

**УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ  
ВОЈНОМЕДИЦИНСКЕ АКАДЕМИЈЕ**

Соња Атанасиевска Кујовић

**ЗНАЧАЈ МУЛТИПЛЕКС КВАНТИТАТИВНОГ  
RT PCR ТЕСТА У ДИЈАГНОСТИЦИ  
ВАГИНАЛНИХ ДИСБИОЗА**

докторска дисертација

Београд, 2022. година

**UNIVERSITY OF DEFENCE IN BELGRADE  
MEDICAL FACULTY OF  
MILITARY MEDICAL ACADEMY**

Sonja Atanasievska Kujović

**THE SIGNIFICANCE OF MULTIPLEX  
QUANTITATIVE RT-PCR TEST IN DIAGNOSIS  
OF VAGINAL DYSBIOSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Докторска дисертација је урађена на Одељењу за микробску генетику и имунологију, Института за микробиологију, Сектор превентивне медицине Војномедицинске академије

**МЕНТОР:**

вс проф. др *Елизабета* Ристановић, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране у Београду

**КОМЕНТОР:**

пк доц. др *Дане* Ненадић, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране у Београду

**ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:**

проф. др *Тања* Јовановић, Медицински факултет Универзитета у Београду, председник

проф. др *Светлана* Врзић Петронијевић, Медицински факултет Универзитета у Београду

проф. др *Славиша* Станковић, Биолошки факултет Универзитета у Београду

## ЗАХВАЛНИЦА

Захваљујем ментору **проф. др Елизабети Ристановић** на труду, енергији и љубави које је пружала током мојих докторских студија, као и на упорности и стручности у изради саме докторске дисертације. Највише од свега, хвала на пријатељским разговорима и подршци током свих тих година.

Коментору **доц. др Данету Ненадићу** захваљујем на увођењу у тему, објашњењима у вези с њеним гинеколошким аспектима и несебичности коју је пружио да мој докторат буде наставак његових истраживања. Посебну захвалност дугујем за труд и време које је посветио прикупљању узорака, микроскопирању, анализи резултата и свим сугестијама и саветима у изради тезе.

Члановима Комисије **проф др. Тањи Јовановић, проф. др Светлана Врзић Петронијевић и проф. др Славиши Станковићу** захваљујем на подршци и саветима током израде тезе.

Колегиницама и колегама, **лекарима и медицинским сестрама из Центра за гинекологију и хуману репродукцију ВМА** дугујем велику захвалност за прикупљање и обраду узорака и података о испитаницама, без којих би било немогуће урадити истраживање.

Мојим другарицама из Одељења за микроскопску генетику и имунологију – **Весни, Биљи, Јаци и Николети** захваљујем за подстицај и разумевање током свих година докторских студија.

Свим **кумовима и пријатељима** хвала што су имали разумевања за моје приче о теми и проблемима у изради тезе.

Тетки **Тањи** и сестри **Диди** дугујем искрену захвалност за несебичну помоћ увек када ми је била потребна адекватна енглеска реч.

Бака **Нади** велико хвала што је увек веровала у мене. На жалост, није доживела крај израде докторске дисертације.

Највећу захвалност дугујем **мами, тати и брату Марку и његовој породици** на безусловној љубави и разумевању. Хвала вам што сте ме увек подржавали, мотивисали и бодрили у животу.

Мојим највећим љубавима, **супругу Данилу и сину Алексеју**, неизмерно хвала што су ми највећи ослонац у животу. Будући да је већи део тезе писан током моје трудноће, до касних ноћних сати, посебан мотив био ми је управо Алексеј из стомака.

# ЗНАЧАЈ МУЛТИПЛЕКС КВАНТИТАТИВНОГ RT PCR ТЕСТА У ДИЈАГНОСТИЦИ ВАГИНАЛНИХ ДИСБИОЗА

## САЖЕТАК

**Увод** Вагиналне дисбиозе (бактеријска вагиноза – БВ и аеробни вагинитис – АВ) су поремећаји у саставу вагиналне флоре који могу да проузрокују различите гинеколошке и опстетричке компликације. Због тога је важно дефинисати тачне и поуздане методе за њихову дијагностику. Највећи проблеми у дијагностици вагиналних дисбиоза су непостојање адекватног златног стандарда за дијагностику бактеријске вагинозе и препознавање аеробног вагинитиса као синдрома. Приликом укупне процене вагиналне флоре посебан значај има и дијагностиковање присуства сексуално преносивих инфекција и *Candida spp.* Истраживање даје увид у међусобну повезаност вагиналних дисбиоза, сексуално преносивих инфекција (СПИ) и *Candida spp.*

**Циљ** Основни циљ студије је поређење различитих клиничких, микроскопских и молекуларних метода како би се утврдио најпоузданија метода за дијагностику вагиналних дисбиоза. Такође, циљ истраживања је испитивање повезаности вагиналних дисбиоза и девет најчешћих узрочника сексуално преносивих инфекција, као и рода *Candida*.

**Методe** У студију је укључено 235 испитаница у репродуктивном периоду. Дијагностика вагиналних дисбиоза урађена је на основу клиничких и микроскопских критеријума – Амсел, Нугент, *Ison/Hay*, *Clayes*, Дондерс, Нова микроскопска метода, као и употребом мултиплекс квантитативног RT PCR теста. Сексуално преносиве инфекције детектоване су са четири различита мултиплекс RT PCR теста. *Candida spp.* дијагностикована је на микроскопом препарату као и култивацијом на Сабуру агару.

**Резултати** Студија утврђује да је RT PCR најпоузданија метода за дијагностику БВ. Поређење клиничких, микроскопских и молекуларних метода показује добро слагање у налазима здраве флоре и БВ док су највеће разлике добијене у интермедијарном налазу. У односу на друге методе, RT PCR тестом детектован је најмањи број испитаница са интермедијарним налазом 9 (3,8%). Нова микроскопска метода има најбоље слагање са PCR-ом као златним стандардом ( $\kappa = 0,74$ ) у односу на остале клиничке и микроскопске методе. Дондерсова и Нова микроскопска метода једине детектују АВ у евалуацији микроскопског препарата. Примењени PCR тест, примарно

намењен за дијагностику БВ, не може се адекватно користити за детекцију АВ. Резултати истраживања потврдили су повезаност између укупног броја детектованих СПИ узročника и БВ, као и да су моноинфекције најчешће код жена са нормалном флором, а коинфекције код жена са БВ. Два узročника СПИ – *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* имају статистички значајну повезаност са БВ. Резултати истраживања показују да је присуство рода *Candida* једнако без обзира на стање вагиналне флоре. Не постоји асоцијација између присуства *Candida spp.* и неког од узročника СПИ, без обзира да ли се ради о моноинфекцији или коинфекцијама.

**Закључак.** За анализу вагиналне флоре треба применити мултидисциплинарни приступ који подразумева сарадњу гинеколога, микробиолога и молекуларних биолога чиме се постиже правилна процена стања вагиналне флоре и унапређује дијагностика и терапијски притуп. Најбољи алгоритам за процену статуса вагиналне флоре је комбинација клиничких и микроскопских критеријума и употреба RT PCR теста у случајевима када је потребна диверзификација одређених препарата попут интермедијарних налаза, препарата са малим бројем ћелија или у случајевима честих рекурентних БВ.

**Кључне речи:** вагиналне дисбиозе, бактеријска вагиноза, аеробни вагинитис, Амсел, Нугент, *Ison/Hay*, *Clays*, Нова микроскопска метода, Дондерс, RT PCR, сексуално преносиве инфекције, *Candida spp.*

**Научна област:** Молекуларна медицина

**Ужа научна област:** Микробиологија, Молекуларна биологија, Гинекологија

# THE SIGNIFICANCE OF MULTIPLEX QUANTITATIVE RT-PCR IN THE DIAGNOSIS OF VAGINAL DYSBIOSIS

## ABSTRACT

**Introduction** Vaginal dysbiosis (bacterial vaginosis (BV) and anaerobic vaginitis (AB)) are disruption of the vaginal flora balance which can cause various gynecological and obstetric complications. Therefore, it is particularly important to validate accurate and reliable diagnostic methods and standards. The most significant problem in diagnostics of vaginal dysbiosis is the lack of adequate 'gold standards' and the inability to recognize anaerobic vaginosis as a syndrome. When undertaking an overall estimate of vaginal flora, it is also diagnostically important assess if there is a presence of sexually transmitted infections (STIs) and *Candida spp.* This research examines the association of vaginal dysbiosis, STIs and *Candida spp.*

**Objectives** The main objective of this research paper is to compare various clinical, microscopic, and molecular methods in order to identify the most reliable method for the diagnosis of vaginal dysbiosis. In addition, the aim of this research is to examine links between vaginal dysbiosis, nine of the most common STIs and *Candida spp.*

**Methodology** In total, 235 patients of reproductive age were recruited for this study. BV diagnoses were made based on standard clinical and microscopic criteria including Amsel, Nugent, Ison/Hay, Clayer, Donders, and our novel *in-house* microscopic method as well as using multiplex quantitative RT-PCR test. STIs were detected with four different multiplex RT-PCR tests. *Candida spp.* were identified by cultivation on Sabouraud agar and by microscopic examination.

**Results** This study confirmed that RT-PCR remains the most reliable method for BV diagnoses. Comparison of clinical, microscopic, and molecular methods showed a good agreement between healthy flora and BV diagnoses, while the biggest disagreement was detected in the intermediate results. Compared with other methods, the use of RT-PCR resulted in the smallest number of patients with intermediate results (9 patients or 3.8%). The *in-house* microscopic method has the best agreement with RT-PCR as a 'gold standard' (*kappa coefficient* = 0.74) compared with other clinical and microscopic methods. Only Donders' and our *in-house* microscopic method detected AB in the microscopic evaluation of vaginal smears. The applied PCR test, primarily used for BV diagnostics, can not be adequately used for AB detection. The results of this research confirmed the association

between total number of detected STIs causes and BV. The presence of detected STI pathogens and relation with the state of vaginal flora indicate that mono infections are present most often in patients with normal flora, while coinfections are mostly present in BV patients. Two STIs pathogens *Ureaplasma spp.* and *M. hominis* were found to be significantly linked with BV. The results show that the presence of *Candida spp.* is ubiquitous regardless of the condition of vaginal flora. It was confirmed that there was no association between the presence of *Candida spp.* and STIs regardless of mono infection or coinfection status.

**Conclusion** For the most comprehensive analysis of vaginal flora, it is necessary to implement a multidisciplinary approach. This would entail collaboration between a gynecologist, microbiologist and molecular biologist that would achieve proper assessment of the condition of vaginal flora with improved diagnostics and therapeutic approaches. The most optimal algorithm for the assessment of the status of vaginal flora is a combination of clinical and microscopic criteria and molecular methods. Due to shortcomings in the clinical and microscopic approaches to BV diagnosis, such as intermediate vaginal flora classification, vaginal smears with limited number of cells, or frequent or recurrent BVs, it is necessary to implement RT-PCR in order to achieve appropriate and accurate diversification of vaginal smears for improved diagnostics.

**Key words:** Vaginal dysbiosis, bacterial vaginosis, anaerobic vaginitis, Amsel, Nugent, Ison/Hay, Clays, novel *in-house* microscopic method, Donders, RT-PCR, sexually transmitted infections, *Candida spp.*

**Scientific field:** Molecular medicine

**Specific scientific field:** Microbiology, Molecular biology, Gynaecology



## СКРАЋЕНИЦЕ

НИН – Национални институт за здравље (енгл. *National Institutes of Health*)

НМП – пројекат хуманог микробиома (енгл. *Human Microbiome Project*)

ВМБ – вагинална микробиота

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

RT PCR – ланчана реакција полимеразе у реалном времену (енгл. *real-time polymerase chain reaction*)

NGS – секвенционирање новом генерацијом (енгл. *Next generation sequencing*)

НIV – Вирус хумане имунодефицијенције

HPV – Хумани папилома вирус

HSV – Херпес симплекс вирус

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – водоник пероксид

CSTs – типови вагиналних заједница (енгл. *community state types*)

БВ – бактеријска вагиноза

АВ – аеробни вагинитис

BVAB – бактерије повезане са БВ (енгл. *Bacterial vaginosis associated bacteria*)

КОН – калијум хидроксид

AVAB – бактерије повезане са АВ (енгл. *Aerobic vaginitis associated bacteria*)

ДИВ – дескваматозни инфламаторни вагинитис

ПМН – полиморфонуклеарни леукоцити

НММ – Нова микроскопска метода

ЛБФ – лактобациларна флора

СБФ – ситне бактеријске форме

ВВК – вуловагинална кандидијаза

WHO – Светска здравствена организација (енгл. *World Health Organization*)

СПИ – сексуално преносиве инфекције

ВМА – Војномедицинска академија

ШФ – штапићасте форме

НШФ – нештапићасте форме

# САДРЖАЈ

## І УВОД

<b>1. Микробиом вагине</b> .....	1
<b>2. Вагиналне дисбиозе</b> .....	5
2.1. Бактеријска вагиноза .....	6
2.1.1. <i>Gardnerella vaginalis</i> .....	7
2.1.2. <i>Atopobium vagine</i> .....	8
2.2. Аеробни вагинитис .....	8
2.3. Вагиналне дисбиозе и трудноћа .....	9
2.4. Дијагностика вагиналних дисбиоза .....	10
<b>3. Вулвовагиналне кандидијазе</b> .....	12
<b>4. Сексуално преносиве инфекције и вагиналне дисбиозе</b> .....	13

## ІІ ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

<b>1. Радне хипотезе</b> .....	16
<b>2. Циљеви истраживања</b> .....	16

## ІІІ МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

<b>1. Протокол истраживања</b> .....	17
<b>2. Дијагностика вагиналних дисбиоза-микроскопски препарат</b> .....	18
2.1. Микроскопски преглед нативног препарата .....	18
2.1.1. <i>Амселови критеријуми</i> .....	19
2.1.2. <i>Дондерсови критеријуми</i> .....	21
2.2. Микроскопски преглед препарата по Граму .....	24
2.2.1. <i>Бојење препарата по Граму</i> .....	24
2.2.2. <i>Нугентови критеријуми</i> .....	24
2.2.3. <i>Ison/Нау критеријуми</i> .....	27
2.2.4. <i>Слаус критеријуми</i> .....	30
2.2.5. <i>Нова микроскопска метода</i> .....	32
2.2.6. <i>Детекција полиморфонуклеарних леукоцита на микроскопском препарату</i> .....	36
2.3. Детекција <i>Candida spp.</i> .....	38
2.3.1. <i>Култивисање микроорганизама</i> .....	38
2.3.2. <i>Candida spp. на микроскопском препарату</i> .....	38
<b>3. Молекуларна дијагностика</b> .....	41
3.1. Дијагностика бактеријске вагинозе .....	41
3.2. RT PCR тест за дијагностику бактеријске вагинозе .....	42
3.2.1. <i>Интерпретација резултата</i> .....	42
3.2.2. <i>Рачунски алгоритам</i> .....	42
3.3. Детекција сексуално преносивих инфекција .....	43
3.4. Тестови за детекцију СПИ .....	45
<b>4. Сређивање резултата за статистичку обраду</b> .....	46
<b>5. Статистичка обрада резултата</b> .....	47

## IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

<b>1. Дијагностика вагиналних дисбиоза клиничким и микроскопским критеријумима</b> .....	48
1.1. Поређење резултата добијених Нугентовом методом и модификованим Амселовим критеријумима .....	49
1.2. Поређење резултата добијених Нугентовим и <i>Ison/Hay</i> критеријумима .....	50
1.3. Поређење резултата добијених Нугентовим и <i>Clays</i> критеријумима .....	51
1.4. Поређење резултата добијених Нугентовим и новом микроскопском методом .....	53
1.5. Поређење резултата добијених Нугентовим и Дондерсовим критеријумима .....	56
1.6. Детекција полиморфонуклеарних леукоцита на микроскопском препарату .....	57
<b>2. Упоредна анализа метода за дијагностику вагиналних дисбиоза добијених микроскопским и клиничким критеријумима</b> .....	58
<b>3. Комбиновање клиничких и микроскопских налаза за дијагностику вагиналних дисбиоза</b> .....	60
<b>4. Детекција <i>Candida spp.</i> на микроскопском налазу и у култури</b> .....	63
<b>5. Дијагностика вагиналних дисбиоза применом <i>real-time</i> RT PCR</b> .....	64
5.1. Поређење резултата RT PCR теста са Амселовим критеријумима .....	66
5.2. Поређење резултата RT PCR теста са Нугентовим критеријумима .....	68
5.3. Поређење резултата RT PCR теста са <i>Ison/Hay</i> критеријумима .....	70
5.4. Поређење резултата RT PCR теста са <i>Clays</i> критеријумима .....	71
5.5. Поређење резултата RT PCR теста са Дондерсовим критеријумима .....	73
5.6. Поређење резултата RT PCR теста са новом микроскопском методом .....	75
5.7. Поређење укупног броја бактеријских морфотипова добијених НММ и бактерија детектованих RT PCR методом .....	77
<b>6. Поређење клиничких, микроскопских и молекуларних метода за дијагностику вагиналне дисбиозе</b> .....	80
<b>7. Дијагностика сексуално преносивих инфекција</b> .....	82
<b>8. Поређење резултата присуства вагиналних дисбиоза и сексуално преносивих инфекција</b> .....	83
<b>9. Поређење присуства сексуално преносивих инфекција и полиморфонуклеарних леукоцита</b> .....	85
<b>10. Поређење присуства вагиналних дисбиоза и рода <i>Candida spp.</i></b> .....	86
<b>11. Поређење присуства сексуално преносивих инфекција и <i>Candida spp.</i></b> .....	87

## V ДИСКУСИЈА

<b>1. Упоредна анализа метода за дијагностику вагиналних дисбиоза добијених микроскопским и клиничким критеријумима</b> .....	89
<b>2. Недостаци и проблеми у дијагностици вагиналних дисбиоза применом микроскопских и клиничких метода</b> .....	95
<b>3. Процена статуса вагиналне флоре упоредном применом клиничких и микроскопских метода за дијагностику вагиналних дисбиоза</b> .....	98
<b>4. Важност полиморфонуклеарних леукоцита у евалуацији микроскопског препарата</b> .....	100
<b>5. Присуство рода <i>Candida</i> у микробиому вагине</b> .....	101
<b>6. Примена мултиплекс квантитативни RT PCR у дијагностици вагиналне дисбиозе</b> .....	102

7. Упоредна анализа и предности RT PCR теста у односу на резултате клиничких и микроскопских критеријума .....	103
8. Сексуално преносиве инфекције – битан фактор у анализи вагиналног микробиома ..	109
9. Корелација вагиналних дисбиоза, СПИ и <i>Candida spp.</i> ....	109
10. Укупна процена стања вагиналног микробиома – мултидисциплинарни приступ .....	113
VI ЗАКЉУЧАК .....	116
VII ЛИТЕРАТУРА .....	118

## I УВОД

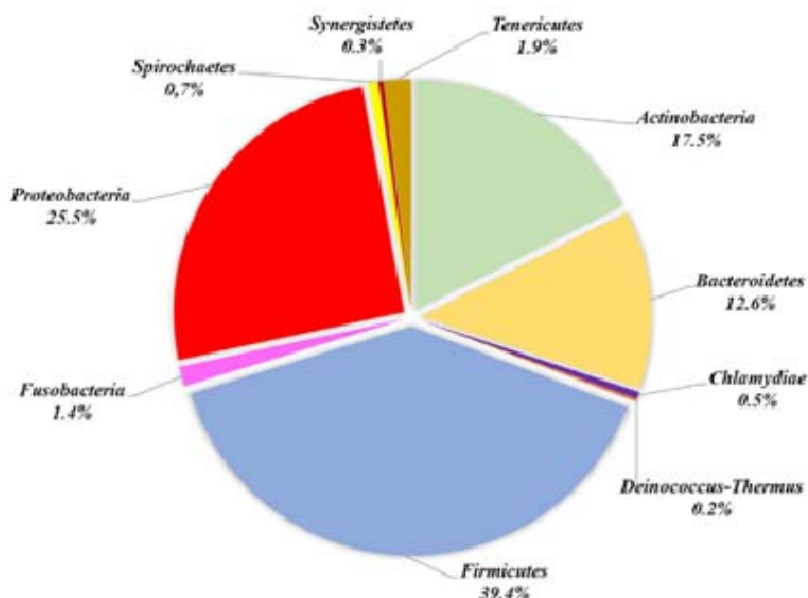
Хумани микробиом представља скуп свих микроорганизама (гена и генома) који насељавају људско тело. (1, 2) Ове микробне заједнице (микробиота) живе на спољашњим и унутрашњим површинама црева, респиратног тракта, вагини, уретри, усној шупљини и кожи (2, 3). Процењено је да је тежина микробиома који насељавају људско тело између 2,5–3 кг и да човек има 10 пута више микроорганизама него својих ћелија (4). Од рођења почиње симбиоза између микроорганизама и домаћина и кроз ове интеракције формирају се сложени екосистеми који имају важну улогу у одржавању здравља човека. Микробиота човека које насељава одређену нишу, релативно је стабилна. Међутим, различити спољашни и унутрашњи фактори као што су године, исхрана, животни стил, хормонске промене и хроничне болести утичу на хумани микробиом. Поремећаји у микробиому називају се дисбиозе и оне могу довести до различитих врста болести (5–7).

Знање о микробиому значајно се проширује након 2007. године када Национални институт за здравље (енгл. *National Institutes of Health* – НИИ) покреће велики пројекат испитивања хуманог микробиома (енгл. *Human Microbiome Project* – НМП) који за циљ има дефинисање микробиома и анализу његове улоге у болести и здрављу човека. (8) Резултати овог пројекта показују да је хумани микробиом човека много комплекснији него што се раније сматрало и да има важну метаболичку, имунолошку и заштитну улогу због чега се у литератури означава као „секундарни” геном. Утврђено је да је микробиота варијабилна међу здравим људима и јединствена за сваког појединца. Иако се интензивно проучава већ више од 15 година не може се са сигурношћу одговорити на питање шта је то здрав микробиом и колико од састава микробиома зависи предиспозиција ка болестима и имунолошки статус појединца (8, 9).

### 1. Микробиом вагине

Вагина је високо нутријентна средина која омогућава развој јединственог микробиома (10, 11). Вагинални микробиом садржи различите заједнице микроорганизама познате као вагинална микробиота (ВМБ) и у њему доминирају бактерије. Ове бактерије имају важан утицај на здравље жена, као и њихових новорођенчади (12, 13).

Жене у репродуктивном периоду производе око 1–4 ml вагиналне течности која садржи  $10^6$  и  $10^8$  бактеријских ћелија/мл (4). До сада је изоловано 581 бактеријских врста које су категорисане у 10 редова (Слика 1). Предоминантне су врсте реда *Firmicutes* (227 бактеријских врста 39.1%), *Proteobacteria* (150, 25.8%), *Actinobacteria* (101, 17.4%) и *Bacteroidetes* (74, 12.7%) (14).



Слика 1. Дистрибуција редова бактеријских врсти изолованих из хумане вагине. Према Diop K, Dufour JC, Levasseur A, Fenollar F. *Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. Human Microbiome Journal* 2019.

Током живота жене долази до промена у вагиналној физиологији, а самим тим и у микробиому жене. Сматра се да ВМБ мајке игра кључну улогу у иницијалној колонизацији код новорођенчета и да је од значаја за развој здравог микробиома коже и гастроинтестиналног тракта (15, 16).

Пре пубертета у вагиналном микробиому жене доминирају анаеробне врсте бактерија (17). У репродуктивном периоду због повећања нивоа естрогена, вагинална слузница повећава ниво синтезе гликогена и код већине жена предоминатно је присуство бактерија из рода *Lactobacillus* који конвертују вагинални гликоген у млечну киселину и одржавају киселост вагине од 3,5 до 4,5 рН (18, 19). Киселост вагине се углавном одржава до менопаузе када долази до опадања нивоа естрогена што узрокује пад нивоа гликогена, а самим тим и количину бактерија рода *Lactobacillus* (20).

Екосистем вагиналне флоре је врло динамичан и условљен је различитим спољашњим и унутрашњим факторима, као што су промене у полним хормонима, фаза менструалног циклуса, сексуална активност, антибиотска терапија, употреба оралне контрацепције, трудноћа, дијабетес мелитус, стрес, итд. (21, 22).

Састав ВМБ је јединствен за сваку жену и врло динамичан због чега не постоји тачна дефиниција здравог микробиома на микробиолошком, клиничком или молекуларном нивоу (23). Проучавање ВМБ почиње још крајем XIX века када је Додерлајн први пут описао организам из вагиналног секрета трудне жене. Овај организам, првобитно назван Додерлајнов бацилус, касније је добио назив *Lactobacillus* (24, 25). С обзиром на чињеницу да су се првобитна испитивања микробиома вагине заснивала на светлосној микроскопији и култури микроорганизама, тек се појавом молекуларних метода добио стварни увид у састав вагиналне флоре. Конвенционалне методе микроскопије омогућују детекцију 20% бактерија које су присутне у вагиналном микробиому, јер је велику већину ових бактерија тешко култивисати и идентификовати (23, 26).

Истраживања уз помоћ квалитативних и квантитативних молекуларних метода, попут секвенцирања ДНК новом генерацијом (енгл. *Next generation sequencing*, NGS) и ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *real-time polymerase chain reaction* – RT PCR) довела су до револуционарних открића о саставу вагиналне флоре. (12, 27) Ове методе омогућиле су детекцију до сада неоткривених и недетерминисаних врста микроорганизама у вагини и ширу слику о бактеријском диверзитету ВМБ. Сматра се да је у здравом ВМБ преодминатно присуство лактобацила, што је случај код око 70% жена. Истраживања показују да доминирају четири врсте рода *Lactobacillus*: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii* (28).

*Lactobacillus spp.* су Грам-позитивне анаеробне бактерије које продукују млечну киселину као резултат ферментације угљених хидрата (углавном гликогена), присутног у епителу жена репродуктивног доба. Млечна киселина поспешује заштиту против инфективних болести, спречавајући колонизацију потенцијалних патогена (22, 29).

Под утицајем естрогена, вагинални епителијум продукује мање од 15% L – млечне киселине, док лактобацили представљају највећи извор млечне киселине (L и D форма) и одржавају киселост вагине око рН,  $3.5 \pm 0.2$  (30). D изомер млечне киселине има већу протективну улогу у односу на L изомер. Његов ниво је највећи када је присутан *L. crispatus*, а најнижи када су присутни *L. iners*, *Gardnerella vaginalis* или *Streptococcus predominate* (31). Млечна киселина у концентрацијама (e.g., 110 mM) закисељује вагиналну секрецију и поспешује протективну активност водоник пероксида и бактериоцина, и инхибира инфекције као што су *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, херпес симплекс вирус (HSV), хумани папилома вируси (HPV), вирус хумане имунодефицијенције (HIV), итд. (32, 33).

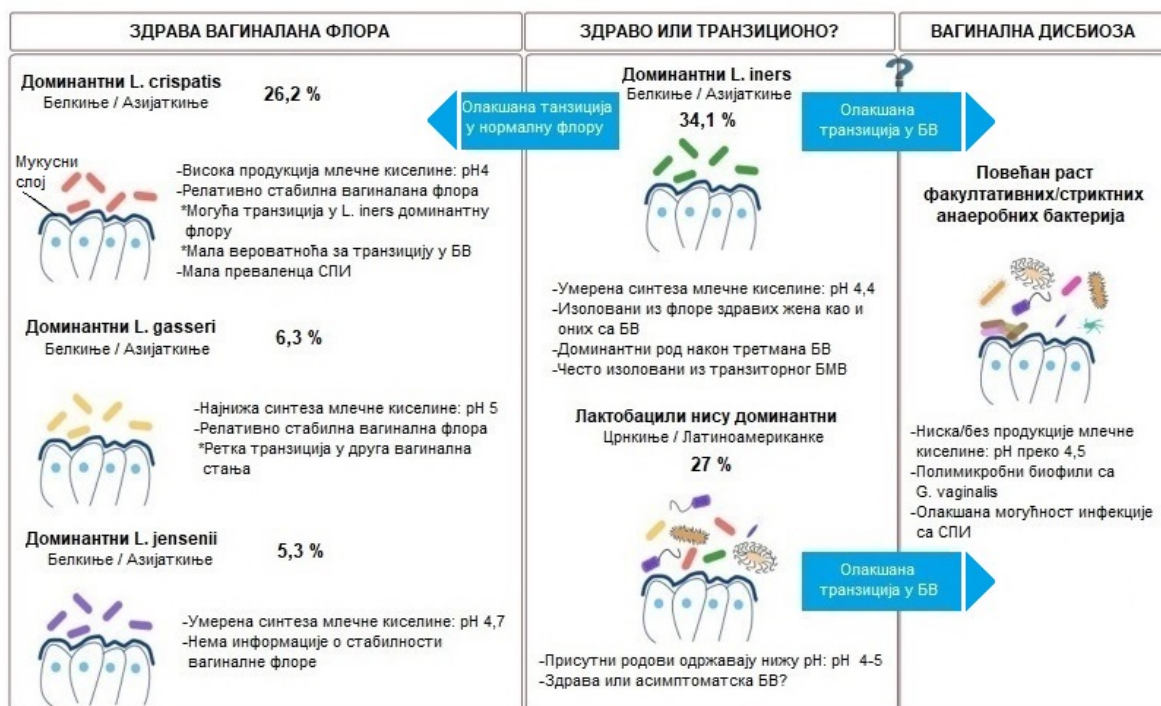
*Lactobacillus spp.* (осим *L. iners*) продукују водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) који инхибира раст каталаза негативних анаеробних микроорганизама, продукцијом слободног хидрокси радикала (21). Они се везују за површину вагиналног епитела и врше превенцију од везивања других микроорганизама и инфекције ћелија. *Lactobacillus spp.* такође синтетишу и друге антимицробне пептиде (бактериоцин, супстанца налик на бактериоцин и биосурфактанте) и поспешују аутофагију интрацелуларних бактерија, вируса и протоза. Кроз ове механизме инхибира се раст других потенцијално патогених ендогених вагиналних бактерија и спречава накупљање егзогених бактерија (22, 31).

Иако се студије секвенционирања вагиналних микробиота ослањају на различите аналитичке методе и дизајн студија (узорковање различитих региона вагине, жене из различитих етничких група, различити географски положај популације, узорковање у односу на фазу менструалног циклуса) резултати ових истраживања показују да постоји неколико типова вагиналних заједница (енгл. *community state types* – CSTs) (34–37). Једна од најчешће цитираних истраживања урађена је од стране Равела и сарадника. Они су утврдили да постоји најмање пет главних група вагиналних заједница (CSTs). У четири ове групе доминатни су једна или више врста рода *Lactobacillus spp.*: *L. crispatus* (CST-I), *L. iners* (CST-III), *L. gasseri* (CST-II), *L. jensenii* (CST-V) док је у CST-IV групи доминатна мешана полимикробна заједница стриктних и факултативних анаероба попут *Gardnerella spp.*, *Atopobium spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Prevotella spp.*, *Megasphaera spp.* (28).

Показано је да дистрибуција *Lactobacillus spp.* варира међу женама у различитим етничким срединама. Код белих жена и Азијанткиња су чешће присутне вагиналне заједнице у којима доминирају лактобацили. Код Латинамериканки и црнкиња рН вредност вагине је виша (4,7–5,0), ређе су присутни лактобацили и најчешће је доминатна врста *L. iners*. Ово откриће подржава хипотезу да различити спољашњи и унутрашњи фактори играју главну улогу у детерминисању састава вагиналног микробиома (28, 35, 36, 38).

*L. crispatus* и *L. iners* углавном доминирају ВМБ, док су *L. gasseri* и *L. jensenii* мање чести (Слика 2) (29). *L. iners* је присутан код готово свих жена, укључујући и оне са дисбиозом, док је *L. crispatus* типично изолован код здравих жена. Пошто истраживања показују да код око 30% жена нису доминатне лактобациларне врсте него стриктни и факултативни анаероби и даље се води дебата да ли је реч о здравом микробиому или о асимптоматској бактеријској вагинози (22).





Слика 2. Састав ВМБ здраве вагиналне флоре и у стању дисбиозе (БВ). Према 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 Mar 25;6:81.*

Степен заштите вагиналног екосистема зависи од преодминатне врсте лактобацилуса. *L. iners* преодминатна вагинална микробиота је обично удружена са дисбиозама, мање је стабилна и склонија транзицији. За разлику од ње, *L. crispatus* који продукује оба изомера млечне киселине удружен је са стабилном вагиналном флором и мање је вероватно да транзитира у дисбиозу (26).

## 2. Вагиналне дисбиозе

Вагинална дисбиоза представља поремећај у саставу вагиналне флоре. Постоји неколико типова поремећаја микробиома вагине: бактеријска вагиноза (БВ), аеробни вагинитис (АВ), вагинална кандидијаза и трихомонозијаза (6, 7). У овом истраживању под термином вагинална дисбиоза сматрани су само БВ и АВ, док је *Candida spp.* посебно описана, а *T. vaginalis* приказан у склопу сексуално-преносивих инфекција. Вагиналне дисбиозе су повезане са различитим гинеколошким и опстетричким компликацијама као што су превремени порођај, ниска телесна тежина новорођенчета, пелвична инфламаторна болест, повећан ризик инфекције HIV-ом и другим сексуално преносивим инфекцијама (6, 7).

## 2.1. Бактеријска вагиноза

Проучавање бактеријске вагинозе (БВ) почиње још крајем 19. века када Менге и Кронг поред Додерлајновог бацила изолују и анаеробни микроорганизам из вагине (39). Куртис 1923. године описује синдром код жена који се назива „бели исцедак”. Он повезује овај синдром са црно пигментованим анаеробом, анаеробним кокама и Грам варијабилним дифтероидним штапићима. Тада је примећено да долази до смањена броја Додерлајанових бацила код жена са овим синдромом (40). Гарднер и Дјук су први описали бактерију повезану са повећаним исцедком код жена и назвали је *Haemophilus vaginalis* (касније промењен назив у *Gardnerella vaginalis*) (41). Дуго се сматрало да је ова бактерија једини узрочник неспецифичног вагинитиса. Тек 80-тих година прошлог века доказује се да неспецифични вагинитис не изазива само једна врста микроорганизма, него да је у питању већи број анаеробних врста. На основу ових открића, назив синдрома повезаног са променама у саставу вагиналне микробиоте се мења у „бактеријски вагинитис”, а касније у „бактеријску вагинозу” због чињенице да инфламаторне ћелије нису повезане са овим синдромом (39).

Истраживања објављена од 2002. до 2008. године потврђују да је бактеријска вагиноза последица смањења лактобацила и замене другим (факултативним) анаеробним бактеријама. Тада су детектоване врсте бактерија које до тада нису биле идентификоване и у литератури се оне означавају као бактерије повезане са БВ (енгл. *Bacterial vaginosis associated bacteria* (BVAB)). Данас постоје три групе ових бактерија BVAB1, BVAB2 и BVAB3 и све припадају реду *Clostridiales* (42–44).

БВ је најчешћа дисбиоза у којој нормалну предоминатну микрофлору лактобацила замењују бројне анаеробне бактерије од којих су најзначајније *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Mobiluncus spp.*, *Sneathia spp.*, *Leptotrichia spp.* (45–47). Учесталост БВ у општој популацији креће се од 10% до 50%, у популацији трудница 12% до 50%, а код 24% до 40% пацијенткиња са другим сексуално преносивим инфекцијама. Симптоми ове дисбиозе су повећан сиво-беличасти секрет, свраб и локална иритација, мада код око 50% пацијенткиња симптоми изостају. БВ се одликује одсуством знакова запаљења и специфичним метаболичким обрасцем који подразумева повећање рН (>4.5) и присуством полиамина који узрокују непријатан мирис покварене рибе (48, 49). Услед великог повећања BVAB, као производ бактеријског метаболизма настају полиамини (путресцин, кадаверин, триметиламин) који постају испарљиви због повећања рН вредности вагине

и на тај начин доводе до појаве непријатног мириса. Ово својство користи се у клиничкој дијагностиви БВ када се испитује позитивна проба са калијум хидроксидом (КОН). Мирис полиамина се такође може детектовати *in vivo* приликом менструације или вагиналних односа са мушкарцем, јер су рН вредности крви и спреме близу 7 што доводи до појачане испарљивости (50, 51). Пораст амина доводи и до повећане трансудације и ћелијске ексфолатације узрокујући хомогену, млечно-беличасту секрецију карактеристичну за пацијенте са симптомима БВ (52).

Иако се и даље не зна тачан узрок, истраживања БВ показују да велики број фактора утиче на њену појаву: хормонска промена, број сексуалних партнера, пушење, лична хигијена, употреба антибиотика и других третмана (53).

Упркос чињеници да се велики број истраживања бави БВ и даље овај поремећај представља велику енигму, чему значајно доприноси непрецизност дијагностике. Употреба клиничких критеријума, преглед препарата бојених по Граму, култура и молекуларне дијагностичке методе до сада нису успеле да пруже прецизну дефиницију БВ. Иако се сматра полимикробним синдромом, одређене бактерије ипак представљају важне маркере за дијагностику ове дисбиозе. Међу њима су најзначајније *A. vaginae* и *G. vaginalis* које су присутне у око 78–96% пацијенткиња са БВ у односу на 5–10% оних са здравом вагиналном флором (12, 49).

### 2.1.1. *Gardnerella vaginalis*

*G. vaginalis* припада фамилији *Bifidobacteriaceae*. То су плеоморфне, штапићасте бактерије просечне димензије 0.4 до 1–1.5  $\mu\text{m}$  које се најчешће описују као Грам варијабилне. Хемијски састав ћелијског зида је типичан за Грам позитивне бактерије, али пептидогликозни слој је тањи него код већине Грам позитивних бактерија што некада резултује негативним бојењем по Граму (54, 55).

Показано је да постоји неколико фактора који омогућују овој бактерији да колонизује и инфицира епителијум домаћина. Површина *G. vaginalis* је прекривена фимбријама које омогућују везивање за вагиналне епителне ћелије. Ова особина бактеријског адхерирања се може видети на микроскопским препаратима у виду тзв. *clue* ћелије (енгл. *clue cells*). То су вагиналне сквамозне епителне ћелије прекривене (окупане) *G. vaginalis* и другим анаеробним бактеријама које узрокују БВ. *Clue* ћелије први су описали Гарднер и Дјук, а назвали су их тако зато што представљају важан траг (енгл. *clue*) за дијагностку БВ (49).

Могућност адхерирања ове бактерије за епителне ћелије ствара основу за настанак биофилма и олакшава везивање других бактерија попут *Atopobium vaginae*. Интеракције између врста у оквиру биофилма су синергистичке. Оне укључују коагрегацију, метаболичку кооперацију и повећање резистентности на антибиотике или имунски одговор домаћина и имају важну улогу у терапеутским импликацијама. Формирање биофилма је кључно за развој БВ, јер показује високу резистентност на антибиотике и толерантност на имунски одговор домаћина што може довести до појаве хроничних форми или релапса (56, 57).

*G. vaginalis* продукује цитолизине од којих је најбоље проучен вагиолизин. То је егзотоксин који формира поре и лизира епителне ћелије, неутрофиле и еритроците. Ова бактерија синтетише сиалидазу и пролидазу, које имају важну улогу у разградњи муцина и на тај начин доприносе ексфолијацији епителних ћелија (58).

Парадоксално је да су ове бактерије присутне код здравих жена, али и оних са БВ. Објашњење за ову енигму дају нова истраживања која показују да постоји чак 13 врста у оквиру рода *Gardnerella* са различитим вирулентним карактеристикама. Код здравих жена присутна је нижа концентрација ове бактерије, док високе концентрације представљају важан маркер за дијагностику БВ. Ова чињеница искоришћена је у молекуларној дијагностици БВ односно у примени *real-time* RT PCR квантитативним тестовима која омогућавају одређивање концентрације ове бактерије (59, 60).

### 2.1.2. *Atopobium vaginæ*

*A. vaginae* је мала (0.6–0,9 µm) издужена Грам позитивна кока која се појављује самостално, у пару или у кратким ланцима. Варијабилна ћелијска морфологија објашњава због чега ова бактерија може бити замењена другим микроорганизмима приликом прегледа препарата по Граму. *A. vaginae* је први пут изолована 1999. године у испитивању здравих жена у Шведској, а тек 2003. године је повезана са БВ. Продукује велике количине млечне, сирћетне и мравље киселине и стриктни је анаероб (61–63). Будући да је резистентна на метронидазол, који је чест избор у лечењу БВ, њена идентификација је од великог значаја. У литератури се могу пронаћи подаци да се *A. vaginae* PCR методом детектује код 96% жена са БВ и само 12 до 19% без БВ. Високе концентрације *A. vaginae* су добар предиктивни маркер у дијагностици БВ (44).

## 2.2. Аеробни вагинитис

Аеробни вагинитис (АВ) се карактерише смањењем броја лактобацила али, за разлику од БВ, овде долази до пораста аеробних бактерија (енгл. *Aerobic vaginitis*

*associated bacteria* – AVAB) од којих су најзначајније *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, група Б *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae*), коагулаза негативне стафилококе попут *S. epidermidis* и *Enterococcus faecalis* (64). Овај поремећај вагиналне флоре препознат је 2002. године од стране Дондерса и сарадника (65, 66). АВ се одликује вагиналном инфламацијом, рН вагине већим од 4.5, присуством парабазалних ћелија, повећаним бројем леукоцита (цитотоксични леукоцити). Преваленца АВ је 8–11% код трудница и око 5–24% у општој популацији жена (67, 68). Симптоми могу бити пецкање, присуство пурулентног жућкастог секрета (непријатног мириса трулежи и буђи) и диспареунија. Вагина жена са АВ често може бити упаљена и едематозна, а код тежих облика могуће је присуство и мањих ерозија и улцерација (64, 65). Тешки облик АВ, попут десквamatозног инфламаторног вагинитиса (ДИВ) је хронично стање које карактерише вагинални гнојни секрет. Многе пацијенткиње имају дуготрајне симптоме вестибуларне иритације, диспареуније и упале вагине чак и до годину дана (69).

