најголема разновидност, односно се докажаа поголем број на видови на лактобацили во однос на другите групи.

Разноликоста на микробиомот се смета дека е знак за здравје, нормална состојба во многу делови од телото, но разноликоста на вагиналниот микробиом, кој најчесто се толкува како атипичен или состојба на дисбиоза, е асоциран со нарушување на нормалната состојба односно појава на болест. Во овој случај, различноста се толкува како фаза на транзиција меѓу нормална флора и бактериска вагиноза.

### 5.7. Карактеристики на групата со бактериска вагиноза

Сите испитанички групирани во оваа група според Нугент скорот, се со нарушена вредност на рН на вагинален секрет и сите се со микробиолошки докажана *Gardnerella vaginalis*. Бактериската вагиноза е полимикробна инфекција со зголемување на бројот на некои клучни микроорганизми во однос на лактобацилите, меѓу кои е *Gardnerella vaginalis*, многу често во асоцијација со бактерии од родот *Mobiluncus*. Улогата на родот *Mobiluncus* е се уште во истражување. Во нашата студија не беа вклучени прајмери за докажување на поединечните видови на *Mobiluncus spp.*, заради што е не правена посебна анализа во резултатите и за оваа бактерија.

Од аспект на молекуларна анализа, јасни соеви на *Lactobacillus* се докажани кај 68.4% од испитаничките. Најчесто идентификуван кај 47,4% е *Lactobacillus iners*, а останатите соеви се регистрираат кај една или две испитанички. *Lactobacillus iners* е најчесто присутен сам, без други видови на *Lactobacillus*.

Во групата со бактериска вагиноза се регистрирани најмал број на лактобацили (N=7) во однос на другите две групи и само еден вид кој се појавува единствено во оваа група и тоа само кај една испитаничка (*L. apis*). Кај 9 од 13 испитанички е докажан само еден вид на *Lactobacillus*, кај 3 се докажани два видови, а само кај еден примерок 3 видови на *Lactobacillus*, што претставува и максимален број на изолирани видови во еден примерок за оваа група на испитанички. За споредба, во останатите две групи има случаи каде се изолирани и по 4, 5, па и 7 видови во еден примерок.

Кај три (15,8%) од испитаничките од оваа група е добиен резултат за т.н. мешана флора, односно тоа се примероците кај кои при молекуларна анализа се добија мешани сигнали од мноштво на бактерии, меѓу кои не може да се диференцира одреден вид.

Во оваа група се докажани и други бактериски видови и тоа *Aerococcus christensenii* кај 10,5%, *Paenivacillus sacheonensis*, некултивабилен *Streptococcus sp.* и некултивабилни *Firmicutes* кај по една пациентка. *Lactobacillus iners* е сигнификантно почесто докажан во споредба со другите видови. Резултатите се во согласност со резултати од многубројни студии, во врска со застапеноста на *L. iners* кај нарушено вагинално миље.

Со анализа на вкупните резултати, генерално, колонизацијата со било кој *Lactobacillus* сигнификантно асоцира со нормалната вагинална флора (прва група) верзус трета група (бактериска вагиноза) за  $p < 0.05$  (Fisher exact 2-tailed test,  $p = 0.000206$ ).

Колонизацијата со *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* сигнификантно асоцира со нормалната вагинална флора (прва група) верзус трета група (бактериска вагиноза) за  $p < 0.05$  (Fisher 2-Tailed test,  $p = 0.010405$ ).

Најчесто изолирани анаероби од вагина се *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium*, *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Ureaplasma*, *Megasphaera* и т.н. кои што може да предизвикуваат инфекции како бактериска вагиноза (БВ), но може и да се неактивни како резултат на протективната активност на лактобацилите (Smith SB et al, 2017; Ravel J et al, 2011). Ова делумно ги објаснува нашите позитивните резултати од молекуларната анализа за *Gardnerella vaginalis* кај испитанички од групата со нормална флора и интермедиерен наод.

Според студијата на Antonio et al 2005 година испитаничките кои што не се колонизирани со  $H_2O_2$  продуцирачки лактобацили како што е главно *Lactobacillus crispatus*, но и *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus vaginalis*, имаат петнаесет пати поголем ризик за бактериска вагиноза отколку испитаничките кои што се колонозирани со овие соеви (Antonio MA et al, 2005).

*Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus jensenii* се изолирани кај испитанички со нормален микробиом, но и кај испитанички со бактериска вагиноза. Присуството на овие соеви кај испитаничките со бактериска вагиноза може да е резултат на нивната послаба колонизација, која овозможува раст на други бактерии или како резултат на зголемената резистентност на овие соеви, во услови на бактериска вагиноза. Студии на бремени жени покажале дека испитаничките кои што ги содржат овие специеси на лактобацили, особено *L. gasseri* и *L. Iners*, се почувствителни и поподложни на бактериска вагиноза во споредба со испитаничките колонизирани со *L. crispatus* (Verstraelen H et al, 2009).

Во нашата студија, во групата со бактериска вагиноза, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* заедно и *Lactobacillus gasseri* се докажани кај по 2 испитанички (10,5%), а *Lactobacillus jensenii* не е докажана ниту во еден примерок.

Според некои автори, врз база на молекуларни иследувања е направена класификација во пет типови на заедници, т.н. communities state type (CST) од кои CST 1, 2 и 5 се оние во кои доминираат *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* и *L. jensenii*, додека кај CST 4 доминираат анеороби слични на оние кои се регистрирани кај бактериска вагиноза (Ravel J et al, 2011; Smith SB et al, 2017). Преваленцата на овие организми варира кај различни етнички групи и географски локации, така што, кај некои доминираат повеќе анеоробни бактериски специеси и покажуваат повисока вредност на рН на вагинален секрет, во присуство или отсуство на клиничка инфекција (Ravel J et al, 2011; MacIntyre DA et al,

2015). Разликите во преваленцата, исто така се и во врска со разликите во животниот стил и интеракциите на околината.

Степенот на заштита на вагиналниот еко систем дефинитивно зависи од специесот на лактобацилус кој доминира. Вагинална средина во која доминира *Lactobacillus iners*, вообичаено асоцирана со дисбиоза е понестабилна и има предиспозиции за промени. Спротивно на тоа, вагинална средина во која доминира *Lactobacillus crispatus* кој ги продуцира двата изомери на млечна киселина е асоцирана со зголемена стабилност односно поретко се случува да премине во дисбиоза (Srinivasan S et al, 2010; Petrova MI et al, 2015; Borgdorff H et al, 2016). Овие анализи се во согласност со нашите резултати во однос на застапеноста на *L. crispatus* по групи. Имено овој вид е докажан само кај 10,5% испитанички од групата со бактериска вагиноза, во споредба со 45,1% од испитаничките од групата со нормална флора. *Lactobacillus crispatus* е докажан кај 39,1% од групата со интермедиерен наод, нешто поретко во однос на групата со НФ, но многу почесто во однос на групата со БВ, Ова може да се толкува како фаза на транзиција, во која токму овој вид би требало да одигра улога во обезбедување на баланс и премин кон НФ, или се работи за почетна фаза при премин од нормална флора кон бактериска вагиноза, во која сеуште е присутен овој вид. Тоа е воедно и фазата во која најмногу може да се делува и да се спречи прогресија.

### **5.8. Компарација на клиничките параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза со молекуларни тестови**

Втората цел на нашето иследување беше да се направи компарација на клиничките параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза со молекуларни тестови и докажување на можни причинители.

Според анализите на клинички критериуми и анализата на препарати обоени по грам, двете методи се добри во поставувањето на дијагноза на бактериска вагиноза. Сепак, кај Амсел критериумите, недостасуваат информации за составот на вагиналната флора, додека со преглед на препаратот се добива само делумно, понекогаш и погрешен увид бидејќи се работи за метод базиран на морфологија. Значи, секако постои потреба од развој на молекуларна дијагностика, како би можело да се детектираат промените во микробиомот на вагината, кои би можеле да имаат влијание во сериозно нарушување на репродуктивното здравје на жената (Meštrović T, 2012).

Во нашата студија 21 (19,1%) од вкупниот број на испитанички беа класифицирани како бактериска вагиноза според Нугент скорот. Кај сите нив, микробиолошката анализа на брисот од вагина е позитивна за *Gardnerella vaginalis*. Со молекуларната анализа, позитивни наоди се добиени кај 38 од вкупниот број на испитанички (40,9%). Од групата со бактериска вагиноза, само кај една испитаничка не е докажана *Gardnerella vaginalis*.

Претпоставка е дека можеби се работи за присуство на некоја друга бактерија, од мноштвото бактерии кои се причинители на бактериска вагиноза, а при културелната анализа наликува на *Gardnerella vaginalis*.

Со молекуларна анализа *Gardnerella vaginalis* се докажа и кај 13 (25,5%) од испитаничките со **нормален наод**. Од нив 61,5% имаат нарушена вредност на рН на вагинален секрет. Најголем процент 38,5% (5 испитанички) се со докажан само *Lactobacillus iners*. Од нив кај 3 е докажана молекуларно *Ureaplasma urealyticum*, а кај две е потврдена и со микробиолошка анализа во брисот. Следат 3 случаи (23,1%) со *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*, од кои 2 се со молекуларно докажана *Ureaplasma urealyticum* и нарушена вредност на рН на вагинален секрет. Останатите се комбинации кај по еден случај. Кај две испитанички е добиен слабо позитивен резултат за *Gardnerella vaginalis*, кај кои сите останати иследувања се уредни, вклучително и вредноста на рН на вагиналниот секрет.

Од групата со **интермедиерен наод**, *Gardnerella vaginalis* е докажана со молекуларна анализа кај 30,4% од испитаничките. И во оваа група најголем процент, односно 57,1% (4 испитанички) се со докажан само *Lactobacillus iners*, сите со нарушена рН вредност на вагиналниот секрет и сите со молекуларно докажана *Ureaplasma urealyticum*. Од нив кај една испитаничка е изолирана *E. Coli*, а кај две *Candida spp.* Кај две испитанички е докажан *Lactobacillus delbrueckii*, обете со *Ureaplasma urealyticum*, една со *Chlamydia trachomatis*. Слабо позитивен резултат е добиен кај две испитанички, обете со докажан *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*, една со *Candida spp.* и *Ureaplasma urealyticum*.

Овие резултати покажуваат дека испитаничките кај кои со молекуларна анализа е докажана *Gardnerella vaginalis*, а се класифицирани во група со нормален наод или интермедиерен, сепак имаат некаков дисбаланс, кој не може да се детектира со класичните микробиолошки и клинички анализи. Тоа се испитанички кои немаат симптоми, но се најверојатно во фаза на транзиција низ трите групи, од дисбаланс кон нормализирање или обратно.

***Gardnerella vaginalis*** има висока сензитивност околу 100% но ниска специфичност 49% за бактериска вагиноза. Таа често се детектира и во отсуство на бактериска вагиноза, преку конвенционални техники на база на културелни техники и молекуларни анализи (van de Wijgert JH et al 2014; Africa CW et al, 2014; Fethers K et al, 2012; Schwebke JR et al, 2014). Независно од тоа концентрацијата на *Gardnerella vaginalis* односно на ДНК на *Gardnerella vaginalis* е поголема кај повисок Нугент скор и статус позитивен за бактериска вагиноза (Swidsinski A et al, 2010)

Постојат силни докази дека *Gardnerella vaginalis* учествува во модифицирање на локалниот имунитет на домакилот и на патогенезата на бактериска вагиноза.

Бројни лонгитудинални студии упатуваат на тоа дека бактериската вагиноза е поврзана со зголемен ризик за сексуално преносливи инфекции. Во најголемата студија на Американскиот национален институт за здравје е пронајдено дека средни и високи вредности на Нугент скор се поврзани со 1,5 до 2 пати поголем ризик од инфекции со *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* (Brotman RM et al, 2010). Ограничувањето на овие студии е тоа што вагиналната флора е евалуирана во период од три месеци пред детекција на инфекцијата. Во строго дизајнирани студии составот на вагиналната флора би требало да се анализира на дневни и неделни интервали, во тек на подолг временски период и на доволен број на испитанички, што е ограничено со многу средства потребни за такво екстензивно истражување. Само на тој начин би можела да се следи динамиката на промените и причината за нивно настанување

Во студијата спроведена на сексуални работнички во Кенија следени шест месеци, високата вредност на Нугент скор е поврзана со честа појава на трихомонијаза, а отсуството на вагинални лактобацили во културата корелира со зачестеноста на гонококна и HIV инфекција (Martin HL et al 1999). Резултатите од студијата спроведена на 670 испитанички во подрачјето на Питсбург, упатуваат на тоа дека високиот Нугент скор е поврзан со двојно поголем ризик од сероконверзија на вирус на herpes simplex тип 2, а исто така се доведува во врска со развојот на пелвични инфламаторни болести (Cherpes TL et al, 2003).

Постојат и претпоставки дека е можно бактериската вагиноза да делува како кофактор кој што е вклучен во примарната инфекција и реактивација на инфекција со HPV вирусот преку влијание на имунолошката рамнотежа внатре во ткивата на грлото на матката, најмногу со дејство во промена во продукцијата на цитокини и интерлеукини.

## 5.9. Некултурелни методи за дијагноза на бактериска вагиноза

Молекуларните методи се употребуваат веќе и како дел од дијагностичкиот процес за бактериска вагиноза. Во студија во која биле вклучени 400 испитанички, направена е анализа според Амсел критериуми и Нугент, како и квантитативна PCR (qPCR) анализа за специфични организми вклучувајќи *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Lactobacillus spp.* Заклучокот покажува дека Нугент скорот и PCR анализата за *Gardnerella vaginalis* и *Mycoplasma hominis* се сигнификантно супериорни во однос на Амсел критериумите за дијагноза на бактериска вагиноза (Sha BE et al, 2005).

Според резултатите од студиите во кои е анализирана микрофлората од вагинален флуид на испитанички со употреба на 16sRNA секвенционирање, кај примероците од испитаничките со бактериска вагиноза постои единствен релативен сооднос на *Lactobacillus iners*, *Atopobium vaginae* и условно анеоробните бактерии (Yoshimura K et al, 2011).

Во студијата на Fredricks и сор од 2007 год, направена е анализа со употреба на Амсел критериумите, Нугент скор системот и таргетирана PCR анализа. Се смета дека PCR детекцијата на еден или повеќе специеси е повалидна како индикатор за бактериска вагиноза отколку културелно испитување и детекција на *Gardnerella vaginalis* (Fredricks DN, et al, 2007).

Веќе постојат и комерцијално достапни, одобрени од FDA молекуларни тестови за детекција на најчести причинители на вагинит како што се *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* и *Gardnerella vaginalis*, кои не се само директно насочени за бактериска вагиноза, туку може да се употребуваат и за испитанички со одредени типови на рецидивантни инфекции.

И покрај тоа што се развиени и употребувани голем број на молекуларни методи за да обезбедат поточна дијагноза односно информација за бактериска вагиноза, јасно е дека постојат многу различни комбинации и пермутации на можни патогени, но ниеден од овие организми или групи на организми не може да ги идентификува сите случаи на бактериска вагиноза. Навистина, внимателната анализа на организмите идентификувани со молекуларни методи како дел од бактериска вагиноза која што е дијагностицирана со употреба на Нугент критериуми, може да биде само исполнување на претпоставките, бидејќи скоринг системот бил развиен за специфично да се идентификуваат испитаничките со низок број на лактобацили и висок број на мали грам варијабилни и анаеробни грам негативни стапчиња. Но клиничките симптоми асоцирани со бактериската вагиноза може да се јават и во отсуство на промени кои што се идентификувани со Нуген скорингот како што е случајот кај аеробниот вагинит, како што е објаснето од Donders (Donders G, 2007; Donders G, 2010). Во ова сценарио бројот на лактобацили е исто така намален но заменет со аеробни организми како што се *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Streptococci*. Со употреба на Нугент скоровите може да се направи пропуст во откривањето. Анализата од молекуларните испитувања може да биде негативна, меѓутоа симптомите сеуште да перзистираат. Ова останува предизвик за понатамошни истражувања и објаснувања на бактериска вагиноза (Srinivasan S et al, 2008).

Независно на кој начин ќе се дефинира бактериската вагиноза, дали со клинички критериуми, микроскопски или молекуларни анализи, особено при отсуство на симптоми, голем број на докази упатуваат на тоа дека оваа состојба е независен причинител, односно ризик за бројни несакани исходи како што се предвремено породување, развој на пелвична инфламаторна болест и особено лесен пренос на сексуално преносливи инфекции вклучително и HIV. Сепак, сеуште не е потполно јасно со кој механизам се одржува протективната вагинална флора, зошто доаѓа до почести промени во составот на присутните микроорганизми и на кој начин тие доведуваат до развој на инфекции, како и на други последици. Дополнително отежнување е фактот дека испитаничките со бактериска вагиноза само незначително почесто ги пријавуваат симптомите во споредба

со испитаничките кои имаат голем број на лактобацили. Тоа значи дека бактериската вагиноза е релативно неспецифичен биомаркер за ризикот од зараза.

### 5.10. *Candida spp*

*Candida spp* се регистрира кај околу 10 до 20% од испитаничките во репродуктивна возраст. Кај асимптоматските носители, концентрацијата на микроорганизмите е ниска. При состојби кои водат до локална имуна супресија, како што се сексуален однос или локална индукција на алергиски одговор, се создава адекватна средина за пролиферација на микроорганизмите и се овозможува трансформација на хифите во поинвазивни (Witkin SS, 1987). Овие состојби резултираат во симптоматски вагинит. *Candida spp* е толерантна на кисела средина. Концентрацијата на *Candida spp* се зголемува вообичаено во предменструалниот период како резултат на порастот на бактерии кои не припаѓаат на групата лактобацили (Eschenbach DA et al, 2000). Во студијата е укажано дека испитаничките со дефицит на т.н. mannose-binding lecithin (MBL) како резултат на полиморфизам на генот кој регулира продукција на овој протеин се поосетливи на рекурентни инфекции со *Candida spp*. Mannose – binding lecithin (MBL) е антимикробен протеин, присутен во вагиналната циркулација и секреција, а се синтетизира главно во црниот дроб, додека вагиналната продукција е сèуште несигурна (Babula O et al, 2003).

Во нашата студија, *Candida spp* е изолирана кај 14,5% од вкупниот број на испитанички, најголем дел од групата со интермедиерна флора. Од овие испитанички само кај 12 е направена молекуларна анализа за видови на *Lactobacilli*. Кај 33,3% од нив е докажан сам *Lactobacillus iners*, следи *Lactobacillus crispatus* кај 25,0% и *Lactobacillus casei* кај 16,7%. Од овие резултати не може да се извлече заклучок во однос на корелација со одредени лактобацили, но факт е дека *Candida spp* е најчесто присутна кај интермедиерен наод, односно кај состојба на дисбаланс на вагиналната средина.

### 5.11. *Chlamydia trachomatis*

Позитивен брис за *Chlamydia* е добиен кај вкупно 6 испитанички од 102 кај кои е направена анализа. Три испитанички се од групата со бактериска вагиноза, две со интермедиерен наод, а една со нормална флора. Покрај тоа што половина од испитаничките се со бактериска вагиноза, сепак бројот на позитивни брисеви е многу мал, за да се извлече било каков заклучок.

Според досега објавени резултати, D-изомерот на млечна киселина ја инхибира инфекцијата со *Chlamydia* преку рН-зависен ефект на вагиналните епителни клетки и

микросредината. Сигнификантно поголема заштитна улога против *Chlamydia* обезбедуваат *L. crispatus*, *L. gasseri* и *L. jensenii* кои продуцираат повеќе D-изомер отколку *L. iners*, кој продуцира главно L-изомер на млечна киселина (Gong Z et al, 2014; Edwards V et al, 2015). Освен тоа D-изомерот превентира и инфекции на горниот генитален тракт (Witkin SS et al, 2013).

### 5.12. *Ureaplasma spp.*

*Ureaplasma* е дел од нормалната генитална флора, со стапка на колонизација од 40% до 80% (Cassell GH et al, 1993). Се смета за опортунистички патоген бидејќи може да биде изолирана од урогениталниот тракт и на здрави луѓе, но и на индивидуи кои имаат некакво заболување. Нејзината улога е докажана кај гинеколошки заболувања, инферилитет и белодробни болести на новороденчињата (Chang-tai Z et al, 2011). *Ureaplasma* е изолирана и кај жени со промени на утерините туби и со пелвична инфламаторна болест. Сепак, присуството на *Ureaplasma* на овие локации е ретко и е вообичаено асоцирано со други познати патогени (Taylor-Robinson D, 1996).

Постојат контрадикторни резултати за асоцијацијата на *Ureaplasma urealyticum* со бактериска вагиноза. Изолирана е кај 62-97% од испитанички со бактериска вагиноза, но сепак нејзината улога како патоген останува нејасна. Стапките на вагинална колонизација се движат од 8,5 до 77,5% и се во релација со сексуалната активност, со тоа што почесто се среќава кај индивидуи со мултипли партнери (Taylor-Robinson D, 1996). Во студијата на Dhawan B и соработници *Ureaplasma* е изолирана од генитален тракт кај 25,8% (Dhawan B et al, 2012).

Во нашата студија, со молекуларна анализа *Ureaplasma urealyticum* е докажана кај 43% од вкупниот број на примероци на кои е направена молекуларна анализа. Од нив 20% се со бактериска вагиноза, 35% се со интермедиерен наод, а 45% со нормална флора.

Позитивни за *Ureaplasma urealyticum* се 42,1% од испитаничките со бактериска вагиноза, 60,9% од групата со интермедиерен наод, како и 35,3% од групата со нормална флора.

Од групата со културелно изолирање, позитивни се 21,6% од испитаничките, од кои 30,4% се со бактериска вагиноза, 30,4% со интермедиерна флора и 39,1% со нормална флора. Позитивни се 36,8% од групата со бактериска вагиноза, а 29,7% од група со ИМ наод и 15,3% од групата со нормална флора. Интересен е податокот што релативно поголем процент од испитаничките со нормален наод се позитивни во споредба со испитаничките од другите две групи, особено од групата со бактериска вагиноза. Освен тоа, процентот на позитивни брисеви е двојно поголем со молекуларна анализа, во споредба со културелното изолирање.

Колонизација на гениталниот тракт со *Ureaplasma* се споменува и како причина за инфертилитет кај 32% (Gupta A et al, 2009). Докажано е дека атхерира со клетките од спермата со тоа што предизвикува и намалување на мотилитетот на сперматозоидите (Meseguer M et al, 1990).