Иако се проучава већ две деценије подаци о патогенези АВ су врло ограничени и овај синдром се често не препознаје и неадекватно лечи (64). Будући да се ова АВ у великом броју случајева замењује са БВ, у табели 1 приказане су клиничке и микробиолошке карактеристике ове две дисбиозе.

Табела 1. Поређење клиничких и микробиолошких карактеристика бактеријске вагиозе (БВ) и аеробног вагинитиса (АВ)

Карактеристике	Бактеријска вагиноза	Аеробни вагинитис
<b>Клиничке</b>		
рН	≥4.5	>4.5 , често преко 6
Вагинални секрет	сиво беличаст, хомоген	жућкаст
Вагинална инфламација	није присутна	присутна
Епителне ћелије	<i>clue</i> ћелије	парабазалне ћелије
Проба са КОН	позитивна	негативна
<i>Lactobacillus</i> spp.	смањени	смањени
<b>Микробиолшке</b>		
Најчешћи узрочници	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Atopobium vaginae</i> <i>Prevotellaspp</i> <i>Mobiluncusspp</i>	<i>Escherichiacoli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> група Б <i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>

### 2.3. Вагиналне дисбиозе и трудноћа

Микробиом вагине гравидне жене је стабилнији и мање варијабилан у односу на жене које нису трудне. Током трудноће долази до повећања нивоа естрогена, а самим тим се одржава киселост вагине, јер врсте рода *Lactobacillus* метаболишу гликоген у млечну киселину. Најчешће бактерије које су изоловане у истраживањима припадају родовима *Lactobacillus*, *Clostridiales*, *Bacteriodales*, и *Actinomycetales*. Иако долази до

физиолошких и хормонских промена током трудноће, када се нивои естрадиола, прогестерона и пролактина повећавају, њихов утицај на вагинални екосистем мајке је и даље недовољно истражен. Поремећај вагиналне флоре током трудноће повезан је са различитим компликацијама попут спонтаног побачаја, хориоамнионитиса, прераног пуцања мембране (енгл. *premature rupture of membranes*) и повећаним ризиком за превремени порођај (70, 71).

Истраживања показују да се, уколико је *Lactobacillus* флора доминантна у првом триместру трудноће, вероватноћа за превремени порођај смањује за 75% (7). Са друге стране, сматра се да је БВ узрок око 40–50% превремених порођаја. Током порођаја, вагиналне дисбиозе могу утицати и на поремећај приликом колонизације микробиома црева и коже новорођенчета (70).

*Waters* и сарадници су у својој лонгитудиналној студији показали да већина жена које су биле БВ позитивне током ране трудноће до трећег триместра имају нормалну вагиналну флору (72). *Duff* и сарадници у свом истраживању закључују да БВ пролази спонтано код 11% жена између 15 и 36 недеље, без примене терапије (73). Свакако, потребно је обавити већи број истраживања како би се дефинисала тачна веза између динамичне ВМБ и напретка трудноће (74).

#### 2.4. Дијагностика вагиналних дисбиоза

Будући да се не зна тачан узрок настанка вагиналних дисбиоза и да ли је за њену појаву одговоран један узрочник или међусобно деловање сложене бактеријске флоре, њихова детекција, представља велики дијагностички и клинички изазов (75).

У дијагностици БВ користе се клинички критеријуми, микроскопске методе и молекуларне методе (75, 76). Дијагностички критеријуми успостављени 1983. године (Амсел) (77) и 1991. године (Нугент) (78) и данас су клинички и научно-истраживачки „златни стандард“ у дијагнози БВ. Амселова метода подразумева позитивна три од четири знака: присуство хомогене сивобеличасте секреције, вагинални рН преко 4.5, позитивну пробу са 10% КОН и присуство *clue* ћелија. На основу тога пацијенткиње се деле на две групе: нормална флора и БВ (77). Поједини аутори указују на њихове недостатке, јер се пацијенткиња са једним или два позитивна знака (нпр. позитиван КОН тест и/или рН = 5,5, без *clue* ћелија) проглашава негативном и сврстава у групу здравих (79, 80).

Нугентови критеријуми користе метод бодовања и заснивају се на микроскопирању препарата бојених по Граму и одређивању односа присутних: грам-позитивних штапића (*Lactobacillus*), грам-негативних и грам-варијабилних штапића и

кока (*G. vaginalis*, *Bacteroides spp.*) и закривљених грам-негативних штапића (*Mobiluncus spp.*). Бодовање се темељи на скали од 0 до 10, где су пацијенткиње разврстане у 3 групе: 1. нормалан налаз (0–3 бодова); 2. интермедијарни налаз (4–6 бодова); 3. БВ (7–10 бодова) (78). Иако добар златни стандард не би требало да има интермедијарну групу, Нугентови критеријуми су и даље у највећем броју истраживачких студија једини критеријуми за дијагностику БВ. Све већи број аутора указује да оваквим приступом значајан број жена са потенцијално различитом вагиналном флором (АВ, коинфекције, мешане инфекције) остаје непознат (81–83).

Први који су указали на постојање и „других стања” вагиналне флоре били су *Ison/Hay*. Поред три Нугентове групе у своју поделу уводе још две: група са преминацијом кока (енгл. *Grade IV*) и група у којој се виде само епителне ћелије, без присуства бактеријских форми (енгл. *Grade 0*) (84).

*Verhelst* и сарадници су на основу поређења PCR методе, културе и Грам препарата увели нову класификацију по *Clays*-у по којој вагиналне размазе деле у 6 категорија. У овој категоризацији није препозната нова група коју су увели *Ison/Hay* (*Grade 0*), али су уведене две нове групе: *I-like* (слична нормалној) коју карактеришу Грам позитивне бактерије дифтероидног морфотипа (личе на лактобациле) и идиопатска лекореја коју карактерише присуство великог број полиморфонуклеарних леукоцита, уз присуство лактобацила (85).

Све три поменуте микроскопске методе (Нугент, *Ison/Hay*, *Clays*) за детекцију БВ користе препарате по Граму, евалуацију врше на основу увећања  $\times 1000$  и заснивају се на прегледу 5–20 несуседних видних поља. Уколико посматрамо укупну површину микроскопске плочице то значи да је проценат самог препарата који се прегледа врло мали. Поједини аутори указују на овај проблем и предлажу модификацију Нугентове методе у зависности од величине видног поља самог микроскопа (86, 87). Др Ненадић са сарадницима уводи нову микроскопску методу (НММ) прегледа препарата по Граму под имерзионим уљем и на увећању  $\times 200$ . НММ представља семиквантитативну методу процене броја (целуларности) и односа штапићастих (дужина  $> 1,5 \mu\text{m}$ ) и ситних бактеријских форми ( $< 1,5 \mu\text{m}$ ) на основу којих се испитанице деле на две групе (нормалне и БВ), односно на подгрупе *full* (пун), *mid* (умерен), *null* (празан). (87, 88).

Иако смо већ навели да постоје велике разлике између БВ и АВ, ове две дисбиозе се често мешају и неправилно дијагностикују што може представљати проблем у правилној процени статуса вагиналне флоре и примени адекватне терапије.

Дондерс је са сарадницима увео дијагностику АВ на нативним препаратима који се посматрају под фазно-контрасним микроскопом на увећању x 400 (65). За правилну дијагностику микроскопских препарата Дондерсовом методом важно је одредити ниво лактобациларне форме (ЛБФ). На основу ЛБФ (Ia, IIa, IIb i III) процењује се да ли је реч о нормалној или поремећеној вагиналној флори (БВ и АВ). Да би се поставила дијагноза АВ поред ЛКФ детектује се и бодује број полиморфонуклеарни леукоцити (ПМН), у поређењу са епителним ћелијама, број токсичних леукоцита, присуство кока/ланца кока као и присуство парабазалних ћелија (64, 65).

Применом молекуларних метода у последњих десетак година откривено је да су квалитативни и квантитативни диверзитет микробиома вагине неупоредиво комплекснији него што се претпостављало на основу микроскопских анализа и налаза културе (23, 48). Ове методе, попут RT PCR имају значајну предност у односу на већ постојеће методе за дијагностику бактеријских дисбиоза. Оне су високо специфичне и омогућавају брзу и поуздану симултану детекцију генома различитих микроорганизама (мултиплекс *real-time* RT PCR) из само једног узорка (89). Будући да се велики број бактерија детектује и код здравих жена, али и пацијенткиња са вагиналним инфекцијама, тек је појава мултиплекс квантитативног RT PCR омогућила да се утврде квантитативни односи између појединих бактерија што је од суштинског значаја за разликовање еубиозе од дисбиозе (48, 90). Истраживања показују да су *G. vaginalis* и *A. vaginae* присутне и у нормалној вагиналној флори, али висока концентрација ових бактерија представља важан фактор у патогенези БВ (59, 91). Уз помоћ мултиплекс квантитативног RT PCR теста одређује се логаритамски однос између *Lactobacillus spp.* и укупне концентрације бактерија, као и између *Lactobacillus spp.* и анаеробних микроорганизама (*G. vaginalis* и *A. vaginae*) и тиме се разврставају испитанице у различите категорије: еубиоза (предоминација лактобациола), БВ (предоминација *G. vaginalis* и *A. vaginae*), интермедијарна флора (подједнаке концентрације лактобацила и *G. vaginalis* и *A. vaginae*), измењена флора неспецифичне етиологије са смањеним бројем лактобацила, као и пацијенткиње са ниском или опадајућом концентрацијом укупне бактеријске ДНК које не могу да буду прецизно идентификоване.

### **3. Вулвовагиналне кандидијазе**

Вулвовагинална кандидијаза (ВВК) је честа гљивична инфекција узрокована родом *Candida*. У око 90% случајева најчешћи узрочник је *C. albicans*. Последњих година уочен је пораст других гљивица рода *Candida*, попут *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C.*



*parapsilosis*. Сматра се да је разлог овоме широка употреба антимицотичних лекова и неадекватно лечење. Све наведене врсте имају сличне вулвовагиналне симптоме и из тог разлога их је тешко клинички разликовати (92, 93).

*C. albicans* је коменсал и присутна је у нормалној физиолошкој флори жена. Ова гљива се јавља у два облика (диморфна гљива) односно у облику кваснице (псеудохифе) или у виду плесни (хифе са паралелним зидовима које заједно представљају мицелијску форму). Облик квасница се углавном јавља код здравих жена, док су хифе присутне код ВВК. И даље се не зна тачан узрок преласка из једног у други облик (92, 93).

До ВВК долази када врсте рода *Candida* површински продру у слузницу вагине и могу да изазову инфламаторни одговор. Доминатне инфламаторне ћелије су полиморфонуклеари макрофаги. Симптом ове инфекције су бели, густ и адхезиван секрет, диспареунија, црвенило, пецкање и свраб вулве/вагине. Појава ВВК је повезана са различитим факторима попут употребе антибиотика, повећања нивоа естрогена, неконтролисаног дијабетес мелитуса, сексуалне активности, итд. Истраживања показују да око 70% жена има бар једну епизоду ВВК током репродуктивног периода, а око 8% жена има рекурентну инфекцију (93, 94).

Детекција ВВК може се извршити клиничким прегледом, прегледом микроскопског препарата (нативног и бојеног по Граму) или култивацијом. Приликом прегледа нативног препарата употребом 10% КОН добија се боља визуализација хифа и спора. Подлога која се најчешће користи је Сабуро декстрозни агар, где се након 72 сата може видети пораст колонија. Само по себи, без присуства симптома, то није индикација за третман с обзиром на чињеницу да ове гљиве могу бити у саставу здраве вагиналне флоре (95).

#### **4. Сексуално преносиве инфекције и вагиналне дисбиозе**

Према подацима Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization* – WHO) на годишњем нивоу су свету се 376 милиона људи инфицира неком сексуално преносивом инфекцијом (СПИ), што показује актуелност овог јавно-здравственог проблема (96). СПИ могу бити изазване са преко 30 бактеријских, вирусних и паразитских патогена који се могу пренети вагиналним, аналним или оралним путем. Неки од најчешћих узрочника СПИ су *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma ureliticum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, хумани папилома вируси (енгл. *Human papilloma viruses* – HPV), итд. (96, 97). Постоји велики број клиничких манифестација које изазивају СПИ у горњем и доњем репродуктивном тракту жена, али су неке од

најчешћих: пелвична инфламаторна болест, цервицитис, ектопична трудноћа, спонтани побачај, хронична пелвична болест, неонаталне инфекције, генитални канцер итд. (97). Велики проблем представљају асимптоматске СПИ, јер се такве инфекције тешко препознају, а могу лако да се шире у популацији сексуално активних особа (96).

Вагинални екосистем састоји се од различитих микроорганизама који коегзистирају у динамичној равнотежи и успостављају сложене везе међусобно, као и са самим домаћином. Већ је речено да су код здравих репродуктивних жена у микробиому вагине преобладајуће бактерије рода *Lactobacillus*. Ове бактерије одржавају вагиналну хомеостазу и превентирају колонизацију и раст нежељених микроорганизама, укључујући и СПИ (7, 98).

Епидемиолошка истраживања показују да БВ олакшава инфекцију узрочницима СПИ (99, 100). Смањење протективних лактобациларних врста и остале промене у вагини, као што су раст рН и смањење концентрације млечне киселине омогућава преживљавање вагиналних патогена. Микроорганизми повезани са БВ продукују муцин деградујуће ензиме (попут салидазе) које деградују мукозну облогу епитела вагине и грлића материце као једне од главних компоненти баријере против инфекције. Ова разградња слузи и гликогена може проузроковати микроабразију или промене епителних ћелија и тиме олакшати везивање патогена за рецепторе на епителним ћелијама (7, 101). Такође, приликом БВ мења се имунолошка равнотежа због појаве повећаног нивоа проинфламаторних цитокина, што жене чини подложнијим за инфекције са узрочницима СПИ (102, 103).

Постоји велики број лабораторијских метода за детекцију СПИ: микроскопирање, култивација, серолошки тестови, методе за детекцију антигена и молекуларне технике (104). У нашем истраживању биће коришћени мултиплекс RT PCR, у коме се симултано из једног узорка може детектовати већи број СПИ.

Јасно је из приложеног да је вагинални микробиом врло комплексан и динамичан и постоје различити фактори који могу да доведу до промене у његовој равнотежи. Будући да су вагиналне дисбиозе врло чести поремећаји који могу довести до различитих последица од изузетног је значаја њихова тачна дијагностика. Оно што представља највећи проблем јесте чињеница да и даље не постоји поуздан златни стандард у дијагностици БВ и да АВ синдром често остаје непрепознат од стране микробиолога и гинеколога. Амселови и Нугентови критеријуми су најчешће коришћене методе у дијагностици БВ и највећи број открића и закључака везан за овај синдром донети су на основу њих. Велики број аутора указује на недостатке ових

метода (*Ison/Hay, Clays*, Ненадић). Употребом мултиплекс RT PCR теста у нашем истраживању указаћемо на његов значај у дијагностици вагиналне дисбиозе и установићемо предности, али и констатовати мане. Због тога ћемо међусобно упоредити PCR тест са клиничким и микроскопским методама за дијагностику БВ. Иако је овај тест примарно намењен за дијагностику БВ, уз додатне клиничке и микроскопске параметре, могао би успешно да се користи и у дијагнози АВ. Дондерс и сарадници дефинисали су дијагностичке критеријуме за АВ у којима број и изглед ПМН представља део дијагностичког збира и најпрецизнији појединачни параметар у разликовању вагиноза од вагинитиса (65). Иако се ПМН врло лако детектују на микроскопском препарату велики број метода их не препознаје као важан критеријум. Ипак, имајући у виду и чињеницу да повећан број ПМН карактерише и друге честе вагиналне инфекције, у нашем истраживању помоћу мултиплекс *real-time* RT PCR утврдићемо присуство и *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisserria gonorrhoeae*, високоризичног HPV и HSV-1/HSV-2, а за идентификацију присуства *Candida spp.* биће коришћен Сабуро агар. Поред тога, установићемо степен целуларности, односно процену броја одређених морфотипова евалуацијом микроскопског препарата и његову подударност са резултатима молекуларно биолошке детекције и квантификације.

## II ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Имајући у виду досадашња сазнања и проблеме везане за дијагностику вагиналних дисбиоза формулисали смо радне хипотезе и циљеве истраживања.

### 1. Радне хипотезе

1. Применом високо специфичног мултиплекс квантитативног RT PCR теста могуће је поставити поузданију дијагнозу бактеријске вагинозе у поређењу са клиничким и микроскопским дијагностичким методама.

2. Применом мултиплекс квантитавног RT PCR примарно конципираног за дијагностику бактеријске вагинозе, у комбинацији са клиничким и микроскопским параметрима, успешно се може дијагностиковати и аеробни вагинитис.

### 2. Циљеви истраживања

1. Анализирати узорке вагиналних брисева испитаница применом различитих клиничких и микроскопских критеријума и категорисати их на основу датих критеријума за сваку методу.

2. Идентификовати и квантификовати бактерије *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus spp.* као и укупну концентрацију бактерија употребом квантитативног мултиплекс RT PCR у узорцима вагиналног бриса и на основу њиховог релативног односа категорисати испитанице.

3. Упоредити резултате добијене на основу постојећих дијагностичких критеријума у дијагнози БВ и АВ са резултатима добијеним RT PCR методом.

4. Утврдити постојање корелације између укупног броја бактеријских морфотипова добијених на основу микроскопске процене степена целуларности и укупног броја бактерија детектованих RT PCR.

5. У цервикалним брисевима вагине испитаница применом мултиплекс RT PCR тестовима идентификовати узрочнике сексуално преносивих инфекција (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, високоризични HPV и херпес симплекс вирус (HSV-1/HSV-2), а применом методе култивације утврдити присуство *Candida spp.* у брисевима бочног зида вагине.

6. Утврдити постојање корелације између присуства испитиваних узрочника сексуално преносивих инфекција, *Candida spp.* и вагиналних дисбиоза.

### III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 1. Протокол истраживања

У студију је укључено 235 пацијенткиња, старијих од 18 година у репродуктивном добу које долазе на редовне контроле у Центар за гинекологију и хуману репродукцију Војномедицинске академије (ВМА). Пацијенткиње су биле са или без симптома вагиналних инфекција, укључујући и труднице. Критеријуми за искључивање из студије је употреба антибиотика две недеље пре узимања узорка. Испитивање је спроведено у периоду од новембра 2018. до децембра 2019. године. Преглед пацијенткиња и узорковање извршено је у Центру за гинекологију и хуману репродукцију, док је тестирање узорака урађено на Одељењу за микробску генетику и имунологију, Института за микробиологију ВМА. Све испитанице су потписале информисани пристанак за учешће у истраживању. Истраживање је одобрено од стране Етичког одбора ВМА.

Клиничким прегледом констатована је количина, изглед и боја вагиналног секрета. Свим испитаницама узето је 6 брисева (5 вагиналних и 1 цервикални) ради даљих микробиолошких и клиничких испитивања. рН вредност вагине одређена је папирним лакмус трачицама (*Merck*, рН од 4,0 до 7,0). Вредност рН изнад 4.5 сматрала се патолошком. Уз помоћ пробе са 10% КОН испитано је присуство мириса покварене рибе. Овај тест је извођен тако што се на памучни брис узоркован са бочног бриса зида вагине сипа кап 10% КОН. Тест је позитиван уколико је присутан мирис покварене рибе. Поред тога забележено је и присуство других непријатних мириса (буђ, гној, бајат мирис), уколико је тест био негативан.

Са бочног зида вагине свим испитаницама су узоркована 4 вагинална бриса. Један брис је ношен на Институт за микробиологију и засејан на Сабуро агар ради праћења раста гљивица. Три памучна бриса су наносена на микроскопску плочицу димензија 76,2 x 25,4 благим котрљањем штапића по дужини. На једну плочицу стављена је кап физиолошког раствора и преко ње покровно стакло, након чега је препарат прегледан под фазно контрастним микроскопом (*leitz dialux*). Друге две микроскопске плочице су након размазивања сушене на ваздуху и након тога бојене по Граму. Следећег дана су прављени трајни препарати додавањем неколико капљица канада балзама на микроскопску плочицу, преко чега је стављано покровно стакло. Након сушења препарати су архивирани до микроскопирања. Микроскопски преглед препарата вршен је од стране два испитивача, неколико пута, да би се донела тачна

процена стања вагиналне флоре. Сlike препарата свих испитаница су фотографисане и архивиране. Поједине оригиналне слике препарата, различитих увељачања, биће приказане у наставку материјала и метода. Дијагностика вагиналних дисбиоза вршена је на основу клиничких и микроскопских критеријума (Амсел-ови, Нугент-ови, *Ison/Hay*-ови, *Clayes*-ови, Дондерсови и Нова микроскопска метода уведена од стране др Ненадића и сарадника).

Један вагинални и један цервикални брис (FLOQ Swabs, COPAN) коришћени су за молекуларну анализу (RT PCR). Након узорковања брисеви су стављени у транспортни медијум, вортексовани и замрзнути на  $-20$  до екстракције ДНК. Из узорка вагиналног бриса испитано је присуство и квантификација као и одређивање међуодноса *Lactobacillus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* и укупне концентрације уз помоћ PCR теста (*AmpliSensFlorocenosis/Bacterial vaginosis* – FRT). Цервикални брис коришћен је за детекцију присуства сексуално преносивих инфекција која су испитана са четири различита комерцијална RT PCR теста (PCR *Chlamydia trachomatis/Ureaplasma/M. genitalium/M. hominis*, PCR *T. vaginalis/N. gonorrhoeae* PCR HSV-1/HSV-2, PCR HPV High Risk Screen Quant. Сва четири кита за детекцију СПИ су произвођача *Sacace Biotehnologies*.

## 2. Дијагностика вагиналних дисбиоза – микроскопски препарат

### 2.1. Микроскопски преглед нативног препарата

Препарат је припреман тако што смо на микроскопску плочицу стављали једну до две капи физиолошког раствора, након чега је постављано покровно стакалце и препарат посматран под фазнокотрасним микроскопом (*leitz dialux*) на увељачу  $\times 400$ . На сваком препарату прегледано је око 30 видних поља и препарат се сматрао релевантним уколико је било присутно најмање 8 епителних ћелија. На нативном препарату детектовано је присуство лактобациларних и ситних бактеријских форми и процењиван њихов међусобни однос. Поред тога детектовано је присуство *clue* ћелија, *T. vaginalis*, *Candida spp.*, цитолиза епителних ћелија, парабазалне ћелије и присуство полиморфонуклеара (ПМН). Након прегледа препарата са физиолошким раствором, додавана је кап 10% КОН на слободну површину плочице ради лакше визуелизације хифа и/или спора гљивица. Будући да након додавања физиолошког раствора и 10% КОН долази до спирања размаза са микроскопске плочице, препарате је било могуће прегледати само једном.

Лактобациларне форме (ЛБФ) се виде као равни или благо закривљени штапићи, који понекад могу бити спојени, равних крајева, различите дужине и ширине. Ситне бактеријске форме (СБФ) је термин коришћен за описивање присуства различитих морфолошких форми ситних бактерија, попут кокобацила или врло малих бацила и покретних закривљених бацила, који се често налазе заједно. Они су знатно мањи од лактобацила и често су удружени и формирају накупине. *Clue* ћелије су вагиналне епителне ћелије које су прекривене великим бројем бактерија који адхерирају на њихову површину због чега се ивице ћелије јасно не разазнају. *T. vaginalis* поседује покретне бичеве који омогућавају карактеристично кретање (трзајне покрете). Парабазалне ћелије су мале округле епителне ћелије са заобљеним ћелијским границама, густом цитоплазмом и сразмерно великим језгром. *C. albicans* се на препарату детектује у виду спора или хифа (танких влакана) често уплетених у епителне ћелије.

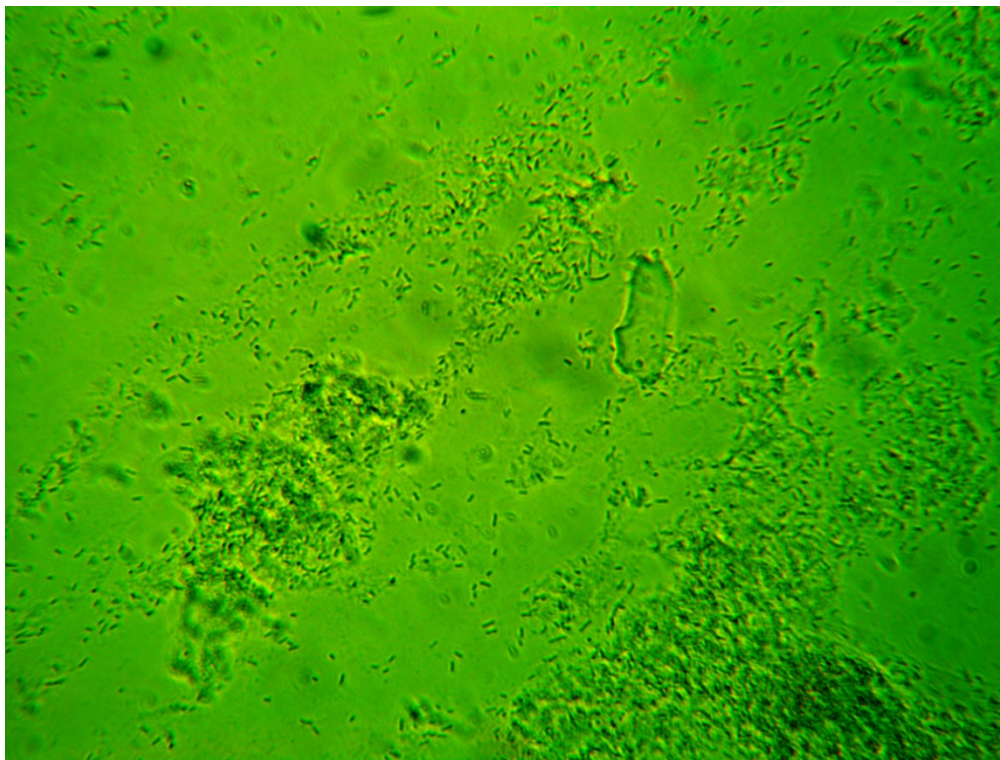
#### 2.1.1. Амселови критеријуми

На основу Амселових клиничких критеријума (77) испитанице се деле у две групе: нормалан налаз (Слика 3) и бактеријска вагиноза (Слика 4). Дијагноза се поставља на основу позитивних 3 од 4 знака:

1. присуство хомогеног беличастог-сивкастог секрета,
2. позитивна проба са 10% КОН,
3. рН вагине преко 4,5,
4. присуство *clue* ћелија.

Поред оригиналних Амселових критеријума у овом истраживању коришћени су модификовани Амселови критеријуми који не подразумевају позитивна 3 од 4 знака, већ се за дијагностику БВ уз преглед нативног препарата користе 2 параметра – позитивна проба са 10% КОН и рН вредност вагине изнад 4,5. Велики број аутора за дијагнозу БВ подразумева присуство *clue* ћелија, док неки сматрају да њихов број треба да буде већи од 20% посматраних ћелија (најмање једна од 5 ћелија, на најмање четири видна поља). У великом броју случајева (20%–30%) пацијенткиње имају БВ, али нису присутне *clue* ћелије. У случајевима када су лактобациларне форме (ЛБФ) бројније или чак подједнаке са ситним бактеријским формама (СБФ) или када је препарат хипоцелуларан (мали број или потпуно одсуство ЛБФ, као и мали број СБФ), а пацијенткиња има друга два позитивна теста (вагинални рН и пробу са 10% КОН) постављали смо дијагнозу БВ без обзира што на препарату није било *clue* ћелија или

појачане хомогене сиво-беличасте секреције. Нормалан налаз се сматрао онај у коме је доминација ЛБФ у односу на СБФ чак и у случајевима када је један од два теста (КОН проба, рН>4,5) позитиван.



Слика 3. Нормални налаз (лактобациларне форме), нативни препарат увеличање x 400



Слика 4. Бактеријска вагиноза (ситне бактеријске форме), нативни препарат увеличање x 400



### 2.1.2. Дондерсови критеријуми

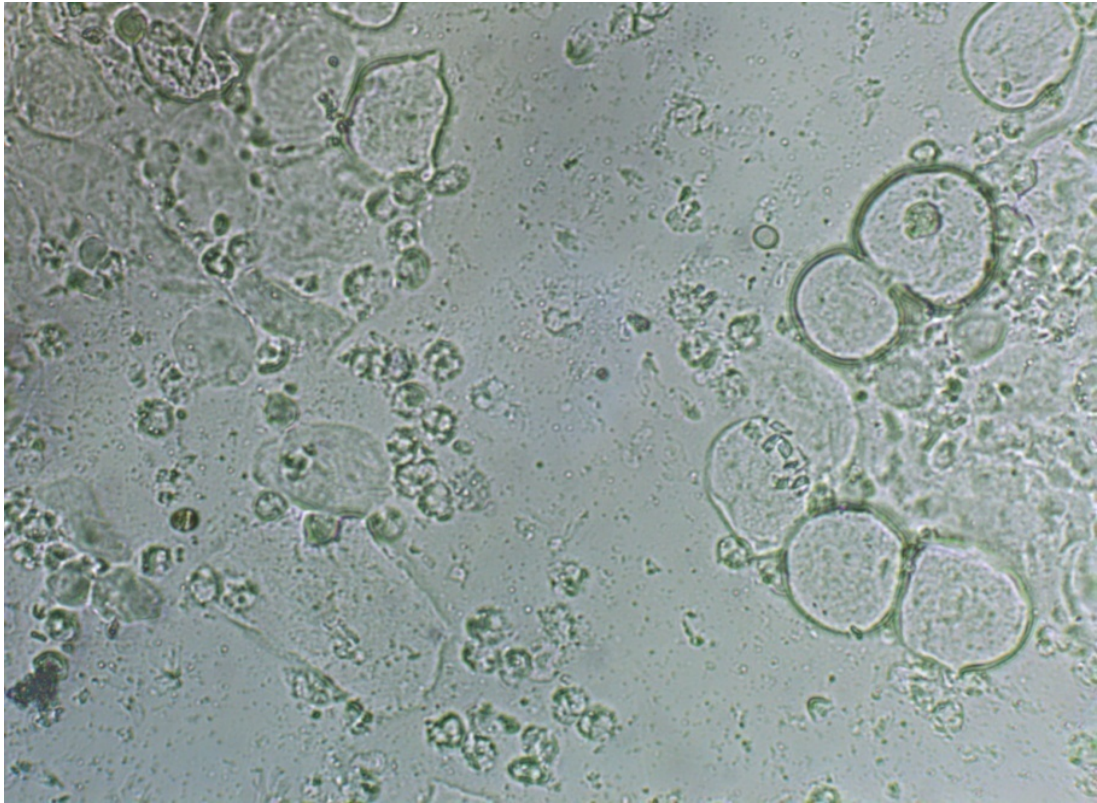
Критеријуми за дијагностику АВ представљени су у табели 2 (65). Прегледом нативног препарата на увећачу x 400 детектовали смо лактобациларне форме (ЛБФ) и разврстали смо их у групе (I, IIa, IIb, III). ЛБФ I кореспондира са нормалном микрофлором односно преминацијом лактобациларног типа ћелија са одсуством или малим присуством кокоидних бактерија. ЛБФ II представља смањен број лактобацила помешан са другим бактеријама и подељен је на две групе: углавном нормална флора, благо измењена (ЛБФ IIa) са доминацијом лактобацила у односу на друге бактерије и умерено измењена флора (ЛБФ IIb) где је подједнак број лактобацила у односу на друге бактерије. ЛБФ III је микрофлора која се састоји од великог броја других бактеријских форми без (или са јако малим) присуством лактобацила. Према Дондерсовим критеријумима дијагноза бактеријске вагинозе даље се дели на две групе на основу броја анаеробних микроорганизама. Уколико су ситне бактеријске форме присутне на целом препарату и присуство *clue* ћелија је преко 20% онда је реч у пуној БВ (енгл. „*Full BV*”). Када је присутно мање од 20% *clue* ћелија, а осим ситних бактеријских форми присутни су и други морфотипови оваква БВ се класификује као парцијална (енгл. „*Partial BV*”).

Поред ЛКФ детектовали смо и бодовали број леукоцита у поређењу са епителним ћелијама, број токсичних леукоцита, присуство кока/ланца кока као и присуство парабазалних ћелија. Према дијагностичким критеријумима Дондерса и сарадника пацијенткиње које би имале укупан збир 0–2 бода имале би нормалан налаз, збир 3–4 указивао би на благе форме АВ, збир 5–6 су средње тешке форме, док би пацијенткиње са збиром преко 6 бодова (до максимално 10) претпостављале тешке облике. У пракси би збир од 8 до 10 бодова одговарало ономе што је раније описивано као десквамативни инфламаторни вагинитис. У нашем истраживању смо поред нативног користили (Слика 5) и Грам препарат (Слика 6, 7, 8), јер сматрамо да се визуелно много јасније виде различити морфотипови на оваквој врсти препарата. Тако смо коначну евалуацију микроскопских препарата вршили прегледом оба препарата.

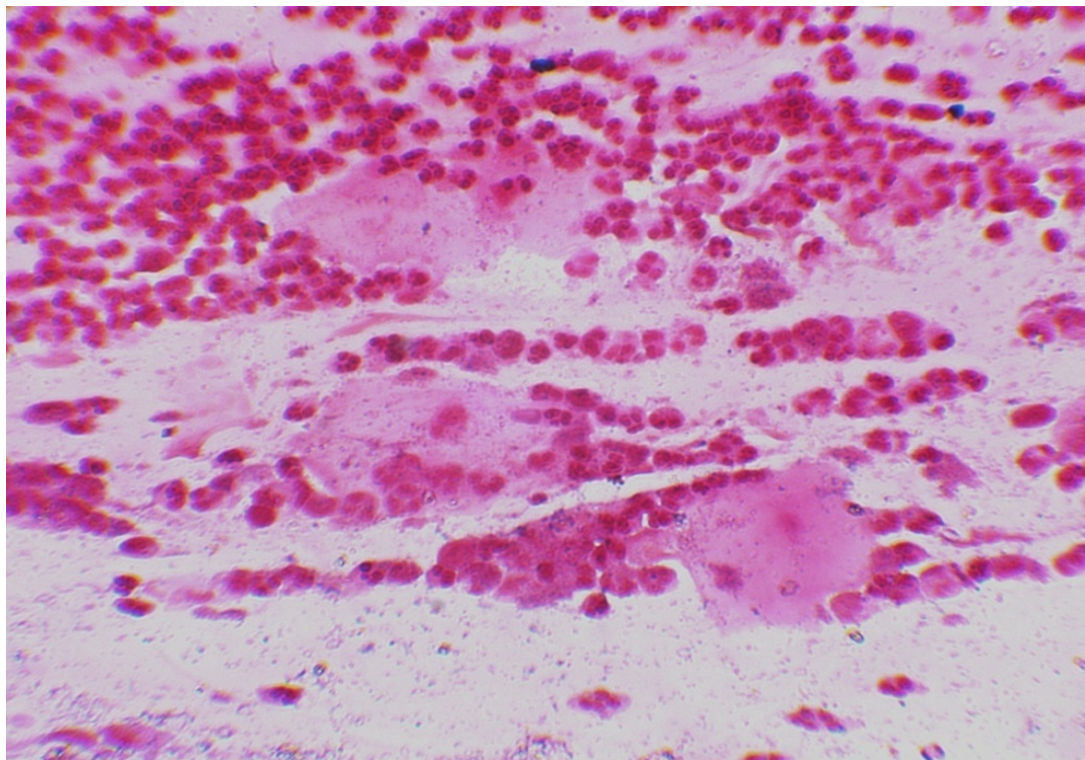
Табела 2. Критеријуми за постављање дијагнозе аеробног вагинитиса Дондерсовом методом

АВ скор	ЛБФ	Број ПМН	Процент токсичних ПМН	Бактеријска флора	Процент парабазалних ћелија
0	I и IIa	< 10/ВВП	Одсутни или спорадично присутни	Безначајан или присутна цитоллиза	Одсутне или на мање од 1%
1	IIb	>10/ВВП	≤ 50 ПМН	Мали колиформни бацили	≤10%
		<10/ЕЋ			
2	III	>10/ЕЋ	>50% ПМН	Коке или ланци	>10%

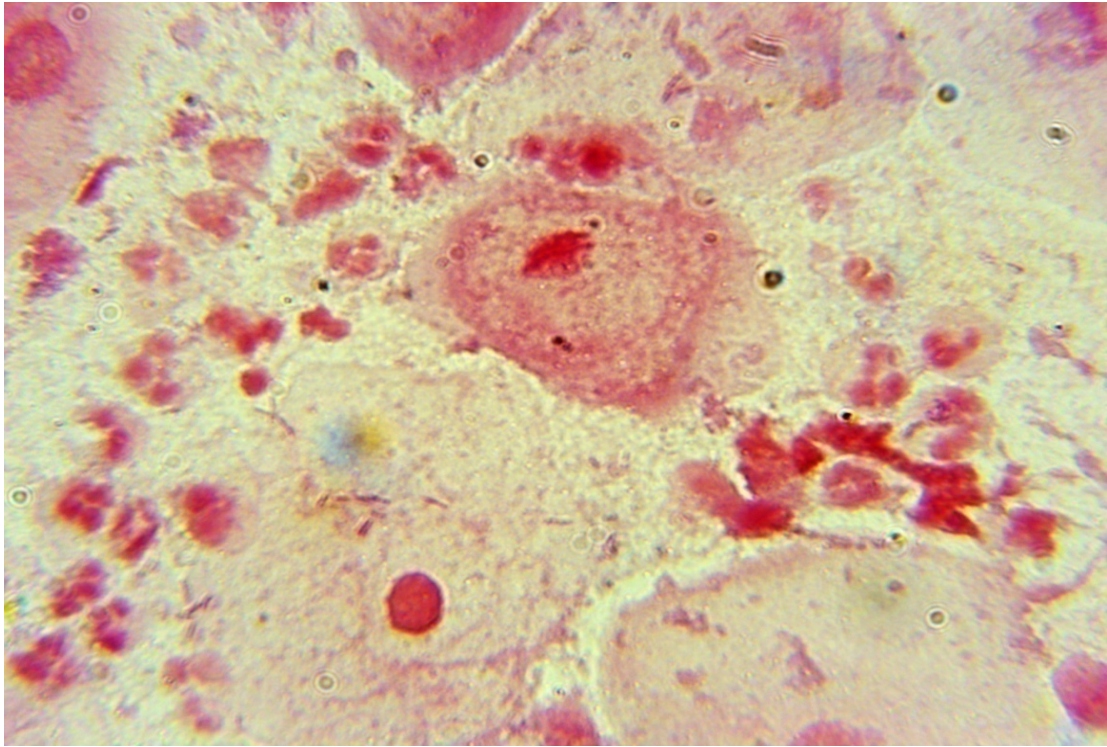
ЛБФ – лактобациларне форме, ПМН – полморфонуклеарни, ВВП – велико видно поље x 400, ЕЋ – епителна ћелија



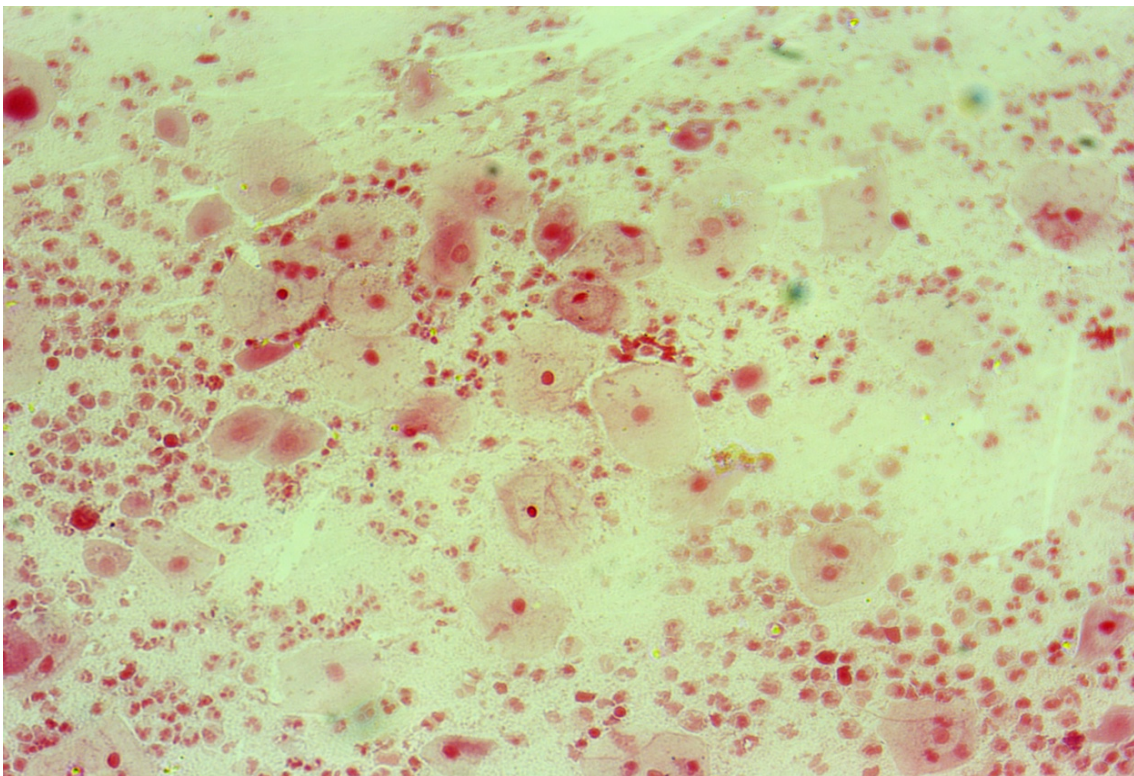
Слика 5. Аеробни вагинитис (парабазалне ћелије, леукоцити, коке) на нативном препарату, увељчање x 400



Слика 6. Аеробни вагинитис на Грам препарату, увељчање x 400



Слика 7. Аеробни вагинитис на Грам препарату, увеличање x 1000



Слика 8. Аеробни вагинитис на Грам препарату, увеличање x 200

## 2.2. Микроскопски преглед препарата по Граму

### 2.2.1. Бојење препарата по Граму

Након наношења бриса на микроскопску плочицу и сушења, препарат је фиксиран на пламенику. Препарат смо бојили генцијаном виолет (15 сек) и након испирања под благим млазом воде нанели смо Луголов раствор (20 сек) након чега је препарат опет испран под благим млазом воде, обезбојен ацетоном, испран водом, 5 секунди третиран сафранином, а затим стављен на сушење. Следећег дана прављени су трајни препарати, након чега су плочице архивирани до микроскопирања. Трајни препарат по Граму је више пута прегледан под микроскопом и на основу њега смо дијагностиковали БВ различитим критеријумима (Нугент, *Ison Hay, Clays* и НММ). Имерзионо уље са покровног стакалца је након прегледа препарата чишћено ксилолом.

### 2.2.2. Нугентови критеријуми

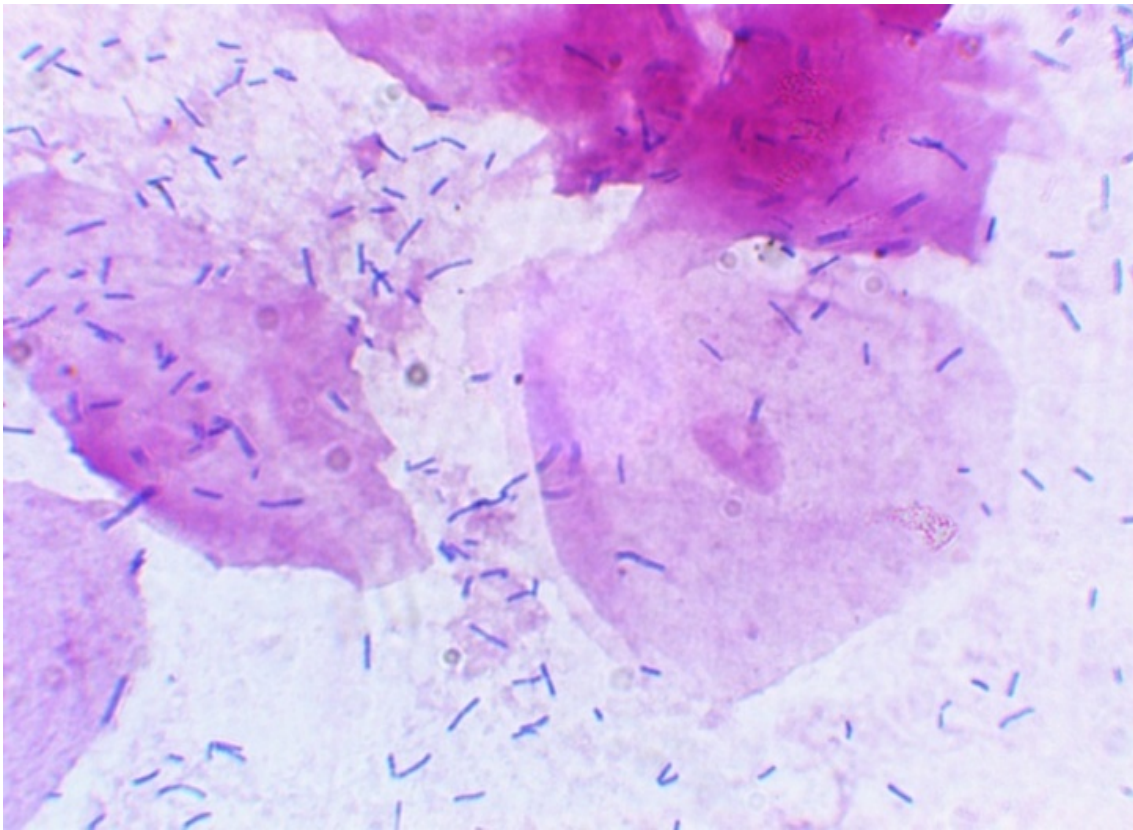
Нугентови критеријуми (78) категоришу вагинални размаз у три групе (нормалан, интермедијаран и БВ) на основу бодовања просечног броја бактеријских морфотипова. Препарате смо посматрали на увећању 1000 x и то 5–20 различитих несуседних видних поља. Прегледом препарата бележили смо присуство и број различитих бактеријских морфотипова: Грам позитивне форме (лактобацели), Грам негативне или варијабилне кокобациле (*Gardnerella, Bacteroides spp.*) и закривљене Грам варијабилне форме (*Mobiluncus spp.*). Ова три бактеријска морфотипа сврстана су у систем бодовања (0–10) приказани у табели 3. Будући да постоји разлика површине видног поља у зависности од врсте микроскопа у истраживању смо користили модификовану Нугентову поделу предложену од стране *Larssona* и сарадника за површину видног поља од 0,0035 мм<sup>2</sup>. (86) На основу присуства и броја ових морфотипова бодовали смо налаз и на основу укупног збира вагинални размази сврстани су у три категорије: нормалан налаз (0–3 бода) (Слика 9), интермедијаран налаз (4–6 бодова) (Слика 10) и бактеријска вагиноза (7–10 бодова) (Слика 11, 12, 13).

Табела 3. Нугентов скор модификован од стране *Larssona* и сарадника

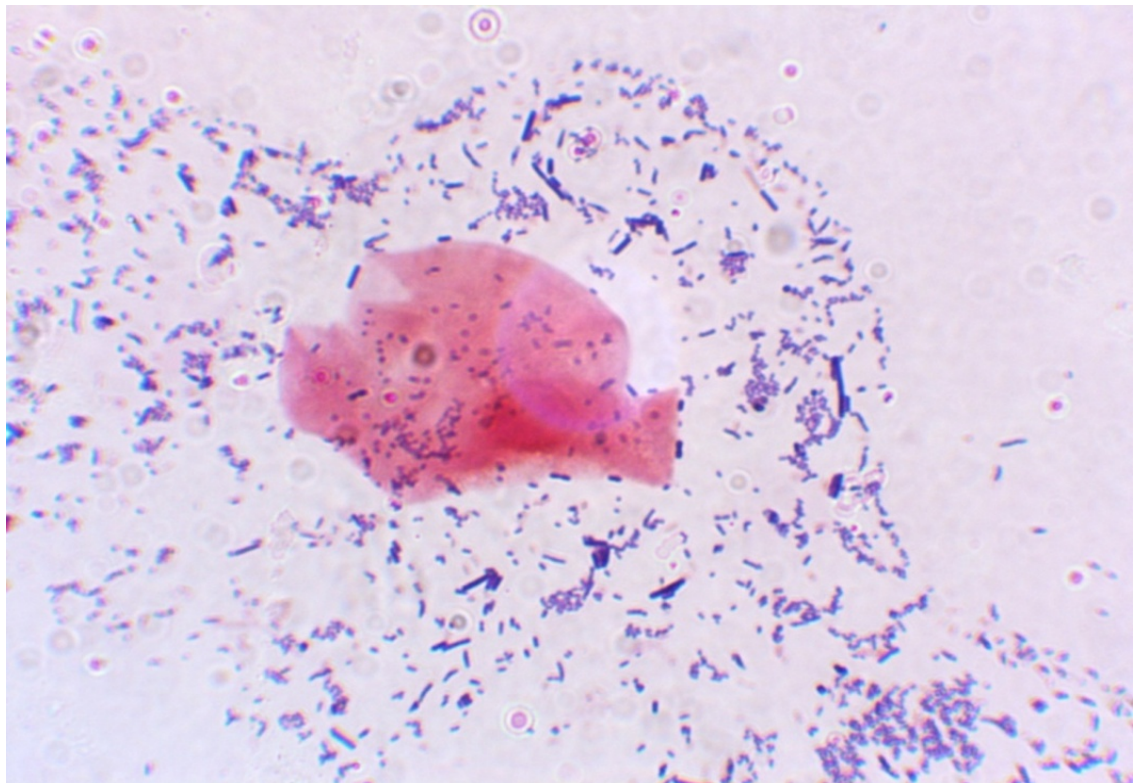
Број латобацила	Бодови	Број <i>G. vaginalis/Bacteroides</i>	Бодови	Број <i>Mobiluncus</i>	Бодови
0	4	>50	4	>10	2
0–2	3	10–49	3	2–10	1
2–8	2	2–8	2	0	0
10–49	1	0–2	1		–
>50	0	0	0		–

Укупан скор = лактобацели + *G. vaginalis/Bacteroides* + закривљени бацели

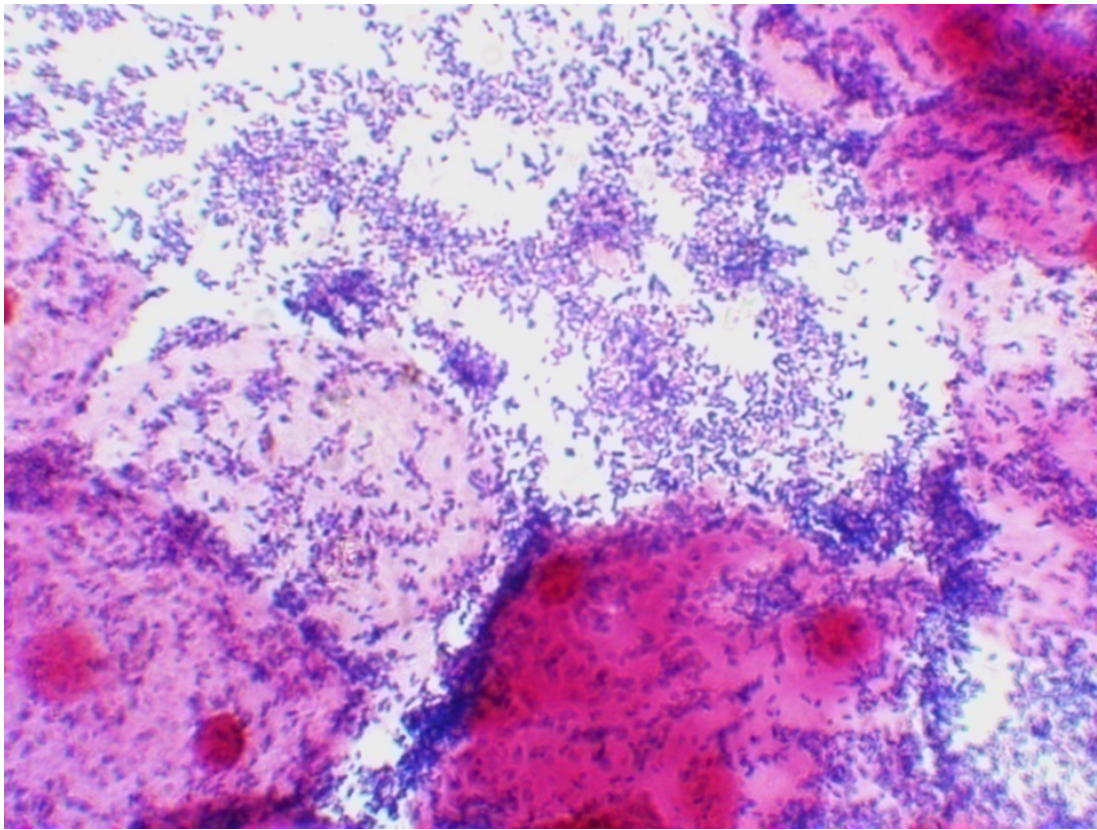
Сабирањем бодова пацијенткиња се сврстава у једну од три групе: (0–3) нормалан налаз, (4–6) интермедијаран налаз, (7–10) бактеријска вагиноза.



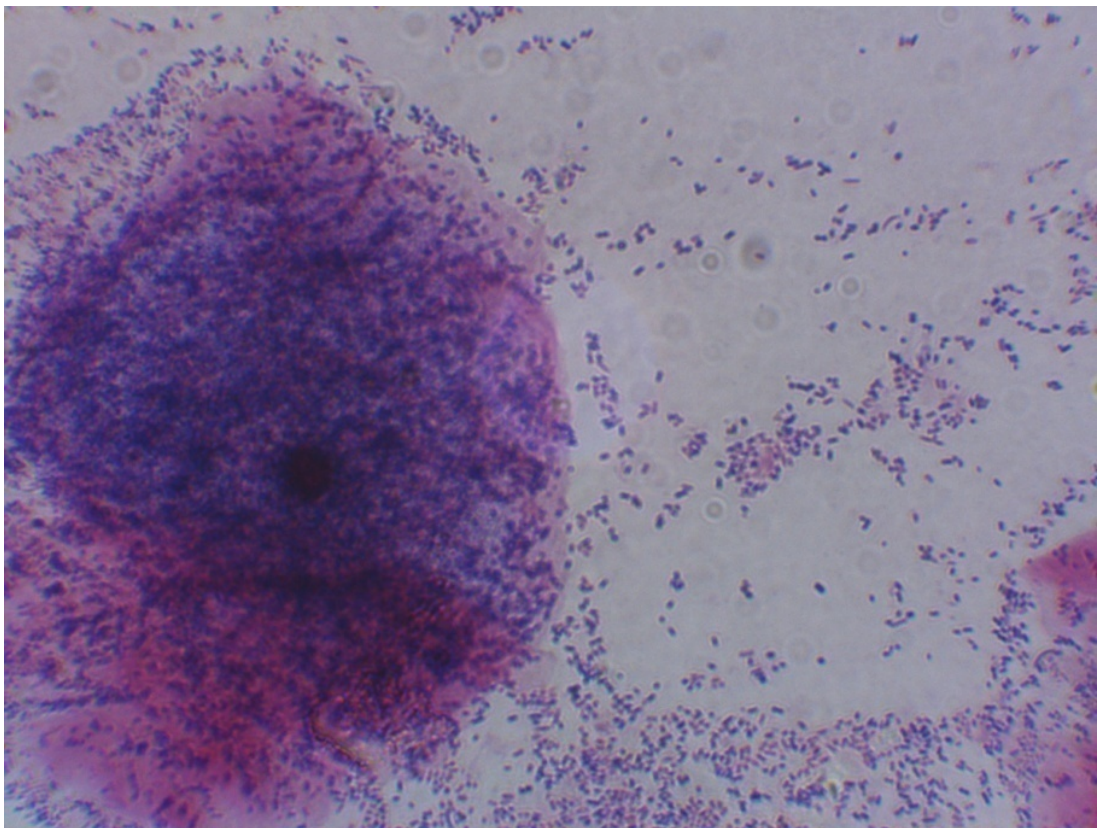
Слика 9. *Нормална флора (лактобациларне форме, епителне ћелије) Грам препарат, увељичање x 1000*



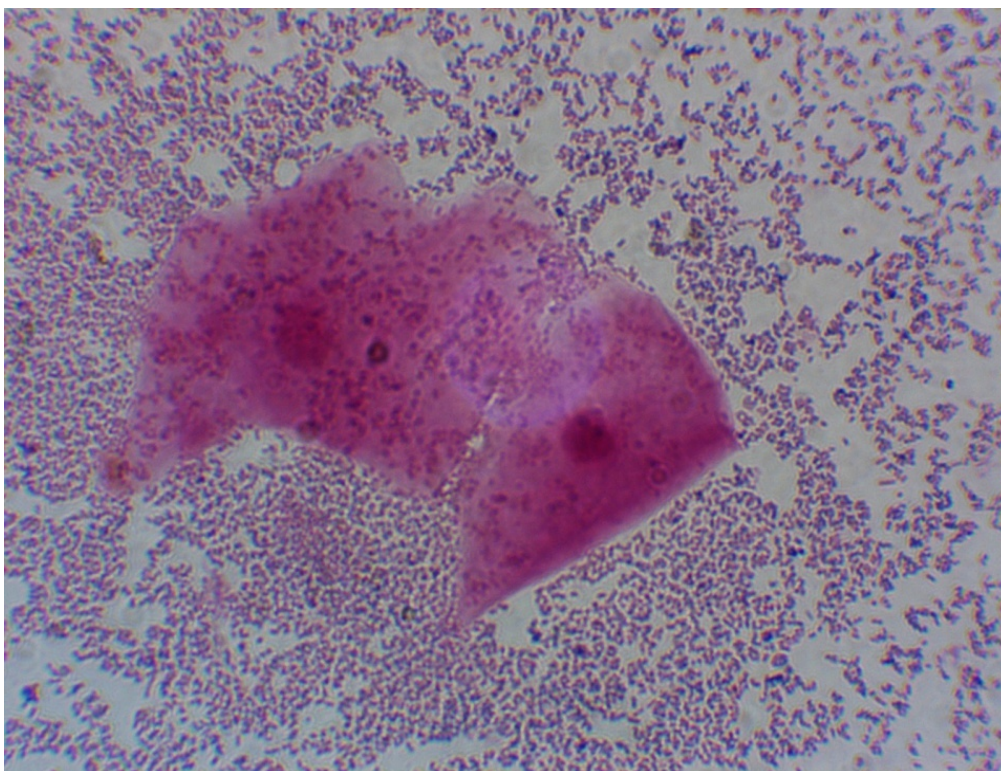
Слика 10. *Интермедијарна флора Грам препарат, увељичање x 400*



Слика 11. Бактеријска вагиноза, Грам препарат, увељичање x 1000



Слика 12. Бактеријска вагиноза (слие ћелија) Грам препарат, увељичање x 1000



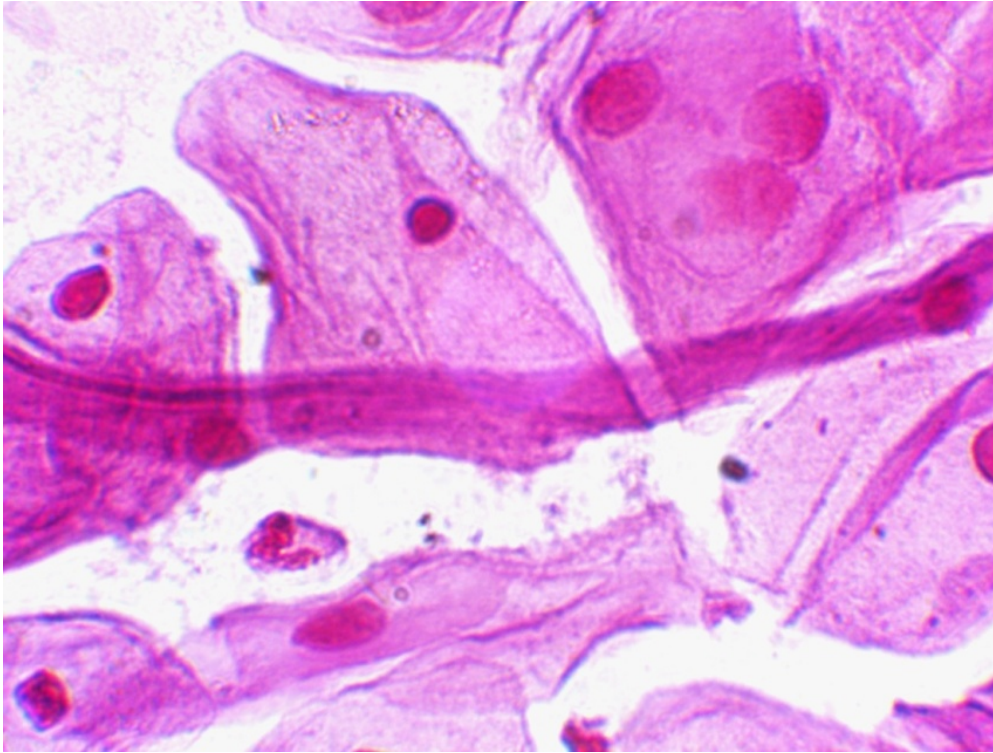
Слика 13. Бактеријска вагиноза (*Mobiluncus*) Грам препарат, увеличање x 1000

### 2.2.3. Ison/Hay критеријуми

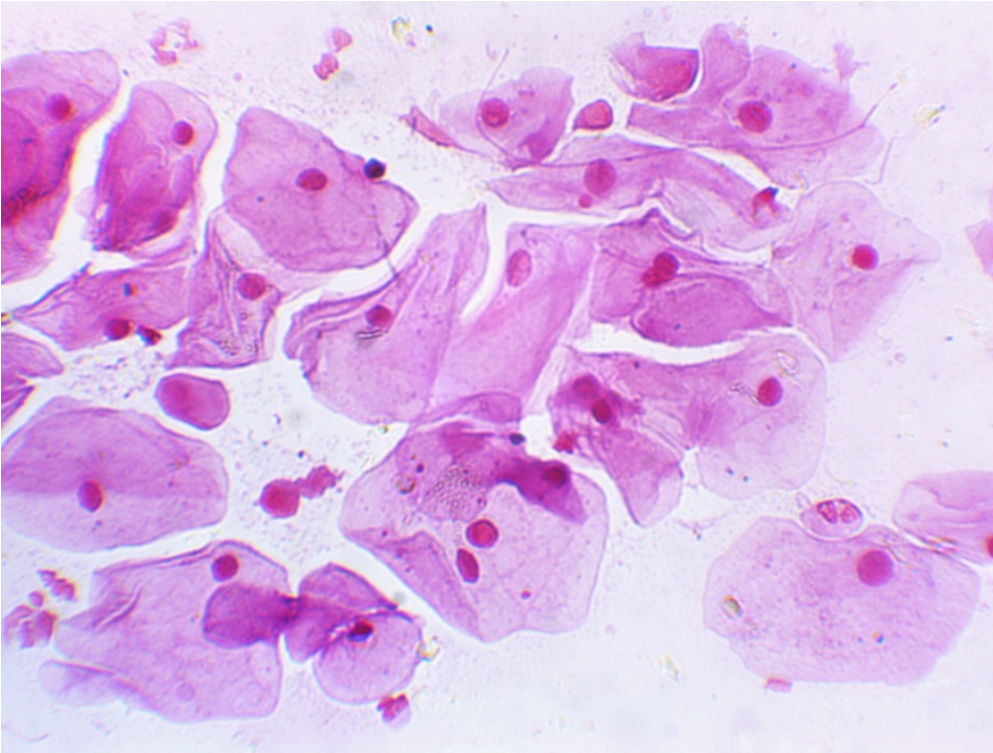
*Ison/Hay* методологија (84) представља модификацију Нугентових критеријума само што се ова класификација заснива на квалитативној процени присуства различитих морфотипова (Табела 4). Препарати су посматрани на увеличању x 1000, а вагинални размази су дељени у 5 група. Поред три Нугентове групе (нормалан, интермедијаран и бактеријска вагиноза) постоје још две нове: нулта (Слика 14, 15) где су присутне само епителне ћелије без присуства бактерија и група са присуством Грам позитивних кока. (Слика 16, 17)

Табела 4. Класификација вагиналних размаза по критеријумима *Ison-a* и *Hay-a*

Група	Квалитативна процена присуства одређених морфотипова
0	Епителне ћелије без или са минималним присуством бактерија (нулта група)
I	Нормална вагинална флора (присутне само ЛБФ)
II	Интермедијарна флора – подједнак број лактобациларних морфотипова и мешаних бактеријских морфотипова
III	Бактеријска вагиноза – доминираја мешани бактеријски морфотипови са одсуством или малим присуством лактобациларних морфотипова
IV	Присуство Грам позитивних кока

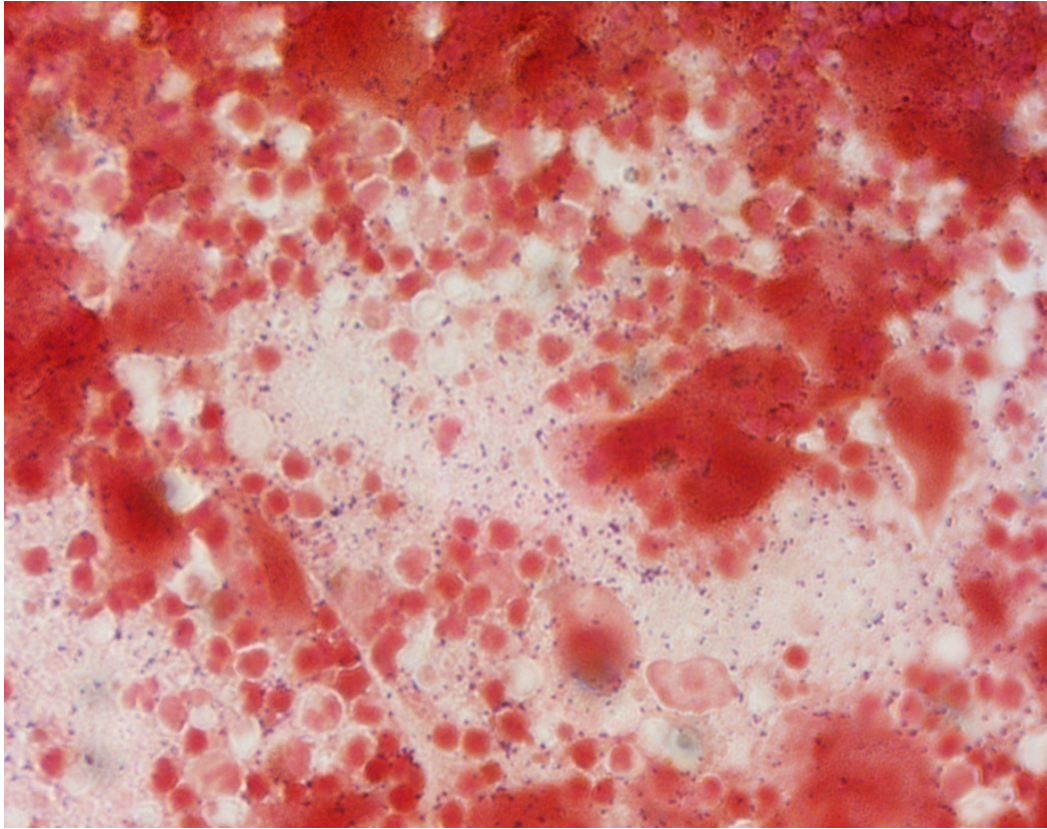


Слика 14. Нулта група детектована Ison/Нау методом, Грам препарат увеличање x 1000

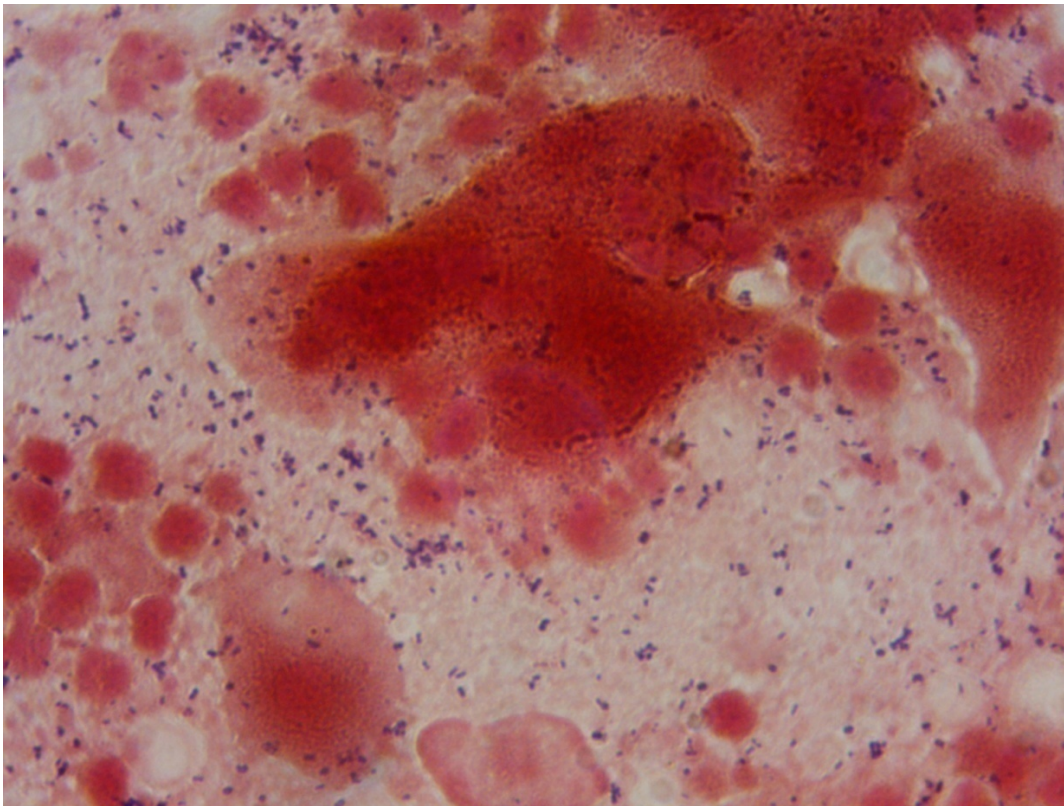


Слика 15. Нулта група детектована Ison/Нау методом, Грам препарат увеличање x 400





Слика 16. Група коке детектована Ison/Нау методом, Грам препарат, увеличање x 400



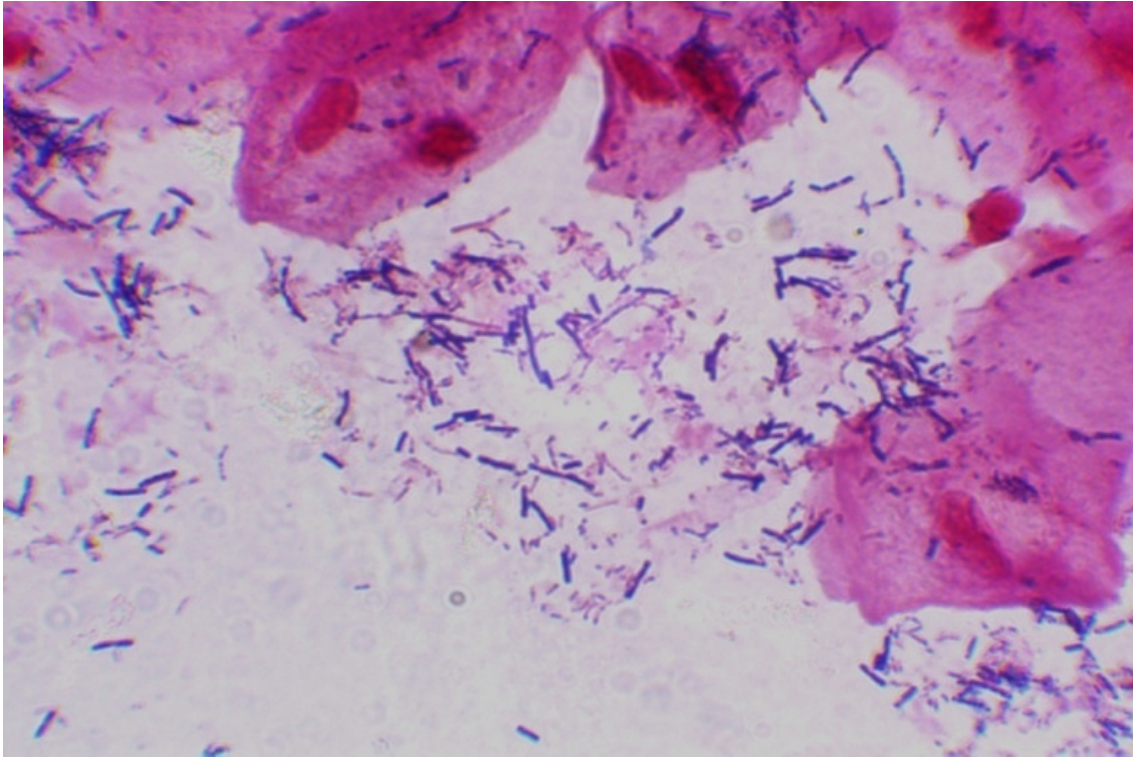
Слика 17. Група коке детектована Ison/Нау методом, Грам препарат, увеличање x 1000

#### 2.2.4. Clays критеријуми

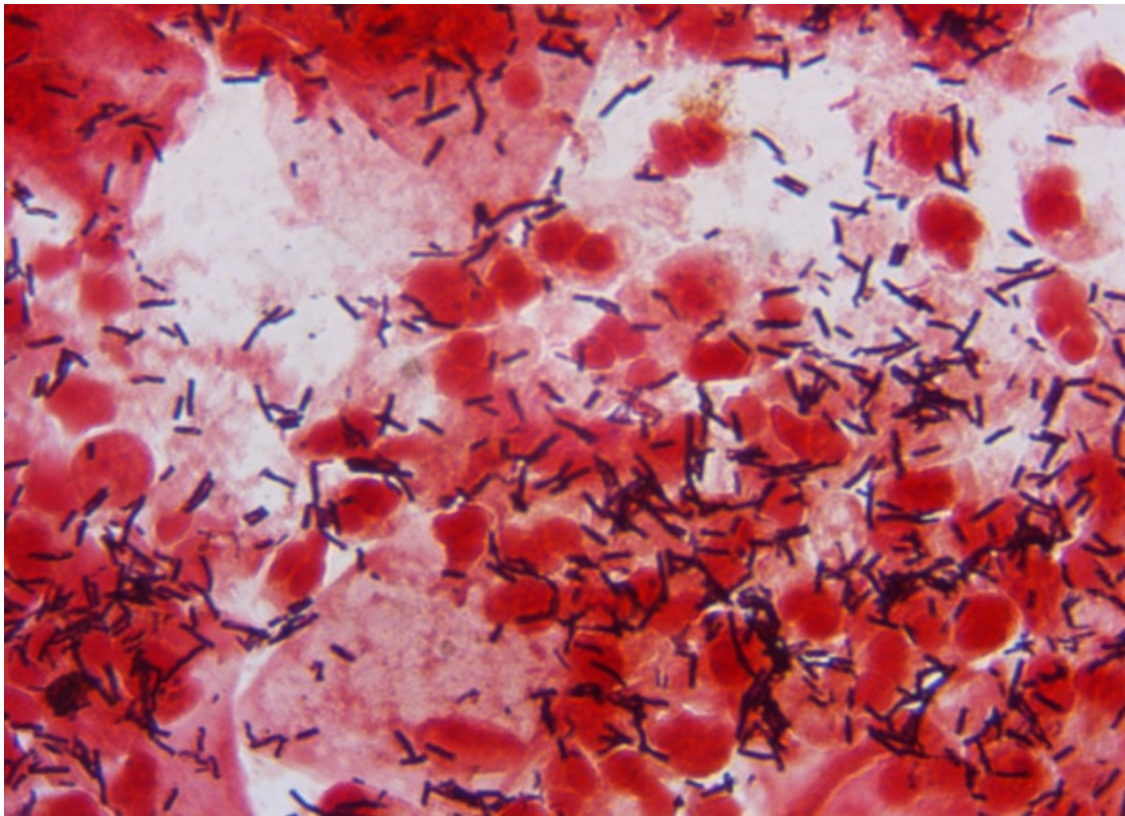
Успостављена је од стране *Verhelst* и сарадника и представља модификацију *Ison/Hay* критеријума и дели вагиналне размазе у 6 група (85). Аутори ове методе изостављају из своје категоризације нулту групу, деле нормалне налазе у неколико категорија (*Ia, Ib, Iab*), и у своју поделу уводе још две нове групе – *I-like* (Слика 18) и идиопатска леукоореја (Слика 19, 20). Код *Ia* групе преодминатно је присуство дебљих краћих штапићастих форми (*Lactobacillus crispatus*). Код *Ib* група присутне су друге врсте рода *Lactobacillus*, док су код *Iab* групе присутни како *Lactobacillus crispatus* тако и друге форме рода *Lactobacillus*. *I-like* група („слична нормалном”) карактерише присуство Грам позитивних штапића кратких или неправилних облика са широким и дебелим, затупастим крајевима, често распоређених тако да праве облике сличне кинеском писму. Идиопатска леукоореја се карактерише присуством великог броја полиморфонуклеара уз истовремено присуство нормалног броја лактобацила. Уколико би пацијенткињу сврставали у ову групу, искључивали смо присуство гљивичне инфекције. У нашем истраживању (*Ia, Ib, Iab*) сматрали смо нормалним налазима, али су *I-like* и идиопатска леукоореја посматрани као засебне групе (Табела 5).

Табела 5. Критеријуми по Clays-у

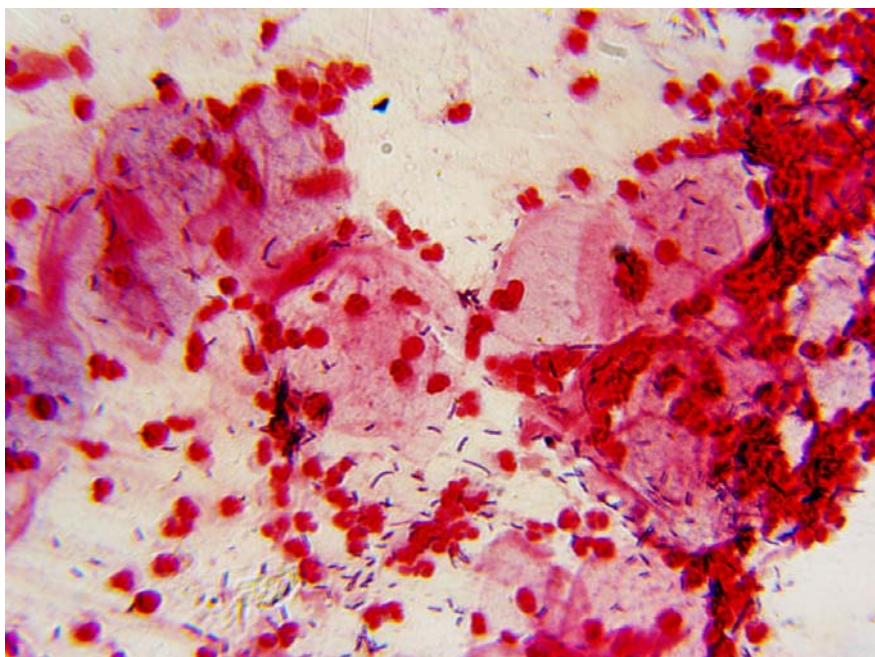
Група	Квалитативна процена присуства одређених морфотипова
<b>I</b> ( <i>Ia, Ib, Iab</i> )	Нормална вагинална флора (присутне само ЛБФ)
<i>I-like</i>	Грам позитивне бактерије дифтероидног морфотипа (слична нормаланом)
<b>Идиопатска Леукоореја</b>	Нормалан број лактобацила уз присуство великог броја ПМН
<b>II</b>	Интермедијарна флора – смањен број лактобациларних морфотипова са мешаним бактеријским морфотиповима
<b>III</b>	Бактеријска вагиноза – доминираја мешани бактеријски морфотипови са одсуством или малим присуством лактобациларних морфотипова
<b>IV</b>	Присуство Грам позитивних кока



Слика 18. *I-like* група детектована на Грам препарату, увеличање x 1000



Слика 19. Идиопатска леукореа (лактобациларне форме и велики број ПМН) детектована на Грам препарату, увеличање x 1000



Слика 20. Идиопатска леукореа (лактобациларне форме и велики број ПМН) детектована на Грам препарату, увеличање x 400

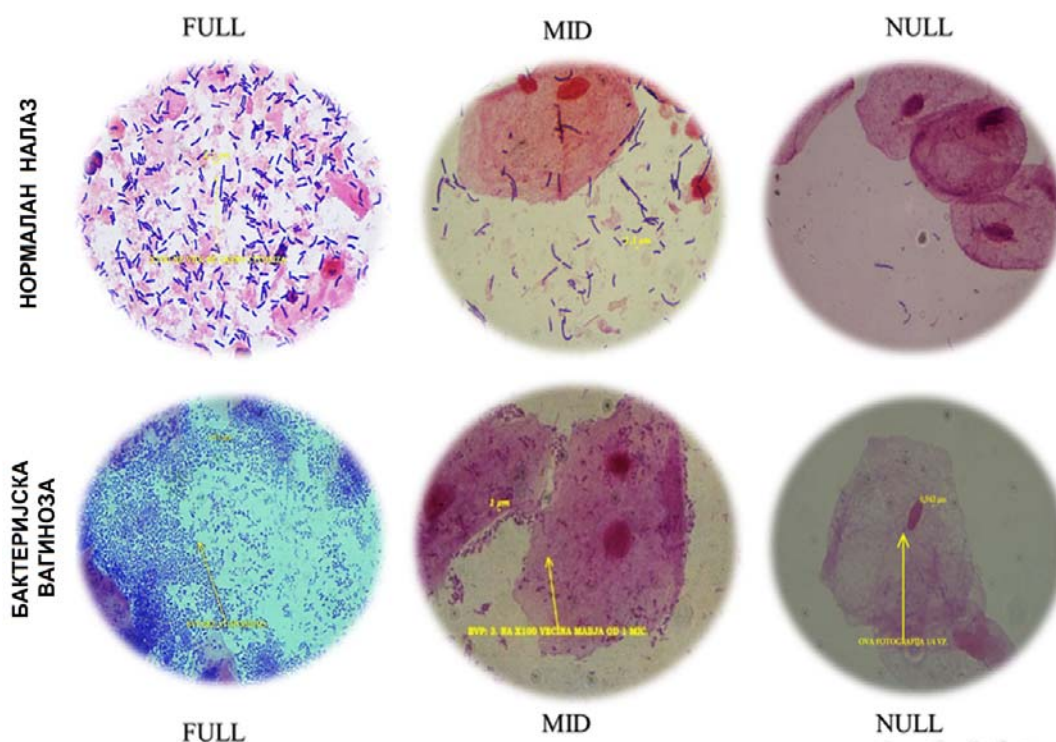
#### 2.2.5. Нова микроскопска метода

Метода је уведена од стране доктора Ненадића и сарадника (87, 88) и представља преглед препарата по Граму на увеличању x 200 са имерзијом. На увеличању x 200 препознајемо два морфотипа: штапићасте форме (ШФ) и нештапићасте форме (НШФ). ШФ су штапићи, лако закривљене форме различитих дужина (већих од 1,5  $\mu\text{m}$ ), дебљине и интензитета бојења и препарате са доминацијом ових форми смо тумачили као здраву вагиналну флору (лактобацили). НШФ су морфотипови кокобациларног или кокоидног облика чија је дужина мања од 1,5  $\mu\text{m}$  и на препаратима смо под овим подразумевали флору удружену са БВ (BVAB). Осим два основна морфоротипа уведена од стране аутора методе који на основу односа ШФ и НШФ пацијенткиње разврставају у оне са нормалним налазом и БВ, увели смо модификацију НММ тако што смо детектовали присуство и АВ. Уколико су на препарату биле присутне коке/ланци кока, присуство повећаног броја ПМН, као и парабазалне ћелије, тада је тај налаз подразумевао поремећену флору удружену са АВ. Морфо тип кока подразумева налаз на коме се виде изразито Грам позитивне округле форме величине 0,2–1  $\mu\text{m}$ . На увећању x 200 виде се као ситне, тачкасте форме, бројне, али не слепљене, као што је случај са BVAB. Да бисмо утврдили коначну дијагнозу АВ, поред прегледа микроскопског препарата упоредо смо пратили и два клиничка критеријума (рН и КОХ). У случају АВ, рН вредност вагине је већа од 4,5 а проба са КОХ је негативна, мада се могу констатовати непријатни мириси попут буђи или гноја.