Според Hiller преваленца на *Ureaplasma urealyticum* кај бремени испитанички со нормална флора е 78%, а кај бактериска вагиноза 92% (Hillier SL et al, 1993). Слични се резултатите на Keane, според кои испитаничките со бактериска вагиноза имале повисока стапка на колонизација со *Ureaplasma Urealyticum* 65%, наспроти 48% од испитаничките со нормална флора. Оваа разлика сепак не е сигнификантна (Keane FE et al, 2000). Според анализите на Patel и Nyirjesy *Ureaplasma urealyticum* се детектира кај испитанички со и без бактериска вагиноза и најверојатно нема асоцијација на овој специес и бактериската вагиноза (Patel MA et al 2010).

*Ureaplasma* е изолирана и од амнионската течност на испитанички со хориомионитис и води до предвремено породување. (DiGiulio DB, 2012; Gerber S et al, 2003). Неколку студии на бремени жени ја потврдуваат улогата на *Ureaplasma* во неповолен исход на бременоста, абортус и предвремено породување (Lee SE et al, 2009; Namba F et al, 2010; Taylor-Robinson D, 1996).

Студијата на Chua KB и сор. потврдува дека *Ureaplasma urealyticum* е повеќе асоцирана со губиток на лактобацили во споредба со другите типови на уреаплазма, како и со инфекции на генито-уринарниот тракт до 58,18% (Povlsen K et al, 2001). Во нашата студија, кај испитаничките со докажана *Ureaplasma* кај 47,5% се регистрира *L. iners*, а кај 32,5% *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* во комбинација заедно. Кај една испитаничка, кој која е добиен слабо позитивен резултат и е до групата со интермедиерен наод, истовремено се докажани *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*.

Независно од различноста во резултатите од досега објавените студии, се смета дека *Ureaplasma urealyticum* има хемолитичка активност и продуцира ензими кои го редуцираат мукозниот имунитет (Africa CW et al, 2014). Тие имаат улога во симптомите и патогенезата на бактериската вагиноза.

*Ureaplasma urealyticum* индуцира проинфламаторна продукција на цитокини во цервикалните и вагиналните епителни клетки и макрофагите, што сугерира дека овој организам има потенцијал да влијае во промените на вагиналната имунолошка средина (Peltier MR et al, 2009; Li Y-H et al, 2000). Постојат и докази во клинички експериментални студии, кои ја потврдуваат улогата на *Ureaplasma* во патогенезата на бактериска вагиноза, од аспект на имуна дисрегулација асоцирана со бактериска вагиноза (Hasebe A et al, 2014).

Основата за дијагноза на *Ureaplasma* се културелното докажување и PCR анализата. Достапни се и комерцијални тестови за потврда. Навремена дијагноза и започнување на соодветен антибиотски третман се основа за превенирање на долготрајни

компликации од инфекции со *Ureaplasma*. *Ureaplasma* специесите се често присутни во урогениталниот тракт кај здрави луѓе, затоа вообичаено и се очекува позитивен резултат од PCR анализа на примероци од овие места. Зголемениот бактериски load кој што се детерминира преку real time PCR има поголемо значење за клиничка инфекција (Waites KB et al, 2012). Позитивните PCR резултати треба да се земат во предвид како дијагноза за клинички сигнификантна инфекција.

### 5.13. *Mycoplasma genitalium*

*Mycoplasma genitalium* се пренесува по сексуален контакт, асоцирана е со зголемен ризик од нарушувања и компликации поврзани со женскиот репродуктивен тракт, вклучувајќи мукопурулентен цервицитис, пелвична инфламаторна болест инфертилитет, предвремено породување како и зголемен ризик од HIV инфекција. Не се многу јасни факторите кои ја зогледуваат осетливоста на *Mycoplasma genitalium* инфекцијата. Бактериската вагиноза е асоцирана со зголемен ризик за други сексуално преносливи инфекции, а може да биде асоцирана и со зголемен ризик за *Mycoplasma genitalium*. *Mycoplasma hominis* е асоцирана со присуство на бактериска вагиноза (Lokken EM et al, 2017).

Податоците се сепак лимитирани и неконзистентни, од студии кои што покажуваат зголемен ризик за *Mycoplasma* помеѓу испитаничките со бактериска вагиноза, некои што покажуваат намален ризик и трети што не покажуваат никаква поврзаност. (Oakeshott P et al 2010; Lokken EM et al, 2017). Едно од објаснувањата за ваквите конфликтни податоци е можеби несоодветната временска рамка во која се правени иследувањата. Можеби не се работи за добро избран временски период за следење на етиолошката поврзаност, бидејќи нивоата на вагиналниот микробиом и на бактериите кои се дел од него флукутираат во тек на времето.

Со културелна анализа, *Mycoplasma hominis* се детектира кај 24% до 75% од случаите на бактериска вагиноза и кај 13% до 22% од испитаничките без бактериска вагиноза (Spiegel SA, 1991). Детекцијата на *Mycoplasma hominis* со PCR дава слични резултати. Постојат податоци за 53% носителство на *Mycoplasma hominis* кај испитанички со бактериска вагиноза и нула детекција кај испитанички со нормален наод (Keane FE et al, 2000). Слична студија има и Taulor-Robinson и Rosenstein, која покажува дека *Mycoplasma hominis* е присутна кај мал број на испитанички со нормална флора но концентрацијата на *Mycoplasma hominis* се зголемува за фактор 10000 кај испитанички со бактериска вагиноза (Taylor-Robinson D, 2001).

Во нашата студија, со молекуларна анализа *Mycoplasma hominis* е докажана кај 15,1% од групата со молекуларна анализа. Од нив 50 % се со бактериска вагиноза, 28,6% се со интермедиерен наод, а 21,4% со нормална флора.

Позитивни се 36,8% од испитаничките со бактериска вагиноза, 17,4% од групата со ИМ, а само 5,9% од групата со нормална флора.

Од групата со културелно изолирање, позитивни се само 3,9% од испитаничките, од кои 75% се со бактериска вагиноза, а само една е со интермедиерна флора.

Позитивни за *Mycoplasma hominis* се 15,8% од групата со бактериска вагиноза, а 4,2% од група со ИМ наод. Од групата со нормална флора нема позитивен наод.

Austin и сор, реферираат намалување на колонизација со *Mycoplasma* кај испитанички со бактериска вагиноза по локален третман со метранидазол или клиндамицин (Austin MN et al, 2005).

Студија на 280 испитанички сексуални работнички од Кенија покажува преваленца на *Mycoplasma genitalium* од 16,1% и бактериска вагиноза 40,4%. Според резултатите од студијата Lokken EM од 2017 г, жените со бактериска вагиноза имале 3,5 пати поголем ризик за инфекција со *Mycoplasma genitalium* при нивната следна посета односно следно земање на примерок за анализа, во споредба со жени со нормален вагинален микробиом (Lokken EM et al, 2017).

Кај популација со низок ризик во Велика Британија и Австралија инциденцата на *Mycoplasma* се движи од 0,9 до 1,3 на 100 годишно (Oakeshott et al, 2010, Walker J et al, 2013). Кај високо ризична популација во Кенија и во САД, инциденцата се движи од 22,7 на 100 годишно до 33,6 на 100 годишно (Cohen CR et al, 2007, Balcus JE et al, 2016). Во овие случаи постои јасна асоцијација помеѓу бактериска вагиноза и инциденца на микоплазма, особено при споредба на испитаничките со бактериска вагиноза со оние со нормален микробиом.

Потребни се дополнителни студии за истражување дали бактериската вагиноза ја зголемува биолошката чувствителност на други сексуално преносливи инфекции или постојат и други ризик фактори. Доколку се докаже дека бактериската вагиноза е ризик ефективниот скрининг и третман може да ја редуцира чувствителноста и ризикот од инфекција со *Mycoplasma genitalium*.

#### **5.14. Вагинален микробиом, HPV, CIN и цервикален карцином**

Lee JE и соработници се први кои правеле истражување на улогата на HPV инфекцијата на составот на вагиналниот микробиом. Студијата вклучила 912 испитанички во Кореа, меѓу кои 16 монозиготни близначки во перименопауза, од кои 9 биле HPV дискордантни. Токму во оваа група се докажала значителна разлика во структурата на вагиналниот микробиом помеѓу близнаците со тоа што HPV позитивните испитанички имале поголеми разлики односно мешана флора и сигнификантно помалку соеви на

*Lactobacillus* во споредба со нивните неинфицирани близнаци (Lee JE et al 2013). *Sneathia spp* е идентификувана како микробиолошки маркер за *HPV* инфекција (Mitra et al, 2016).

Во лонгитудинална студија на Brotman и соработници, анализирани се 32 сексуално активни испитанички од Северна Америка во период од 16 недели, со само-тестирање, односно self-sampling на дво-неделни интервали (Brotman RM, et al 2014). Од вкупно 930 примероци, најчесто *HPV* позитивни биле испитаничките од 3-та и 4-та група (Mitra et al, 2016). Во групата каде доминира *Lactobacillus gasseri* е регистрирано најбрзо лекување на акутната инфекција со *HPV* што ја потврдува неговата протективна улога. Согласно на ова, *Lactobacillus gasseri* е потенцијален терапевтски специес за одржување на цервикалното здравје, но секако дека за ова се потребни дополнителни студии како би ја докажале поврзаноста меѓу вагиналниот микробиом и *HPV* инфекцијата.

Според резултатите од студијата спроведена во Велика Британија за анализа на вагиналниот микробиом кај испитанички со цервикални лезии, во која се вклучени 159 испитанички од кои 20 со нормален наод како контролна група, 52 со LSIL, 92 HSIL и 5 со инвазивен карцином, како што се зголемува степенот на CIN, така се регистрирани поголеми промени во вагиналниот микробиом и сè помала концентрација на соевите на лактобацили (Mitra A et al, 2015).

### **5.15. Бактериска вагиноза и инфекција со *Humanpapilloma virus (HPV)***

Бактериската вагиноза корелира со повисока инциденца, преваленца и перзистенција на *HPV* инфекција, како и со развој на CIN (Gillet E et al 2011; Gillet E et al 2012; King CC et al 2011; Guo Y et al, 2012 ). Но, има резултати од студии кои не покажуваат корелација помеѓу CIN и бактериска вагиноза (Frega A et al, 1997; Peters N et al, 1995; Rahkola P et al, 2009) што индиректно се објаснува со недостаток на објективни дијагностички тестови за бактериска вагиноза или субјективни скоринг системи, како и со хетерогеноста на самата бактериска вагиноза (Sha BE et al, 2005).

Според нашата анализа, од групата испитанички со наод од цитолошка анализа (Папаниколау тест) за *HPV* или за промени што асоцираат на вирусна инфекција, кај 60,0% е докажан *Lactobacillus iners* и тоа секогаш сам, што во однос на останатите докажани лактобацили е сигнификантно.

Од нашата група на испитанички, само кај 20 е направен скрининг за високоризичен *HPV*. Од нив позитивен наод е регистриран кај 37,5% од групата со нормален наод, 40,0% од групата со интермедиерен наод и кај 42,9% од групата со бактериска вагиноза.

Мала студија на HPV статус кај 20 испитанички покажува дека HPV детекцијата е највисока од 7-от до 11-от од менструалниот циклус што претставува период кога вагиналниот микробиом е најразновиден (Gajer P et al, 2012; van Ham MA et al, 2002). Ова сугерира дека е можна корелација на флукутации на HPV статусот со промените на вагиналниот микробиом кои што се јавуваат како резултат на менструалниот циклус. Но секако овие анализи се однесуваат на здрави испитанички и во релативно краток временски период.