Прегледом препарата на увеличању x 200 семиквантитативном проценом штапићастих, нештапићастих форми, као и кока (уз присуство ПМН и парабазалних

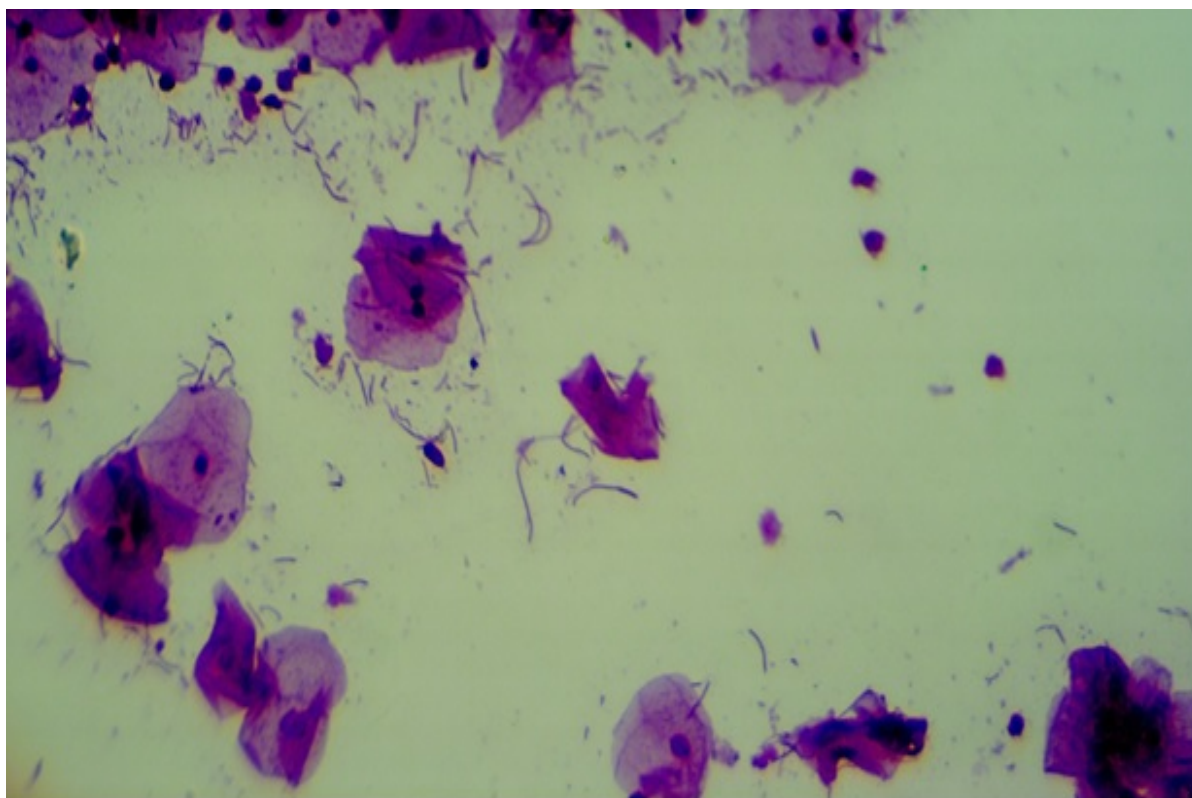
ћелија) сви микроскопски налази су подељени на 3 групе: *full* (пун), *mid* (умерен), *null* (празан). *Full* (пун) означава хиперцелуларни препарат и присуство великог броја ШФ или НШФ који се налазе на читавом препарату како у међупросторима епителних ћелија, тако и у самим накупинама епителних ћелија. Будући да присуство кока на препаратима за разлику у ШФ и НШФ никада није равномерно и једнако, позитивним налазом кока сматрали смо испитанице које имају преко 5 региона богатих кокама. Уколико су ти региони били богати ћелијама онда смо такав препарат сврставали у *full*. *Mid* (умерен) означава присуство мањег броја ових форми које су ређе или их нема у међупросторима епителних ћелија и углавном се налазе око и у накупинама епителних ћелија, али у мањем броју него код претходне групе. *Null* (празан) представља хипоцелуларни препарат, категорију у којој он делује чист, међупростори епителних ћелија су без или са мало бактеријских форми, а веома мали број се налази око и у накупинама епителних ћелија.

У зависности од односа између штапићастих, нештапићастих форми, кока (уз присуство ПМН и парабазалних ћелија) испитанице су подељене у три групе, односно 9 подгрупа. Три подгрупе су пацијенткиње са нормалним налазом: нормалан (*full, mid, null*), а остале две групе, односно 6 подгрупа су испитанице са патолошком флором БВ (*full, mid, null*) и АВ (*full, mid, null*) (Слика 21).

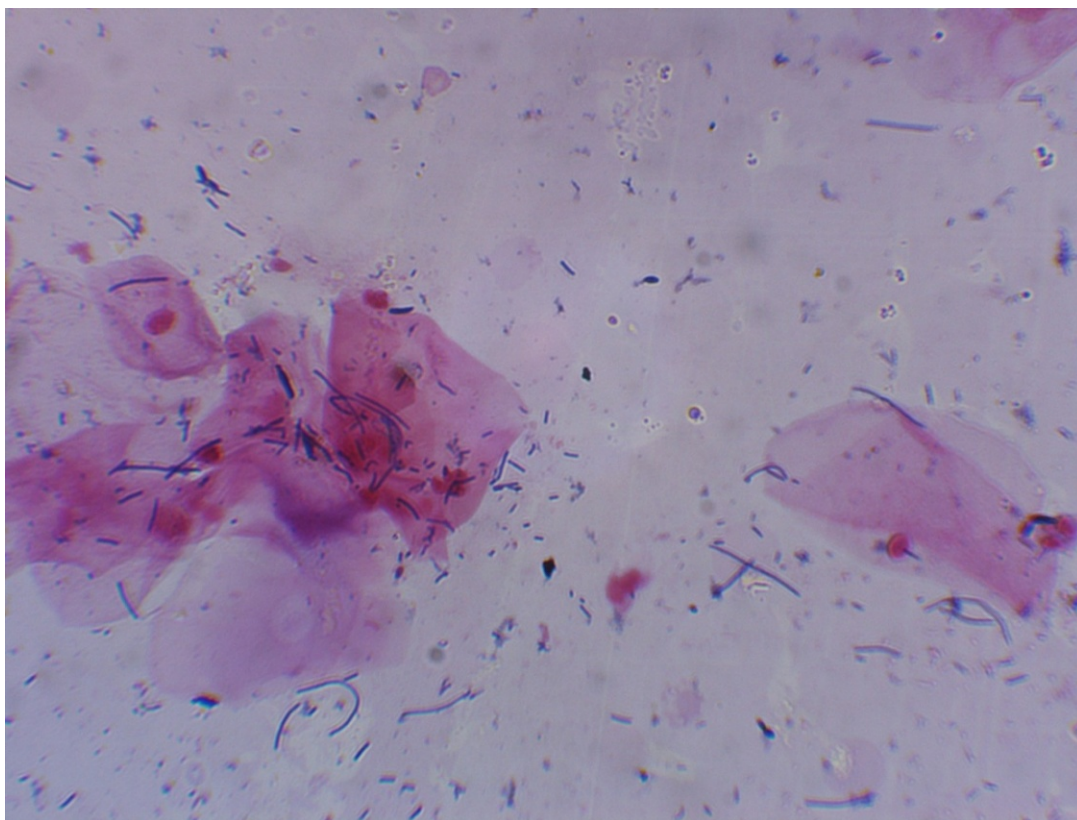


Слика 21. Оригинална подела препарата према Новој микроскопској методи уведена од стране Ненадића и сарадника. Подела на две групе са шест подгрупа (нормалан налаз (*full, mid, null*) и БВ (*full, mid, null*)). Према Nenađić D. Broj i vijabilnost vaginalnih polimorfonukleara kao pokazatelj rizika za prevremeni porođaj [Doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane; 2014.

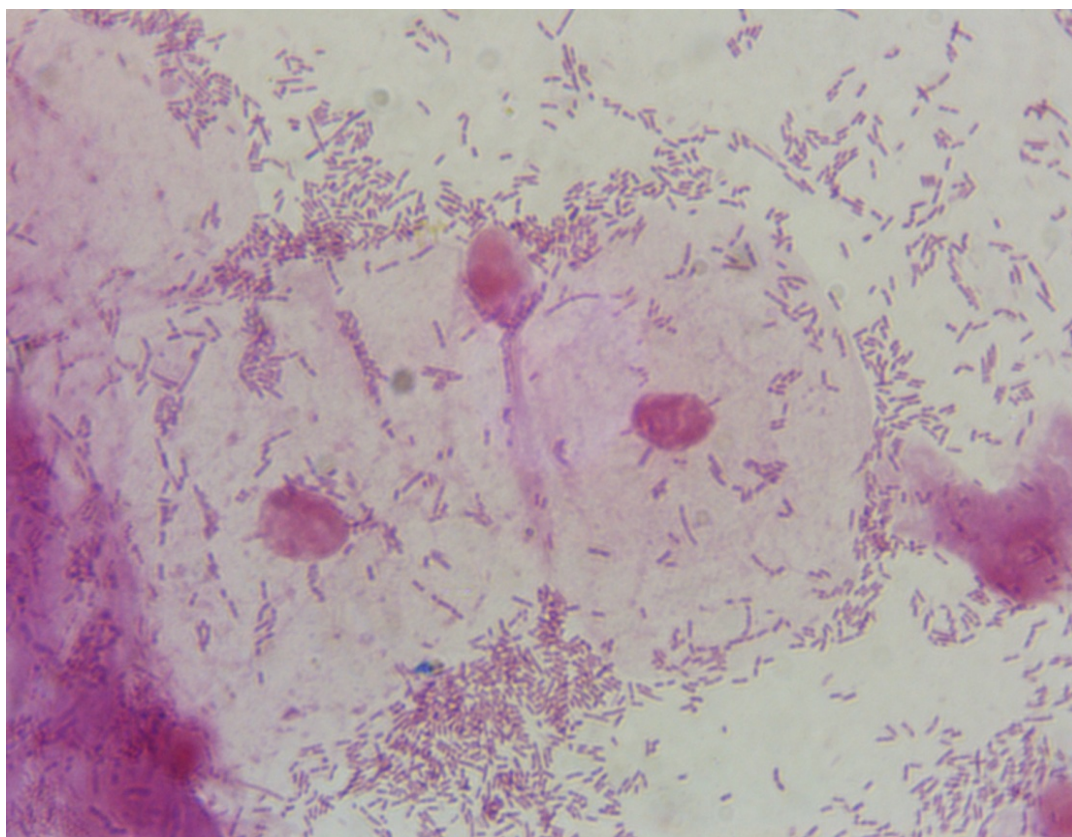
Поред три основне форме (нормалан налаз, БВ и АВ) аутори истичу да постоје и још два бактеријска морфотипа који се могу наћи на препаратима: бифидо и лепто (Слика 22–25). Морфотип бифидо су микроскопске форме најближе групи које су *Verhelst* и сарадници у својој подели назвали *I-like* (слична нормалном). Будући да су аутори *Clays*-ове методе секвенционирањем открили да је у групи *I-like* детектовано преко 50% *Bifidobacteria*, Ненадић и сарадници ову групу називају бифидо. Морфотип лепто представљају штапићасте, мање више закривљене форме, различите дебљине и бојења по Граму чија је дужина преко 20  $\mu\text{m}$ . Иако смо детектовали ова додатна два морфотипа, приликом статистичке обраде резултата у поређењу са другим методама они су сматрани нормалним налазима.



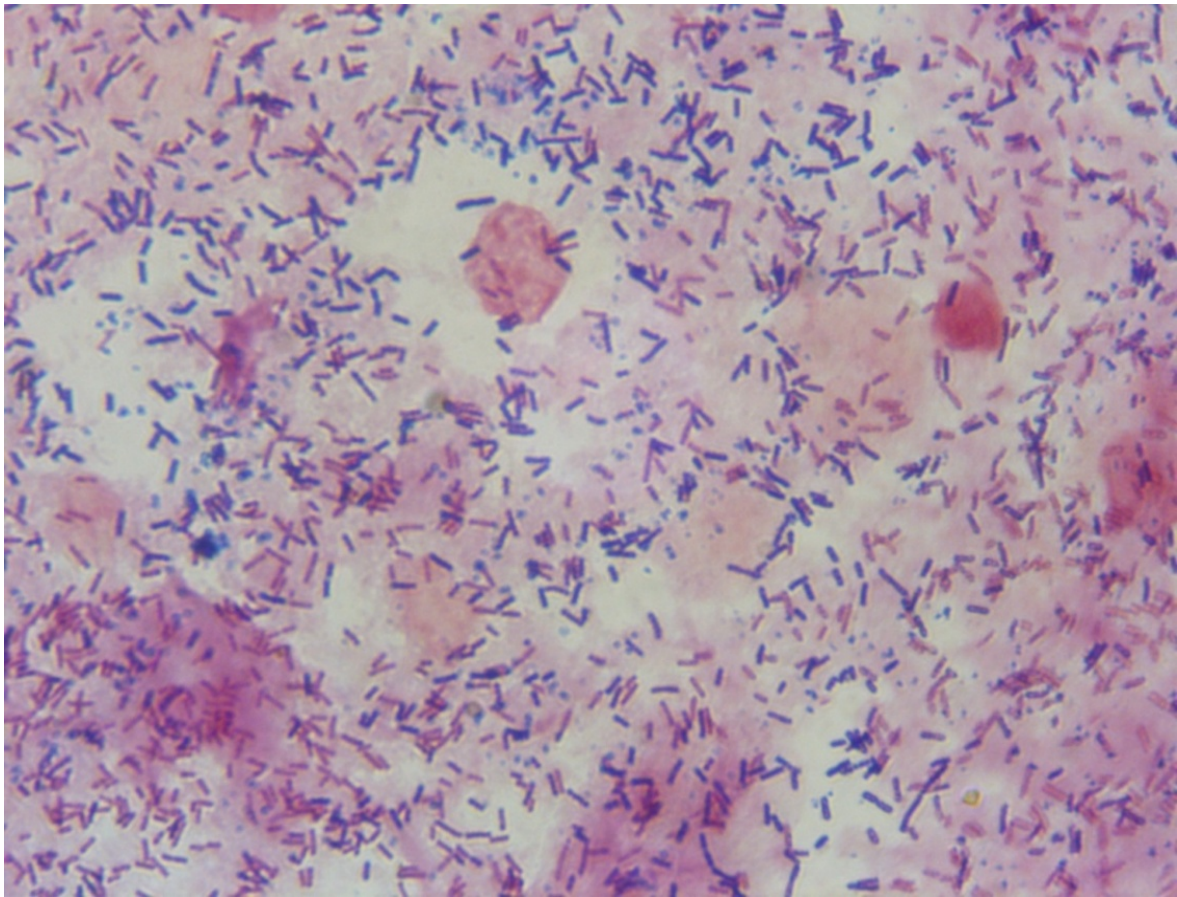
Слика 22. Форма лепто, нова микроскопска метода, увељичање  $\times 200$



Слика 23. Форма лепто, нова микроскопска метода, увељичање  $\times 400$



Слика 24. Форма бифидо, нова микроскопска метода, увељичање  $\times 1000$



Слика 25. Форма бифидо, нова микроскопска метода, увеличање x 1000

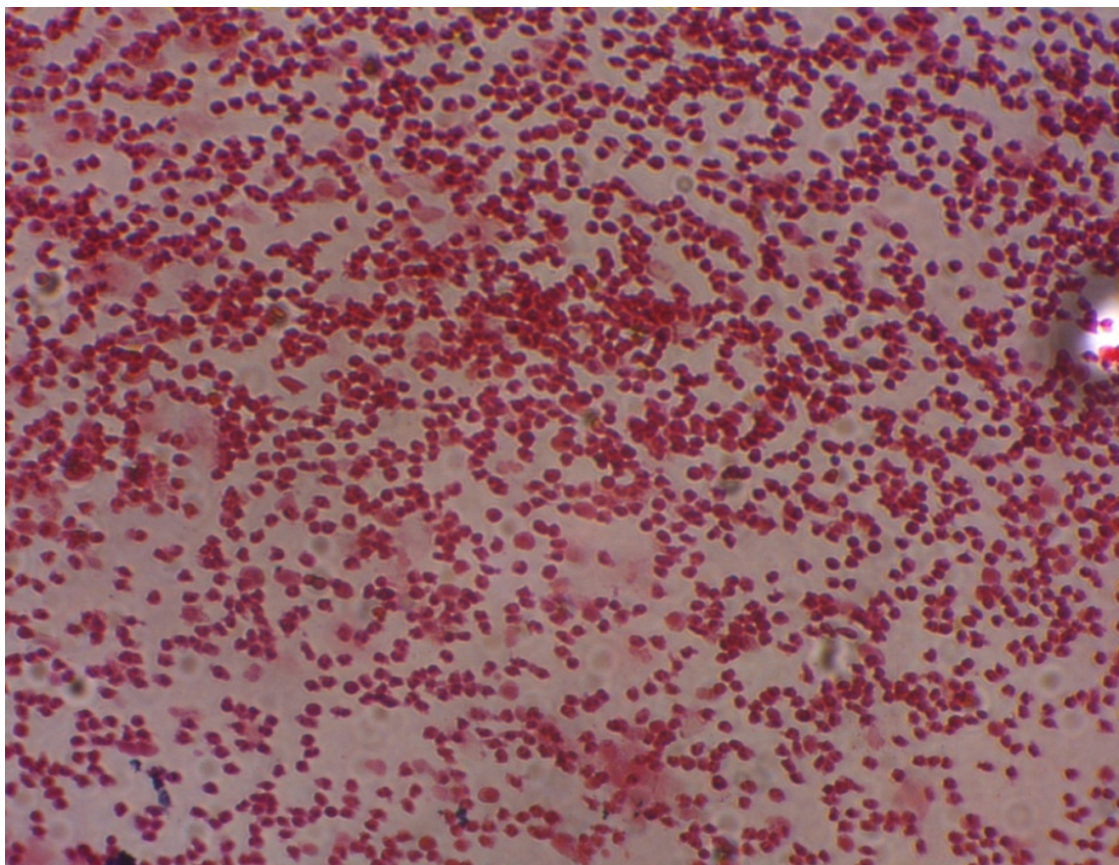
#### 2.2.6. Детекција полиморфонуклеарних леукоцита на микроскопском препарату

Приликом прегледа микроскопских препарата и дијагностике вагиналних дисбиоза, бележили смо и број ПМН на увеличању x 200, x 400 и x 1000 (87). На основу семиквантитативне процене, односно односа између присуства ПМН и епителних ћелија на препарату, све испитанице смо поделили у 4 групе:

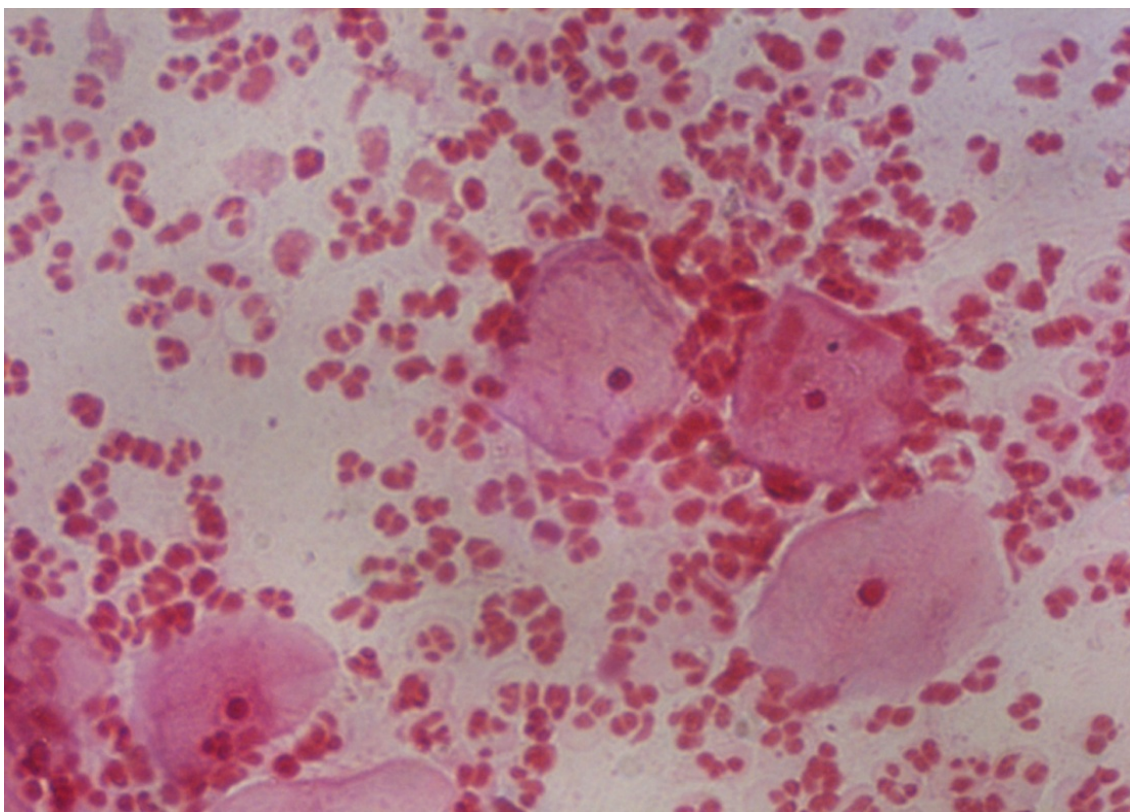
1. Група 0 – на препарату нису присутни ПМН или су присутни у знатном мањем броју у односу на епителне ћелије.
2. Група 1 – ПМН су присутни на преко 50% видних поља, али је њихов број мањи у односу на епителне ћелије.
3. Група 2 – прегледом препарата ПМН се виде на већини видних поља, али је њихов број једнак или мало већи у односу на број епителних ћелија.
4. Група 3 – број ПМН је знатно већи у односу на епителне ћелије.

У нашем испитивању групу 0 и 1 смо сматрали нормалним налазом ПМН, док су група 2 и 3 патолошки налази (Слика 26, Слика 27).





Слика 26. Полиморфонуклеарни леукоцити, патолошки налаз, увељичање x 200



Слика 27. Полиморфонуклеарни леукоцити, патолошки налаз, увељичање x 200

## 2.3. Детекција *Candida spp.*

### 2.3.1. Култивисање микроорганизама

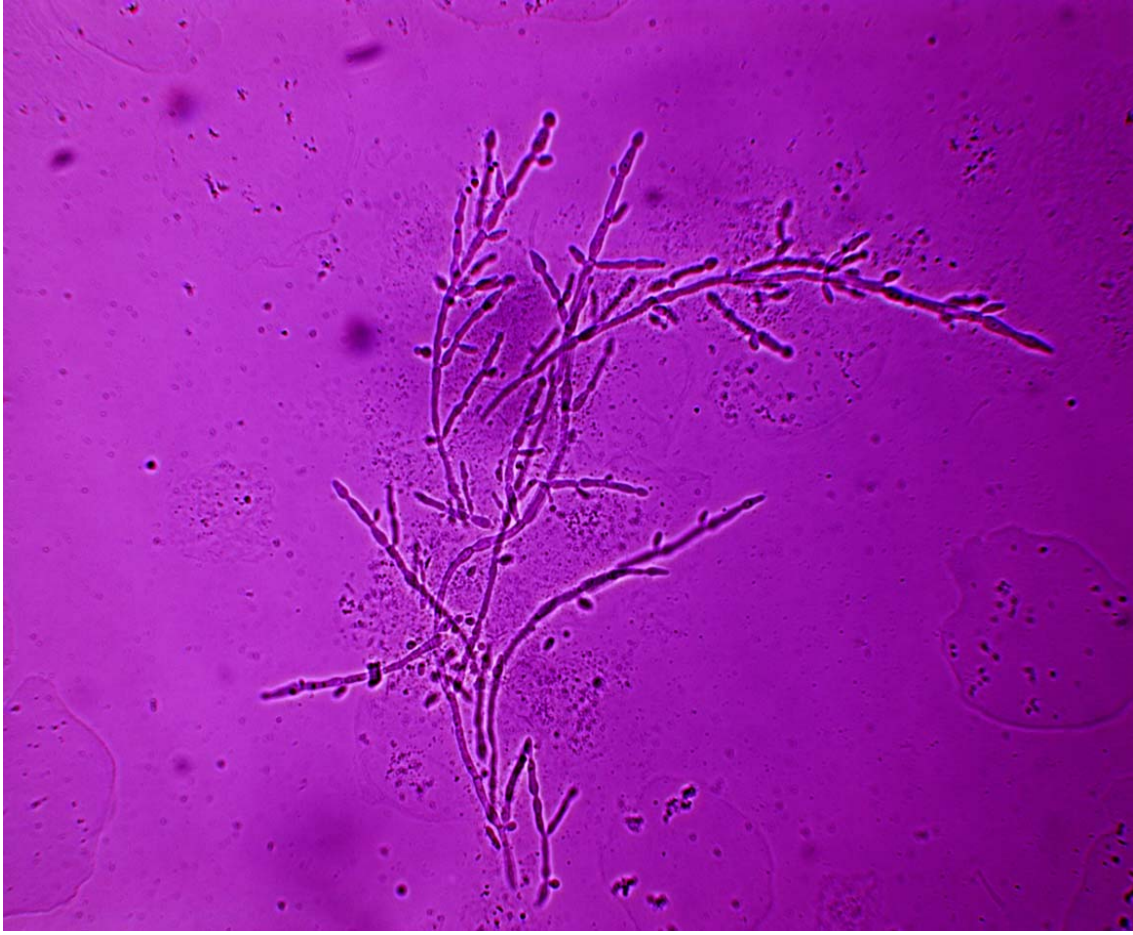
Један вагинални брис засејан је на Сабуро-декстрозни агар методом размазивања цик-цак потезима. Инкубација је трајала 72 h на 37°C. Након инкубације анализиран је пораст и присуство гљива рода кандида. (Слика 28)



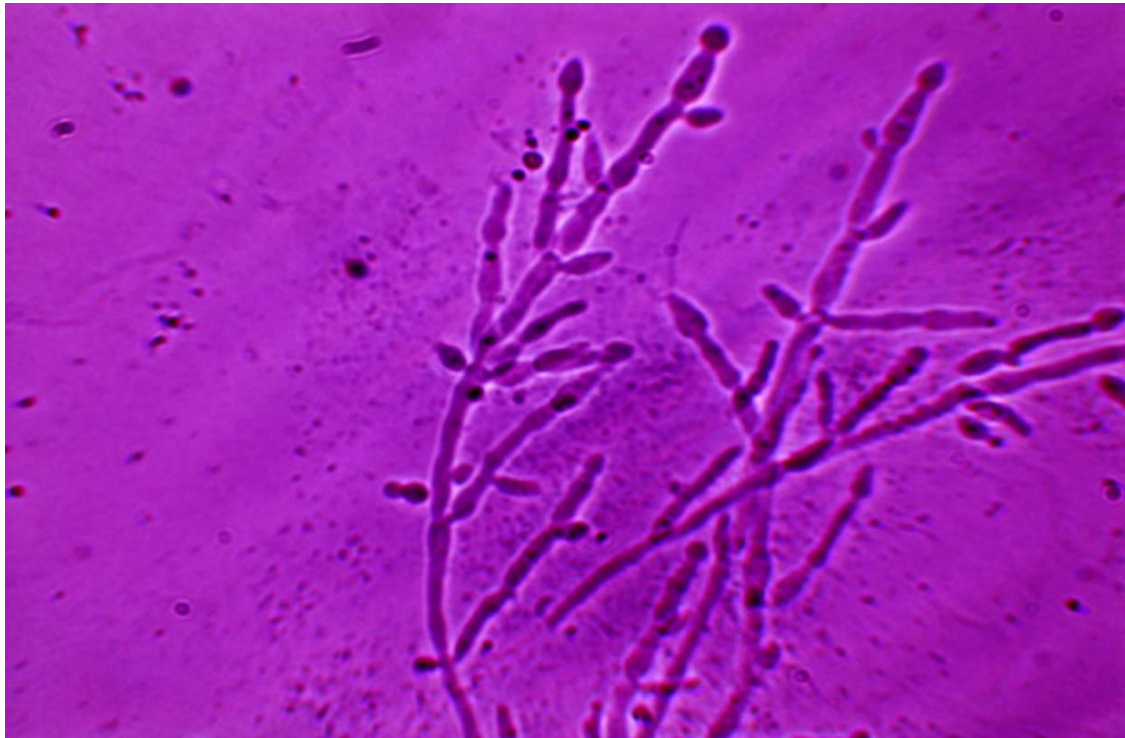
Слика 28. *Candida spp.* на Сабуро агару

### 2.3.2. *Candida spp.* на микроскопском препарату

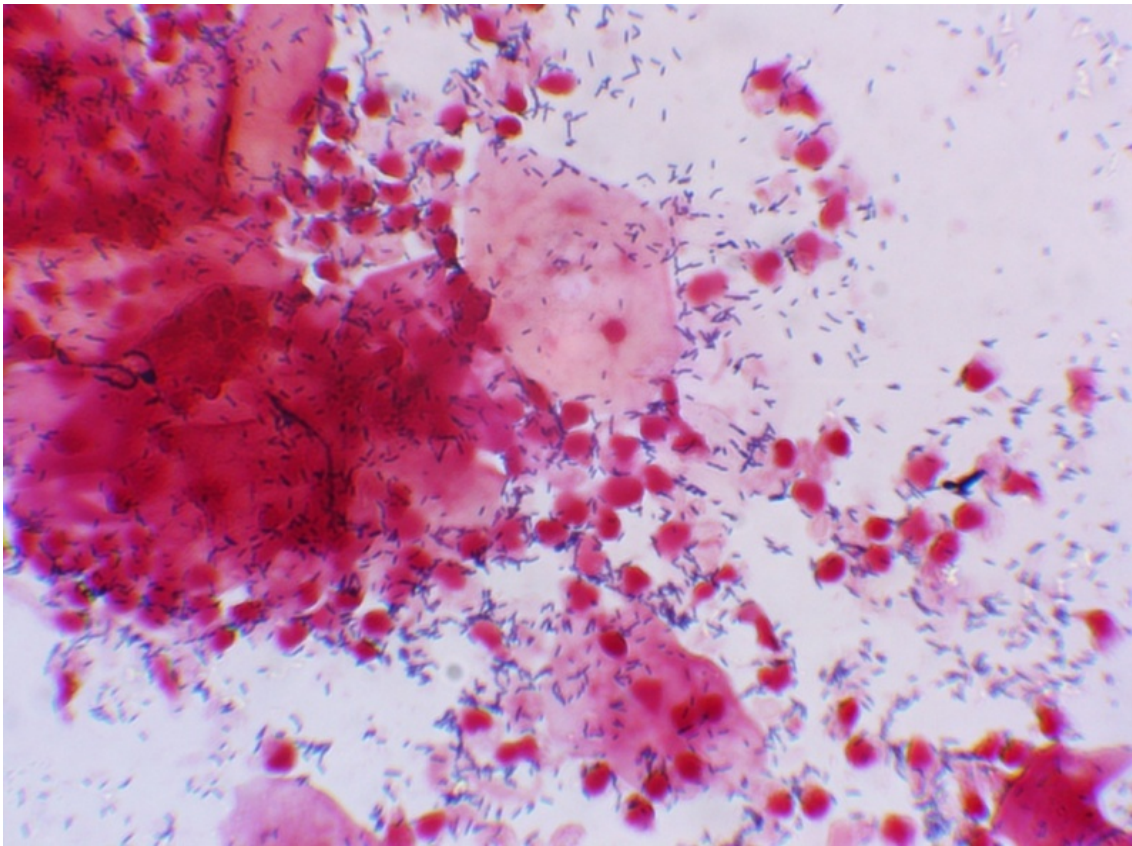
Приликом прегледа нативних (Слика 29, 30) и препарата по Граму (Слика 31, 32) детектовали смо и присуство рода *Candida spp.* на увељичању x 200, x 400 и x 1000. Будући да је нативни препарат прегледан само једанпут приликом детекције вагиналних дисбиоза, на Грам препарату бележено је и присуство гљивица. На основу оба препарата доносили смо коначну процену о присуству рода *Candida spp.*



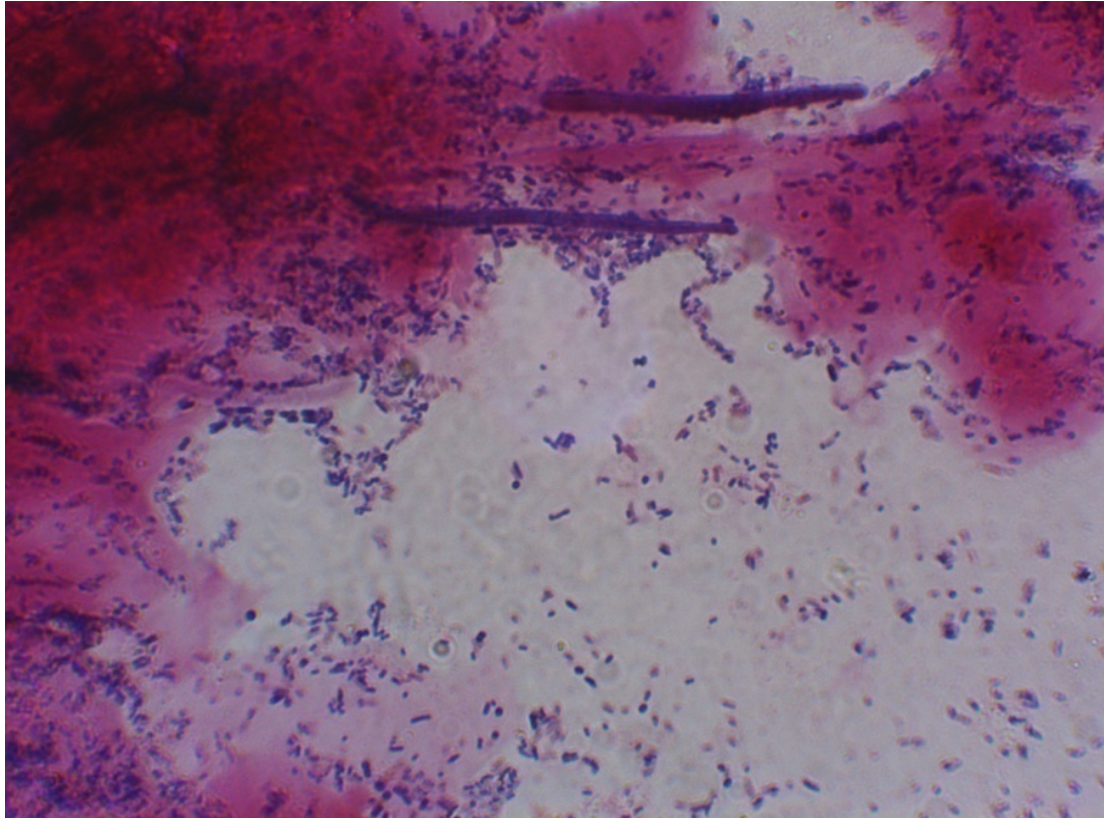
Слика 29. *Candida spp.* на нативном препарату, увеличање x 400



Слика 30. *Candida spp.* на нативном препарату, увеличање x 1000



Слика 31. Нормалан налаз са *Candida spp.* између епителних ћелија (бројни ПМН),  
Грам препарат увеличање x 400



Слика 32. Бактеријска вагиноза и *Candida spp.*, Грам препарат увеличање x 400

### 3. Молекуларна дијагностика

#### 3.1. Дијагностика бактеријске вагинозе

За дијагностику бактеријске вагинозе коришћен је вагинални брис који је засејаван у транспортни медијум, вортексован и чуван у замрзивачу на  $-20^{\circ}\text{C}$  до процеса екстрације ДНК. Екстракција је вршена комерцијалним китом DNA-sorb-AM (*Ampli Sens*).

Протокол екстракције:

1. Пре почетка рада загревавати лизис-пуфер на температури  $60-65^{\circ}\text{C}$ , како би се отопи кристали и извадили узорке да се отопе уколико су били замрзнути.
2. Припремити стерилне епендорфице (1.5 ml) у зависности од броја узорака и контрола и обележити их.
3. Сипати 300  $\mu\text{l}$  пуфера у сваку епендорфицу.
4. Вортексовати све отопљене узорке и ставити 100  $\mu\text{l}$  у одговарајућу обележену епендорфицу.
5. Сипати 100  $\mu\text{l}$  негативне контроле у обележену епендорфицу.
6. У сваку епендорфицу сипати 10  $\mu\text{l}$  интерне контроле.
7. Извортексовати универзални сорбент. У све узорке и негативну контролу сипати 20  $\mu\text{l}$ .
8. Извортексовати све епендорфице и контролу.
9. Инкубирати све епендорфице 5 минута на  $65^{\circ}\text{C}$ .
10. Након инкубације извортексовати све епендорфице и оставити да одстоје 2 минута на собној температури.
11. Центрифугирати епендорфице на 10 000 rpm 30 секунди и пажљиво стерилним наставком извући супернатант без додиривања талога. За сваки узорак користити нови стерилни наставак.
12. Додати 1 ml пуфера за испирање у сваку епендорфицу. Вортексовати до потпуне ресуспензије сорбента.
13. Поновити корак 11.
14. Инкубирати све епендорфице на  $65^{\circ}\text{C}$  5–10 минута са отвореним поклопцима (док се талог не осуши).
15. Додати 100  $\mu\text{l}$  ТЕ-пуфера за ДНК екстракцију. Вортексовати до потпуне ресуспензије талога. Инкубирати све епендорфице на  $65^{\circ}\text{C}$ , 5–10 минута.
16. Центрифугирати све епендорфице на 12 000 rpm 2 минута. Супернатант садржи пречишћену ДНК. Узорци су спремни за PCR амплификацију. Пажљиво пребацити супернатант из епендорфица. Уколико је супернатант замућен, центрифугирати узорак поново до преципитације талога. Изолована ДНК се може чувати недељу дана на  $2-8^{\circ}\text{C}$  или на  $-20^{\circ}\text{C}$  годину дана.

### 3.2. RT PCR тест за дијагностику бактеријске вагинозе

Коришћен RT PCR тест за детекцију и квантификацију *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacilus spp.* и укупне концентрација ДНК бактерија (*AmpliSensFlorocenosis/Bacterial vaginosis* – FRT). Апарат који је коришћен је *real-time* RT PCR, *SaCycler-96* (*Sacace Biotecnologies, Italy*).

Протокол амплификације:

1. Припремити одговарајући број епендорфица (0.2 ml) за PCR плочу.
2. Припремити мастер микс у једној епендорфици у зависности од броја узорака, контрола и стандарда (10\*N PCR-mix 1, 5\*N PCR-mix 2, 0.5\*N Taq Polymerase).
3. Додати 15 µl реакционог микса у сваку епендорфицу рачунајући контроле и стандарде.
4. Додати 10 µl изоловане ДНК у одговарајуће епендорфице.
5. У епендорфицу за стандарде додати по 10 µl QS1 и QS2 у дупликату.
6. Додати 10 µl негативне контроле за амплификацију у одговарајућу епендорфицу.
8. Затворити све епендорфице и пребацити у PCR плочу.

Табела 6. Температурни профил PCR реакције

Температура °C	Време	Циклуси
95	15 мин.	1
95	5 с	5
60	20 с	
72	15 с	
95	5 с	
60	30 с детекција флуоресцентног сигнала	40
72	15 с	

*G. vaginalis* је детектована на FAM/Green, *A. vaginae* на JOE/Yellow/HEX/Cy3, *Lactobacilus spp.* на ROX/Orange/TexasREDA укупна концентрације ДНК на Cy5/Red каналу.

#### 3.2.1. Интерпретација резултата

Након завршене PCR реакције уз помоћ *Miscrosoft Excel* софтвера према алгоритму произвођача израчунавали смо три коефицијената на основу концентрација *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacili spp.* и укупне концентрација ДНК бактерија.

#### 3.2.2. Рачунски алгоритам

**RC1 коефицијент** – представља релативне концентрације *Lactobacilus spp.* (Lac) и анаеробних микроорганизама (*G. vaginalis* + *A. vaginae* (Gv + Av)). Израчунава се као разлика између логаритама ДНК концентрације специфичних микроорганизама.

$$RC1 = \log (\text{Lac DNK}) - \log (\text{Gv} + \text{Av DNK})$$

**RC2 коефицијент** – представља релативну концентрацију укупног броја бактерија (*Bac*) и *Lactobacilus spp.* (*Lac*). Израчунава се као разлика између логаритама ДНК концентрације специфичних микроорганизама.

$$RC2 = \log (Bac\ DNK) - \log (Lac\ DNK)$$

**RC3 коефицијент** – представља релативну концентрацију укупног броја бактерија (*Bac*) и анаеробних микроорганизама (*G. vaginalis* + *A. vaginae* (*Gv* + *Av*)). Израчунава се као разлика између логаритама ДНК концентрације специфичних микроорганизама.

$$RC3 = \log (Bac\ DNK) - \log (Gv + Av\ DNK)$$

На основу вредности датих коефицијената (*RC1*, *RC2*, *RC3*) узорци се сврставају у 6 категорија:

1. Релативна концентрација микробне ДНК кореспондира са бактеријском вагинозом ( $KC1 < 0.5$ );
2. Релативна концентрација микробне ДНК не кореспондира са бактеријском вагинозом ( $KC1 > 1$ );
3. Релативна концентрација микробне ДНК кореспондира са интермедијерном флором ( $0.5 \leq KC1 \leq 1$ );
4. Релативна концентрација микробне ДНК кореспондира са поремећајем флоре неспецифичне етиологије ( $KC2 > 1$ ,  $KC3 > 2$ , било која *KC1* вредност);
5. Низак ниво копија ( $KC1 > 1$ , тако да се сматра да је узорак БВ негативан, а укупна количина бактеријске ДНК је у концентрацијама између  $10^5$ – $10^6$  копија/мл). Приликом анализе резултата испитанице са ниским нивоом копија сврставали смо у групу са нормалном флором;
6. Недовољан број копија за анализу (укупна количина бактеријске ДНК мања је од  $10^5$  копија/мл).

### 3.3. Детекција сексуално преносивих инфекција

За детекцију СПИ коришћена су 4 мултиплекс RT PCR теста. Као узорак коришћен је један цервикални брис. За екстракцију ДНК употребљен је комерцијални кит DNA – *Sorb-A* (*Sacace Biotechnologies*). Процедура овог комерцијалног кита мало се разликује од кита који је коришћен за изолацију ДНК за детекцију бактеријске вагинозе.

Протокол екстракције:

1. Пре почетка рада загрејати лизис и раствор за испирање на температури 60–65°C због нестанка кристала и извадити узорке да се отопају уколико су били замрзнути.
2. Припремити стерилне епендорфице (1.5 ml) у зависности од броја узорака и контрола и обележити их.
3. Сипати 300  $\mu$ l лизиса у сваку епендорфицу.
4. Вортексовати све отопљене узорке и ставити 100  $\mu$ l у одговарајућу обележену епендорфицу.
5. Сипати 100  $\mu$ l негативне контроле у обележену епендорфицу.
6. У сваку епендорфицу сипати 10  $\mu$ l интерне контроле.
7. Вортексовати све узорке и ставити у парно купатило 5 минута на 65°C.
8. Извортексовати универзални сорбент и у све узорке и негативну контролу сипати 20  $\mu$ l.
9. Извортексовати све епендорфице и контролу.
10. Вортексовати све узорке и оставити на собној температури 3 минута. Поновити још једном исти корак.
11. Центрифугирати све епендорфице 30 секунди на 5000 g и пажљиво стерилним наставком извући супернатант без додиривања талога. За сваки узорак користити нови стерилни наставкак.
12. Додати 500 ml пуфера за испирање у сваку епендорфицу. Вортексовати до потпуне ресуспензије сорбента. Центрифугирати 1 минут на 10000 g и пажљиво стерилним наставком извући супернатант без додиривања талога.
13. Поновити корак 12.
14. Инкубирати све епендорфице на 65°C, 5–10 минута, са отвореним поклопцима (док се талог не осуши).
15. Додати 100  $\mu$ l ТЕ-пуфера за ДНК екстракцију. Вортексовати до потпуне ресуспензије талога. Инкубирати све епендорфице на 65°C, 5–10 минута, уз повремено вортексовање.
16. Центрифугирати све епендорфице на 12 000 rpm 2 минута. Супернатант садржи пречишћену ДНК. Узорци су спремни за PCR амплификацију. Пажљиво пребацити супернатант уз епендорфице. Уколико је супернатант замућен, центрифугирати узорак поново до преципитације талога. Изолована ДНК се може чувати 5 дана на 2–8°C или на –20/80°C годину дана.



### 3.4. Тестови за детекцију СПИ

Коришћена су 4 RT PCR мултиплекс теста за детекцију СПИ. Три квалитативна теста PCR *Chlamydia trachomatis/ Ureaplasma/ M. genitalium /M. hominis*, PCR *T. vaginalis/N. gonorrhoeae* и PCR HSV-1/HSV-2 (*Sacace Biotechnology*) и један квантитативан тест PCR HPV *High Risk Screen Quant* за квантитативну детекцију 12 вискоризичних типова HPV вируса (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 – *Sacace Biotechnology*).

Након изолације ДНК припреман је мастер микс за амплификацију укупног реакционог волумена 25  $\mu$ l. Протокол за све тестове је исти:

1. Припремити одговарајући број епендорфица (0.2 ml) за PCR плочу.
2. Припремити мастер микс у једној епендорфици у зависности од броја узорака, контрола и стандарда (10\*N PCR-mix 1, 5\*N PCR-mix 2, 0.5\*N *Taq Polymerase*).
3. Додати 15  $\mu$ l реакционог микса у сваку епендорфицу рачунајући контроле и стандарде.
4. Додати 10  $\mu$ l изоловане ДНК у одговарајуће епендорфице.
5. Додати 10  $\mu$ l позитивне контроле у одговарајућу епендорфицу.
6. Додати 10  $\mu$ l негативне амплификације у одговарајућу епендорфицу.

*C. trachomatis* је детектована на FAM/Green, *Ureaplasma spp.* (*U. parvum* и *U. urealyticum*) на JOE/Yellow/HEX/, *M. genitalum* на ROX/Orange, *M. hominis* на Cy5/Red, а интерна контрола на Cy5.5 флуоресцентном каналу.

*T. vaginalis* је детектована на FAM/Green, *N. gonorrhoeae* на JOE/Yellow/HEX/Cy3 а интерна контрола на ROX/Orange флуоресцентном каналу.

HSV-2 је детектована на FAM/Green, HSV-1 на JOE/Yellow/HEX/Cy3, а интерна контрола на ROX/Orange флуоресцентном каналу.

HPV А9 (16, 31, 33, 35, 52, 58) група је детектована на JOE/Yellow/HEX, HPV А7 група (18, 39, 45, 59) на ROX/Orange, HPV А5/А6 група (51, 56) на Cy5/Red а интерна контрола на FAM/Green флуоресцентном каналу.

Табела 7. Температурни профил за сва четири PCR теста за детекцију СПИ

Температура °C	Време	Циклуси
95	15 мин.	1
95	5 с	5
60	20 с	
72	15 с	
95	5 с	40
60	30 с	
72	детекција флуоресцентног сигнала 15 с	

#### 4. Сређивање резултата за статистичку обраду

С обзиром на чињеницу да смо у нашем истраживању користили више метода за детекцију вагиналних дисбиоза које имају различити број група и критеријума, да бисмо статистички упоредили ове резултате морали смо да смањујемо и припајамо одређене групе. У табелама 8, 9, 10 приказано је како су резултати метода подељени у 2, 3 и 4 групе ради њиховог међусобног поређења.

Табела 8. Подела резултата различитих метода за детекцију вагиналних дисбиоза на две опште групе

Метода	I група – Не(нон)БВ	II група – БВ
Амсел	Нормалан налаз	БВ
Дондерс	I, IIa, IIb, АВ	БВ
Нугент	Нормалан и интермедијаран налаз	БВ
<i>Ison/Hay</i>	Нулта група, нормалан, интермедијаран налаз и група са кокама	БВ
<i>Clays</i>	Нормалан налаз. Група слична нормалној, интермедијарана и леукореа	БВ
НММ	Нормалан налаз ( <i>null, mid, full</i> ), АВ ( <i>null, mid, full</i> )	БВ ( <i>null, mid, full</i> )
RT PCR БВ	Низак и недовољан број копија, нормалан и интермедијаран налаз, поремећај флоре неспецифичне етиологије	БВ

Табела 9. Подела резултата различитих метода за детекцију вагиналних дисбиоза на три групе

Метода	I група – нормалан налаз	II група – интермедијарни налаз (остало)	III група – БВ
Дондерс	I	IIa, IIb, АВ	БВ
Нугент	Нормалан налаз	Интермедијаран налаз	БВ
<i>Ison/Hay</i>	Нулта група и нормалан налаз	Интермедијаран налаз	БВ, група са кокама
<i>Clays</i>	Нормалан налаз, група слична нормалној и леукореа	Интермедијаран налаз	БВ, група са кокама
НММ	Нормалан налаз ( <i>null, mid, full</i> )	АВ ( <i>null, mid, full</i> )	БВ ( <i>null, mid, full</i> )
RT PCR БВ	Нормалан налаз, низак број копија	Интермедијаран налаз, поремећај флоре непознате етиологије, недовољан број копија	БВ

Табела 10. Подела резултата различитих метода за детекцију вагиналних дисбиоза на четири групе

Метода	I група – нормалан налаз	II група – интермедијаран налаз	III група – БВ	IV група – остали (АВ)
Дондерс	I	IIa, IIb	БВ	АВ
RT PCR БВ	Нормалан налаз, низак број копија	Интермедијаран налаз	БВ	поремећај флоре непознате етиологије, недовољан број копија

## 5. Статистичка обрада резултата

За анализу примарних података коришћене су дескриптивне статистичке методе за тестирање статистичких хипотеза и методе за оцену слагања. Од дескриптивних статистичких метода коришћене су мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација) и релативни бројеви (показатељи структуре). Од метода за тестирање статистичких хипотеза коришћени су: хи-квадрат, Фишеров тест тачне вероватноће, *Kruskal-Wallis* тест и *Mann-Whitney* тест. Од метода за оцену слагања коришћени су: *kappa* коефицијент и *Weighted Kappa* коефицијент. Рангирање *kappa* коефицијента вршено је на основу поделе по Алтману (105). (Табела 11) Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности (алфа ниво) од 0.05.

Табела 11. Рангирање *kappa* коефицијент категоризацијом по Алтману

Вредност <i>kappa</i> коефицијента	Степен слагања
<0,40	Слабо
0,41–0,60	Умерено
0,61–0,80	Добро
0,81–0,92	Веома добро
>0,93	Одлично

Резултати су приказани табеларно и графички. Сви подаци су обрађени у IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) софтерском пакету или у R програмском окружењу (R Core Team, 2019).

## IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

У истраживању је учествовало 235 пацијенткиња у репродуктивном добу. Просечна старост испитаница износила 29.39 ( $\pm 6,685$ ) док је број трудница 41 (17,4%). Дијагноза вагиналних дисбиоза (бактеријске вагинозе и аеробног вагинитиса) извршена је различитим клиничким (Амсел), микроскопским (Нугент, *Ison/Hay*, *Clays*, Дондерс и НММ) и молекуларним методама (RT PCR).

### 1. Дијагностика вагиналних дисбиоза клиничким и микроскопским критеријумима

Општи преглед резултата добијених клиничким и микроскопским методама за дијагностику вагиналних дисбиоза приказан је у Табели 12. Пошто се Нугентови критеријуми користе као „златни стандард” у највећем броју научно-истраживачких радова у нашем истраживању све клиничке и микроскопске методе смо упоредили са овом методом.

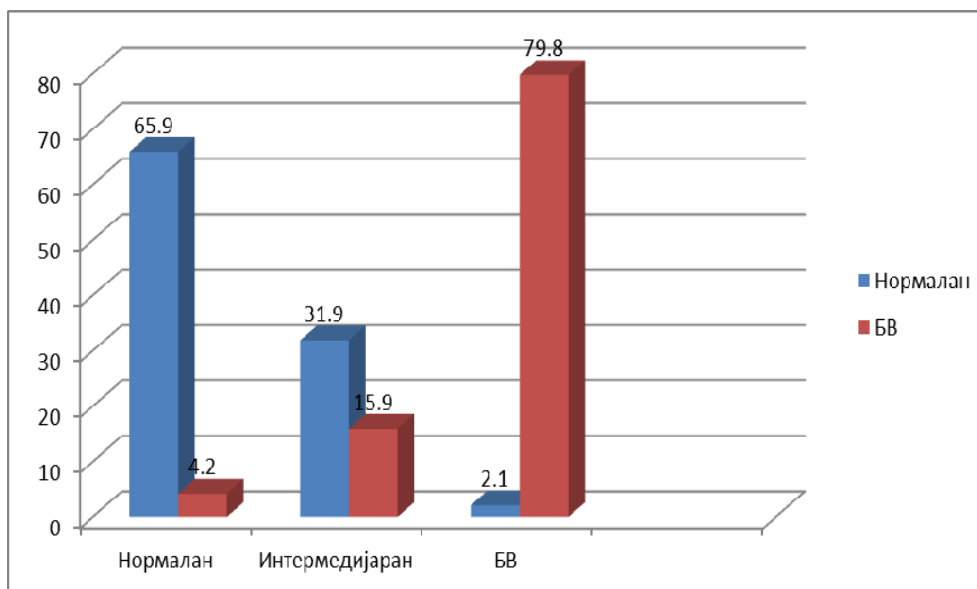
Табела 12. Резултати микроскопских и клиничких критеријума у дијагностици вагиналних дисбиоза

Критеријуми	Нор. налаз	БВ	Интер. налаз	Нулта група	Коке Аеробни вагинитис	<i>I-Like</i> (слична нор.)	Идиопатска леукореа
Амсел ориг.	162 (68,9%)	73 (31%)					
Амсел модиф.	141 (60%)	94 (40%)					
Нугент	97 (41,3%)	78 (33,1%)	60 (25,5%)				
<i>Ison/Hay</i>	95 (40,4%)	76 (32,3%)	50 (21,3%)	10 (4,2%)	4 (1,7%)		
<i>Clays</i>	88 (37,4%)	80 (34%)	53 (22,5%)			10 (4,2%)	4 (1,7%)
НММ	123 (52,3%)	97 (41,3%)			15 (6,4%)		
Дондерс	64 (27,2%)	82 (34,9%)	69 (29,3%)		20 (8,5%)		

На основу оригиналне Амселове методе која у обзир узима 4 критеријума добијени су следећи резултати: у групу здравих сврстано је 162 (68,9%) док је у групу БВ сврстано 73 (31%) пацијенткиња. Модификованим Амселовим критеријумима у групу нормалних налаза сврстано је 141 (60%) пацијенткиња а у групу БВ 94 (40%). Поређењем оригиналне и модификоване методе добили смо статистички значајну разлику ( $\chi^2 = 158,843$ ;  $p < 0,001$ ). Због тога смо у даљем истраживању и поређењу са осталим методама користили модификоване Амселове критеријуме.

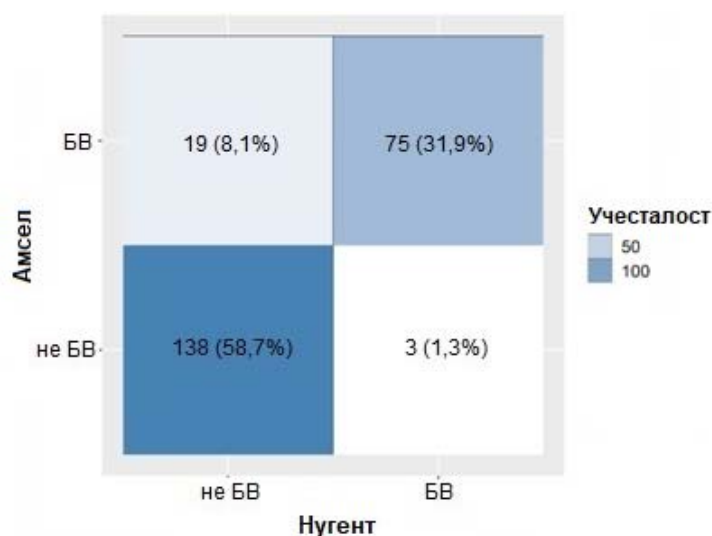
### 1.1. Поређење резултата добијених Нугентовом методом и модификованим Амселовим критеријумима

Поређење између Амсела и Нугента приказано је на графикону 1. Највеће подударане између метода је код испитаница са БВ. Наши резултати показују да чак 45 (31,9%) пацијенткиња са нормалним налазом и 15 (15,9%) са БВ добијених Амселовим критеријумима Нугентовом методом сврстаном у интермедијарну групу (Графикон 1).



Графикон 1. Поређење између Нугентове и Амселове методе

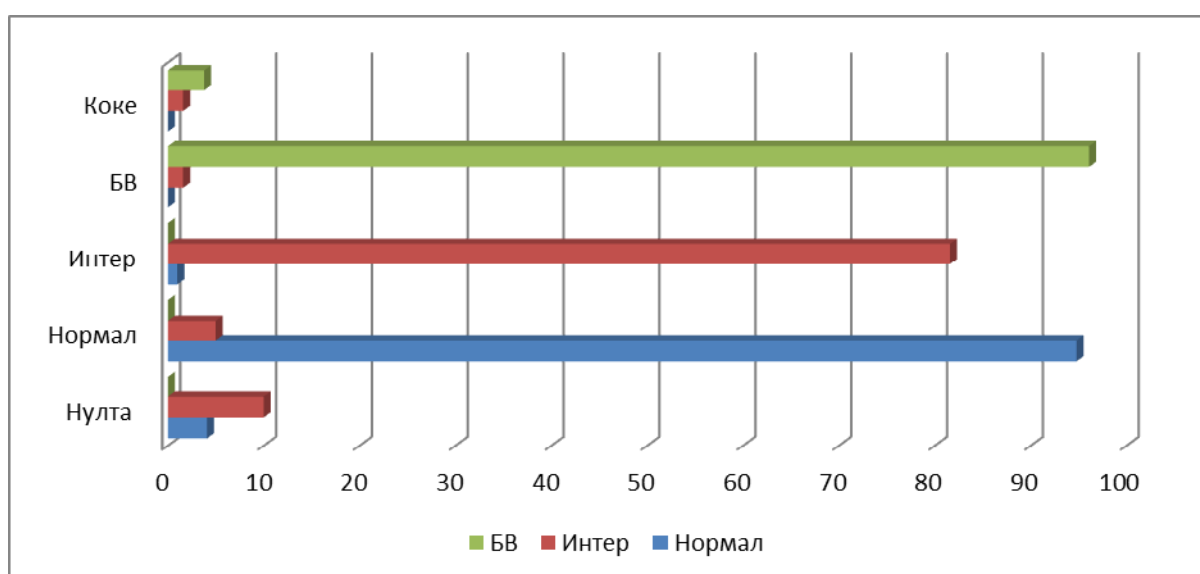
Да бисмо статистички упоредили ове две методе интермедијарне и нормалне налазе припојили смо у једну групу (не БВ). (Слика 33) Слагање између Амселове и Нугентове методе је добро ( $кappa = 0,80$ ). Укупно слагање између метода је 90,6%. Сензитивност Амселове методе у нашем истраживању износи 82,05% док је специфичност 94,27%.



Слика 33. Слагање између Нугентове и Амселове методе када су подељене на две групе (БВ и не БВ)

## 1.2. Поређење резултата добијених Нугентовим и *Ison/Hay* критеријумима

Резултати поређења између ове две методе приказани су на графикону 2. У случају нормалних, интермедијарних и налаза БВ постоји добро слагање две методе. *Ison/Hay* метода поред три постојеће групе уводи и две нове (нулта група и коке). Овом методом чист налаз без присуства бактерија детектован је код 10 (4,2%) пацијенткиња, док је у групу кока сврстано 4 (1,7%) жена. Уколико упоредимо налазе видимо да је нулту групу добијену *Ison/Hay* методом Нугентовм свртано у 6 (10%) интермедијарних, а 4 (4,1%) као нормалан налаз. Што се тиче групе кока 3 (3,8%) испитанице је Нугентовом методом сврстано у БВ, а 1 (1,6%) у интермедијарни налаз.

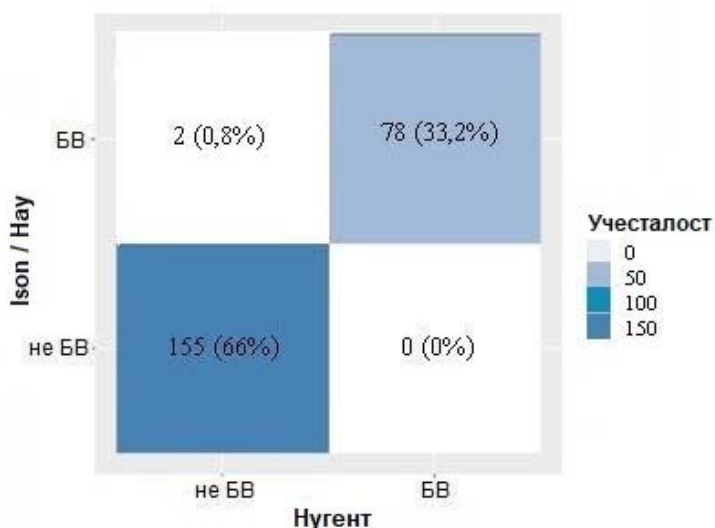


Графикон 2. Резултати поређења *Ison/Hay* и Нугентове методе

Статистичко поређење ове две методе захтевало је да се модификују *Ison/Hay* критеријуми – уместо 5 категорија испитанице су подељене у 3 групе. (Слика 34). Чист налаз је припојен нормалном, а група коке, групи БВ. Слагање између модификоване *Ison/Hay* и Нугентове методе када поредимо три групе је одлично са *kappa* коефицијентом 0,95, а укупно слагање износи 94,9%. Када поредимо слагање ове две методе, подељене у две групе (БВ и не БВ) тада *kappa* вредност износи 0,98 а укупно слагање је 99,1% (Слика 35). Специфичност *Ison/Hay* методе износи 100% док је сензитивност 98,73%.



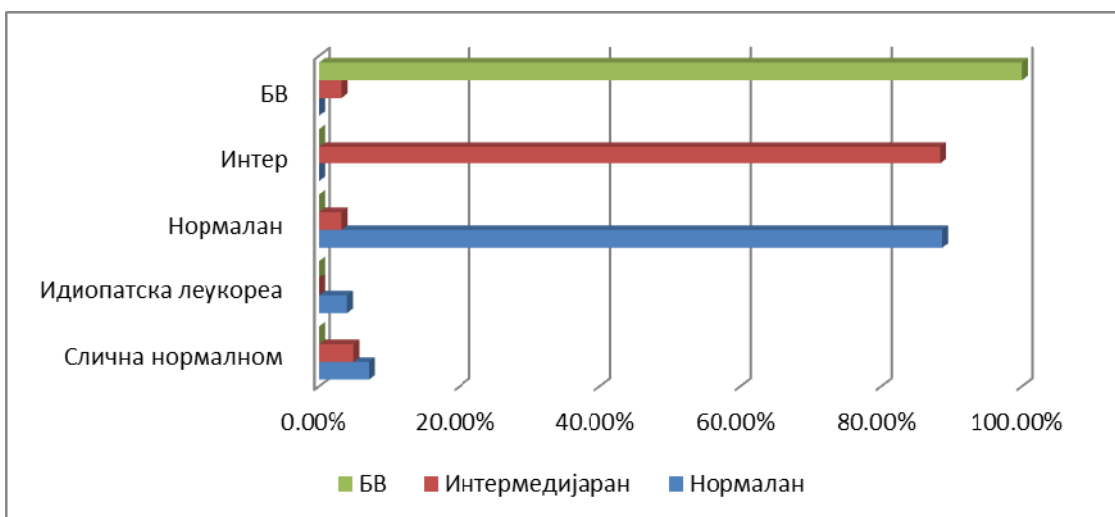
Слика 34. Слагање између Нугентове и Ison/Hay методе када су подељене на три групе (нормалан налаз, интермедијаран налаз и БВ)



Слика 35. Слагање између Нугентове и Ison/Hay методе када су подељене на две групе (БВ и не БВ)

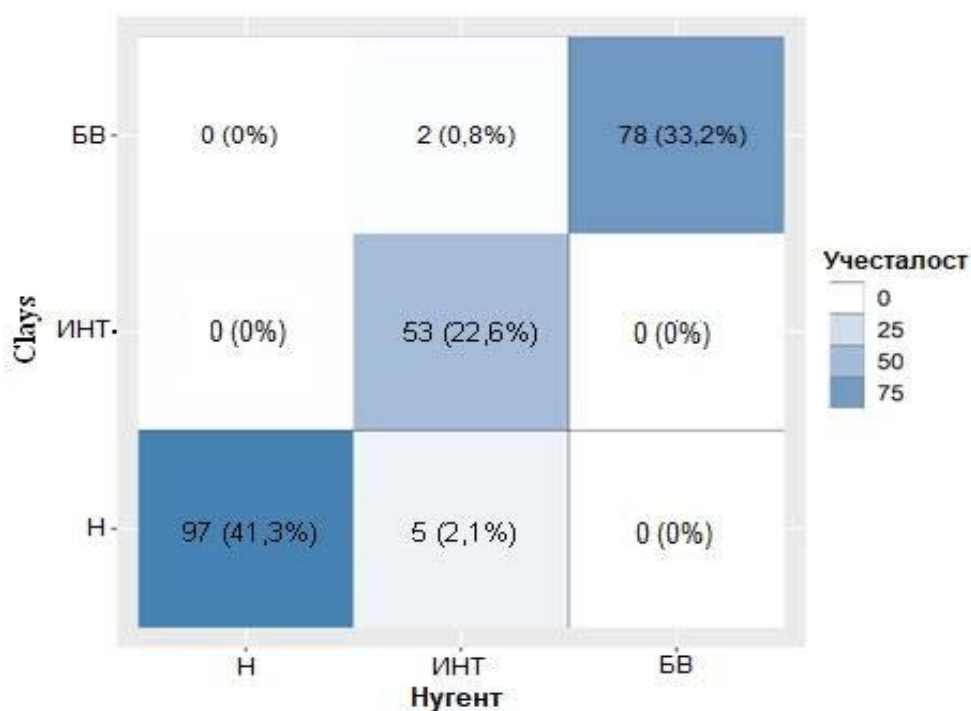
### 1.3. Поређење резултата добијених Нугентовим и Clays критеријумима

Clays метода представља модификацију Ison/Hay методе, само што се у овој подели не постоји нулта група. Аутори методе у своју поделу уводе две нове групе – *I-like* и идиооптска леукореја. Слагање између Нугент и Clays методе је добро у случају нормалног, интермедијарног и БВ налаза. (Графикон 3) Од 10 *I-like* налаза добијених Clays методом, Нугентовом методом ове испитанице су сврстане у нормалне 7 (7,2%) и интермедијарне 3 (5%). Четири пацијенткиње са идиопатском леукорејом, Нугентовом методом распоређени су као нормалан налаз. Налаз кока методом по Clays-у, за разлику од Ison/Hay методе, није детектован ни код једне пацијенткиње.



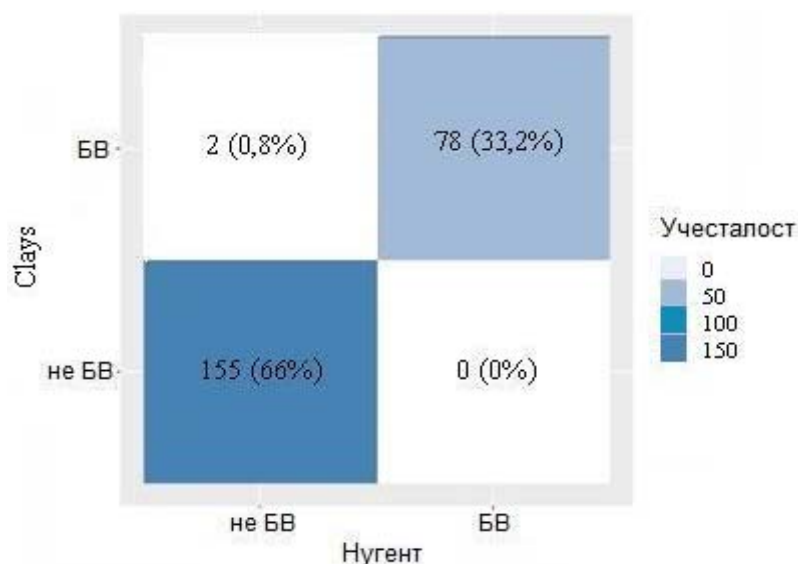
Графикон 3. Резултати поређења Clays и Нугентове методе

Слично као код *Ison/Hay* методе, слагање између Нугента и модификоване *Clays* методе је одлично ( $кара = 0,97$ ), када поредимо три групе (Слика 36). Идиопатска леукореа и *I-like* група због поређења са Нугентом сврстане су у нормалан налаз. Укупно слагање између метода је 97%. Када упоредимо методе ако су налази смањени на две групе (БВ и не БВ) тада  $кара$  коефицијент износи 0.98, а укупно слагање је 99,1%. (Слика 37) Специфичност *Clays* методе износи 100% док је сензитивност 98,73%.



Слика 36. Слагање између Нугентове и Clays методе када су подељене на три групе (нормалан налаз, интермедијаран налаз и БВ)

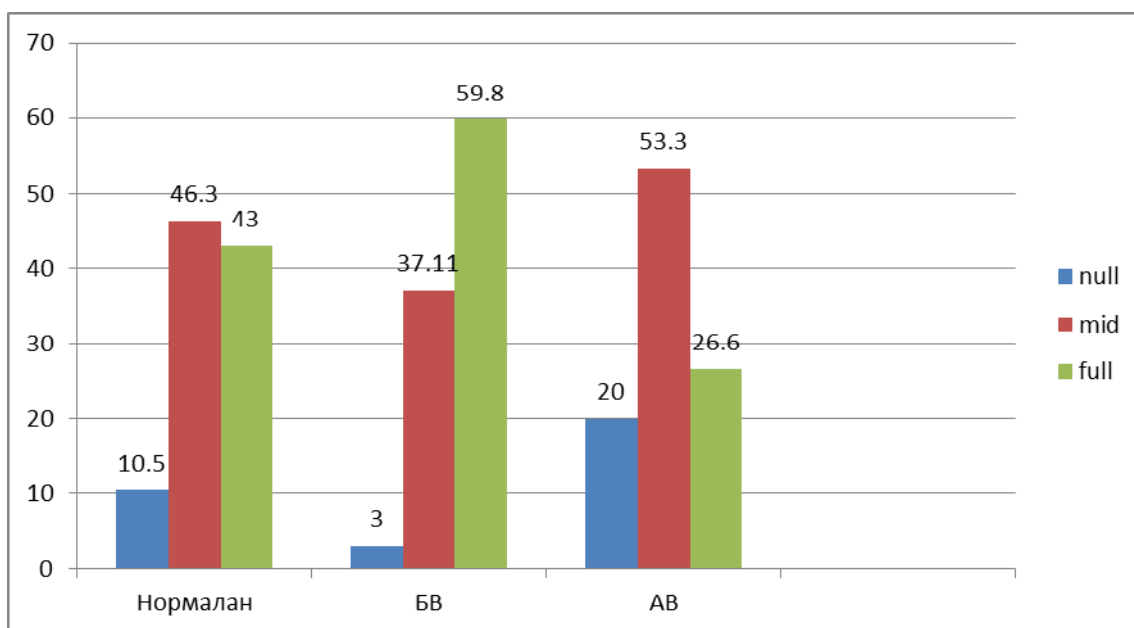




Слика 37. Слагање између Хугентове и Clays методе када су подељене на две групе (БВ и не БВ)

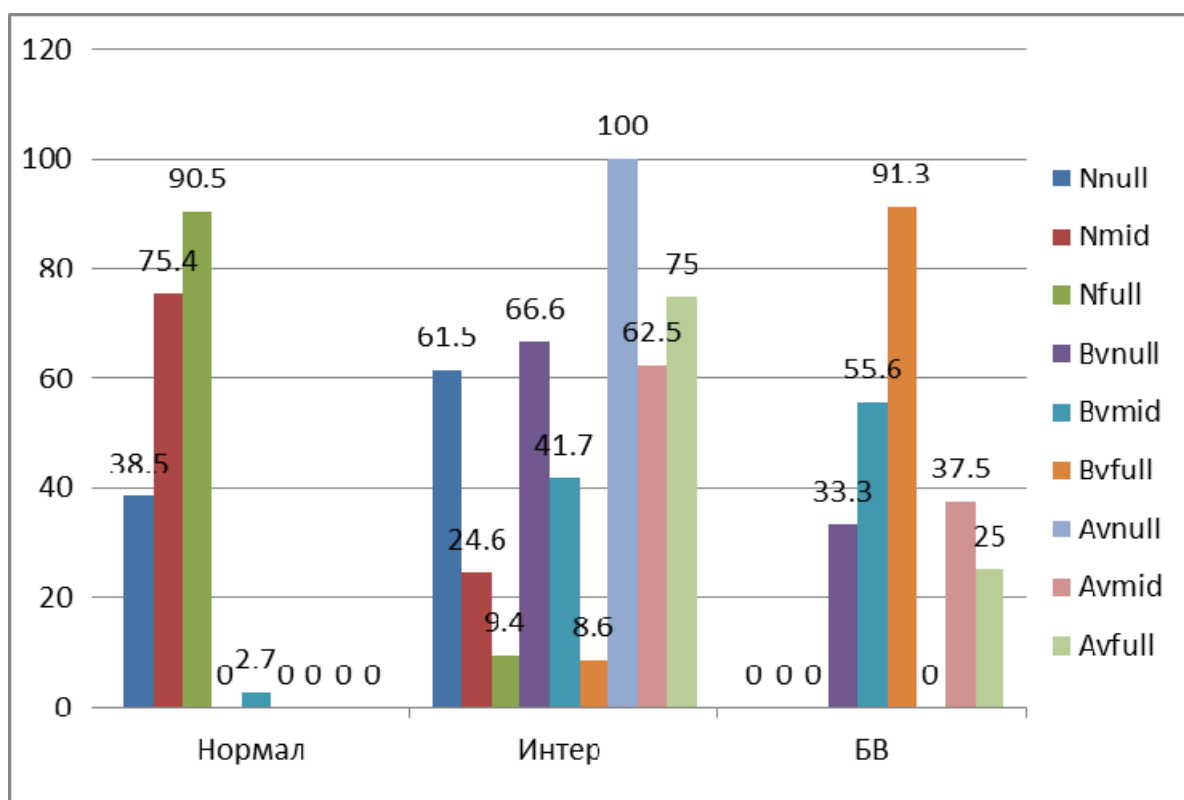
#### 1.4. Поређење резултата добијених Хугентовим и новом микроскопском методом

Нова микроскопска метода је семиквантитативна метода којом се врши евалуација микроскопских препарата на увећању  $\times 200$ . На основу целуларности (односно присуства броја и врсте присутних морфитипова) препарати се класификују као нормални налаз (*nul*, *mid* и *full*), БВ (*nul*, *mid* и *full*) и АВ (*nul*, *mid* и *full*). Овом методом добијено је 123 (52,3%) нормалних налаза, 97 (41,3%) БВ и 15 (6,4%) АВ. Резултати поделе на основу целуларности приказани су графикону 4.



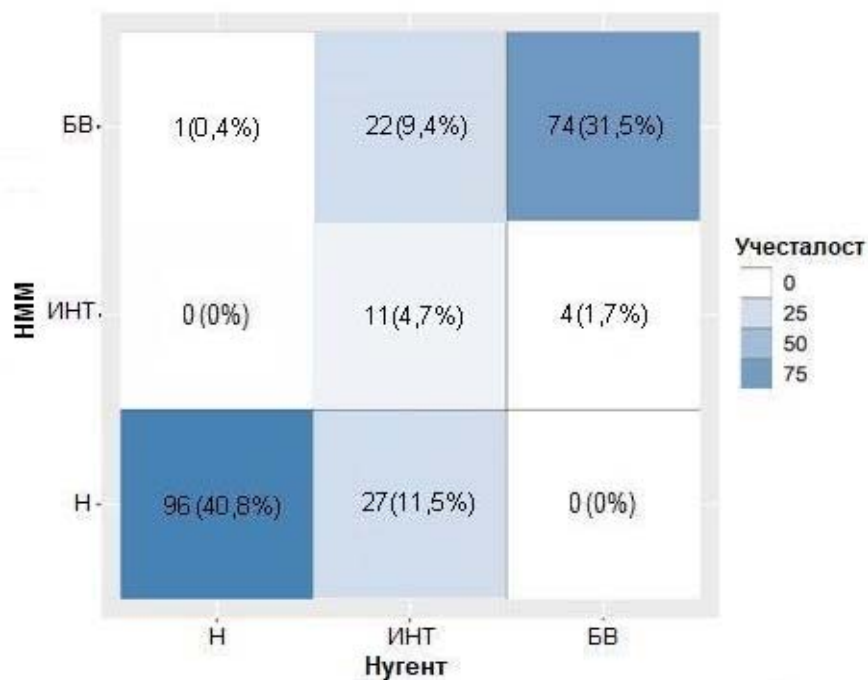
Графикон 4. Резултати нове микроскопске методе – подела у 3 групе и 9 подгрупа на основу целуларности микроскопског препарата (нормалан налаз (*nul*, *mid* и *full*), БВ (*nul*, *mid* и *full*) и АВ (*nul*, *mid* и *full*))

Поређење између Нугента и НММ приказано је на Графикон 5. Резултати показују да је добро слагање између ове две методе између нормалних налаза и БВ. Већина налаза која је НММ сврстана у групу *nil* без обзира да ли је реч о нормалном налазу (61,5%), БВ (66,6%) или АВ (100%) Нугентовом методом је класификовано у интермедијарни налаз. Уколико погледамо налаз АВ добијен НММ он је Нугентовом методом углавном распоређен у интермедијарни налаз а мањим делом у БВ.

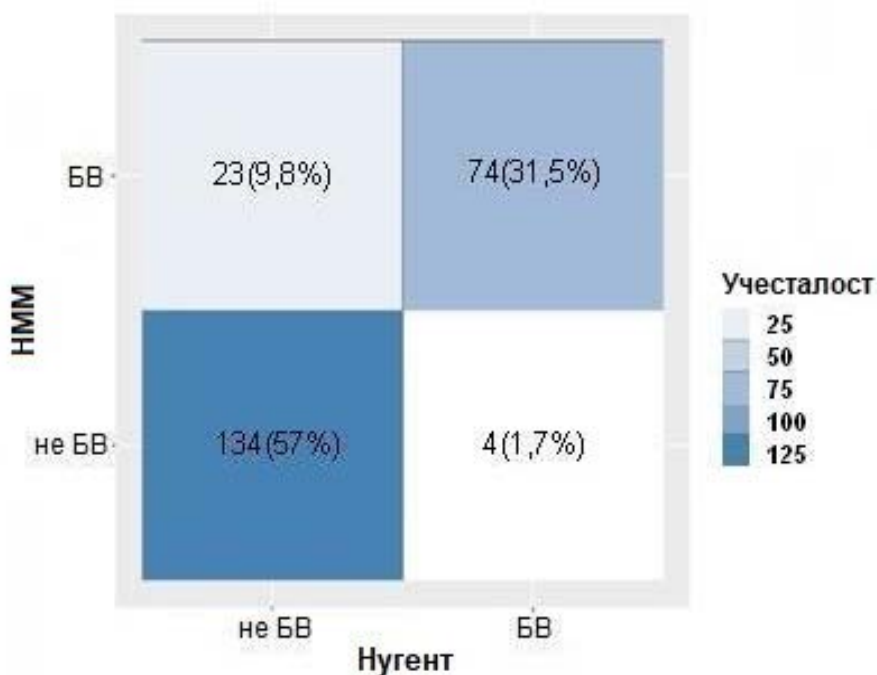


Графикон 5. Резултати поређења Нугентове и нове микроскопске методе

Да бисмо статистички упоредили ове две методе све АВ налазе добијене НММ сврстали смо интермедијарне и на тај начин смо добили да је слагање ове две методе добро ( $каппа = 0,76$ ) а укупно слагање између метода је 77%. (Слика 39) Поређење метода када су смањене на две групе (БВ и не БВ) такође је добро ( $каппа = 0,76$ ) а тада укупно слагање износи 88,5%. (Слика 40) У нашем истраживању специфичност НММ је 85,35% а сензитивност 94,87%.