Покрај тоа што бројни студии покажуваат некаква корелација помеѓу HPV инфекцијата и промените на грлото на матката, потребно е да се направат уште многу иследувања за да се докаже таа софистицирана врска помеѓу домакилот, микробиотата и карциногенезата. Секако доколку се докаже некаква врска, клиничкото значење би било огромно и ќе отвори потенцијал за терапевтски стратегии кои што ќе вклучуваат манипулација на вагиналниот микробиом со стимулација на оние кои се асоцирани односно кои што имаат заштитна улога за здравјето.

#### **5.16. Субјективни симптоми**

Субјективните симптоми вообичаено се карактеристични за понапредната фаза од вагинален дисбаланс или инфекција. Податок за поинтензивен вагинален секрет сигнификантно асоцира со интермедиерна флора или бактериска вагиноза. Во нашата студија ваков податок е добиен од 95,2% од испитаничките со бактериска вагиноза и од 62,5% од испитаничките со интермедирена флора. Наспроти ова, само 7,7% од групата со нормална флора се пожалиле, најголем дел од нив со нарушена рН вредност на вагинален секрет.

Податок за често мокрење или печење при мокрење сигнификантно асоцира со бактериска вагиноза наспроти нормална флора. Пецкање во интимна регија е регистрирано кај 95,2% од групата со бактериска вагиноза и сигнификантно асоцира со нарушена вагинална флора

#### **5.17. Навики, тоалета на надворешни гениталии**

Составот на вагиналниот микробиом е под дејство на бројни фактори. Разликите може да бидат и резултат на варијации во хигенските практики. Хигената во тек на крвавење од менструалниот циклус, како и вагиналната тоалета имаат голема улога во промените на вагиналниот микробиом (Water Aid, 2016; Koumans EH et al, 2007).

Вагиналната тоалета (не само на надворешни гениталии) особено по менструално крвавење се покажало дека сигнификантно го зголемува ризикот од бактериска вагиноза, а откажувањето од оваа пракса може да го редуцира ризикот од бактериска вагиноза (Schwebke JR et al, 2004; Brotman RM et al, 2008). Последна студија спроведена во Америка на 1271 испитаничка, го потврдува фактот дека тоалетата го зголемува ризикот од *HPV* инфекција особено со високоризични субтипови (Vui TC et al, 2016). Интересно е што авторот на оваа метаанализа заклучува дека тоалетата може да го зголеми ризикот и од CIN и од цервикален карцином, што може да биде резултат на процесот на промени во микробиомот (Zhang J et al, 1997).

Според анализите на нашата група, 38,5% од групата со нормална флора, 37,5% од интермедиерна и 23,8% од групата со бактериска вагиноза, даваат податок дека практикуваат тоалета на надворешни гениталии. Сепак нема статистички сигнификантна процентуална разлика помеѓу групите.

### 5.18. Пробиотици и пребиотици

Препарати за орална употреба што содржат *Lactobacillus rhamnosus GR-1* во комбинација со *Lactobacillus reuteri RC-14*, имаат влијание на зголемување на преваленцата на микробиом во кој преовладуваат лактобацили, како и подобрување на лекувањето на бактериска вагиноза, кога се дава во комбинација со метронидазол (Hummelen R et al, 2010). Оваа студија покажува дека и орален внес на лактобацили може да има улога во моделирање на структурата на вагиналниот микробиом. Овие орално внесени бактерии, веројатно стигнуваат во вагината преку не многу јасни механизми, кои што вклучуваат транзиција преку анусот, перинеумот и кожата на вулвата (Reid G and Hammond JA, 2005).

Се смета дека и капсули, односно супозитории што содржат *Lactobacillus crispatus* доколку се внесат во вагината може да помогнат во регулирање на флората (Ma L et al, 2013).

Потенцијалните механизми преку кои овие специеси ја моделираат структурата на вагиналната средина вклучуваат секреција на бактериоцин и гасерин од *Lactobacillus reuteri*, како и секреција на лактоцин 160 од *Lactobacillus rhamnosus*, сличен на бактериоциноот кој е особено активен против *Gardnerella vaginalis*. Објавени се резултати од две студии во кои што се вклучени пременопаузални испитанички, во кои *Lactobacillus gasseri* е негативно асоциран со *Lactobacillus iners* и *Atopobium vaginae*, двата специеси кои се поврзани еден со друг и сугерираат можно влијание во интермедиерен или висок ризик за развој на CIN (De Backer E et al, 2007; Oh NY et al. 2015). Овие анализи се дополнителна потврда дека *Lactobacillus iners* не е секогаш асоциран со здрава средина. Тоа треба да се има предвид кога се дизајнираат терапии со пробиотици, со цел да се постигне доминантност на соеви на *Lactobacillus* кои имаат докажана протективна улога .

Резултатите од нашата студија покажаа дека сигнификантно поголем процент на испитанички од групата со нормален наод практикуваат речиси секојдневно внес на исхрана со пробиотици, како што се ферментирани млечни продукти. Во однос на внес со суплементи, само 12,3% од првата и 4,2% од втората група внесуваат пробиотици со суплементи, кои се ординирани, главно поради проблеми со гастроинтестинален тракт, во тек на последниот месец. Процентуалната разлика е несигнификантна. Препарати за вагинална употреба, главно гел со млечна киселина, употребувале само 10,8% од испитаничките од групата со нормална флора. За статистичка анализа нема можност и во овој случај.

Пробиотиците може да имаат улога во т.н. „чистење“ од HPV. *Lactobacillus gasseri* е асоциран со брзо „чистење“, односно намалување на инциденцата на HPV инфекција (Brotman RM et al, 2014). Овој вид заедно со *Lactobacillus crispatus* е цитотоксичен за клетките инфицирани со HPV 18, но најверојатно со многу пософистициран механизам на делување (Motevaseli E et al, 2013a; Motevaseli E et al, 2013b).

Според некои студии, испитаничките со HPV 54 и low grade цервикални лезии кои се третирани со орални препарати што содржеле *Lactobacillus casei* имаат поголем процент на излекување од HPV инфекција односно 29% v.s 19%, а сигнификантно почесто се излекувале и цервикалните лезии 60% v.s. 31% во споредба со нетретираниите (Verhoeven V et al, 2013).

**Пребиотиците** се јаглехидрати кои човековиот организам не ги разградува и имаат позитивно влијание на растот на здрави бактерии, кои што се веќе присутни во човековото тело. Тие се најмногу проучени во гастроинтестиналниот тракт каде што имаат улога во модулирање на композицијата на микробиомот (Valcheva R et Dielman LA, 2016).

Неколку ин витро студии и мали ин виво студии докажуваат дека пребиотиците имаат позитивно влијание на растот на *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii* и *L. vaginalis* ин витро, но не и на *Candida Albicans*, *Escherichia Coli* или *Gardnerella Vaginalis* (Rousseau V et al, 2005).

Студија на 42 жени, кои што се третирани поради бактериска вагиноза со метранидазол и локално со гел што содржи гликоолигосахариди, покажала сигнификантна редуција во Нугент скорот за 8 до 16 дена од третманот. По антибиотскиот третман, на нултиот ден, нема статистички сигнификантна разлика во Нугент скорот во двете групи ( $p=0,296$ ), односно нормален скор е регистриран кај 72,22% од испитуваната група и кај 66,66% од плацебо-групата. По осум-дневен третман, сите од испитуваната група имале нормален Нугент скор, додека 33% од групата со плацебо имале интермедиерен или повисок скор. По 16 дена, сите од испитуваната група имале нормален скор, а 24% од плацебо групата сеуште имале интермедиерен или повисок скор (Coste I et al, 2012).

Кога пребиотиците се аплицираат заедно со пробиотици во симбиотски препарати, може да го забрзаат и подржуваат растот на пробиотските специеси како и продукцијата на бактериоцини (Pranckute R et al, 2016). Овие резултати се особено важни, бидејќи ваквиот третман е многу евтин и безбеден од аспект на несакани ефекти, како за домаќинот така и за лекување на болеста, која секако, со било кој друг начин на лекување ќе има определен ризик особено за репродукција и за морбидитет во бременост (Kyrgiou M et al, 2006; Kyrgiou M et al, 2014; Kyrgiou M et al, 2016; Arbyn M et al, 2008).

Пребиотиците и пробиотиците може да бидат опција за практични интервенции особено во земјите во развој (Ferlay J et al, 2015).

По дефиниција членовите на одреден бактериски специес имаат комплетен нуклеотиден идентитет со повеќе од 70% од нивниот геном (Chen J et al, 2015). Останатата разновидност на геномот овозможува егзистенција на различни типови кои може да имаат различни функционални гени што предизвикуваат и имаат различни биолошки карактеристики. Затоа се потребни дополнителни испитувања за да се открие дали само еден одреден тип од бактерискиот специес има протективно или патогено влијание нпр. во однос на HPV инфекцијата и цервикалната дисплазија. Студијата на Abdelmaksoud го разработува токму овој проблем. Во анализата се компарирани различни типови на *Lactobacillus crispatus* со кои биле колонизирани испитанички со и без бактериска вагиноза, кои имаат значителна геномска разновидност во специесот и идентификуваат неколку гени кои што ги има исклучиво кај оние што имаат бактериска вагиноза и други кои што немаат бактериска вагиноза (Abdelmaksoud AA, et al 2016). Овие гени бараат дополнителни иследувања, за да се разбере протективниот механизам на одредени бактерии или болести кои што се поврзани со одредени соеви, со употреба на метагенозни техники кои што ќе имаат улога во развојот на одредени препарати со соодветни пробиотици.

### **5.19. Флукуацина вагиналниот микробиом во однос на хормонските промени во текот на менструелниот циклус**

Флукуациите во составот на вагиналниот микробиом се поврзани со циклична секреција на естрогени и прогестерон во тек на менструалниот циклус. Најголема нестабилност се регистрира во тек на менструалното крварење, кога нивоата на естроген и прогестерон се најниски. Присуството на менструална крв е фактор што ги стимулира овие промени на составот на вагиналната мукоза, води до намалување на едни, а до зголемување на концентрацијата на други типови. Најголема стабилност на вагиналниот микробиом се регистрира во време на естрогенскиот пик (периоволаторен период) по кој следи и прогестеронскиот пик (периодот околу 21ви до 23ти ден од циклус) (Gajer P al, 2012; Eschenbach DA et al, 2000)

Широката употреба на синтетски хормони за контрацептивни цели исто така има улога во составот на вагиналниот микробиом. Мета анализите покажале дека употреба на хормонски контрацептиви е поврзана со околу 32% редуција на рекурентна и превалентна бактериска вагиноза и со 18% намален ризик од појава на истата (Vodstrcil LA et al, 2013). Во студијата биле вклучени комбинирани хормонски контрацептиви и чисти хормонски препарати, но ниту едните, ниту другите не се покажале како позаштитни. Освен хормонските контрацептиви, се смета дека и други надворешни фактори делуваат на составот на вагиналниот микробиом, како што е и неодамнешен сексуален однос, кој е асоциран со редуција на концентрацијата на *Lactobacillus crispatus* (Mandar R et al 2015).

Во нашата студија, многу мал процент од испитаничките дадоа податок дека користат хормонски комбинирани препарати за орална контрацепција.

Од аспект на анализа на улогата на фазата од циклус во момент на земање на примерокот, не добивме статистички сигнификантни податоци. За обезбедување на ваков тип на податоци, неопходно е следење, со земање на примероци од иста пациентка, на одредени интервали и анализа на структурата и промените/флукуации на микробиомот.

## 5.20. Дијагностички и терапевтски стратегии

Една од најважните цели и мотив за истражувањето, беше да се направи анализа и од добиените резултати да се процени дали може да се развие брз, евтин, едноставен тест / метод за одредување на вагинален микробиом.

Пре- и пробиотиците претставуваат еден нов терапевтски пристап на болест, бидејќи се евтини, едноставно се аплицираат и имаат малку и ретки несакани ефекти (Mitra A et al, 2016). Пре и пробиотиците имаат и позитивен ефект во другите области од женското здравје бидејќи дисбиозата е причина за 2 до 4-кратно зголемување на ризикот за предвремено породување, ризикот од абортус и зголемените стапки на трансмисија на HIV (Leitch H et al, 2003; Atashili J et al, 2008). Овие податоци укажуваат на тоа дека е паметно да се инвестираат и време и ресурси во оваа област на истражување како и развој на терапевтски стратегии.

Вагиналниот микробиом несомнено игра улога во инфицирањето и перзистенција со HPV вирусот во хуманата вагина, како и во последователен развој и прогресија на CIN лезии. Потребно е да се дизајнираат добри студии за да се докаже оваа поврзаност со исходот од болеста, како и влијанието на вагиналниот микробиом. Ова се многу важни податоци за развој на нови терапевтски продукти во форма на пробиотици за превенирање на HPV инфекција, промовирање на лекувањето на инфицираните испитанички и намалување на ризикот од развој на цервикална дисплазија. Предикцијата и превенцијата

се клучни за избегнување на понатамошни несакани репродуктивни исходи, кои може да се резултат на претходен третман на лезии на грлото на матката (Kyrgiou et al, 2006; Kyrgiou et al, 2014; Arbyn M et al, 2008).

Од досегашните анализи, кои се во согласност и со нашите резултати, несомнено е дека најпротективен вид е *Lactobacillus crispatus*. Но, можно е само одредени типови од одреден бактериски специес да имаат протективен ефект и превенираат развој на болест.

Резултатите од молекуларните иследувања покажуваат дека во одредени случаи, Нугент скорот има недотатоци во однос на класифицирањето на испитаничките во однос на тоа дали се работи за бактериска вагиноза, нормална флора или интермедиерен наод. Молекуларните анализи покажуваат дека се можни сигнификантни промени на микробиомот во релативно краток временски период. Врз база на инцијалните анализи од областа на молекуларната анализа, консензусот помеѓу експертите во оваа област е дека најчестите членови на вагиналниот микробиом се идентификувани (Marrazzo JM et al, 2010). Врз основа на тоа се развиени панели за детекција на одреден број на квантитативни специеси и специфични квантитативни PCR есеи за одредување на концентрацијата на бактериските специеси во вагиналниот микробиом (Zozaya - Hinchliffe M et al, 2010). Доколку се започне со нивна употреба, од голема важност би било да се одредат и границите на варијација на бактериските заедници во тек на времето, а би била потребна релативна стабилност за да се докаже хипотезата дека еден или друг тип на микробиота или пак субтип е причина за несакан исход или за болест.

Клиничките истражувања во иднина би требало да се насочат во правец на истражување на улогата на нови, дефинирани типови на вагинален микробиом и развој на евтини маркери за секој тип на вагинална заедница. Развој на релативно мали сетови за детекција на одредени типови специфични за разликување на вагинален микробиом, делува како најразумен пристап за во иднина. Но покрај откривањето на составот, фокусот во иднина можеби треба да се насочи кон истражување на тоа што точно организмите прават. Изгледа дека директно мерење на метаболитите е можно и треба да се направат истражувања во однос на комплексноста на тоа како домаќинот одговара на различните микробиота. Од особен интерес е инфламаторниот одговор.

Особен акцент во иднина треба да се стави на истражување во тек на бременост, со анализа на промените кои настануваат од почеток до крај на бременост. Факт е дека настануваат флукуации во составот на микробиомот во тек на бременост, кои може да имаат улога во развој на генитални инфекции кои водат до лош репродуктивен исход. (DiGiulio DB, 2015)

Клиничките симптоми асоцирани со бактериската вагиноза се релативно некомплицирани и лесно мерливи, но факт е дека сите симптоми не се јавуваат кај сите жени со дијагностицирана бактериска вагиноза. Тоа останува и понатаму како проблем.

Покрај дефинираните критериуми за дијагноза на бактериска вагиноза, сепак, не е толку едноставно да се дефинира истата со методите кои што се откриени и што се користат до денес.

Во континуитет со ова, напорите кои што се прават за да се карактеризира бактериската вагиноза, сеуште не го постигнаа очекуваниот резултат за откривање на етиологијата за сите жени со бактериска вагиноза. Ова и не е изненадување, со оглед на фактот за комплексноста на вагиналниот микробиом, имунитетот на домаќинот и варијабилноста во индивидуалните одговори на потенцијалните инфламатори и инфламаторни медијатори продуцирани од низа микроорганизми.

Терминот бактериска вагиноза практично претставува сет на чести клинички знаци и симптоми, кои може да се резултат и да бидат поттикнати од низа бактериски специеси со проинфламаторни карактеристики, придружени од имунолошкиот одговор, кој зависи од индивидуалната варијабилност на функцијата на имунитетот на домаќинот.

Постојат и многу други клинички синдроми каде што симптомите се чести помеѓу индивидуалците, но инфективниот причинител не е. Во сите случаи клиничките симптоми и инфламаторниот процес кај афектираните пациенти е ист, но причинителот, односно микробиолошкиот агенс е различен или варира.

Бактериската вагиноза најдобро може да се дефинира како полимикробен, инфективен процес кој што вклучува повеќе бактериски специеси кои што може да варираат од пациент до пациент. Можеби подобар термин за бактериска вагиноза е полимикробна вагиноза бидејќи тоа поточно објаснува што се случува (Onderdonk AB et al, 2016).

Идентификацијата на *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* како преобладајќи вагинални лактобацили го стеснува листот на потенцијални пробиотици и врз основа на ова може да се фокусира истражувањето во однос на фармаколошкиот третман. Фактот дека се ендогени вагинални лактобацили и дека се слепуваат на вагиналниот епител, т.е. за епителните клетки, претставува корисна информација за планирање на фармаколошка терапија со препарати кои што би ги содржеле овие специеси и би се внесувале во форма на вагинални гелови, капсули или таблети.

Многу прашања во однос на бактериската вагиноза остануваат нејасни. Зошто превентивните третмани некогаш немаат ефект особено кај бремените жени? Зошто некои испитанички одговараат на третман кај симптоматска болест, а некои не? Зошто некои испитанички имаат симптоми а други не? За да се одговораат овие прашања и уште многу други, потребни се подобри дефиниции на вагиналниот микробиом, како и истражување на патофизиологијата на разликите во вагиналниот микробиом и имунолошките одговори на домаќинот.

Молекуларните студии на вагиналниот микробиом се базираат на екстракција, симплификација и секвенционирање на варијабилни региони на 16S rRNA генот со употреба на прајмери. Додека молекуларните студии за микробиоми се исклучително важни и големо откритие во однос на демонстрирање на потенцијалот на молекуларните техники за проширување на знаењата на вагиналниот микробиом, методите што се употребуваат се сепак лимитирани и бројот на секвенците кои што реално може да бидат анализирани е релативно мал за да го овозможни комплетното разбирање на структурата на целата микробиомска заедница. За одбележување е дека и овие анализи и проширувањето на анализите се исклучително скапи, особено за широка употреба. Сепак во последните години стануваат достапни компетитивните технологии и нивната цена полесно опаѓа.

Како заклучок на сето ова во тек на последните 10 - 15 години се создаде малку појасна слика за комплексноста на вагиналниот микробиом, која што се појави благодарение на техниките на молекуларната микробиологија. Научивме дека многу претходно непознати бактерии се важни состојки на вагиналниот микробиом, а ниту една сама по себе нема некое огромно значење.

Бројни спроведени студии со секвенционирање на ДНК од примерок од вагинален секрет, обезбедија комплетна слика за тоталната бактериска различност на вагиналната средина и се открија многу непознати категории кои се важни за вагиналниот микробиом.

Клучниот предизвик особено за клиничарите во иднина е истражување од оваа област, кое ќе ги поврзе заедно резултатите од студиите кои што вклучуваат различни секвенционирачки пристапи и кои што ќе може да се употребат за утврдување на клинички важните вагинални микробиоти, односно категории на вагинален микробиом. Дури тогаш истражувачите ќе бидат во можност да одат понатаму со клинички испитувања кои што се неопходни за идентификувањето на категориите асоцирани со здрава средина, наспроти оние асоцирани со болест. Еднаш кога микробиотите за кои е јасно дека имаат добар ефект односно го штитат здравјето на жената ќе се идентификуваат, ќе може да се развијат и механизми кои што ќе ја објаснат патогенезата или заштитата. Тоа понатаму ќе може да води до развој на интервенции кои може да за подобрување на здравјето на жената (Martin DH, 2012).

Од досега спроведените студии станува јасно дека вагиналниот микробиом е област во која што треба понатаму да се насочат иследувањата, особено анализа на микробиомот во тек на бременост.

Се очекува дека проектот на откривање на човечкиот и хуманиот микробиом ќе обезбеди некои нови биомаркери со чија што помош ќе можеме полесно да ја следиме и да влијаеме на состојбата на микробиомот на вагината

## 6. ЗАКЛУЧОЦИ

- Во согласност со резултатите и заклучоците од различни светски студии, нашите резултати ја потврдија хипотезата дека постојат разлики во составот на вагиналниот микробиом кај испитанички со нормален клинички и микробиолошки наод (нормална флора) во однос на оние со интермедиерен наод или докажана бактериска вагиноза.
- Резултатите од студијата покажаа дека најчесто застапени видови на лактобацилус се *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei*. Колонизацијата со *Lactobacillus crispatus* и *Lactobacillus casei* сигнификантно асоцира со нормалната вагинална флора и ја намалуваа веројатноста (делуваат протективно) за настанување на бактериска вагиноза
- *Lactobacillus iners* е видот кој се регистрира во сите три групи
- Врз основа на добиените резултати, се доби приказ за типови на лактобацили, што овозможи и креирање на генеолошко стебло – дендрограм.
- Резултатите од анализа на вкупниот број на испитанички, покажаа дека колонизацијата со *Lactobacillus* сигнификантно асоцира со нормална вагинална флора во споредба со бактериска вагиноза.
- Резултатите покажаа присуство на лактобацили кај сите испитанички од групата со нормален наод, како и статистички сигнификантна разлика во процентуалната застапеност на лактобацили во групата со нормална флора во споредба со групата со бактериска вагиноза, како и во групата со интермедиерен наод наспроти групата со бактериска вагиноза.
- Кај испитаничките со интермедиерен наод се докажаа најголем број на видови на лактобацили од кои седум видови се појавуваат само во оваа група на испитанички. Со молекуларната анализа се докажа и присуство на *Gardnerella vaginalis* (брус е негативан), *Ureaplasma urealyticum* (најголем процент во ИМ група) и *Mycoplasma hominis*.
- *Lactobacillus iners* е најчестиот вид докажан кај бактериска вагиноза.
- Кај испитаничките со докажана бактериска вагиноза се изолира *Gardnerella vaginalis*.
- Постои статистички сигнификантна корелација на клиничките параметри и класичните микробиолошки иследувања за бактериска вагиноза со молекуларните анализи.

- Со молекуларна анализа се потврди присуство на причинители на бактериска вагиноза.
- Препорака за иднина е дополнување на испитувањата со примена на молекуларна микробиологија за ризични групи со позитивна анамнеза за проблеми во репродукција и бременост.