Слика 39. Слагање између Нугентове и НММ методе када су подељене на три групе (нормалан налаз, интермеђијаран налаз и БВ)

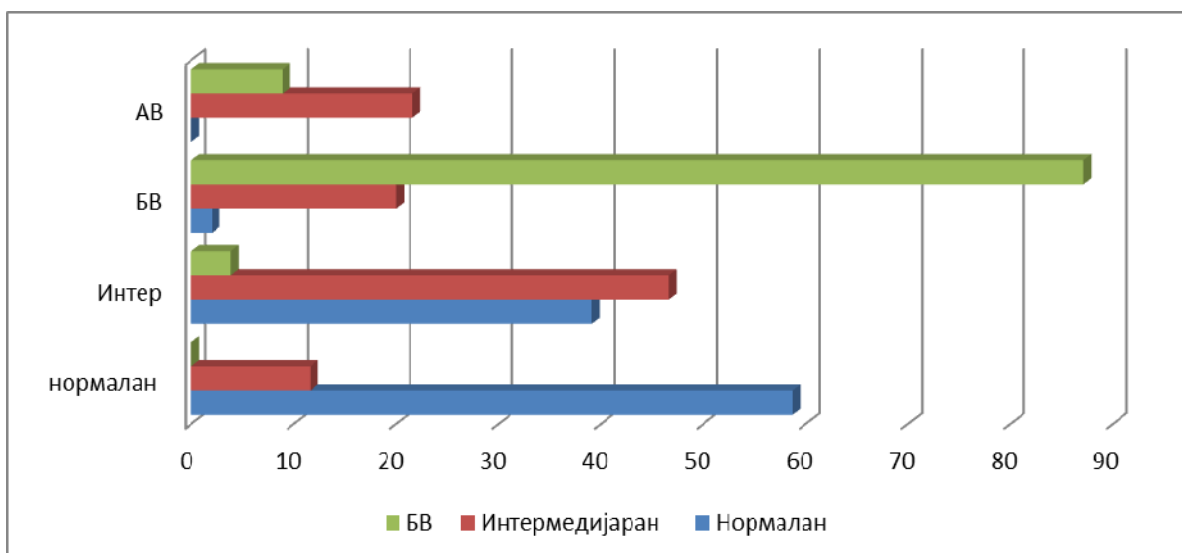


Слика 40. Слагање између Нугентове и НММ методе када су подељене на две групе (БВ и не БВ)

Поред нормалног налаза, БВ и АВ НММ бележили смо присуство још два морфотипа – бифидо и лепто. Прегледом микроскопских препарата НММ детектовали смо 12 (5,1%) пацијенткиња са бифидо, док су лепто форме идентификоване код 2 (0,8%) испитанице. Приликом анализе резултата добијених НММ ова два посебна морфотипа су сматрани нормалним налазима.

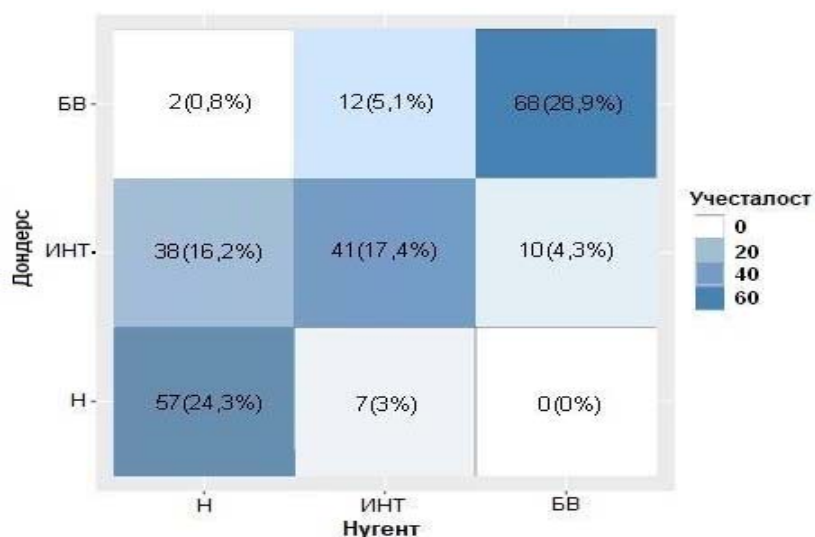
### 1.5. Поређење резултата добијених Нугентовим и Дондерсовим критеријумима

Дондерсовом методом добијено је 64 (27,2%) испитаница са нормалним налазом, 82 (34,9%) са БВ [22 (9,3%) парцијалне и 60 (25,5%) *full*], 69 (29,3%) са интермедијарним налазом [48 (20,4%) Па и 20 (8,5%) Пб], 20 (8,5%) са АВ [7 (3%) блага форма, 5 (2,1%) средња форма, 4 (1,7%) тешка форма и ДИВ 4 (1,7%)]. На графикону 6 приказано је поређење Нугентове и Дондерсове методе. Највећа разлика између ове две методе је у интермедијарном налазу. Интермедијарна група добијена Дондерсовом методом Нугентовом је сврстана као нормална 38 (39,1%), интермедијарна 28 (46,6%) и БВ 3 (3,8%). Налази АВ добијен Дондерсовом методом у највећем броју случајева 13 (21,6%) препознати су Нугентовом методом као интермедијарни налаз или као БВ у 7 (8,9%) случајева.

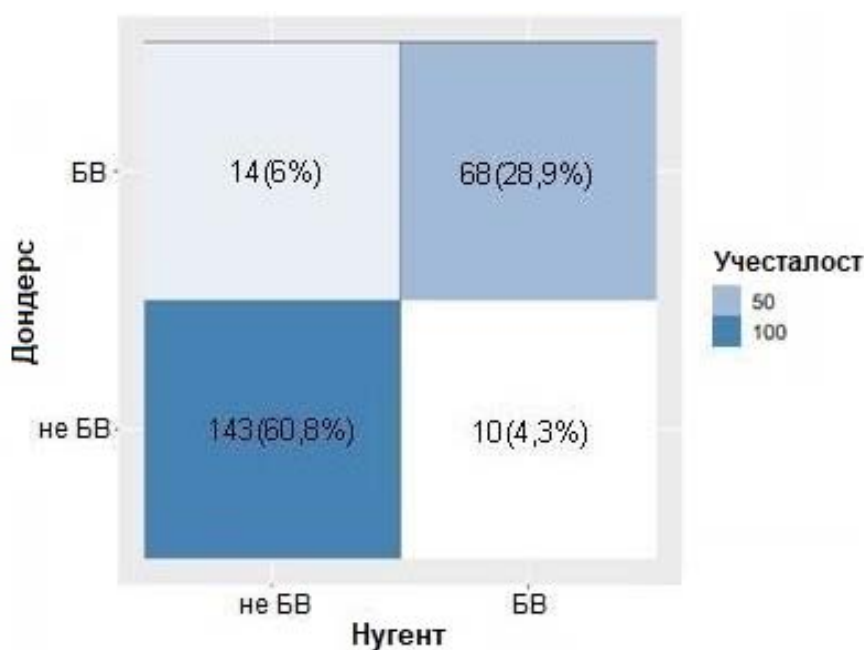


Графикон 6. Резултати поређења Дондерсове и Нугентове методе

Када поредимо слагање са три групе између Нугента и Дондерсове методе оно износи ( $карра = 0,77$ ), а укупно слагање је 70,6%. (Слика 41) Поређењем редукованих група (БВ и не БВ) слагање између ове две методе је такође добро ( $карра = 0,77$ ), док укупно слагање износи 89,8%. (Слика 42) Сензитивност методе по Дондерсу у поређењу са Нугентовом методом је 87,18%, док је специфичност 91,08%.



Слика 41. Слагање између Нугентове и Дондерсове методе када су подељене на три групе (нормалан налаз, интермеђијаран налаз и БВ)



Слика 42. Слагање између Нугентове и Дондерс методе када су подељене на две групе (БВ и не БВ)

### 1.6. Детекција полиморфонуклеарних леукоцита на микроскопском препарату

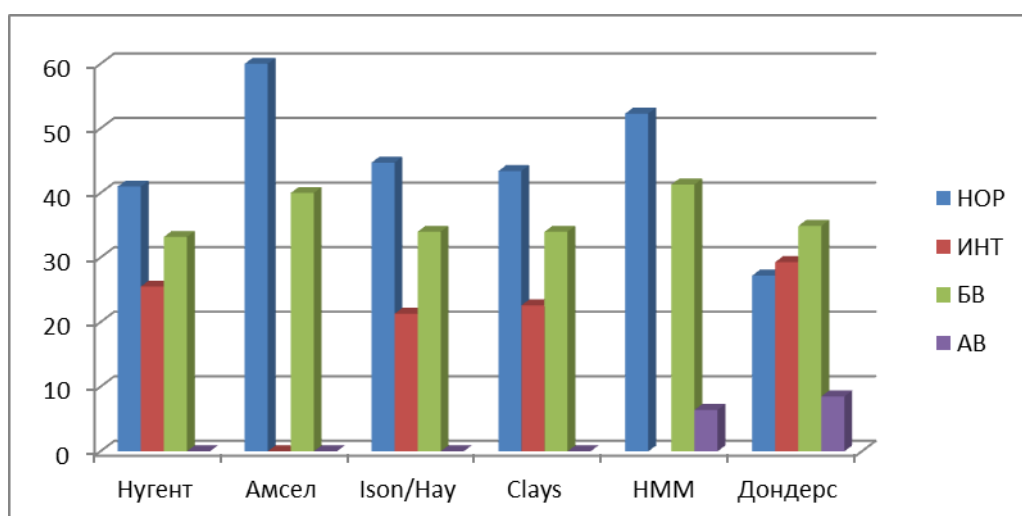
У нашем истраживању прегледом микроскопском препарата ПМН су идентификовани код 62 (26,4%) испитанице, док код 173 (73%) нису присутни или су присутни у малом броју. Наше испитивање показује да је патолошки број ПМН детектован код сваке 4 пацијенткиње. Присуство патолошких ПМН у зависности од стања вагиналне флоре детектоване различитим микроскопским методама приказане су у табели 13. Резултати показују да у свим микроскопским методама патолошки ПМН постоје у налазима испитаница са БВ.

Табела 13. Присуство патолошких полиморфонуклеарних леукоцита у зависности од статуса вагиналне флоре добијене различитим микроскопским методама да детекцију вагиналних дисбиоза

		Број ПМН	
		Нормалан	Патолошки
Нугент	Нор	83 (85,8%)	14 (14,4%)
	Интер	35 (58,3%)	25 (41,7%)
	БВ	55 (70,5%)	23 (29,5%)
Ison/Hay	Нор	87 (82,8%)	18 (17,2%)
	Интер	31 (62%)	19 (38%)
	БВ	55 (68,8%)	25 (31,2%)
Clays	Нор	84 (82,3%)	18 (17,7%)
	Интер	34 (64,1%)	19 (35,8%)
	БВ	55 (68,8%)	25 (31,2%)
Дондерс	Нор	54 (84,3%)	10 (15,6%)
	Интер	51 (73,9%)	18 (26,1%)
	БВ	63 (76,8%)	19 (23,2%)
	АВ	5 (25%)	15 (75%)
НММ	Нор	97 (78,7%)	26 (21,2%)
	АВ	72 (74,2%)	25 (25,8%)
	БВ	4 (26,7%)	11 (73,3%)

## 2. Упоредна анализа метода за дијагностику вагиналних дисбиоза добијених микроскопским и клиничким критеријумима

Анализом свих микроскопских и клиничких метода у нашем истраживању произилази да је највећи проценат испитаница са здравом флором детектован Амселовим критеријумима, док је пацијенткиња са БВ највише детектовано НММ, а интермедијарних налаза Дондерсовом методом. НММ и Дондерсови критеријуми у односу на друге микроскопске методе препознају и АВ. (Графикон 7)



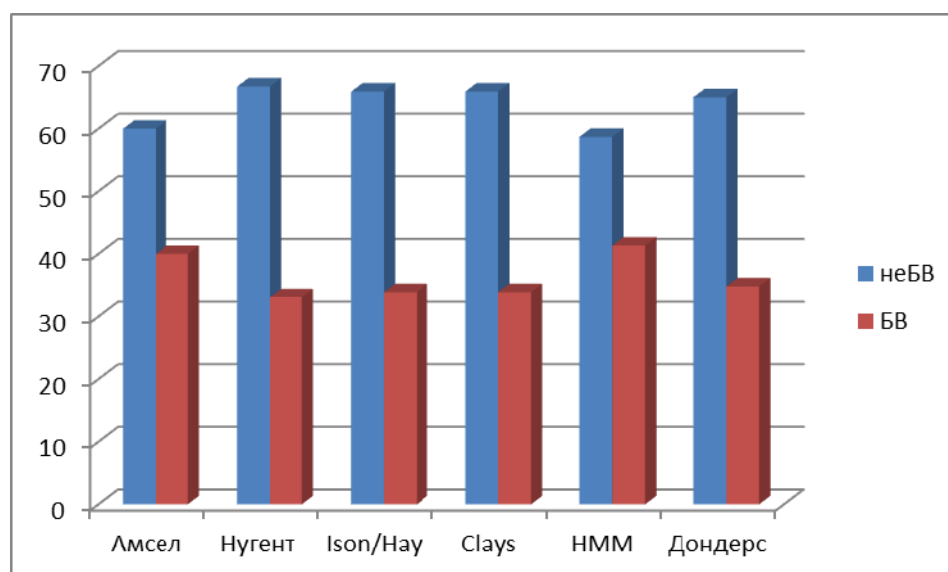
Графикон 7. Резултати поређења клиничких и микроскопских метода за дијагностику вагиналне дисбиозе

Поређења микроскопских и клиничких метода са златним стандардом када је укључена и интермедијарна група приказано је у табели 14. Најбоље укупно слагање са Нугентом имају *Clays* (97%) и *Ison/Hay* метода (94,9%). Приликом поређења били смо приморани да нове групе на коју указују аутори *Clays* и *Ison/Hay* методе распоредимо у постојеће три групе (БВ, здраве и интермедијарне). Укупно слагање између НММ и Дондерса са Нугентовом методом је мање (88,5% и 89%) због постојања АВ које Нугентова метода не препознаје. Дондерс у нашем истраживању детектује највећи број интермедијарних налаза, али се они само код 28 (46%) пацијената преклапају са Нугентовом интермедијарном групом. У највећем броју случајева Нугент Дондерсове интермедијарне налазе распоређује у групу нормалних.

Табела 14. Слагање различитих клиничких и микроскопских метода са Нугентовом методом као златним стандардом. Поређење са три (БВ, интермедијаран и нормалан налаз) и две групе (БВ и сви остали не БВ)

		Амсел	<i>Ison/Hay</i>	<i>Clays</i>	НММ	Дондерс
Три групе (Н, интер, нор)	<i>Карра</i>	–	0,95	0,97	0,76	0,77
	Укупно слагање	–	94,9%	97%	77%	70,6%
Две групе (нон БВ и БВ)	<i>Карра</i>	0,80	0,98	0,98	0,76	0,77
	Укупно слагање	90,6%	99,1%	99,1%	88,5%	89,8%
	Специфичност	94,27%	100%	100%	85,35%	91,08%
	Сензитивност	82,05%	97,5%	97,5%	94,87%	87,18%

Поређење свих клиничких и микроскопских метода када постоје само две групе (БВ и сви остали налази (не БВ)) приказано је на графикону 8. Највећи број БВ детектован је НММ методом 97 (41,3%), па Амселовим критеријумима 94 (40%).



Графикон 8. Резултати поређења клиничких и микроскопских метода за дијагностику вагиналних дисбиоза када су резултати подељени у две групе (БВ и не БВ)

### 3. Комбиновање клиничких и микроскопских налаза за дијагностику вагиналних дисбиоза

У табели 15 приказан је упоредни приказ клиничких критеријума (рН вредност и проба са КОН-ом) са резултатима добијеним различитим микроскопским методама. Код налаза БВ добијене микроскопским методама рН вредност вагине је у већини случајева патолошка (>4,5), а проба са КОН-ом позитивна. Супротно, у нормалним налазима рН вредност је углавном <4,5, а проба са КОН-ом негативна.

Табела 15. Упоредни приказ клиничких критеријума (рН вредност и проба са КОН-ом) и резултатима добијеним различитим микроскопским методама за детекцију вагиналних дисбиоза.

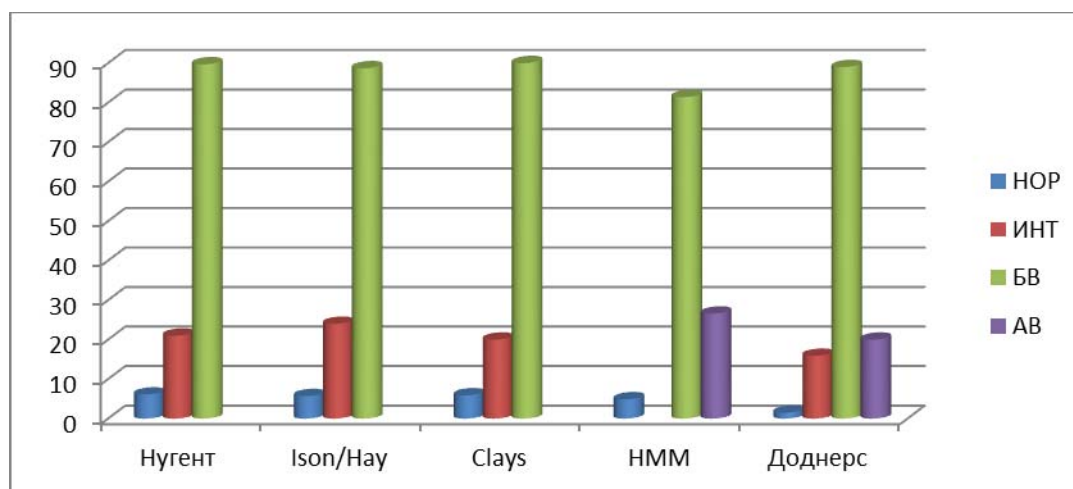
Критеријуми	Нор. налаз		БВ		Интер. налаз		Нулта група		Коке Аеробни вагинитис		I-Like (слична нор.)		Идиопатска леукореа	
Амсел Оригинал	162		73											
	КОН+	17	КОН+	72										
	КОН-	145	КОН-	1										
	рН>4,5	35	рН>4,5	72										
	рН<4,5	127	рН<4,5	1										
Амсел Модиф.	141		94											
	КОН+	4	КОН+	85										
	КОН-	137	КОН-	9										
	рН>4,5	18	рН>4,5	89										
	рН<4,5	123	рН<4,5	5										
Нугент	97		78		60									
	КОН+	6	КОН+	70	КОН+	13								
	КОН-	91	КОН-	8	КОН-	47								
	рН>4,5	7	рН>4,5	71	рН>4,5	29								
	рН<4,5	90	рН<4,5	7	рН<4,5	31								
Ison/Hay	95		76		50		10		4					
	КОН+	7	КОН+	71	КОН+	12	КОН+	1	КОН+	0				
	КОН-	88	КОН-	5	КОН-	38	КОН-	9	КОН-	4				
	рН>4,5	8	рН>4,5	70	рН>4,5	26	рН>4,5	2	рН>4,5	3				
	рН<4,5	87	рН<4,5	6	рН<4,5	24	рН<4,5	8	рН<4,5	1				
Clays	88		80		53						10		4	
	КОН+	7	КОН+	72	КОН+	11					КОН+	0	КОН+	0
	КОН-	81	КОН-	8	КОН-	42					КОН-	10	КОН-	4
	рН>4,5	7	рН>4,5	73	рН>4,5	28					рН>4,5	0	рН>4,5	1
	рН<4,5	81	рН<4,5	7	рН<4,5	25					рН<4,5	10	рН<4,5	3
НММ	123		97						15					
	КОН+	6	КОН+	79					КОН+	4				
	КОН-	117	КОН-	18					КОН-	11				
	рН>4,5	8	рН>4,5	85					рН>4,5	14				
	рН<4,5	115	рН<4,5	12					рН<4,5	1				
Дондерс	64		82		69				20					
	КОН+	1	КОН+	73	КОН+	11			КОН+	4				
	КОН-	63	КОН-	9	КОН-	58			КОН-	16				
	рН>4,5	2	рН>4,5	75	рН>4,5	13			рН>4,5	17				
	рН<4,5	62	рН<4,5	7	рН<4,5	56			рН<4,5	3				



Поређењем присуства позитивне пробе са КОН у зависности од статуса вагиналне флоре добијене различитим микроскопским методама приказана је у табели 16. У свакој микроскопској методи понаособ постоји статистички значајна разлика дистрибуције позитивне пробе са КОН, односно овај тест је позитиван највећим делом код пацијената са БВ (Графикон 9). Битно је уочити да је и код једног дела интемедијарних налаза у микроскопским методама (Нугент 13, *Ison/Hay* 12, *Clays* 11, Дондерс 15) проба са КОН позитивна. Такође, резултати поређења микроскопских и клиничких метода показују да је проба са КОН-ом позитивна и код једног дела испитаница са АВ.

Табела 16. *Поређење резултата пробе са КОН у зависности од стања вагиналне флоре добијене различитим микроскопским методама за детекцију вагиналних дисбиоза*

Проба са КОН				
		негативна	позитивна	р вредност
Нугент	Нор	91 (93,8%)	6 (6,2%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 137,2$
	Интер	47 (78,3%)	13 (21,7%)	
	БВ	8 (10,3%)	70 (89,7%)	
<i>Ison/Hay</i>	Нор	99 (94,3%)	6 (5,7%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 138,2$
	Интер	38 (76%)	12 (24%)	
	БВ	9 (18,3%)	71 (88,8%)	
<i>Clays</i>	Нор	96 (94,1%)	6 (5,9%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 143,3$
	Интер	42 (79,2%)	11 (20,8%)	
	БВ	8 (10%)	72 (90%)	
Дондерс	Нор	63 (98,4%)	1 (1,6%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 143,8$
	Интер и АВ	74 (83,1%)	15 (16,9%)	
	БВ	9 (11%)	73 (89%)	
НММ	Нор	117 (95,1%)	6 (4,9%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 135,9$
	АВ	11 (73,3%)	4 (26,7%)	
	БВ	18 (18,6%)	79 (81,4%)	

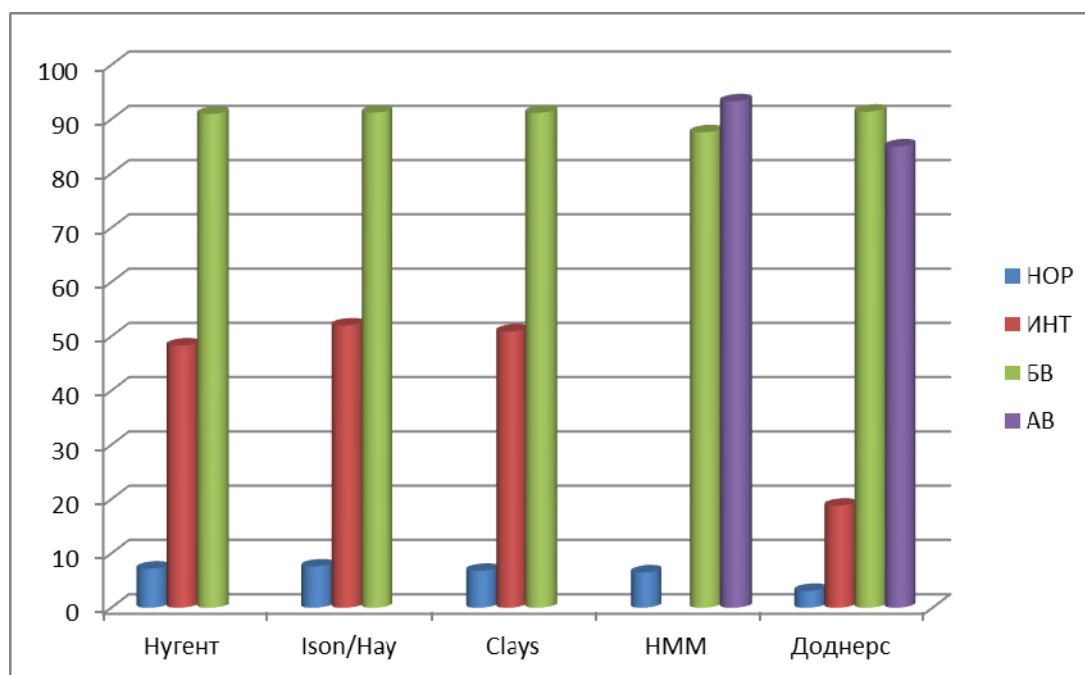


Графикон 9. *Дистрибуција позитивне пробе са КОН у зависности од стања вагиналне флоре добијене различитим методама за дијагностику вагиналних дисбиоза*

Као и код пробе са КОН, поређењем присуства патолошке вредности рН вагине у зависности од стања вагиналне флоре добијене различитим микроскопским методама добија се статистичка значајна разлика. (Табела 17, Графикон 10) Патолошке вредности рН највише су присутне су код БВ и АВ а најмање код испитаница са нормалним налазом. У интермедијарним налазима, рН вредности су веће од 4,5 у око 50% случајева код Нугента, *Ison/Hay*, *Clays*-а и 33% код Дондерса с тим што су овој групи налазе интермедијарни налази заједно са АВ.

Табела 17. Поређење резултата рН вредности вагине у зависности од стања вагиналне флоре добијене различитим микроскопским методама за детекцију вагиналних дисбиоза

		рН вредност		р вредност
		нормална	патолошка	
Нугент	Нор	90 (92,8%)	7 (7,2%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 122,7$
	Интер	31 (51,7%)	29 (48,3%)	
	БВ	7 (9%)	71 (91%)	
<i>Ison/Hay</i>	Нор	97 (92,4%)	8 (7,6%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 129,1$
	Интер	24 (48%)	26 (52%)	
	БВ	7 (8,8%)	73 (91,3%)	
<i>Clays</i>	Нор	95 (93,1%)	7 (6,9%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 129,5$
	Интер	26 (49,1%)	27 (50,9%)	
	БВ	73 (91,3%)	73 (91,3%)	
Дондерс	Нор	62 (96,9%)	2 (3,1%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 121,2$
	Интер и АВ	59 (66,3%)	30 (33,7%)	
	БВ	7 (8,5%)	75 (91,5%)	
НММ	Нор	115 (93,9%)	8 (6,5%)	$p < 0,001$ $\chi^2 = 158,7$
	АВ	1 (6,7%)	14 (93,9%)	
	БВ	12 (12,4%)	85 (87,6%)	



Графикон 10. Дистрибуција патолошке вредности рН у зависности од стања вагиналне флоре добијене различитим методама за дијагностику вагиналних дисбиоза

#### 4. Детекција *Candida spp.* на микроскопском налазу и култури

Гљиве рода *Candida* у нашој студији дијагностиковали смо прегледом микроскопског препарата (нативни и бојен по Граму) и засејавањем бриса на декстрозном Сабуро агару. Иако је најлакше визуелно детектовати гљивице на нативном препарату са додатим КОН, проблем оваквог типа препарата је што се након једне евалуације не може више употребљавати. Зато смо проред овог препарата за детекцију користили и трајни препарат по Граму где смо након прегледа под различитим увећањима (x 200, x 400, x 1000) неколико пута, и у комбинацији са нативним препаратом, доносили закључак о присуству гљивица. На препарату *Candida* је детектована код 33 (14%) жена док је у култури изоловано 48 (20,4%) (Табела 18). Поређењем резултата добијених прегледом микроскопског препарата и културом постоји статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 89,026$ ,  $p < 0.001$ ).

Табела 18. Поређење резултата детекције *Candida spp.* прегледом микроскопског препарата и засејавањем културе на Сабуро агар

Преглед препарата	Сабуро агар		Укупно
	Негативан	Позитиван	
Негативан	181 (96,8%)	21 (43,8%)	202 (86%)
Позитиван	6 (3,2%)	27 (56,3%)	33 (14%)
Укупно	187 (79,6%)	48 (20,4%)	235 (100%)

Присуство *Candida* у зависности од флоре одређене различитим микроскопским методама приказано је у табели 19. Наши резултати показују да је у свим микроскопским методама присуство рода *Candida* веће код пацијенткиња које имају дисбиозе (БВ и АВ) и интермедијарне налазе у односу на испитанице са нормалном флором.

Табела 19. Поређење присуства *Candida spp.* детектоване на препарату и културом у зависности од статуса вагиналне флоре одређене микроскопским методама за детекцију вагиналних дисбиоза

		<i>Candida</i> препарат		<i>Candida</i> сабуро	
		Присутна	Није присутна	Присутна	Није присутна
Нугент	Нор	8 (8,2%)	89 (91,8%)	14 (14,4%)	83 (85,6%)
	Интер	11 (18,3%)	49 (81,7%)	19 (31,6%)	41 (68,3%)
	БВ	14 (18%)	64 (82%)	15 (19,2%)	63 (80,3%)
Ison/Hay	Нор	7 (6,7%)	89 (91,8%)	14 (13,3%)	91 (86,7%)
	Интер	11 (22%)	49 (81,7%)	18 (36%)	32 (64%)
	БВ	15 (18,8%)	64 (82%)	16 (20%)	64 (80%)
Clays	Нор	9 (8,8%)	93 (91,2%)	16 (15,7%)	86 (84,3%)
	Интер	8 (15%)	45 (85%)	15 (28,3%)	38 (71,4%)
	БВ	16 (20%)	64 (80%)	17 (21,2%)	63 (78,8%)
Дондерс	Нор	2 (3,1%)	62 (96,9%)	5 (7,8%)	59 (92,2%)
	Интер	12 (17,4%)	57 (82,6%)	18 (26%)	51 (74%)
	БВ	14 (17%)	68 (83%)	19 (23,2%)	63 (76,8%)
	АВ	5 (25%)	15 (75%)	6 (30%)	14 (70%)
НММ	Нор	12 (9,8%)	111 (90,2%)	23 (18,7%)	100 (81,3%)
	АВ	17 (17,5%)	80 (82,5%)	21 (21,6%)	76 (78,3%)
	БВ	4 (26,7%)	11 (73,3%)	4 (26,7%)	11 (73,3%)

Испитивали смо такође упоредно присуство *Canida spp.* са патолошким ПМН на микроскопским препаратима. Резултати показују статистички значајну разлику ( $\chi^2 = 27,704$ ;  $p < 0,001$ ), јер је присуство патолошких ПМН детектовано код 37 (18,3%) негативних и 25 (75,8%) позитивних испитаница на *Canida spp.*

## 5. Дијагностика вагиналних дисбиоза применом *real-time* RT PCR теста

Мултиплекс квантитативни RT PCR тест за детекцију БВ који је коришћен у овом истраживању детектује присуство *Laktobacillus spp.*, *G. vaginalis* и *A. vagine* као и укупну концентрацију бактерија и на основу њиховог међусобног односа категорише пацијенткиње у 6 група. Резултати теста приказани су у табели 20. Пошто произвођач теста низак ниво копија сматра БВ негативним, ми смо ову групу припојили нормалним налазима.

Табела 20. Резултати мултиплекс квантитативног RT PCR теста за детекцију бактеријске вагинозе

Група	Вредност (%)
1. Нормалан налаз	114 (48%)
2. Интермедијаран налаз	9 (3,8%)
3. Бактеријска вагиноза	90 (38%)
4. Флора неспецифичне етиологије	5 (2,1%)
5. Низак ниво копија	7 (2,9%)
6. Недовољан број копија за анализу	10 (4,2%)

У табели 21 приказане су просечне вредности бактерија добијених мултиплекс квантитативним PCR тестом у зависности од стања вагиналне флоре. Може се уочити да су код нормалних налаза просечне концентрације *G. vaginalis* и *A. vagine* ниске (31132 и 2094) док је код БВ просечна вредност концентрација *G. vaginalis* 130 пута већа од вредности нормалних налаза, а код *A. vagine* чак 1030 пута веће. Просечна вредност рода *Laktobacillus* код нормалних налаза износи 8538838, али треба истаћи да су просечне концентрације лактобацилуса код интермедијарних налаза и БВ сличне.

Табела 21. Просечне вредности бактерија *Laktobacillus spp.*, *G. vaginalis* и *A. vagine* и укупан број бактерија у зависности од стања вагиналне флоре добијене PCR тестом

	Нулта група	Нормална флора	Интермедијарна флора	БВ	Флора неспецифичне етиологије
<i>G. vaginalis</i>	1056	31332	503245	4087654	825
<i>A. vagine</i>	225	2094	280337	2155658	88
<i>Laktobacillus spp.</i>	33330	8538838	3365222	3122494	882
Укупан бр. бактерија	28341	6143876	10176667	18106332	4222800
Збирно све бактерије	62952	14716084	14325471	27472127	4224595

Уколико погледамо вредности нулте групе концентрације бактерија у свим категоријама су врло мале. У упутству самог произвођача теста наведено је да се овакви налази поново узоркују, али у истраживању такве резултате код 10 пацијенткиња нисмо понављали како бисмо вредности ових налаза упоредили са нултом групом *Ison/Нау* методе и *null* налазима добијених НММ.

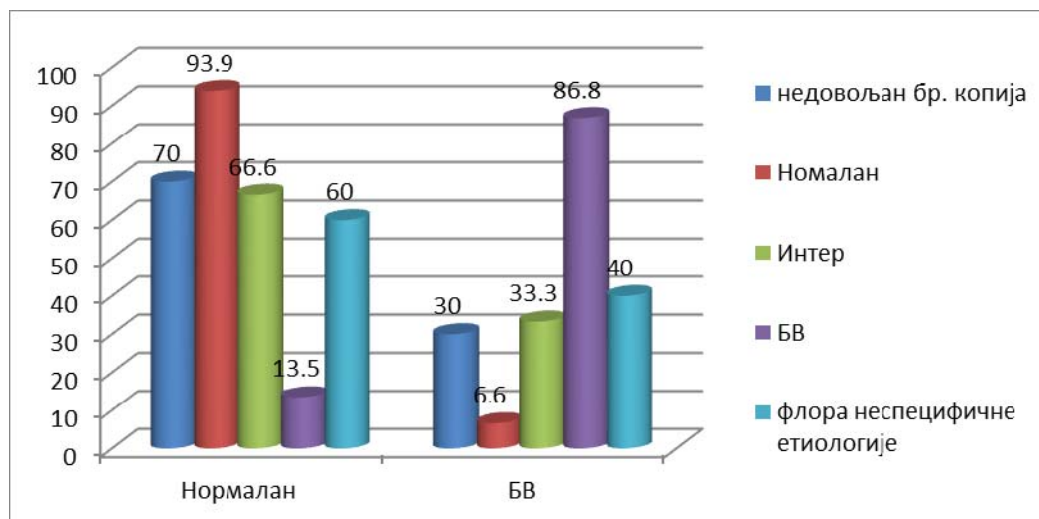
Према очекивањима резултати флоре неспецифичне етиологије имају ниску вредност и анаероба и лактобацилуса. У случају оваквог налаза не може се са сигурношћу тврдити да ли се ради о БВ која је узрокована неком другом врстом анаероба или је реч о АВ због ниске концентрације лактобацилуса.

Укупан број бактеријске ДНК чији се резултати детектују у оквиру теста не представљају укупан број *G. vaginalis*, *A. vagine* и лактобацилуса већ присуство других бактерија, али се у самом тесту не наводи о којима је тачно реч. Концентрација укупног броја бактерија расте од нормалних налаза ка БВ при чему је вредност интермедијарних налаза негде између ове две просечне вредности. Да би смо упоредили укупне концентрације свих бактерија присутне код одређене пацијенткиње сабрали смо све концентрације добијених бактерија (*G. vaginalis*, *A. vagine* и лактобацилуса и укупан број бактерија) и на тај начин добили збирни налаз. Вредност збирног броја бактерија је сличних вредности код нормалних и интермедијарних налаза, али је око 1.8 пута виша код БВ.

Будући да смо претпоставили да је тест за дијагностику БВ поузданији од постојећих клиничких и микроскопских дијагностичких метода овај тест смо користили као златни стандард и упоредили га са осталим тестовима. Такође, претпоставили смо да ћемо употребом овог теста примарно намењеног за дијагностику БВ, упоредном анализом са клиничким и микроскопским критеријумима успешно детектовати и АВ.

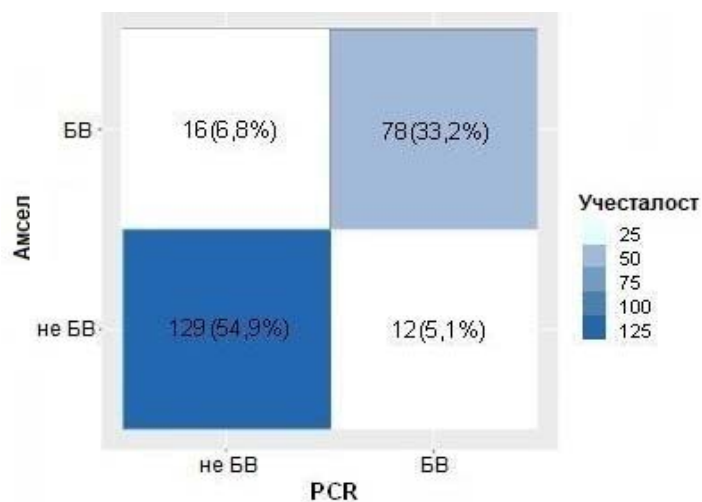
### 5.1. Поређење резултата RT PCR теста са Амселовим критеријумима

На графикону 11 су резултати поређења између Амселове методе и RT PCR теста. Испитанице са недовољним бројем копија 7 (70%), 6 (66,6%) интермедијарних, 12 (13,5%) са БВ и 3 (60%) са флором неспецифичне етиологије добијене PCR тестом, Амселовом методом сврстане су у групу здравих. У групи БВ добијене Амселовом методом PCR тест је поред налаза БВ показао 3 (30%) пацијенткиње са недовољним бројем копија, 8 (6,6%) са нормалном налазом, 3 (33,3%) интермедијарне и 2 (40%) са флором неспецифичне етиологије.



Графикон 11. Поређење резултата добијених Амселовом методом и RT PCR тестом

Да бисмо упоредили ове две методе PCR је редукован на две групе односно на БВ и не БВ у којој су сврстани сви остали резултати (нормалан налаз, интермедијаран, флора неспецифичне етиологије и недовољан број копија). Слагање између PCR и Амселових критеријума је добро ( $\kappa$  = 0,75). Укупно слагање износи 88,1% док је сензитивност и специфичност Амселове методе 82,98% и 91,49% респективно (Слика 43).



Слика 43. Слагање између RT PCR и Амселове методе када су подељене у две групе (БВ и не БВ)

Будући да у се Амселови модификовани критеријуми базирају на одређивању рН вредности и пробе са КОН у табели 21 и 22 приказана је расподела ових клиничких критеријума у зависности од стања вагиналне флоре добијена PCR методом. У оба поређења флора неспецифичне етиологије и нулта група сврстани су као остали. Поређењем рН вредности и налаза добијених PCR постоји статистичка значајност ( $\chi^2 = 125, 2, p < 0,001$ ). Код 80 (88,9%) испитаница које су PCR детектоване као БВ, рН вредност вагине је патолошка. Насупрот томе, нормалан рН налаз добијен је код 107 (88,4%) испитаница са здравом вагиналном флором. Испитанице са интермедијарном флором су у половини случајева са патолошким налазима рН, а другој половини са нормалним.

Табела 21. *Поређење резултата рН вредности вагине у зависности од стања вагиналне флоре добијене RT PCR тестом*

рН вредност				
		нормална	патолошка	р вредност
RT PCR	Нор	107 (88,4%)	14 (11,6%)	p<0,001 $\chi^2=125,2$
	БВ	10 (11,1%)	80 (88,9%)	
	Интер	4 (44,5%)	5 (55,5%)	
	Остали	7 (46,7%)	8 (53,3%)	

Поређење пробе са КОН у зависности од статуса вагиналне флоре добијене молекуларном методом је слично са резултатима добијеним евалуацијом микроскопског препарата ( $\chi^2 = 113,7, p < 0,001$ ). Проба са КОН негативна је код 91,7% и позитивна код 10 (8,3%) нормалних налаза, док је позитивна код 72 (80%), а негативна код 18 (20%) испитаница са БВ.

Табела 22. *Поређење резултата пробе са КОН у зависности од стања вагиналне флоре добијене RT PCR тестом*

Проба са КОХ				
		негативна	позитивна	р вредност
RT PCR	Нор	111 (91,7%)	10 (8,3%)	p<0,001 $\chi^2=113,7$
	БВ	18 (20%)	72 (80%)	
	Интер	5 (55,5%)	4 (44,5%)	
	АВ	12 (80%)	3 (20%)	

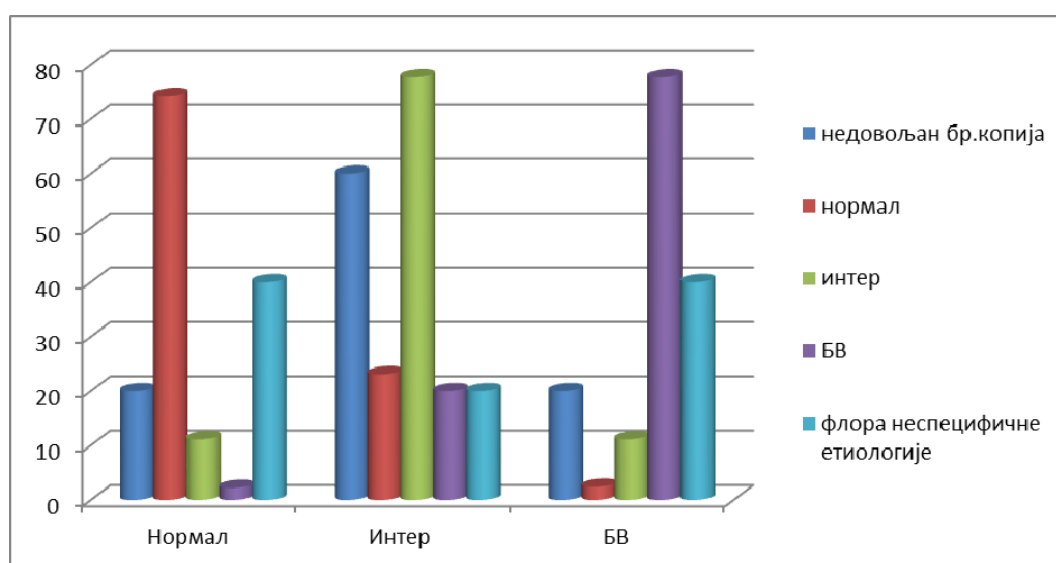
Комбинација оба параметра у зависности од резултата добијених *real-time* RT PCR приказана је у табели 23. Будући да код оба параметра понаособ постоји статистичка значајност када упоредимо резултате можемо да закључимо да ови клинички параметри имају добру подударност са резултатима добијених молекуларним методом.

Табела 23. Упоредни приказ клиничких критеријума (рН вредност и проба са КОН-ом) и резултатима добијеним RT PCR тестом

RT PCR	Нор. налаз		БВ		Интер. налаз		Нулта група		Коке Аеробни вагинитис	
	121		90		9		10		5	
	КОН+	10	КОН+	72	КОН+	4	КОН+	3	КОН+	0
	КОН-	111	КОН-	18	КОН-	5	КОН-	7	КОН-	5
	рН>4,5	14	рН>4,5	80	рН>4,5	5	рН>4,5	5	рН>4,5	3
	рН<4,5	107	рН<4,5	10	рН<4,5	4	рН<4,5	5	рН<4,5	2

## 5.2. Поређење резултата RT PCR теста са Нугентовим критеријумима

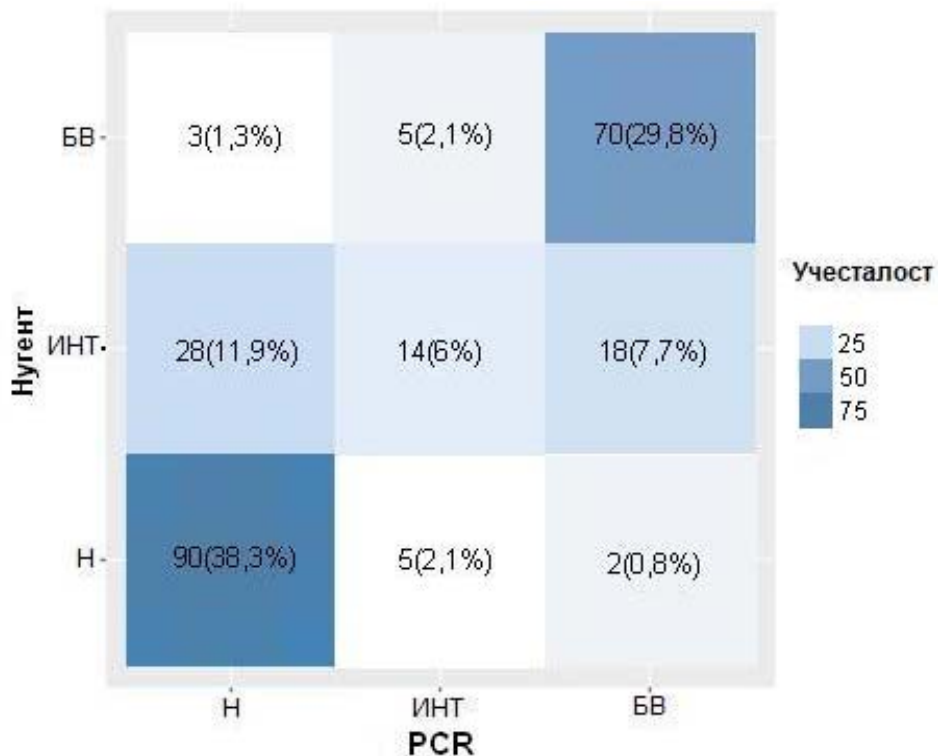
Поређење ове две методе показује велику подударност у нормалним налазима и БВ (графикон 12). Од укупно 97 испитаница које су сврстане у групу нормалних налаза Нугентовом методом њих 90 је распоређену у ову групу и PCR методом. Од 78 пацијената које су Нугентом сврстане у БВ, њих 70 је имало исти налаз и PCR-ом. Резултати поређења између Нугентове методе и PCR теста показују да је највећа разлика између ове две методе у интермедијарном налазу. Нугентовом методом је сврстано 60 (25,5%) испитаница у ову групу док је молекуларном методом добијено њих 9 (3,8%). Што значи да ако PCR тест користимо као златни стандард Нугентов скор показује да је 51 пацијенткиња грешком сврстана у ову групу. Тих 51 пацијенткиња PCR метода распоредила је у следеће групе: недовољни број копија 6 (60%), здравих 28 (23,1%), БВ 18 (20%) и 1 (20%) са флором непознате етиологије. Пошто је PCR-ом добијено укупно 9 интермедијарних налаза, њих 7 је такође препознато Нугетовом методом, док је по једна испитаница у групи са нормалном флором и БВ. Оно што је занимљиво јесте да је од 5 пацијената које су PCR у групи флоре неспецифичне етиологије Нугент препознао њих 2 као нормалан налаз, 2 као БВ а 1 као интермедијарни налаз.



Графикон 12. Поређење резултата RT PCR теста и Нугентових критеријума



Да бисмо статистички могли да упоредимо ове две методе у интермедијарну групу смо сврстали и нулту групу и флору неспецифичне етиологије. Поређење је приказано на Слици 44. Номинално поређење, односно поређење између налаза БВ и свих осталих не БВ приказано је на Слици 45.



Слика 44. Слагање између RT PCR и Нугнетове методе када су подељене у три групе (нормалан налаз, интермедијаран и БВ)



Слика 45. Слагање између RT PCR и Нугнетове методе када су подељене у две групе (БВ и не БВ)

Уколико упоредимо ове две методе са три групе тада је слагање између метода добро ( $\kappa$  = 0,71), а укупно слагање 74%. Уколико упоредимо методе са две групе (БВ и не БВ) тада је укупно слагање између метода 88,1% ( $\kappa$  = 0,74). Сензитивност Нугентове методе у односу на PCR износи 77,78%, док је специфичност 94,48%.

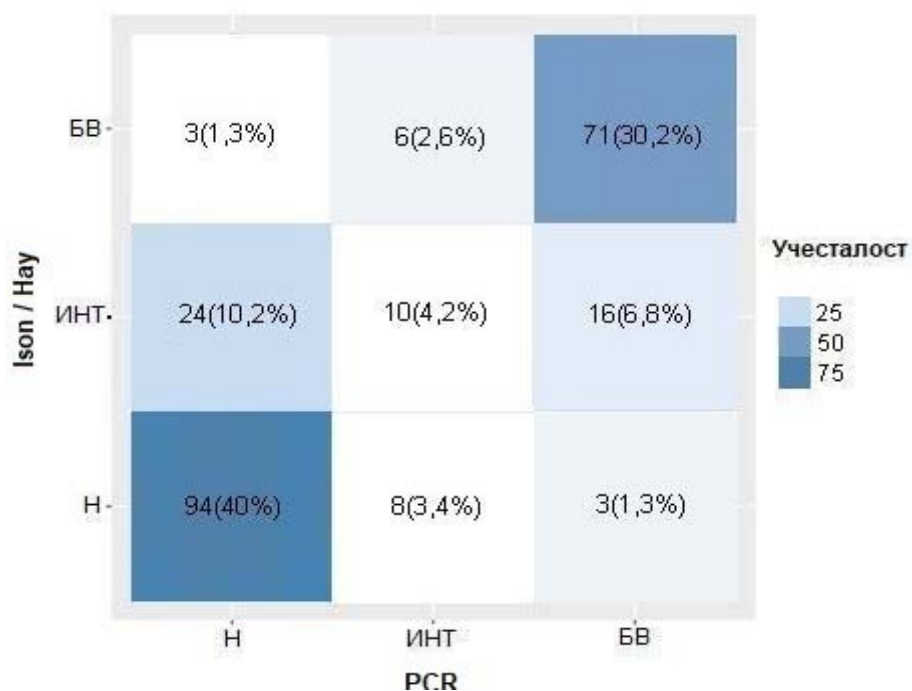
### 5.3. Поређење резултата RT PCR теста са *Ison/Hay* критеријумима

Резултати поређења између ове две методе приказани су у табели 24. Подударност *Ison/Hay* методе и PCR теста најбоље је у случају нормалних 88 (92,6%) и налаза БВ 71 (93,4%). Као и код Нугентовог скорa најмање подударање је у случају интермедијарног налаза. Чак 24 (48%) жена добијених *Ison/Hay* методом молекуларна метода је сврстала у здраве, док је њих 16 (32%) у групи БВ. Иако смо очекивали добро преклапање између нулте групе и групе са недовољним бројем копија, то није био случај. Ове две групе се преклапају само код 2 (20%) испитанице. Нулте групе добијене микроскопским налазом PCR је распоредио као здраве 6 (60%), интермедијарне 1 (10%) и БВ 1(10%). Док испитанице са недовољним бројем копија добијене PCR тестом *Ison/Hay* методом су сврстане у следеће групе: 2 (2,1%) здраве, 3 (6%) интермедијарне, 2 (2,6%) БВ и 1 (25%) коке. Остале налазе кока добијене *Ison/Hay* методом молекуларном методом су у групи нормалних налаза 1 (25%) и флоре неспецифичне етиологије 2 (50%).

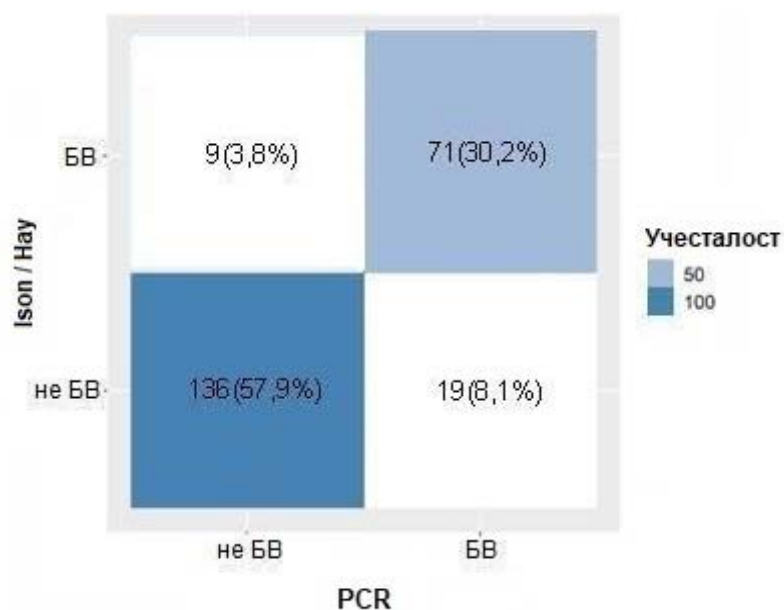
Табела 24. Поређење резултата добијених RT PCR тестом и *Ison/Hay* критеријумима

<i>real-time</i> RT PCR						
<i>Ison/Hay</i>	Недовољни број копија	Здрава	Интермедијарна	БВ	Флора неспецифичне етиологије	Укупно
Нулта група	2 (20%)	6 (60%)	1 (10%)	1 (10%)	0	<b>10</b>
Здрави	2 (2,1%)	88 (92,6%)	1 (1%)	2 (2,1%)	2 (2,1%)	<b>95</b>
Интермедијарни	3 (6%)	24 (48%)	6 (12%)	16 (32%)	1 (2,1%)	<b>50</b>
БВ	2 (2,6%)	2 (2,6%)	1 (1,3%)	71 (93,4%)	0	<b>76</b>
Коке	1 (25%)	1 (25%)	0	0	2 (50%)	<b>4</b>
<b>Укупно</b>	<b>10</b>	<b>121</b>	<b>9</b>	<b>90</b>	<b>5</b>	<b>235</b>

Када се пореде три групе слагање између PCR и *Ison/Hay* методе је добро ( $\kappa$  = 0,71), а укупно слагање износи 74,5% (Слика 46). Поређење са две групе је такође добро ( $\kappa$  = 0,74) а укупно слагање износи 88,1%. Сензитивност *Ison/Hay* је 78,89% док је специфичност 93,79%. (Слика 47)



Слика 46. Слагање између RT PCR и Ison/Hay методе када су подељене у три групе (нормалан налаз, интермеђијаран и БВ)



Слика 47. Слагање између RT PCR и Ison/Hay методе када су подељене у две групе (БВ и не БВ)

#### 5.4. Поређење резултата RT PCR тест са *Clay* критеријумима

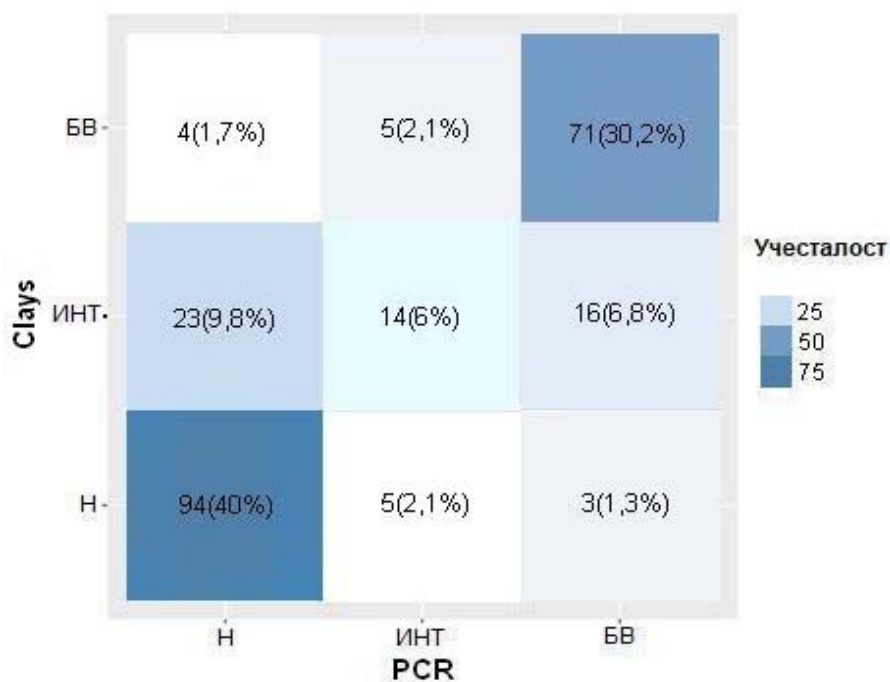
Резултати поређења између ове две методе су врло слични са резултатима поређења молекуларне методе са *Ison/Hay*-ом (Табела 25). Све налазе идиопатске леукоуреје добијене *Clay* методом, PCR метода препознаје као здраве. Овај налаз није изненађујући с обзиром да ова група представља присуство лактобацила, али уз истовремено присуство великог броја леукоцита. У овом случају требало би

преиспитати зашто је присутан повећан број леукоцита на овим препаратима с обзиром да је искључен налаз гљивица. Налази друге нове групе која уводи *Clays*-ова метода – слична нормалном, молекуларна метода распоређује у следеће категорије: 6 (60%) здравих, 1 (10%) интермедијарних, 2 (20%) са флором неспецифичне етиологије.

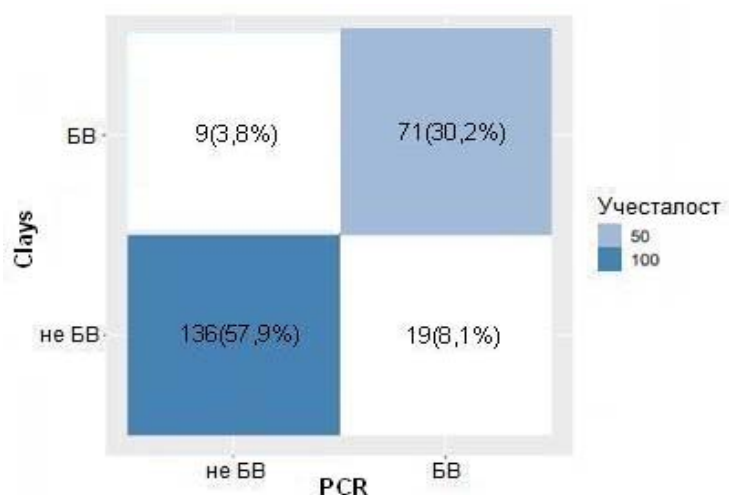
Табела 25. Поређење резултата добијених RT PCR тестом и *Clays* критеријума

RT PCR						
<i>Clays</i>	Недовољан број копија	Здрава	Интермедијарна	БВ	Флора неспецифичне етиологије	Укупно
Слична нормалном	0	6 (60%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	<b>10</b>
Здрави	2 (2,3%)	84 (95,5%)	0	2 (2,3%)	0	<b>88</b>
Интермедијарни	6 (11,5%)	23 (43,4%)	7 (13,2%)	16 (30,11%)	1 (1,9%)	<b>53</b>
БВ	2 (2,5%)	4 (5%)	1 (1,25%)	71 (88,75%)	2 (2,5%)	<b>80</b>
Леукореа	0	4 (100%)	0	0	0	<b>4</b>
<b>Укупно</b>	<b>10</b>	<b>121</b>	<b>9</b>	<b>90</b>	<b>5</b>	<b>235</b>

Слагање између *real-time* R PCR и *Clays* методе када поредимо 3 групе је добро ( $\kappa$  = 0,72), а укупно слагање износи 76,2%. (Слика 48) Поређење са две групе је такође добро ( $\kappa$  = 0,74) и укупно слагање износи 88,1%. (Слика 49) Исто као код *Ison/Нау* методе сензитивност *Clays* методе у односу на *real-time* RT PCR износи 78,89% док је специфичност 93,79%.



Слика 48. Слагање између *real-time* RT PCR и *Clays* методе када су подељене у три групе (нормалан налаз, интермедијаран и БВ)



Слика 49. Слагање RT PCR и Clays методе када су подељене у две групе (БВ и не БВ)

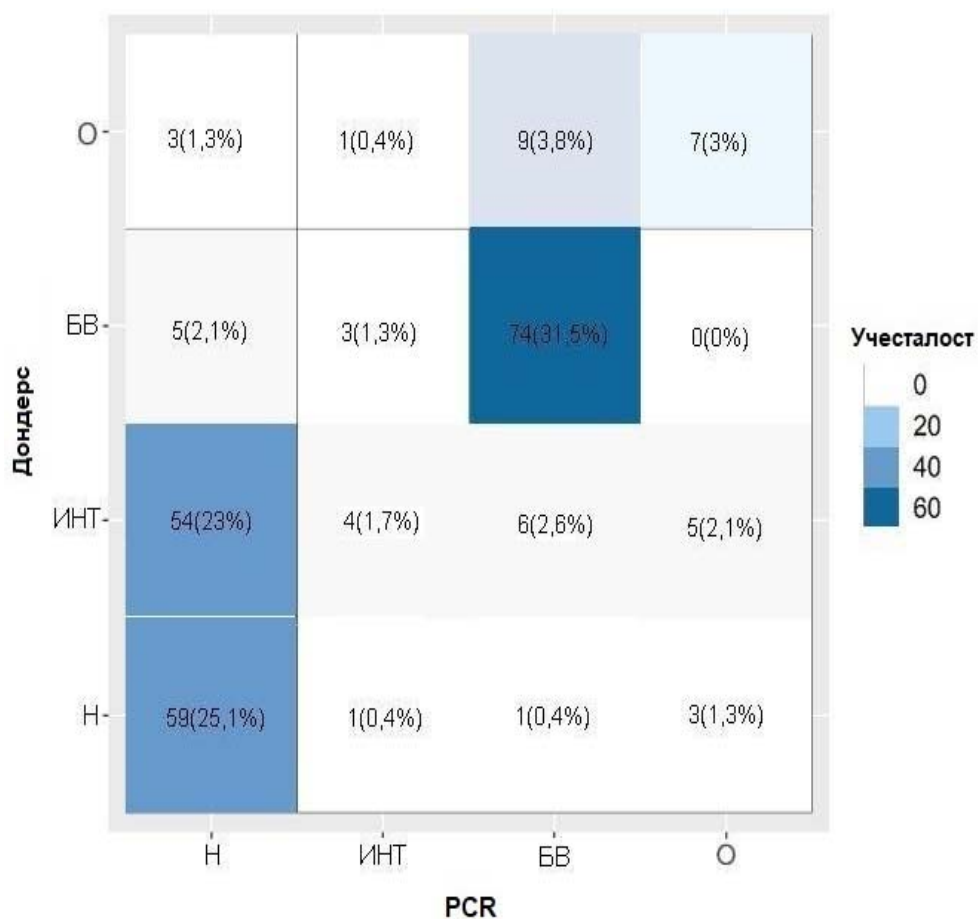
### 5.5. Поређење резултата RT PCR тест са Дондерсовим критеријумима

Поређење између Дондерса и *real-time* RT PCR представљено је у табели 26. Чак 54 (78,2%) пацијенткиње које су Дондерсовом методом у групи интермедијарних, PCR методом је у групи здравих. Као и у случају других микроскопских метода подударност између ове две методе је добра у случају нормалних налаза и БВ. АВ се са флором неспецифичне етиологије поклапа код 3 (15%) жене, а остали налази ове вагиналне дисбиозе PCR распоређени су у недовољном броју копија: 4 (20%), здрава 3 (15%), интермедијарна 3 (15) и једна испитаница (5%) са БВ.

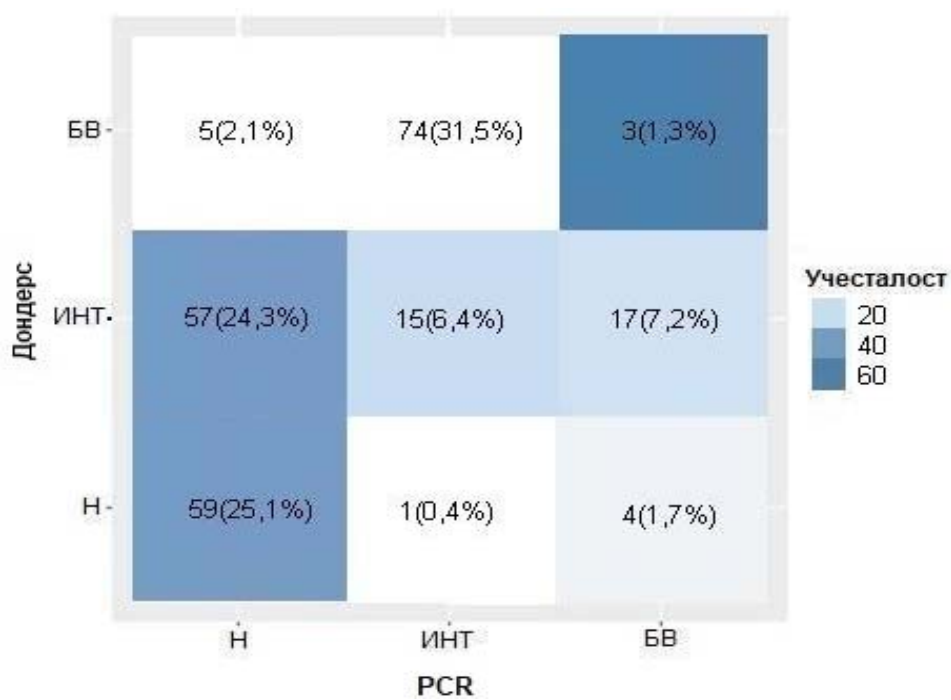
Табела 26. Поређење резултата добијених RT PCR тестом и Дондерсовом методом

Дондерс	RT PCR					Укупно
	Недовољан број копија	Здрава	Интермедијарна	БВ	Флора неспецифичне етиологије	
Здрави	2 (3,1%)	59 (92,1%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	<b>64</b>
Интермедијарни	4 (5,8%)	54 (78,2%)	4 (5,8%)	6 (8,7%)	1 (1,5%)	<b>69</b>
БВ	0	5 (6%)	3 (3,7%)	74 (90,2%)	0	<b>82</b>
АВ	4 (20%)	3 (15%)	3 (15%)	1 (5%)	3 (15%)	<b>20</b>
<b>Укупно</b>	<b>10</b>	<b>121</b>	<b>9</b>	<b>90</b>	<b>5</b>	<b>235</b>

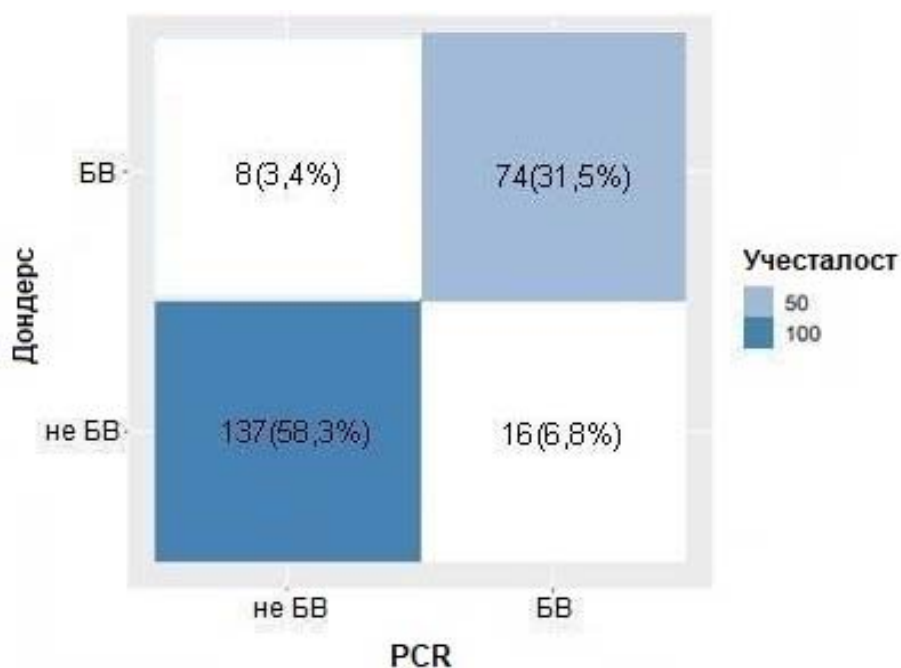
Када се упореде четири групе слагање између PCR и Дондерс методе је умерено ( $\kappa$  = 0,45), а укупно слагање износи 61,3%. (Слика 50) Поређење са три групе је умерено ( $\kappa$  = 0,47), док укупно слагање износи 63,8%. (Слика 51) Поређење са две групе је добро ( $\kappa$  = 0,78) а укупно слагање је 89,8%. (Слика 52) Сензитивност Дондерс методе у односу на PCR износи 82,22% док је специфичност 94,48%.



Слика 50. Слагање између RT PCR и Дондерс методе када су подељене у четири групе (нормалан налаз, интермедијаран БВ и остали (АВ/флора неспецифичне етиологије))



Слика 51. Слагање између RT PCR и Дондерс методе када су подељене у три групе (нормалан налаз, интермедијаран и БВ)



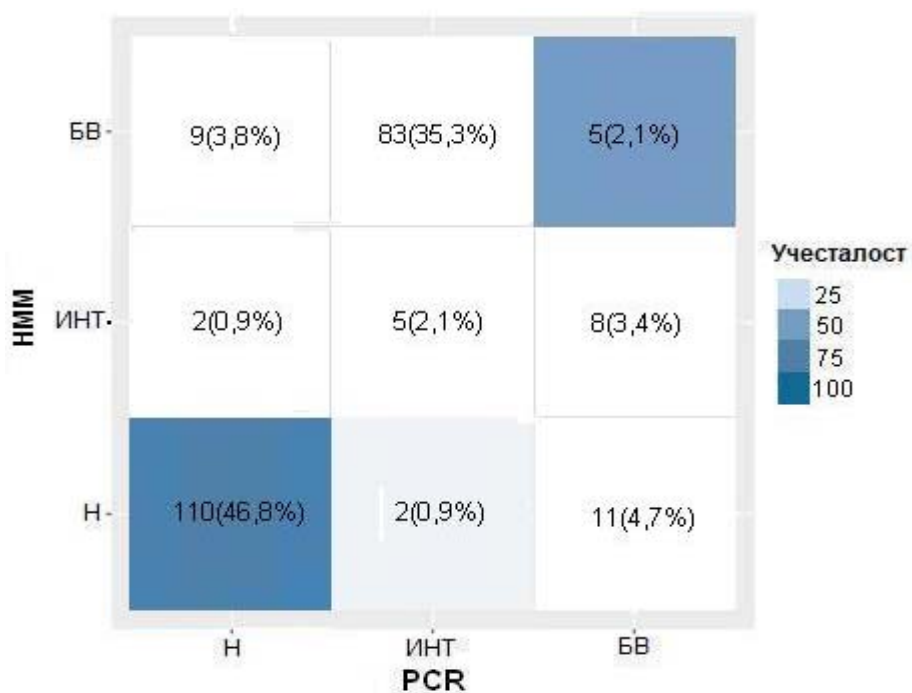
Слика 52. Слагање између RT PCR и Дондерс методе када су подељене у две групе (БВ и не БВ)

### 5.6. Поређење резултата RT PCR теста новом микроскопском методом

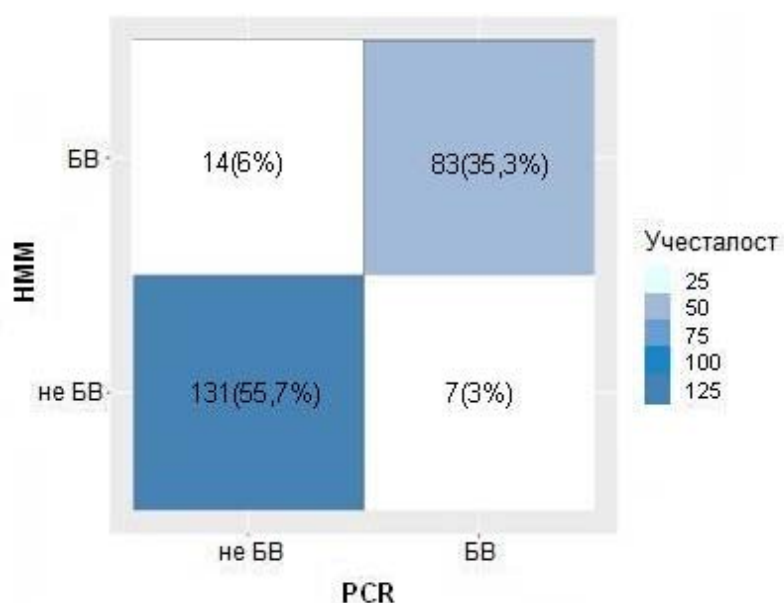
Поређење између НММ методе и PCR показују да је најбоље слагање код пацијенткиња са нормалном флором 110 (89,4%) и БВ 83 (85,5%) (Табела 27). Слично као и код Дондерсове методе АВ се поклапа само код 3 (20%) испитанице са флором неспецифичне етиологије, а остале налазе молекуларна метода распоређује у следеће групе: 4 (26%) недовољан број копија, 2 (13,3%) здрава флора, 1 (6,7%) интермедијарна и 5 (33,3%) БВ.

Табела 27. Поређење резултата добијених RT PCR тестом и новом микроскопском методом

RT PCR						
НММ	Недовољан број копија	Здрава	Интермедијарна	БВ	Флора неспецифичне етиологије	Укупно
Здрави	5 (4%)	110 (89,4%)	4 (3,2%)	2 (1,6%)	2 (1,6%)	123
БВ	1 (1%)	9 (9,2%)	4 (4,1%)	83 (85,5%)	0	97
АВ	4 (26,6%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)	5 (33,3%)	3 (20%)	15
<b>Укупно</b>	<b>10</b>	<b>121</b>	<b>9</b>	<b>90</b>	<b>5</b>	<b>235</b>



Слика 53. Слагање између RT PCR и HMM када су подељене у три групе (нормалан налаз, интермеђијаран и БВ)



Слика 54. Слагање између RT PCR и HMM када су подељене у две групе (БВ и не БВ)

Када се пореде три групе слагање између PCR и HMM методе је добро ( $каппа = 0,74$ ) а укупно слагање износи 85,5%. (Слика 53) Поређење са две групе је добро ( $каппа = 0,81$ ), а укупно слагање износи 91,1%. (Слика 54) Сензитивност HMM методе у односу на *real-time* RT PCR износи 85,57% док је специфичност 94,93%.



## 5.7. Поређење укупног броја бактеријских морфотипова добијених НММ и бактерија детектованих RT PCR методом

Будући да смо у овом истраживању користили НММ методу која се базира на семиквантитавној процени бактеријских морфотипова упоредили смо ове резултате са квантитативним резултатима добијених PCR методом. Пошто су микроскопски налази на основу степена целуларности подељени на три групе (*null*, *mid* и *full*), упоредили смо ове налазе са збирном вредношћу бактерија која је добијена PCR методом. У табели 28 приказане су просечне вредности бактерија, као и максимална и минимална вредност добијена у свакој од група НММ.

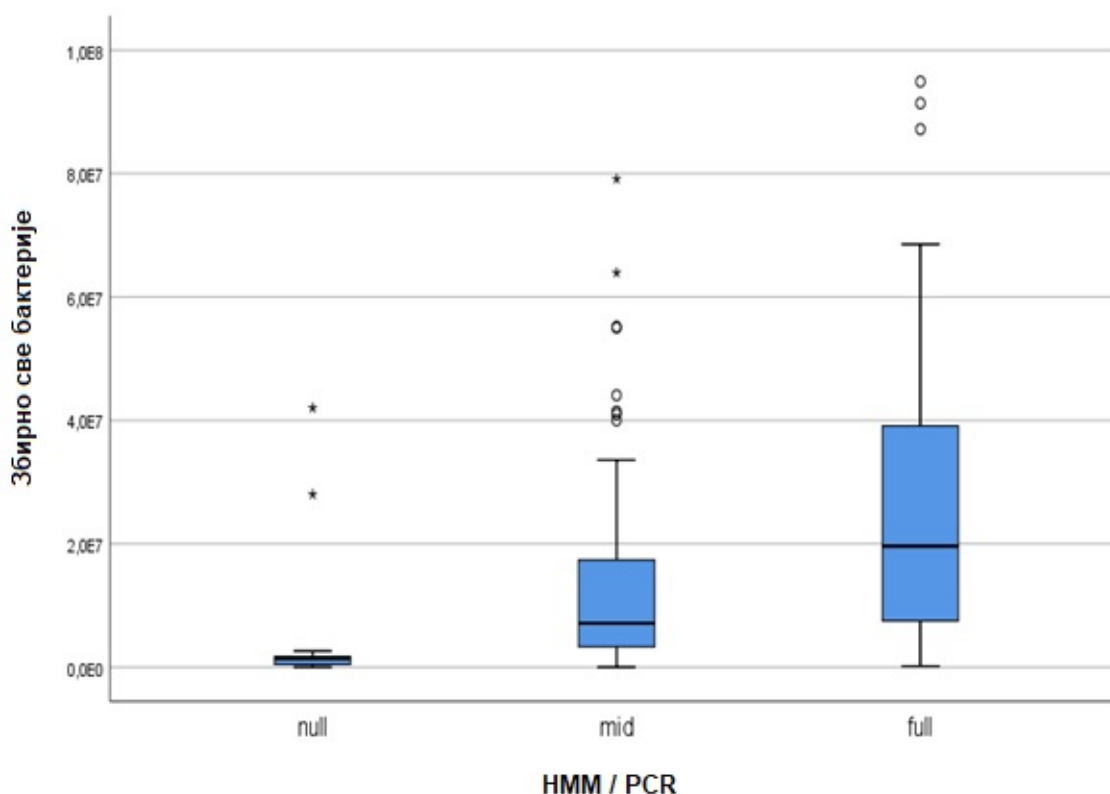
Табела 28. Просечна вредност бактерија добијена RT PCR тестом у зависности од степена целуларности одређених новом микроскопском методом

Степен целуларности	Број узорака	Просечна вредност	Стандардна девијација	Медијана	Минимум	Максимум
<i>null</i>	19	4649679,77	10975182,321	1440043,00	4097	42004675
<i>mid</i>	99	13062185,02	15122859,966	7100017,10	1555	79100010
<i>full</i>	117	25831787,05	21468344,697	19616114,70	154112	94900000
<b>Укупно</b>	235	18739656,67	19708576,530	12000024,10	1555	94900000

Када се упореде квантитативни резултати PCR теста са целуларношћу одређеном НММ видимо да збирна просечна вредност бактерија расте градијски од *null* ка *full*. Просечна вредност бактерија у групи *mid* је 2,8 пута већа од просечне вредности групе *null*. Просечна вредност *full* је 2 пута већа од просечне вредности групе *mid*, а 5,5 од групе *null*.

Медијана броја свих бактерија збирно код *null* износила је 1440043 (опсег 4097–42004675), код *mid* 7100017,1 (опсег 1555–79100010) док је код *full* 19616114,7 (опсег 154112–949000 00) што је статистички значајна разлика ( $\chi^2 = 47,650$ ;  $df = 2$ ;  $p < 0,001$ ). Статистички значајна разлика постоји између *null* у односу на *mid* ( $p = 0,003$ ) и *full* ( $p < 0,001$ ), као и између *mid* и *full* ( $p < 0,001$ ).

На графикону 13 приказано је поређење степена целуларности (*null*, *mid* и *full*) одређених НММ приликом евалуације микроскопског препарата и збирне просечне вредности квантитативног броја бактерија идентификованих применом PCR теста. Као што се може уочити из приложеног постоји добра подударност у све три категорије (*null*, *mid* и *full*).



Графикон 13. Поређење збирног броја бактерија детектованих RT PCR теста у односу на укупан степен целуларности (null, mid и full) бактеријских морфотипова одређен НММ

Уколико понаособ упоредимо квантитативне резултате броја бактерија (*G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacillus spp.* и укупног броја бактерија добијене PCR методом у поређењу са степеном целуларности добијене НММ видећемо да постоји раст у просечном броју бактерија (Табела 29) и медијани (Табела 30) посматрано од null ка full у свим групама.

Табела 29. Просечна вредност бактерија (*G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacillus spp.* и укупног броја бактерија) добијена RT PCR у зависности од степена целуларности одређена НММ (null, mid и full)

	<i>G. vaginalis</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Укупан бр. бактерија	Збирно све бактерије
<i>null</i>	26733,8	11927,6	2787061,6	1823956,8	4649679,8
<i>mid</i>	659360,6	200805,8	4972720,6	7229345,8	13062185,0
<i>full</i>	2653326,7	1510101,1	6834144,1	14834230,8	25831787,1

Табела 30. Медијана, минимум и максимум *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacillus spp.* и укупног броја бактерија) добијена RT PCR у зависности од степена целуларности одређена HMM (*null*, *mid* и *full*)

		<i>G. vaginalis</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Укупан бр. бактерија	Збирно све бактерије
<b><i>null</i></b>	Медијана	146,0	19,9	588000,0	525000,0	1440043,0
	Минимум	1,0	0,0	370,0	3680,0	4097,0
	Максимум	241000,0	204000,0	26000000,0	16000000,0	42004675,0
<b><i>mid</i></b>	Медијана	1540,0	29,7	3100000,0	3400000,0	7100017,1
	Минимум	0,0	0,0	55,0	1480,0	1555,0
	Максимум	24000000,0	3700000,0	33000000,0	70000000,0	79100010,0
<b><i>full</i></b>	Медијана	127000,0	464,0	3300000,0	9300000,0	19616114,7
	Минимум	0,0	0,0	0,0	104000,0	154112,0
	Максимум	25000000,0	13000000,0	52000000,0	61000000,0	94900000

Резултати *Kruskal-Wallis* статистичке анализе поређења просечних вредности *G. vaginalis* у зависности од степена целуларности показују да не постоји статистичка значајност између групе *null-mid* ( $p = 0,003$ ), али постоји између групе *full-mid* ( $p < 0,001$ ), и *full-null* ( $p < 0,001$ ).

Слична ситуација је и са бактеријом *A. vaginae*, иако просечан број бактерија расте од *null* ка *full* не постоји статистичка значајност између *null-mid* ( $p = 1,000$ ), док постоји између *mid-full* ( $p = 0,015$ ) и *full-null* ( $p = 0,042$ ).

У случају рода *Lactobacillus spp.* статистичка разлика постоји само између *null-full* ( $p < 0,001$ ), али не и између *null-mid* ( $p = 0,061$ ) и *mid-full* ( $p = 0,812$ ) група.