## **Импликации во пракса**

Познавањето на вагиналниот микробиом, особено дефинирањето на видовите на протективни лактобацили во одредена популација, овозможува планирање и избор на фармаколошки третман, со цел превенција на гениталните инфекции.

Освен клиничките и стандардните културелни микробиолошки анализи, од голема корист би била употребата на молекуларната анализа за детекција на евентуалните причинители на инфекции, особено кај испитанички со рецидивантни инфекции и со репродуктивни проблеми вклучително и инфертилитет.

Молекуларната анализа овозможува поедноставна детекција на испитанички со нарушена вагинална микросредина, особено важно во тек на бременост. Тоа би овозможило соодветен избор на фармаколошки третман за нормализирање на вагиналната микросредина, односно воспоставување/реставрирање на нормален микробиом.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdelmaksoud AA, Koparde VN, Sheth NU, Serrano MG, Glascock AL, Fettweis JM, Strauss JF, Buck GA, Jefferson KK. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from Lactobacillus-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology*. 2016; 162(3):466-475. doi:10.1099/mic.0.000238.
2. Africa CW, Nel J, Stemmet M. Anaerobes and bacterial vaginosis in pregnancy: virulence factors contributing to vaginal colonisation. *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11(7):6979-7000. doi:10.3390/ijerph110706979.
3. Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R, Cone RA, Tachedjian G. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol*. 2015; 6:164. doi:10.3389/fphys.2015.00164.
4. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*. 1983; 74(1):14-22.
5. Anderson BL, Cu-Uvin S, Raker CA, Fitzsimmons C, Hillier SL. Subtle perturbations of genital microflora alter mucosal immunity among low-risk pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011; 90(5):510-515. doi:10.1111/j.1600-0412.2011.01082.x.
6. Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL: The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*. 1999, 180: 1950-1956. doi:10.1086/315109.
7. Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J Infect Dis*. 2005; 192(3):394-398. doi: 10.1086/430926.
8. Anukam KC, Osazuwa EO, Ahonkhai I, Reid G. *Lactobacillus* vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sex Transm Dis*. 2006; 33(1):59-62.
9. Arbyn M, Kyrgiou M, Simoens C, Raifu AO, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Paraskevaidis E. Perinatal mortality and other severe adverse pregnancy outcomes associated with treatment of cervical intraepithelial neoplasia: meta-analysis. *BMJ*. 2008; 337:a1284. doi:10.1136/bmj.a1284.

10. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS*. 2008; 22(12):1493-1501. doi:10.1097/QAD.0b013e3283021a37.
11. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, López-Estrada G, Delgado-Romero K, Burguete-García AI, Cantú D, García-Carrancá A, Madrid-Marina V. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One*. 2016; 11(4):e0153274. doi:10.1371/journal.pone.0153274.
12. Austin MN, Beigi RH, Meyn LA, Hillier SL. Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(9):4492-4497. doi:10.1128/JCM.43.9.4492-4497.2005.
13. Babula O, Lazdane G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(5):733-7. doi: 10.1086/377234.
14. Balkus JE, Manhart LE, Lee J, Anzala O, Kimani J, Schwebke J, Shafi J, Rivers C, Kabare E, Scott McClelland R. Periodic Presumptive Treatment for Vaginal Infections May Reduce the Incidence of Sexually Transmitted Bacterial Infections. *J Infect Dis*. 2016; 213(12):1932-1937. doi:10.1093/infdis/jiw043.
15. Borgdorff H, Tsvitshivadze E, Verhelst R, Marzorati M, Jurriaans S, Ndayisaba GF, Schuren FH, van de Wijgert JH. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J*. 2014; 8(9):1781-1793. doi:10.1038/ismej.2014.26.
16. Borgdorff H, Armstrong SD, Tytgat HL, Xia D, Ndayisaba GF, Wastling JM, van de Wijgert JH. Unique Insights in the Cervicovaginal Lactobacillus iners and L. crispatus Proteomes and Their Associations with Microbiota Dysbiosis. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0150767. doi:10.1371/journal.pone.0150767
17. Breshears LM, Edwards VL, Ravel J, Peterson ML. Lactobacillus crispatus inhibits growth of Gardnerella vaginalis and Neisseria gonorrhoeae on a porcine vaginal mucosa model. *BMC Microbiol*. 2015; 15:276. doi:10.1186/s12866-015-0608-0.
18. Brotman RM, Erbeling EJ, Jamshidi RM, Klebanoff MA, Zenilman JM, Ghanem KG. Findings associated with recurrence of bacterial vaginosis among adolescents attending sexually transmitted diseases clinics. *J Ped Adoles Gyn* 2007,20:225-31.

19. Brotman RM, Ghanem KG, Klebanoff MA, Taha TE, Scharfstein DO, Zenilman JM. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis: a pilot study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(6):628.e1-628.e6287. doi:10.1016/j.ajog.2007.11.043.
20. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, Schwebke JR. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis* 2010;202:1907-15
21. Brotman RM. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *J Clin Invest.* 2011 Dec;121(12):4610-7. doi: 10.1172/JCI57172. Epub 2011 Dec 1. Review
22. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, Gravitt PE. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis.* 2014; 210(11):1723-1733. doi:10.1093/infdis/jiu330.
23. Bui TC, Thai TN, Tran LT, Shete SS, Ramondetta LM, Basen-Engquist KM. Association Between Vaginal Douching and Genital Human Papillomavirus Infection Among Women in the United States. *J Infect Dis.* 2016; 214(9):1370-1375. doi:10.1093/infdis/jiw388.
24. Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(1):97-101. doi:10.1128/aem.69.1.97-101.2003.
25. Cadieux PA, Burton J, Devillard E, Reid G. Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60 Suppl 6:13-18.
26. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: Role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:69-87
27. Chang-tai Z, Zhong-yi H, Chun-lei D, Chang-song Z, Mei-zhen W, Yang L. Investigation of *Ureaplasma urealyticum* biovars and their relationship with antimicrobial resistance. *Indian J Med Microbiol.* 2011; 29:288-92.
28. Chen J, Yang X, Chen J, Cen Z, Guo C, Jin T, Cui Y. SISP: a fast species identification system for prokaryotes based on total nucleotide identity of whole genome sequences. *Infectious Diseases and Translational Medicine.* 2015; 1(1):30-55. doi 10.11979/idtm.201501008.

29. Cheriyan VT, Krishna SM, Kumar A, Jayaprakash PG, Balaram P. Signaling defects and functional impairment in T-cells from cervical cancer patients. *Cancer Biother Radiopharm.* 2009; 24(6):667-673. doi: 10.1089/cbr.2009.0660.
30. Cherpes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003;37:319-25.
31. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(4):260-270. doi:10.1038/nrg3182.
32. Clark RA, Klebanoff SJ. Role of the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide system in concanavalin A-induced tumor cell killing by human neutrophils. *J Immunol.* 1979; 122(6):2605-2610.
33. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, Burk R, Schiffman M. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis.* 2012; 12:33. doi:10.1186/1471-2334-12-33.
34. Clinical Effectiveness Group, British Association for Sexual Health and HIV (BASHH). National guideline for the management of bacterial vaginosis. London (UK): British Association for Sexual Health and HIV (BASHH); 2012. 15 p. [43 references].
35. Cohen CR, Nosek M, Meier A, Astete SG, Iverson-Cabral S, Mugo NR, Totten PA. Mycoplasma genitalium infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. *Sex Transm Dis.* 2007; 34(5):274-279. doi:10.1097/01.olq.0000237860.61298.54.
36. Conlan SI, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47075. doi: 10.1371/journal.pone.0047075. Epub 2012 Oct 10.
37. Coste I, Judlin P, Lepargneur JP, Bou-Antoun S. Safety and efficacy of an intravaginal prebiotic gel in the prevention of recurrent bacterial vaginosis: a randomized double-blind study. *Obstet Gynecol Int.* 2012; 2012:147867. doi:10.1155/2012/147867.
38. Damelin LH, Paximadis M, Mavri-Damelin D, Birkhead M, Lewis DA, Tiemessen CT. Identification of predominant culturable vaginal Lactobacillus species and associated bacteriophages from women with and without vaginal discharge syndrome in South Africa. *J Med Microbiol.* 2011; 60(Pt 2):180-183. doi: 10.1099/jmm.0.024463-0.

39. Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1230:48-58. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06041.x.
40. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, Temmerman M, Vaneechoutte M. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus species*, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol.* 2007; 7:115. doi:10.1186/1471-2180-7-115.
41. Delabaere A, Huchon C, Deffieux X, Beucher G, Gallot V, Nedellec S, Vialard F, Carcopino X, Quibel T, Subtil D, Barasinski C, Gallot D, Vendittelli F, Laurichesse-Delmas H, Lémerly D. Epidemiology of loss pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2014; 43:764-775. doi: 10.1016/j.jgyn.2014.09.011.
42. Dhawan B, Malhotra N, Sreenivas V, Rawre J, Khanna N, Chaudhry R, Mittal S. Ureaplasma serovars and their antimicrobial susceptibility in patients of infertility and genital tract infections. *Indian J Med Res* 2012;136:991-6
43. DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012; 17(1):2-11. doi: 10.1016/j.siny.2011.10.001.
44. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, Sun CL, Goltsman DS, Wong RJ, Shaw G, Stevenson DK, Holmes SP, Relman DA.. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(35):11060-11065. doi:10.1073/pnas.1502875112.
45. Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(2):431-437.
46. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007; 21:355–73. 10.1016/j.bpobgyn.2007.01.002.
47. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 2010;65(7):462-473. doi: 10.1097/OGX.0b013e3181e09621.
48. Eckert LO, Moore DE, Patton DL, Agnew KJ, Eschenbach DA. Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2003;11(1):11-17. doi:10.1155/S1064744903000024.

49. Edwards V, McComb E, Guttman H, M Humphrys M, Forney L, Bavoil P, Ravel J. P08.06 Lactic acid isomers differentially reduce chlamydia trachomatis infection in a pH dependent manner. *Sex Trans Infect.* 2015; 91:A134. doi: 10.1136/sextrans-2015-052270.352.
50. Efremov, GD, Dimovski AJ, Plaseska-Karanfilska D, Simjanovska L, Sukarova E, Koceva S. *Laboratory manual* 3<sup>rd</sup> Edition, RCGEB, MASA 1999.
51. Erlich HA, Gibbs R, Kazazian JrHH. *Polymerase chain reaction. Current communications in Molecular biology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
52. Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, Holmes KK. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(2):251-256.
53. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, Winter C, Meier A, Stamm WE. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis.* 2000; 30(6):901-907.
54. Falsen E, Pascual C, Sjöden B, Ohlén M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49 Pt 1:217-221. doi: 10.1099/00207713-49-1-217.
55. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5):E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
56. Fethers K, Twin J, Fairley CK, Fowkes FJ, Garland SM, Fehler G, Morton AM, Hocking JS, Tabrizi SN, Bradshaw CS. Bacterial vaginosis (BV) candidate bacteria: associations with BV and behavioural practices in sexually-experienced and inexperienced women. *PLoS One.* 2012; 7(2):e30633. doi:10.1371/journal.pone.0030633.
57. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med.* 2005; 353(18):1899-1911. doi: 10.1056/NEJMoa043802.
58. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(10):3270-3276. doi:10.1128/JCM.01272-07.

59. Frega A, Stentella P, Spera G, Pace S, Cipriano L, Di Ruzza D, Villani C, Pachi A. Cervical intraepithelial neoplasia and bacterial vaginosis: correlation or risk factor? *Eur J Gynaecol Oncol.* 1997;18(1):76-77.
60. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, Koenig SS, Fu L, Ma ZS, Zhou X, Abdo Z, Forney LJ, Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med.* 2012; 4(132):132ra52. doi:10.1126/scitranslmed.3003605.
61. Gerber S, Vial Y, Hohlfeld P, Witkin SS. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polymerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. *J Infect Dis* 2003;187:518-521. doi: 10.1086/368205.
62. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:10. doi:10.1186/1471-2334-11-10.
63. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Verhelst R, De Sutter P, Temmerman M, Vanden Broeck D.. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012; 7(10):e45201. doi:10.1371/journal.pone.0045201.
64. Gong Z, Luna Y, Yu P, Fan H. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *PLoS One.* 2014; 9(9):e107758. doi: 10.1371/journal.pone.0107758.
65. Graver MA, Wade JJ. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2011; 10:8. doi:10.1186/1476-0711-10-8.
66. Guo Y, You K, Qiao J, Zhao Y, Geng L. Bacterial vaginosis is conducive to the persistence of HPV infection. *Int J STD AIDS.* 2012; 23(8):581-4. doi: 10.1258/ijsa.2012.011342.
67. Gupta A, Gupta A, Gupta S, Mittal A, Chandra P, Gill AK. Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet.* 2009; 280(6):981-985. doi: 10.1007/s00404-009-1042-z.
68. Hallen A, Pahlson C, Forsum U. Bacterial vaginosis in women attending STD clinic: diagnostic criteria and prevalence of *Mobiluncus* spp. *Genitourinary Medicine* 1987;63:386-9.

69. Hasebe A, Mu H-H, Cole BC. A potential pathogenic factor from *Mycoplasma hominis* is a TLR2-dependent, macrophage-activating, P50-related adhesin. *Am J Reprod Immunol.* 2014; 72(3):285-95. doi: 10.1111/aji.12279.
70. Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P, Holmes KK. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis.* 1996; 174(5):1058-1063.
71. Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis.* 2006; 193(4):556-562. doi: 10.1086/499824.
72. Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169 (2 Pt 2):450-454.
73. Hillier SL, Krohn MA, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet Gynecol.* 1992; 79(3):369-373
74. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 1993;16 Suppl 4:S273-281. doi:10.1093/clinids/16.supplement\_4.s273.
75. Hummelen R, Changalucha J, Butamanya NL, Cook A, Habbema JD, Reid G. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 to prevent or cure bacterial vaginosis among women with HIV. *Int JGynaecol Obstet.* 2010; 111(3):245-248. doi: 10.1016/j.ijgo.2010.07.008.
76. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002; 78(6):413-415.
77. Jakobsson T, Forsum U. *Lactobacillus iners*: a marker of changes in the vaginal flora?. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9):3145. doi:10.1128/JCM.00558-07.
78. Johnson HL, Ghanem KG, Zenilman JM, Erbelding EJ. Sexually transmitted infections and adverse pregnancy outcomes among women attending inner city public sexually transmitted diseases clinics. *Sexually Transmitted Diseases* 2011,38:167-71.
79. Kabuki T, Saito T, Kawai Y, Uemura J, Itoh T. Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by *Lactobacillus reuteri* LA6. *Int J Food Microbiol.* 1997; 34(2):145-156.

80. Kawai Y, Saitoh B, Takahashi O, Kitazawa H, Saito T, Nakajima H, Itoh T. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000; 64(10):2201-2208.
81. Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Taylor-Robinson D. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *Int J STD AIDS*. 2000; 11(6):356-360. doi: 10.1258/0956462001916056.
82. Kindinger LM, Bennett PR, Lee YS, Marchesi JR, Smith A, Cacciatore S, Holmes E, Nicholson JK, Teoh TG, MacIntyre DA.. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. *Microbiome*. 2017; 5(1):6. doi:10.1186/s40168-016-0223-9.
83. King CC, Jamieson DJ, Wiener J, Cu-Uvin S, Klein RS, Rompalo AM, Shah KV, Sobel JD. Bacterial vaginosis and the natural history of human papillomavirus. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2011; 2011:319460. doi:10.1155/2011/319460.
84. Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating lactobacilli. *J Infect Dis*. 1991;164(1):94-100. doi: 10.1093/infdis/164.1.94.
85. Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, McQuillan G, Kendrick J, Sutton M, Markowitz LE. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sex Transm Dis*. 2007; 34(11):864-869. doi: 10.1097/OLQ.0b013e318074e565.
86. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Prendiville W, Paraskeva E. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and metaanalysis. *Lancet*. 2006; 367(9509):489-498. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68181-6.
87. Kyrgiou M, Mitra A, Arbyn M, Stasinou SM, Martin-Hirsch P, Bennett P, Paraskeva E. Fertility and early pregnancy outcomes after treatment for cervical intraepithelial neoplasia: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014; 349:g6192. doi:10.1136/bmj.g6192.
88. Kyrgiou M, Mitra A, Paraskeva E. Fertility and early pregnancy outcomes following conservative treatment for cervical intraepithelial neoplasia and early cervical cancer. *JAMA Oncol*. 2016; 2(11):1496-1498. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.1839.
89. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romero R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using

- molecular based techniques. *BJOG*. 2011 Apr;118(5):533-49. doi: 10.1111/j.1471-0528.2010.02840.x. Epub 2011 Jan 20. Review.
90. Lederberg J, McCray AT, 'Ome Sweet 'Omics-a genealogical treasury of words. *Genealogical Treasury of Words*. *Scientist*. 2001; 15(7):8.
91. Lee SE, Romero R, Kim EC, Yoon BH. A high Nugent score but not a positive culture for genital mycoplasmas is a risk factor for spontaneous preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009; 22(3):212-217. doi:10.1080/14767050802616994.
92. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, Sung J, Ko G. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS One*. 2013; 8(5):e63514. doi:10.1371/journal.pone.0063514.
93. Leitich H, Bodner-Adler B, Brunbauer M, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Bacterial vaginosis as a risk factor for preterm delivery: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189(1):139-147.
94. Lewis FM, Bernstein KT, Aral SO. Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases. *Obstet Gynecol*. 2017; 129(4):643-654. doi: 10.1097/AOG.0000000000001932.
95. Li Y-H, Brauner A, Jonsson B, van der Ploeg I, Soder O, Holst M, Jensen JS, Lagercrantz H, Tullus K. Ureaplasma urealyticum-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Pediatr Res*. 2000; 48(1):114-9. doi: 10.1203/00006450-200007000-00020.
96. Lokken EM, Balkus JE, Kiarie J, Hughes JP, Jaoko W, Totten PA, McClelland RS, Manhart LE.. Association of Recent Bacterial Vaginosis With Acquisition of *Mycoplasma genitalium*. *Am J Epidemiol*. 2017;186(2):194–201. doi:10.1093/aje/kwx043
97. Ma L, Lv Z, Su J, Wang J, Yan D, Wei J, Pei S. Consistent condom use increases the colonization of *Lactobacillus crispatus* in the vagina. *PLoS One*. 2013; 8(7):e70716. doi:10.1371/journal.pone.0070716.
98. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A, Angelopoulos N, Lehne B, Arulkumaran S, Brown R, Teoh TG, Holmes E, Nicholson JK, Marchesi JR, Bennett PR. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep*. 2015; 5:8988. doi:10.1038/srep08988.

99. Mandar R, Punab M, Borovkova N, Lapp E, Kiiker R, Korrovits P, Metspalu A, Krjutskov K, Nolvak H, Preem JK, et al. Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Res Microbiol.* 2015; 166(5):440-447. doi: 10.1016/j.resmic.2015.03.009.
100. Marrazzo JM, Martin DH, Watts DH, Schulte J, Sobel JD, Hillier SL, Deal C, Fredricks DN. Bacterial vaginosis: identifying research gaps proceedings of a workshop sponsored by DHHS/NIH/NIAID. *Sexually transmitted diseases.* 2010;37:732–744
101. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci.* 2012; 343:2–9.
102. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999,180:1863-8
103. Martínez-Peña MD, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG. Lactobacillus species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 2013;13:189. doi:10.1186/1471-2334-13-189.
104. Mastromarino P, Di Pietro M, Schiavoni G, Nardis C, Gentile M, Sessa R. Effects of vaginal lactobacilli in Chlamydia trachomatis infection. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(5-6):654-661. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.04.006.
105. McGregor JA, French JI. Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2000; 55(5 Suppl 1):S1-19.
106. Meseguer M, Ferrer MM, Caballero P. Changes in semen parameters by incubation with *Urea plasma urealyticum* strains. In: Stanek G, Cassell GH, Tully JG, Whitcomb RF, editors. Recent advances in mycoplasmaology. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1990. p. 745-749.
107. Meštrović T. Uloga mikrobioma rodnice u spolno prenosivim infekcijama. *Medicus* [Internet]. 2012,21(1\_UGI):117-121
108. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, Bhatia R, Lyons D, Paraskevaidis E, Li JV, Holmes E, Nicholson JK, Bennett PR, Kyrgiou M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep.* 2015; 5:16865. doi:10.1038/srep16865.
109. Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next?. *Microbiome.* 2016; 4(1):58. doi:10.1186/s40168-016-0203-0.

110. Motevaseli E, Shirzad M, Akrami SM, Mousavi AS, Mirsalehian A, Modarressi MH. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *J Med Microbiol.* 2013; 62(Pt 7):1065-1072. doi: 10.1099/jmm.0.057521-0.
111. Motevaseli E, Shirzad M, Raoofian R, Motevaseli E, Shirzad M, Raoofian R. Differences in vaginal lactobacilli comp. Differences in vaginal lactobacilli composition of Iranian healthy and bacterial vaginosis infected women: a comparative analysis of their cytotoxic effects with commercial vaginal probiotics. *Iran Red Crescent Med J.* 2013; 15(3):199-206. doi:10.5812/ircmj.3533.
112. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol* 1987;155:335-350.
113. Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I. Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatr Res.* 2010; 67:166-172. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181c6e58e.
114. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2):297-301.
115. Oakeshott P, Hay P, Hay S, Steinke F, Rink E, Kerry S. Association between bacterial vaginosis or chlamydial infection and miscarriage before 16 weeks' gestation: prospective community based cohort study. *BMJ.* 2002; 325(7376):1334.
116. Oakeshott P, Aghaizu A, Hay P, Reid F, Kerry S, Atherton H, Simms I, Taylor-Robinson D, Dohn B, Jensen JS. Is *Mycoplasma genitalium* in women the "new chlamydia?" A communitybased prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2010; 51(10): 1160-1166. doi: 10.1086/656739.
117. Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, Hong KM, Kim HK, Kim MK. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(7): 674.e1-9. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.026.
118. O'Hanlon DE, Lanier BR, Moench TR, Cone RA. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infect Dis.* 2010; 10:120. doi:10.1186/1471-2334-10-120.

119. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:200. doi:10.1186/1471-2334-11-200.
120. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The Human Microbiome during Bacterial Vaginosis. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(2):223-238. doi: 10.1128/CMR.00075-15.
121. Patel MA, Nyirjesy P. Role of Mycoplasma and Ureaplasma species in female lower genital tract infections. *Curr Infect Dis Rep.* 2010;12(6):417-22. doi: 10.1007/s11908-010-0136-x.
122. Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, Tao L. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol.* 2002; 92(3):451-459. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01547.x.
123. Peerayeh NS, Sattari M. Detection of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in endocervical specimens from infertile women by polymerase chain reaction. *Middle East Fertility Society Journal.* 2006;11(2):104-108.
124. Peltier MR, Berlin Y, Tee SC, Smulian JC. Does progesterone inhibit bacteria-stimulated interleukin-8 production by lower genital tract epithelial cells? *J. Perinat. Med.* 2009; 37:328-333. doi: 10.1515/JPM.2009.064.
125. Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, de Bruyn G, Gray GE, Hammarström L, Marcotte H. Identification and characterization of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infectious Diseases.* 2013; 13:43. DOI: 10.1186/1471-2334-13-43.
126. Peters N, Van Leeuwen AM, Pieters WJ, Hollema H, Quint WG, Burger MP. Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. *Sex Transm Dis.* 1995; 22(5):296-302.
127. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. NIH HMP Working Group. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 2009; 19(12):2317-2323. doi: 10.1101/gr.096651.109. Epub 2009 Oct 9.
128. Petricevic L, Witt A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. *BJOG: An*

- International Journal of Obstetrics & Gynaecology. 2008; 115: 1369-1374. doi:10.1111/j.1471-0528.2008.01882.x
129. Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol.* 2015; 6:81. doi:10.3389/fphys.2015.00081.
130. Piyathilake CJ, Ollberding NJ, Kumar R, Macaluso M, Alvarez RD, Morrow CD. Cervical Microbiota Associated with Higher Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women Infected with High-Risk Human Papillomaviruses. *Cancer Prev Res (Phila).* 2016; 9(5):357-366. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0350.
131. Povlsen K, Thorsen P, Lind I. Relationship of Ureaplasma urealyticum biovars to the presence or absence of bacterial vaginosis in pregnant women and to the time of delivery. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:65-7
132. Pranckute R, Kaunietis A, Kuisiene N, Citavicius DJ. Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *Int J Biol Macromol.* 2016; 89:669-676. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.05.041.
133. Rahkola P, Mikkola TS, Ylikorkala O, Vaisanen-Tommiska M. Association between high risk papillomavirus DNA and nitric oxide release in the human uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2009;114(2):323-326. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.05.003.
134. Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ.* 1999; 319(7204):220-223.
135. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4680-4687. doi:10.1073/pnas.1002611107.
136. Ravel J, Brotman RM. Translating the vaginal microbiome: gaps and challenges. *Genome Med.* 2016; 8(1):35. doi: 10.1186/s13073-016-0291-2.
137. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2 Suppl):437S-443S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.437s.
138. Reid G, Hammond JA. Probiotics. Some evidence of their effectiveness. *Can Fam Physician.* 2005; 51(11):1487-1493.
139. Relman DA. Microbiology: Learning about who we are. *Nature.* 2012; 486(7402):194-195. doi: 10.1038/486194a.

140. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, Galuppi M, Lamont RF, Chaemsathong P, Miranda J, Chaiworapongsa T, Ravel J. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014; 2(1):4. doi: 10.1186/2049-2618-2-4.
141. Rousseau V, Lepargneur JP, Roques C, Remaud-Simeon M, Paul F. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*. 2005; 11(3):145-153. doi: 10.1016/j.anaerobe.2004.12.002.
142. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GH, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.
143. Saiki RK, Golfand DH, Stoffel S, Scharf ST, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988;239:487-491.
144. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975 May 25;94(3):441-8.
145. Schelonka RL, Waites KB. Ureaplasma infection and neonatal lung disease. *Semin Perinatol* 2007;31:2-9.
146. Schwebke JR, Desmond RA, Oh MK. Predictors of bacterial vaginosis in adolescent women who douche. *Sex Transm Dis*. 2004;31(7):433-436.
147. Schwebke JR, Flynn MS, Rivers CA. Prevalence of Gardnerella vaginalis among women with lactobacillus-predominant vaginal flora. *Sex Transm Infect*. 2014; 90(1):61-3. doi: 10.1136/sextrans-2013-051232.
148. Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH, Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis, and Lactobacillus spp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(9):4607-4612. doi:10.1128/JCM.43.9.4607-4612.2005.
149. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol*. 2017; 595(2):451-463. doi:10.1113/JP271694.
150. Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(9):3062-3064.

151. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(4):485-502. doi:10.1128/cmr.4.4.485.
152. Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2008; 2008:750479. doi:10.1155/2008/750479.
153. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, Marrazzo JM, Fredricks DN. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. PLoS One. 2010; 5(4):e10197. doi:10.1371/journal.pone.0010197.
154. Stafford GP, Parker JL, Amabebe E, Kistler J, Reynolds S, Stern V, Paley M, Anumba DOC. Spontaneous Preterm Birth Is Associated with Differential Expression of Vaginal Metabolites by Lactobacilli-Dominated Microflora. Front Physiol. 2017; 8:615. doi:10.3389/fphys.2017.00615.
155. Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal Lactobacillus strains. Arch Microbiol. 2014; 196(9):645-653. doi: 10.1007/s00203-014-1003-1.
156. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Verstraelen H, Vaneechoutte M, Lemm V, Schilling J, Mendling W. Gardnerella biofilm involves females and males and is transmitted sexually. Gynecol Obstet Invest. 2010; 70(4):256-263. doi: 10.1159/000314015.
157. Tabatabaei N, Eren AM, Barreiro LB, Yotova V, Dumaine A, Allard C, Fraser WD. Vaginal microbiome in early pregnancy and subsequent risk of spontaneous preterm birth: a case-control study. BJOG. 2019 Feb;126(3):349-358. doi: 10.1111/1471-0528.15299.
158. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Association between *Lactobacillus species* and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. BMC Infect Dis. 2007; 7:128. doi:10.1186/1471-2334-7-128.
159. Taylor-Robinson D. Infections due to species of Mycoplasma and Ureaplasma: An update. Clin Infect Dis 1996; 23(4):671-82. 10.1093/clinids/23.4.671.
160. Taylor-Robinson D, Rosenstein IJ. Is Mycoplasma hominis a vaginal pathogen?. Sex Transm Infect. 2001; 77(4):302. doi:10.1136/sti.77.4.302-a.
161. The National Center for Biotechnology Information [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)] Accessed 15 Jan 2018

162. Thoma ME, Gray RH, Kiwanuka N, Aluma S, Wang M-C, Sewankambo N, Wawer MJ. Longitudinal changes in vaginal microbiota composition assessed by Gram stain among never sexually active pre- and postmenarcheal adolescents in Rakai, Uganda. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2011; 24(1):42–47. doi:10.1016/j.jpag.2010.07.002.
163. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007; 449(7164):804-810.
164. Uren A, Fallen S, Yuan H, Usubutun A, Kucukali T, Schlegel R, Toretsky JA. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res.* 2005; 65(14):6199-6206. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0455.
165. Valcheva R, Dieleman LA. Prebiotics: definition and protective mechanisms. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016; 30(1):27-37. doi: 10.1016/j.bpg.2016.02.008.
166. Vallor AC, Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J Infect Dis.* 2001; 184(11):1431-1436.
167. Vaneechoutte M. Lactobacillus Iners, the Unusual Suspect. *Res microbiol.* 2017; 168(9-10): 826–836.
168. van de Wijkert JH, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, Jaspers V. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?. *PLoS One.* 2014;9(8):e105998. doi:10.1371/journal.pone.0105998.
169. van Ham MA, Melchers WJ, Hanselaar AG, Bekkers RL, Boonstra H, Massuger LF. Fluctuations in prevalence of cervical human papillomavirus in women frequently sampled during a single menstrual cycle. *Br J Cancer.* 2002; 87(4):373-376. doi:10.1038/sj.bjc.6600485.
170. van Oostrum N, De Sutter P, Meys J, Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2013; 28(7):1809-1815. doi: 10.1093/humrep/det096. Epub 2013 Mar 29.
171. Vázquez A, Jakobsson T, Ahrné S, Forsum U, Molin G. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(8):2746-2749. doi:10.1128/jcm.40.8.2746-2749.2002.
172. Verhoeven V, Renard N, Makar A, Van Royen P, Bogers JP, Lardon F, Peeters M, Baay M. Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: a

- prospective controlled pilot study. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22(1):46-51. doi:10.1097/CEJ.0b013e328355ed23.
173. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol.* 2009; 9:116. doi:10.1186/1471-2180-9-116.
174. Vodstrcil LA, Hocking JS, Law M, Walker S, Tabrizi SN, Fairley CK, Bradshaw CS. Hormonal contraception is associated with a reduced risk of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2013; 8(9):e73055. doi:10.1371/journal.pone.0073055.
175. Vujic G, Jajac Knez A, Despot Stefanovic V, Kuzmic Vrbanovic V. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(1):75–9.
176. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2012; 14(5):437-450. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.06.001.
177. Walker J, Fairley CK, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Twin J, Chen MY, Taylor N, Donovan B, Kaldor JM, McNamee K, Urban E, Walker S, Currie M, Birden H, Bowden FJ, Gunn J, Pirota M, Gurrin L, Harindra V, Garland SM, Hocking JS. *Mycoplasma genitalium* incidence, organism load, and treatment failure in a cohort of young Australian women. *Clin Infect Dis.* 2013; 56(8):1094-1100. doi: 10.1093/cid/cis1210.
178. Water Aid. Menstrual hygiene matters. [<http://www.wateraid.org/what-wedo/our-approach/research-and-publications/view-publication?id=02309d73-8e41-4d04-b2ef-6641f6616a4f>]. Accessed 19 Oct 2016.
179. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. The polymerase chain reaction in Recombinant DNA. 1992. Second Edition.
180. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, Corfield A, Millar M. Identification and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(2):713-717.

181. Witkin SS. Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1987;15(1):34-37.
182. Witkin SS, Ledger WJ. Complexities of the uniquely human vagina. *Sci Transl Med.* 2012; 4(132):132fs11. doi: 10.1126/scitranslmed.3003944.
183. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *MBio.* 2013; 4(4). pii: e00460-13. doi: 10.1128/mBio.00460-13.
184. Witkin SS. The vaginal microbiome, vaginal anti-microbial defence mechanisms and the clinical challenge of reducing infection-related preterm birth. *BJOG.* 2015; 122(2):213-218. doi: 10.1111/1471-0528.13115.
185. Witkin SS, Linhares IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG* 2016; 124:606-611. doi:10.1111/1471-0528.14390.
186. Wylie JG, Henderson A. Identity and glycogen-fermenting ability of lactobacilli isolated from the vagina of pregnant women. *J Med Microbiol.* 1969; 2(3):363-366. doi: 10.1099/00222615-2-3-363.
187. Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, Hochwalt A, Forney LJ. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2009; 22(1):11-18. doi: 10.1016/j.jpag.2008.01.073.
188. Yeruva T, Rajkumar H, Donugama V. Vaginal lactobacilli profile in pregnant women with normal & abnormal vaginal flora. *Indian J Med Res.* 2017 Oct;146(4):534-540. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_774\_16
189. Yoshimura K, Morotomi N, Fukuda K, Nakano M, Kashimura M, Hachisuga T, Taniguchi H. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Sep;205(3):235.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2011.04.018.
190. Zhang J, Thomas AG, Leybovich E. Vaginal douching and adverse health effects: a meta-analysis. *Am J Public Health.* 1997; 87(7):1207-1211. doi:10.2105/ajph.87.7.1207
191. Zheng HY, Alcorn TM, Cohen MS. Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J Infect Dis.* 1994; 170(5):1209-1215. doi: 10.1093/infdis/170.5.1209.

192. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004; 150(Pt 8):2565-2573. doi:10.1099/mic.0.26905-0.
193. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, Foster JA, Forney LJ. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*. 2007; 1(2):121-133. doi: 10.1038/ismej.2007.12.
194. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, Pierson JD, Forney LJ. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 58(2):169-181. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00618.x.
195. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:1812–1819.