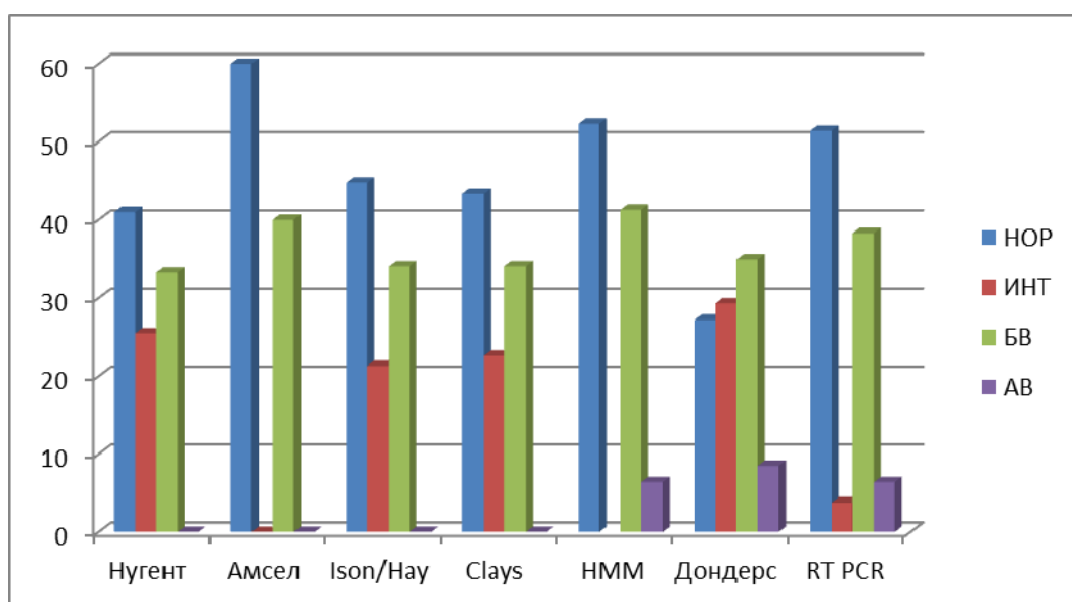
Табела 31. Просечна вредност бактерија добијена RT PCR зависности од стања вагиналне флоре одређене HMM и степена целуларности

HMM		<i>G. vaginalis</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Укупан бр. бактерија	Збирно све бактерије
<b>Нормал</b>	<i>null</i>	17475	93	1899336	1212129	3129034
	<i>mid</i>	20740	37189	6551957	5476906	12086712
	<i>full</i>	164803	262991	10532906	6970925	17931584
<b>БВ</b>	<i>null</i>	81717	7032	9219000	5802333	15110082
	<i>mid</i>	1861724	521611	3138549	11101963	16623846
	<i>full</i>	5138149	2767108	3977048	22756759	34639064
<b>АВ</b>	<i>null</i>	11870	68106	201933	496833	778743
	<i>mid</i>	117685	133311	887433	3534498	4672927
	<i>full</i>	416007	162752	1504780	6863500	8947039

Просечне вредности бактерија добијене RT PCR у зависности од стања вагиналне флоре и степена целуларности добијене НММ приказане су у табели 31. У свакој појединачној групи (нормална флора, БВ и АВ) постоји градацијски раст од *null* ка *full*. Изузетак је само просечна вредност лактобацилуса код налаза БВ. Овде у случају *null* налаза имамо 3 пута већу вредност у односу на *mid* и *full* које су релативно једнаке. Ово се може објаснити и чињеницом да сврстаних БВ *null* налаза имамо код само 3 пацијенткиње, тако да на основу тога не можемо дати прави приказ овог поређења. Очекивано, просечна вредност *G. vaginalis* и *A. vaginae* је већа код БВ у односу на нормалне налазе. У групи АВ такође постоји градацијски раст од *null* ка *full* али овај резултат морамо посматрати са резервом с обзиром да се НММ и флора неспецифичне етиологије добијене *real-time* RT PCR подударају само код 3 испитанице од 10. Уколико погледамо збирно све бактерије видећемо да је просечна вредност бактерија код БВ већа него нормалних налаза и то 4,8 пута код *null*, 1,4 пута код *mid* и 1,9 код *full*.

## 6. Поређење клиничких, микроскопских и молекуларних метода за дијагностику вагиналне дисбиозе

Поређење клиничких, микроскопских метода и RT PCR показује добро слагање у случају нормалних налаза и бактеријске вагинозе. Највећа разлика између метода је у случају интермедијарног налаза (графикон 14). RT PCR методом добијено је 9 (3,8%) интермедијарних налаза у односу на микроскопске налазе (осим НММ) чији је просек био од 21,3%–29,3%.



Графикон 14. Упоредно поређење резултата добијених клиничким, микроскопским и молекуларним методама у дијагностици вагиналних дисбиоза

С обзиром да се слагање између метода статистички анализира употребом *карра* вредности у табели 32 приказано је поређење микроскопских и клиничких метода са RT PCR-ом као златним стандардом. Највеће подударане у нашој студији је имала НММ, посматрано са три и са две групе.

Табела 32. Слагање различитих клиничких и микроскопских метода са RT PCR као златним стандардом. Поређење са три (БВ, интемедијаран и нормалан налаз) и две групе (БВ и не БВ).

		Нугент	Амсел	<i>Ison/Hay</i>	<i>Clays</i>	НММ	Дондерс
Три групе (Н, интер, нор)	<i>Карра</i>	0,71	–	0,71	0,72	0,74	0,47
	Укупно слагање	74%	–	74,5%	76,2%	85,5%	63,8%
Две групе (нон БВ и БВ)	<i>Карра</i>	0,74	0,75	0,74	0,74	0,81	0,78
	Укупно слагање	88,1%	88,1%	88,1%	88,1%	91,1%	89,8%
	Специфичност	77,8%	82,9%	78,9%	78,9%	85,6%	82,2%
	Сензитивност	94,5%	91,5%	93,8%	93,8%	95%	94,5%

Табела 33. Поређење просечних вредности бактерија добијених RT PCR тестом у односу на налазе добијене клиничким и микроскопским методама

		<i>G. vaginalis</i>	<i>A. vaginae</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Укупан бр. бактерија	Збирно све бактерије
Амсел	Нор	136920	125332	7004055	5241411	12 507 671
	БВ	3797001	1905493	3800816	18584324	28087635
Нугент	Нор	12756	134264	8640808	5988443	14776248
	Интер	751829	299105	3995876	5886649	10933385
	БВ	4229190	215876	3422276	19895994	29673336
<i>Ison/Hay</i>	Нор	14219	125988	8037090	5576074	13753352
	Интер	809078	338081	4439026	6210588	11796684
	БВ	3837328	2083192	3487534	19874353	29623540
<i>Clays</i>	Нор	69 955	136859	8388709	5891216	14485817
	Интер	658553	305155	3721936	5393847	10079407
	БВ	4178462	2083192	3649219	19989843	29900717
Дондерс	Нор	11115	203357	7640797	4888638	12743803
	Интер	269369	61484	7607465	6070784	14009103
	БВ	4339086	2146020	3864214	20515622	30820294
	АВ	239104	177866	702844	3596374	4716189
НММ	Нор	81485	118672	7795521	5616888	13612512
	БВ	3748043	1858451	3837887	17916162	27360542
	АВ	176075	128120	914959	3814699	5033853

У табели 33 приказана је просечна вредност бактерија добијених RT PC-ом у односу на налазе добијене клиничким и микроскопским методама за дијагностику вагиналних дисбиоза. Запажамо да су у нормалним налазима добијеним

микроскопским и клиничким методама вредности *G. vaginalis* и *A. vaginae* око  $10^4$  и  $10^5$  респективно, док су највеће вредности у налазима са БВ, где су у распону око  $3-4 \times 10^6$  за *G. vaginalis*, око  $2 \times 10^6$  за *A. vaginae*. Супротно, просечна концентрација лактобацила има највећу вредност у нормалним налазима ( $7 \times 10^6-8 \times 10^6$ ), али се такође вредности лактобацила у налазима са БВ крећу се у опсегу  $3 \times 10^6-4 \times 10^6$ . Уколико упоредимо збирни налаз бактерија између нормалних налаза и БВ видимо да је код вагиналне дисбиозе та вредност у просеку око два пута већа у односу на здраве испитанице. Концентрација бактерија у интермедијарном налазу у већини метода градијски расте (*G. vaginalis* и *A. vaginae*), односно опада (лактобацили) од нормалног налаза ка БВ. Највеће одступање имамо код интермедијарних налаза добијених Дондерсовом методом где је концентрација добијена у нормалном и интермедијарном налазу идентична.

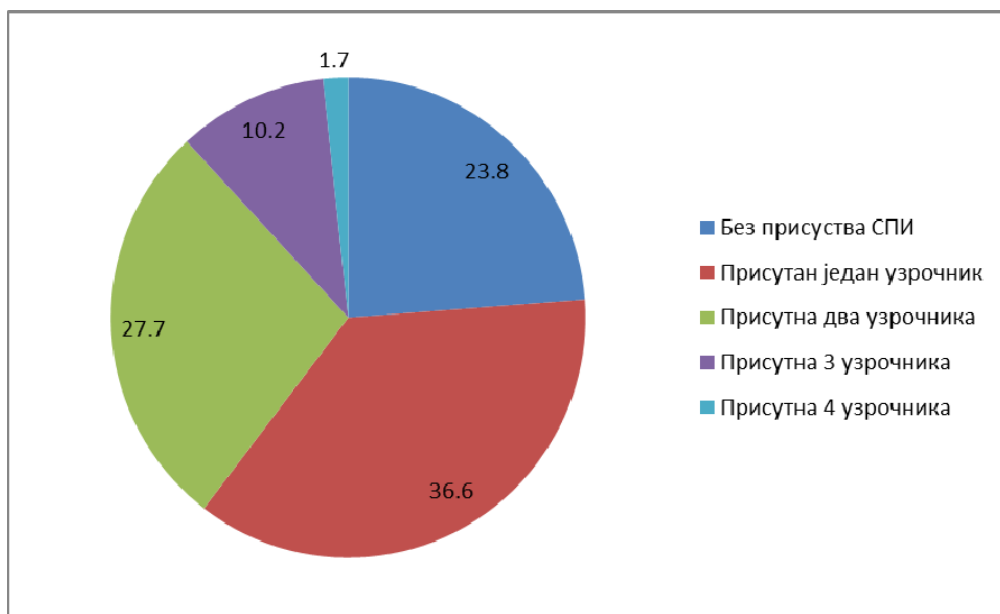
## 7. Дијагностика сексуално преносивих инфекција

Приликом анализе вагиналног микробиома свакако не треба запоставити значај сексуално преносивих инфекција. У нашој студији употребом 4 различита мултиплекс квантитативна RT PCR теста испитали смо присуство девет најчешћих узрочника СПИ. Учесталост СПИ међу нашим испитаницама приказана је у табели 34.

Табела 34. Резултати учесталости различитих сексуално преносивих инфекција детектованих RT PCR

СПИ	Позитиван	Негативан
<i>C. trachomatis</i>	16 (6,8%)	219 (93,2%)
<i>Ureaplasma spp.</i>	143 (60,9%)	92 (39,1%)
<i>M. hominis</i>	66(28,1%)	169 (71,9%)
<i>M. genitalium</i>	2(0,9%)	233 (99,1%)
HPV 12 типова	70(29,8%)	165 (70.2%)
<i>T. vaginalis</i>	3 (1,3%)	232 (98,7%)
<i>N. gonorrhoeae</i>	0	235 (100%)
HSV I	2 (0,9%)	233 (99,1%)
HSV II	2 (0,9%)	233 (99,1%)

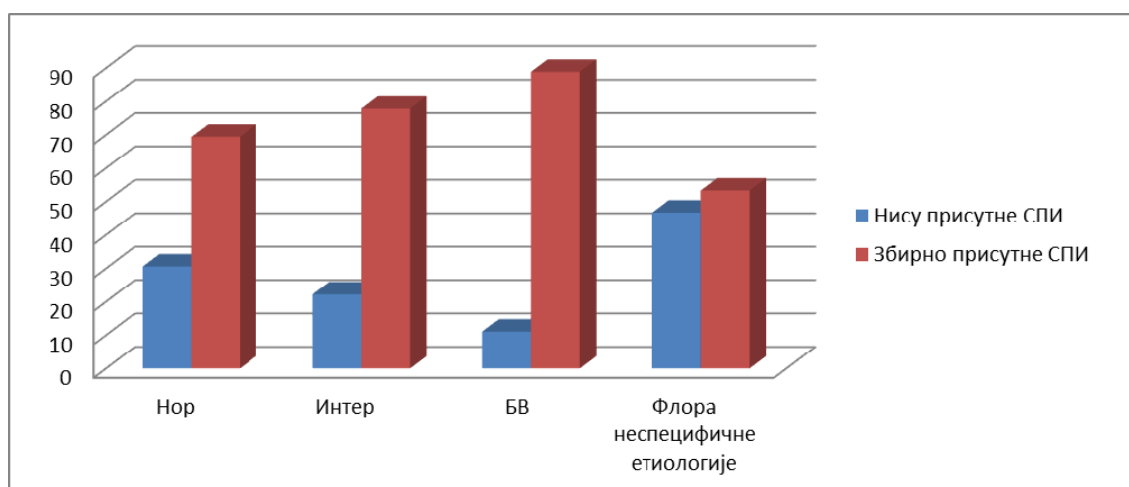
Од 235 испитаница код 179 (76,2%) присутан је неки од узрочника СПИ, док је 56 (23,8%) негативних на све узрочнике. Код 86 (36,6%) жена детектована је моноинфекција са неким од узрочника, док је код 93 (39,6%) испитаница детектовано истовремено присуство више узрочника. Дистрибуција присуства и одсуства (ко) инфекција приказана је на графикону 15.



Графикон 15. Дистрибуција сексуално преносивих инфекција

## 8. Поређење резултата присуства вагиналних дисбиоза и сексуално преносивих инфекција

Будући да смо показали да је RT PCR поуздан тест у дијагностици БВ, упоредили смо резултате статуса вагиналне флоре са присуством узрочника СПИ. Наши резултати показују да уколико упоредимо збирно присуство свих СПИ у односу на стање вагиналне флоре постоји статистички значајна разлика. ( $\chi^2 = 15,380$ ,  $p = 0,001$ ) (Графикон 16). Сексуално преносиве инфекције су најчешће присутне код испитаница са БВ 80 (89,9%), а затим код жена са интермедијарном флором 7 (77,8%). Такође важан податак је да је у групи здравих жена детектовано 84 (69,4%) узрочника СПИ, и у овом случају се вероватно ради о асимптоматској инфекцији.



Графикон 16. Поређење укупног детектованих сексуално преносивих инфекција у зависности од стања вагиналне флоре детектоване RT PCR

Дистрибуција присуства различитих узročника СПИ у зависности од стања вагиналне флоре приказана је у табели 35. Статистичка значајност постоји само код *Ureaplasma spp.* и *M. hominis*. Иако код осталих узročника СПИ не постоји разлика у дистрибуцији у зависности од стања вагиналне флоре, може се уочити да је највећи проценат позитивних патогена код испитаница са БВ.

Табела 35. Дистрибуција присуства различитих СПИ у зависности од стања вагиналне флоре детектоване RT PCR

		Нормална флора	БВ	Интермедијарна флора	Флора неспецифичне етиологије	р вредност
<i>C. trachomatis</i>	Поз	5 (4,1%)	10 (11,1%)	0	1 (6,7%)	<b>0,21</b>
	Нег	116 (95,9)	80 (88,9%)	9 (100%)	14 (93,3%)	
<i>Ureaplasma spp</i>	Поз	63 (52,1%)	71 (78,9%)	5 (55,6%)	4 (26,7%)	<b>&lt;0,01</b>
	Нег	58 (47,9%)	19 (21,1%)	4 (44,4%)	11 (73,3%)	
<i>M. genitalium</i>	Поз	0	2 (2,2%)	0	0	<b>0,34</b>
	Нег	121 (100%)	88 (98,8%)	9 (100%)	15 (100%)	
<i>M. hominis</i>	Поз	20(16,5%)	50(44,4%)	3 (33,3%)	3 (20,0%)	<b>&lt;0,01</b>
	Нег	101 (83,5%)	50 (55,6%)	6 (66,7%)	12 (80%)	
<i>T. vaginalis</i>	Поз	1 (0,8%)	1 (1,11%)	0	1 (6,7%)	<b>0,33</b>
	Нег	120 (99,2%)	89 (96,9%)	9 (100%)	14 (93,3%)	
<i>N. gonorrhoeae</i>	Поз	0	0	0	0	-
	Нег	121 (100%)	90 (100%)	9 (100%)	15 (100%)	
HPV 12 типова	Поз	34 (37%)	25 (50%)	6 (75%)	5 (45%)	<b>0,125</b>
	Нег	58 (63%)	25 (50%)	2 (25%)	6 (54,5%)	
HSV-1	Поз	1 (0,8%)	1 (1,1%)	0	0	<b>1</b>
	Нег	120 (99,2%)	89 (98,9%)	9 (100%)	15 (100%)	
HSV-2	Поз	0	1 (1,1%)	1 (11,1%)	0	<b>0,4</b>
	Нег	121 (100%)	89 (98,9%)	8(88,9%)	15 (100%)	

Наша студија показује да су поједини СПИ узročници (*C. trachomatis* и високо ризични HPV) детектовани код жена у сва три стања вагиналне флоре. Међутим, утврдили смо да је највећи проценат позитивних испитаница на *C. trachomatis* (11,1%) у групи жена са БВ. Док је код жена позитивних на HPV највећи број у групи са интермедијарном (75%) вагиналном флором и БВ (50%).

У нашем истраживању одређени узročници (*T. vaginalis*, *M. genitalium*, HSV-1/HSV-2) идентификовани су у малом броју узорака или нису уопште идентификовани (*N. gonorrhoeae*). С обзиром на овај резултат, ограничена је могућност поређења ових узročника СПИ са различитим стањима вагиналне флоре.



Асоцијација између БВ и присуства свих детектованих узročника СПИ приказана је у табели 36. Постоји статистичка значајност између присуства моноинфекција и коинфекција у односу на стање вагиналне флоре ( $\chi^2 = 27,733$ ,  $p < 0,001$ ). Жене са нормалном флором имају најчешће моноинфекцију 51 (42,1%), док жене са интермедијарном флором 6 (66%) и БВ имају чешће коинфекцију 50 (55,6%).

Табела 36. Резултати поређења присуства моно и коинфекција у зависности од вагиналне флоре добијене RT PCR

	Нормална флора	Бактеријска вагиноза	Интермедијарна флора	Флора неспецифичне етиологије	Укупно
<b>Без присуства СПИ</b>	37 (30,6%)	10 (11,1%)	2 (22,2%)	7 (46,7%)	56 (23,8%)
<b>Моноинфекција</b>	51 (42,1%)	30 (33,3%)	1 (11,1%)	4 (26,7%)	86 (36,6%)
<b>Коинфекција</b>	33 (27,3%)	50 (55,6%)	6 (66,7%)	4 (26,7%)	93 (39,6%)
<b>Укупно</b>	121 (51,4%)	90 (38,2%)	9 (3,8%)	14 (5,9%)	235 (100%)

Иако је у нашем истраживању код испитаница са интермедијарном флором добијен висок проценат оних које имају коинфекцију, сматрамо да ови резултати не могу адекватно да прикажу повезаност са инфекцијама, будући на мали број таквих испитаница детектованих PCR методом.

## 9. Поређење присуства сексуално преносивих инфекција и полиморфонуклеарних леукоцита

Резултати испитивања показују да је патолошке ПМН имало 15 (26,8%) испитаница код којих није детектован ни један узročник СПИ и 47 (26,3%) жена код којих је присутан неки од СПИ патогена. Испитанице са присуством неког од узročника СПИ у нашем истраживању немају повећан број патолошких полиморфонуклеара детектованих евалуацијом микроскопског препарата ( $\chi^2 = 0,006$ ,  $p = 0,938$ ). Наша студија показује да повећано присуство ПМН на микроскопском препарату не значи да је повећана учесталост узročника СПИ код тих испитаница.

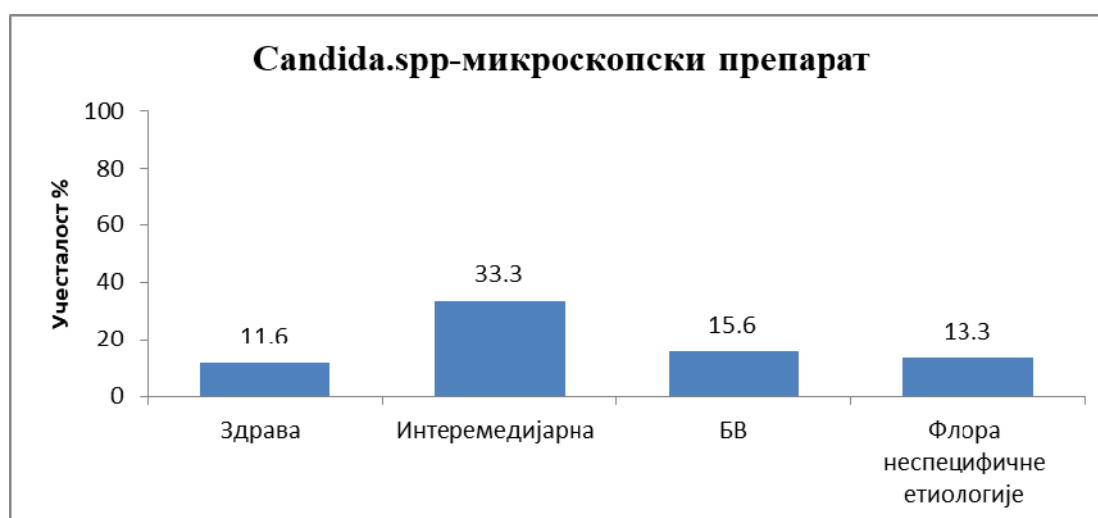
Поређење присуства патолошких ПМН у зависности од детекције појединачне СПИ приказано је у табели 37. Као што можемо видети ни код једног узročника не постоји статистички значајна разлика, што значи да је дистрибуција ПМН подједнака без обзира на присуство/одсуство инфекције.

Табела 37. Поређење присуства ПМН у зависности од присуства различитих узрочника СПИ

		ПМН		
		Нормални	Патолошки	р вредност
<i>C. trchomatis</i>	Поз	12 (75%)	4 (25%)	<b>1,000</b>
	Нег	161 (73,5%)	58 (25,5%)	
<i>Ureplasma spp</i>	Поз	104 (72,7%)	39 (27,3%)	<b>0,700</b>
	Нег	69 (75%)	23 (25%)	
<i>M. genitalium</i>	Поз	50 (75,8%)	16 (24,2%)	<b>1,000</b>
	Нег	123 (72,8%)	46 (27,2%)	
<i>M. hominis</i>	Поз	2 (100%)	0	<b>0,642</b>
	Нег	171 (73,4%)	62 (26,6%)	
<i>T. vaginalis</i>	Поз	1 (33,3%)	2 (66,7%)	<b>0,171</b>
	Нег	172 (74,2%)	60 (25,9%)	
HPV 12 tipova	Поз	49 (70%)	21 (30%)	<b>0,063</b>
	Нег	75 (82,4)	16 (17,6%)	
HSV-1	Поз	2 (100%)	0	<b>1,000</b>
	Нег	171 (73,4%)	62 (26,6%)	
HSV-2	Поз	2 (100%)	0	<b>1,000</b>
	Нег	171 (73,4%)	62 (26,6%)	

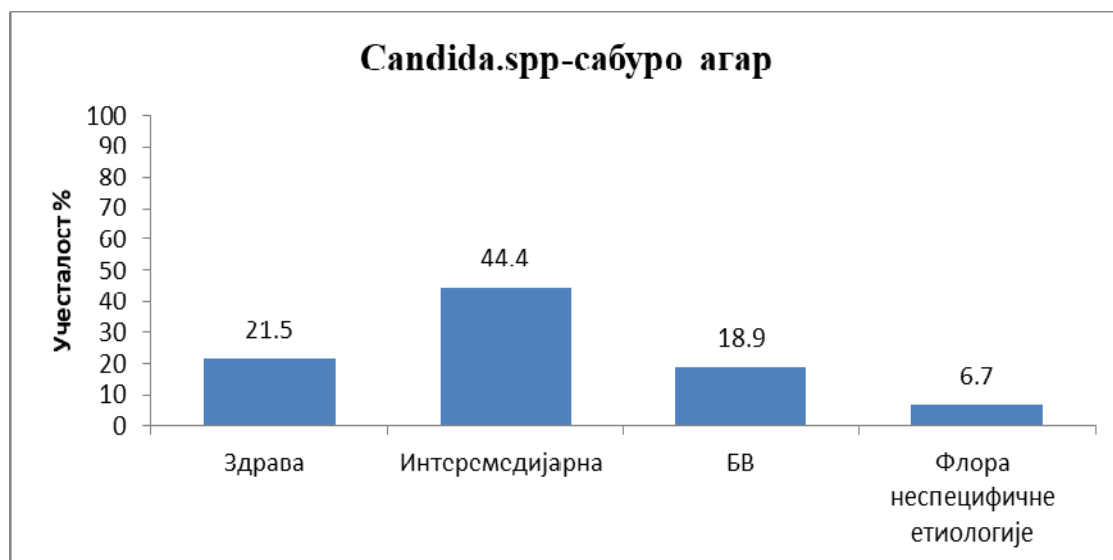
### 10. Поређење присуства вагиналних дисбиоза и рода *Candida spp.*

Резултати поређења између различитих стања вагиналне флоре добијеним *real-time* RT PCR за дијагностику БВ и детекције *Candida spp.* приликом прегледа микроскопским препаратом показују да је гљивица присутна у сличним процентима без обзира на статус вагиналне флоре (Графикон 17). Позитивну *Candida spp.* имало је 11,6% са здравом, 33,3% са интермедијарном, 15,6% са БВ флором и 13,3% осталих што статистички није значајна разлика (Фишеров тест вероватноће  $p = 0,271$ )



Графикон 17. Учесталост *Candida spp.* детектоване на микроскопском препарату у односу на стање вагиналне флоре детектоване RT PCR

Слични резултати добијају се и поређењем културе Сабуро агара са молекуларном методом (Графикон 18). Позитивна кандида изолована је код 26 (21,5%) пацијената са здравом флором, 4 (44,4%) са интермедијарном, 17 (18,9%) са БВ и 1 (6,7%) са флором неспецифичне етиологије што статистички није значајна разлика (Фишеров тест вероватноће  $p = 0,178$ ).



Графикон 18. Учесталост *Candida spp.* изоловане на Сабуро агару у односу на стање вагиналне флоре детектоване RT PCR

## 11. Поређење присуства сексуално преносивих инфекција и *Candida spp.*

Поређење између збирног присуства узрочника неке од СПИ и детекције *Candida spp.* уз помоћ микроскопског препарата и изолацијом на Сабуро агару приказано је у табели 38. Присуство *Candida spp.* (детектовано и на микроскопском препарату и на Сабуро подлози) подједнако је заступљено и код жена са узрочницима СПИ, као и код оних које су негативне на све узрочнике ( $\chi^2 = 0,004$ ,  $p = 0,952$ ) и ( $\chi^2 = 0,298$ ,  $p = 0,585$ ), респективно.

Табела 38. Поређење резултата присуства *Candida spp.* детектованих на микроскопском препарату и у култури у зависности од присуства неке од СПИ

		Присутан неки од узрочника СПИ	Без узрочника СПИ
<i>Candida spp.</i> микроскопски препарат	Поз	25 (75,8%)	8 (24,2%)
	Нег	154 (76,2%)	48 (23,8%)
<i>Candida spp.</i> Сабуро агар	Поз	38 (79,2%)	10 (20,8%)
	Нег	141 (75,4%)	46 (24,6%)

Поређење резултата присуства *Candida spp.* (детектоване на микроскопском препарату и Сабуро агару) у зависности од присуства моноинфекција/коинфекција са неком од СПИ приказано је у табели 39. Резултати показују је *Candida spp.* (детектована и на микроскопском препарату и на Сабуро подлози) подједнако присутна код моноинфекција/коинфекција и испитаница негативних на све узрочнике СПИ, односно да између ових група не постоји статистичка значајна разлика ( $\chi^2 = 0,185$ ,  $p = 0,912$ ) и ( $\chi^2 = 1,334$ ,  $p = 0,513$ ), респективно.

Табела 39. Поређење резултата присуства *Candida spp.* детектованих на микроскопском препарату и у култури у зависности од присуства моно или коинфекција

		Без присуства СПИ	Моноинфекција	Коинфекција	Укупно
<i>Candida spp.</i> микроскопски препарат	Поз	8 (14,3%)	13 (15,1%)	12 (12,9%)	33 (14%)
	Нег	48 (85,7%)	73 (84,9%)	81 (87,1%)	202 (86%)
<i>Candida spp.</i> Сабуро агар	Поз	10 (17,9%)	21 (24,4%)	17 (18,3%)	48 (20,4%)
	Нег	46 (82,1%)	65 (75,6%)	76 (81,7%)	187 (79,6%)

## V ДИСКУСИЈА

Вагиналне дисбиозе представљају поремећај у саставу микробиома вагине и могу утицати на здравље жена и њихових новорођенчади. Иако се велики број истраживања бави БВ и АВ и даље постоје непознанице везане за ове синдроме, чему значајно доприноси непрецизност у њиховој дијагностици и непостојање адекватног златног стандарда. У нашем истраживању користили смо различите клиничке, микроскопске и молекуларне методе за дијагностику вагиналних дисбиоза. Њиховим поређењем желели смо да укажемо на предности и мане сваке од појединачне методе, као и на сложеност и проблеме везане да дијагностику ових поремећаја вагине.

Појава молекуларних метода допринела је новим сазнањима о саставу и комплексности микробиома вагине. Међутим, молекуларне методе нису добиле примат у дијагностици вагиналних дисбиоза, јер се Амселови и Нугентови критеријуми и даље, у највећем броју истраживања, користе као златни стандард. Главна полазница у истраживању је претпоставка да ће примена мултиплекс квантитивног RT PCR дати поузданије резултате у поређењу са клиничким и микроскопским методама. Зато је истраживање конципирано као поређење постојећег златног стандарда – Нугента са другим методама, а затим увођење PCR-а као златног стандарда како бисмо сагледали поузданост у дијагностици вагиналних дисбиоза.

Да би истраживање дало шири увид у правилну процену статуса вагиналне флоре, поред вагиналних дисбиоза испитивали смо и присуство сексуално преносивих инфекција као и *Candida spp.* и упоредили смо њихову међусобну повезаност.

### **1. Упоредна анализа метода за дијагностику вагиналних дисбиоза добијених микроскопским и клиничким критеријумима**

Иако су успостављени пре више од 30 година, Нугентови критеријуми се и даље користе у највећем броју истраживања као златни стандард. Под термином „златни стандард“ у медицини се сматра свака стандардизована клиничка процена, метода, процедура, интервенција или мерење познате валидности и поузданости са којима се упоређују нови тестови или протоколи. Таква метода треба правилно да разврста пацијенте у здраве или болесне (106). Из тог разлога сматрамо да постојање интермедијарне групе, односно стања између здравог и патолошког не може да буде одлика доброг златног стандарда.

Преваленца БВ у нашем истраживању креће се између 33–41% у зависности од клиничке и микроскопске методе за дијагностику. Важно је истаћи да је Нугентовом методом препознат најмањи број БВ, што говори у прилог несавршености ове методе као златног стандарда. Уколико упоредимо све микроскопске методе за дијагностику БВ у нашем истраживању видећемо да су добра подударња између нормалних налаза и БВ. Највеће разлике између метода присутне су управо код интермедијарног налаза. У нашем испитивању Нугентом је добијено 60 (25,5%), *Ison/Hay* 50 (21,3%), *Clays* 53 (22,6%) а Дондерсовом методом 69 (29,3%) интермедијарних налаза. То значи да је приликом евалуације препарата овим микроскопским методама свака четврта испитаница сврстана у ову групу. У литератури преваленца интермедијарног налаза је слична са нашим резултатима и у зависности од истраживања варира у опсегу од 20 до 40% (80, 107, 108). Треба указати да велики број интермедијарних налаза добијених Дондерсовом методом проистиче и из чињенице да постоје две групе у тој категорији (IIa и IIb). У групи IIa, која представља углавном нормалну флору са доминацијом лактобацила у односу на друге бактерије, детектовано је 48 (20,4%) жена. Нугентовом методом највећи број ових налаза сврстан је у групи здравих. Будући да методе Нугента и Дондерса за евалуацију користе различита увеличања (x 1000 односно x 400) могуће је да приликом евалуације Нугетовом методом није запажено присуство и других бактерија. У нашем истраживању IIb категорија интермедијарних налаза детектована је код 20 (8,5%) испитаница. Сам Дондерс, у једном од својих радова, истиче да иако је ово умерено измењена флора налаз је вероватно повезан са патолошком вагиналном флором (66).

Интермедијарна група представља транзиторно стање између здравог и болесног па може да се постави питање терапије овако добијеног налаза. У литератури поједини радови интермедијарни налаз сматрају БВ негативним (109–111), али се са овим ставом не би требало сложити. *Hiler* и сарадници (112) су у свом истраживању пратили перзистентност и карактеристике вагиналног микробиома 7918 трудних жене (23–26 гестацијаска недеља). Свим испитаницама скупљени су узорци и одређен статус вагиналне флоре користећи Нугентове и Амселове критеријуме. Затим су труднице долазиле на контролу у 31 до 36 недељи где су поновно узорковани брисеви и праћена статус вагиналне флоре. Приликом контролног прегледа из студије су искључене испитанице које су користиле неку антибиотску терапију. Резултати истраживања показују да је интермедијарна флора најмање стабилна. Код 32% испитанице са интермедијарном флором у контролној евалуацији микроскопских препарата њих 32%

је развило БВ, 31% је било са нормалном флором, док је трећина и даље имала интермедијаран налаз. У студији се истиче и да су, у поређењу са Амселовом методом, жене са интемедијарном флором углавном имале неки од позитивних критеријума у односу на жене са здравом флором (112).

Нугент и Амсел су најчешће коришћени клинички и микроскопски критеријуми за дијагностику БВ у литератури. Да би испитаница Амселовом методом била сврстана у групу са БВ, потребно је да 3 од 4 критеријума буду позитивна (77). Сматрамо да је на тај начин велики број жена лажно негативно. Уколико посматрамо повећан вагинални секрет као критеријум, он са једне стране не мора да буде присутан јер је БВ у 50% случајева асимптоматска, а са друге стране повећан секрет карактеристичан је и за друге вагиналне инфекције попут кандидијазе, *T. vaginalis*, *C. trachomatis*, итд. Присуство хомогеног сиво-беличастог секрета представља најмање специфичан критеријум у дијагностици Амселове методе. Поред тога, потребно је да на препарату буде више од 20% *clue* ћелија да би се такав препарат сматрао позитивним. На основу искуства у прегледу препарата у 20–30% случајева *clue* ћелије нису присутне, иако је реч о БВ. Више истраживања која пореде Амсела са Нугентовим скором показују да проба са КОН и рН вредност имају најбољу сензитивност и специфичност и да заједно у комбинацији представљају добар предиктивни показатељ у дијагностици БВ (80, 113, 114). Из тог разлога ми смо као главне критеријуме приликом дијагностике Амселовом методом, након прегледа нативног препарата, у обзир узимали пробу са КОН и рН вредност.

Резултати наше студије показују да је слагање ове две методе добро (*каппа* = 0,80), а највеће подударење је између испитаница са БВ (79,8%). (Графикон 1) Постоји велики број радова који се бави поређењем Амселове и Нугнетове методе. Слагање између ових метода се разликује у зависности од истраживања, али се укупно Нугентов скор сматра за прецизнију и објективнију методу (80, 115–117). Ми се са овим ставом не слажемо, будући да је употребом модификоване Амселове методе у нашој студији детектовано 94 (40%) испитаница са БВ, док је Нугентовом методом тај број износио 78 (33,1%). Једно од истраживања које подржава наш став је *Chaijareenont* и сарадника (113). Аутори ове студије су поредили резултате Амсела и Нугента код 217 жена, и користећи Амсела као златни стандард, добили да је сензитивност Нугентовог скорa 65,6% а специфичност 97,3%. У закључку овог испитивања истиче се да Нугент није добар скрининг тест за дијагностику БВ због ниске специфичности, али сматра се да је предност ове методе у односу на Амселов критеријум што препарати по Граму могу

ретроспективно да се прегледају више пута због вишеструког мишљења у потврди дијагнозе БВ (113). *Mohammadzadeh* и сарадници (118) су у својој студији добили резултате слагања Амсела и Нугента исте као и у нашем истраживању ( $\kappa = 0.8$ ). За разлику од ове студије *Mahajan* и сарадници (119) су добили умерено слагање између ове две методе ( $\kappa = 0,58$ ). Због велике разлике у резултатима многобројних студија када се користе Амселови и Нугентови критеријуми намеће се закључак да ове методе као златни стандарди нису поуздани у дијагностици БВ. Кључна разлика је у томе што Амсел испитанице сврстава у две групе – нормалан налаз и БВ, док Нугентова метода осим те две групе има и интермедијарну која представља стање вагиналне флоре између здравог и БВ.

Један од главних недостатака Амселове методе је што она не пружа никакве информације о самом типу бактерије које је узрочник БВ, као ни о постојању других стања вагиналне флоре већ све испитанице распоређује у две групе. Међутим, Амселова модификована метода има предности у односу на све микроскопске зато што може лако и једноставно да се изведе већ у самој гинеколошкој ординацији.

Наше истраживање показује да је слагање између Нугента и *Ison/Hay* методе када се пореде са три групе одлично ( $\kappa = 0,91$ ). (Слика 34) Међутим, *Ison/Hay* су први који указују на недостатке Нугентове методе. Аутори истичу да је микроскопски налаз комплекснији у односу на златни стандард. У оригиналном раду *Ison/Hay* нулта група се тумачи као последица примене антибиотске терапије (84). Приликом поређења Нугентна са својом методом нулту и групу са кокама тумачили су као нормалан налаз. Кључна разлика између ове две методе јесте да се *Ison/Hay* базира на одређивању релативног односа бактеријских морфотипова, док се Нугент базира на збиру бодова.

У литератури не постоје радови који се баве нултом групом, тако да не можемо са сигурношћу да тврдимо да ли је овај налаз ближи нормалном или БВ, нити како клинички да третирамо овако добијени резултат. Приликом евалуације препарата *Ison/Hay* се метода посматра под увећањем  $\times 1000$ , тако да је површина плочице која се прегледа веома мала и из тог разлога могуће је да на одређеним деловима препарата нема адекватне видљивости бактерија.

*Ison/Hay* у оригиналном раду сматрају да коке нису повезане са поремећеном вагиналном флором, али касније у свом истраживању указују и на постојање кока. (84). До појаве Дондерсове методе која указује на важност кока на препарату и повезује их са новим вагиналним поремећајем, у литератури постоји мали број радова који се њима баве. *Santos Santiago* са сарадницима (120) у истраживању које прати свакодневно Грам



препарате и недељне културе 17 жена између два циклуса, показује да су коке повезане са поремећеном вагиналном флором. Резултати њихове студије указују да менструација и употреба антимикробних лекова представљају главне факторе који доводе до поремећаја у ВМБ и да је у тим случајевима увек било пораста Грам позитивних кока. У закључку истраживања аутори подвлаче да су коке неправедно запостављене у литератури (120).

У нашем истраживању *Ison/Hay* методом детектоване су коке код 4 испитанице. Коке се углавном налазе у одређеним деловима микроскопског препарата и нису равномерно распоређење и зато сматрамо да евалуацијом под увећањем  $\times 1000$  не може да се стекне увид о њиховој правој дистрибуцији на микроскопским препаратима.

У литератури постоји мали број радова који за дијагностику БВ користи *Ison/Hay* методу, али већина резултата постојећих радова показује добро слагање са Нугентовом методом. Наши резултати слични су резултатима који су добили *Ison/Hay* у свом првом раду у коме је представљена нова метода за дијагностику. Слагање између Нугента и нове методе добијене у том истраживању било је добро ( $\kappa = 0,91$ ) (84). *Chawla* и сарадници (121) су у својој студији такође поредили ове методе само што су у статистичкој анализи интермедијарну групу припајали нормалним налазима и тада је  $\kappa$  коефицијент износио 0.83 док је спајање интермедијарне групе са БВ дало боље резултате у односу на Нугентов скор ( $\kappa = 0,9$ ) (121).

Слагање између Нугента и *Clays* методе је одлично ( $\kappa = 0,91$ ) и веће је у односу на све друге микроскопске и клиничке методе. Метода по *Clays*-у није заживела у научним истраживањима и врло мали број радова користи је за дијагностику БВ. Један од ретких радова су *Martines* и сарадници (122), који у својој студији пореде резултате Амсела, Нугента и *Clays* методе код 101 жене у репродуктивном периоду. Ова студија приликом поређења метода када су редуковане на две групе интермедијарне налазе третира БВ негативним, што је такође учињено у нашој студији. Резултати истраживања показују да је БВ детектована Амселовом, Нугентовом и *Clays* методом код 36,6%, 28,7% и 41,6%, респективно. За разлику од наших резултата слагање између Нугентове и методе по *Clays* је добро ( $\kappa = 0,75$ ). На основу свог испитивања аутори студије истичу да је *Clays* метода најефикаснија за дијагностику БВ (122).

Иако није присутна у истраживањима *Clays* метода, као и *Ison/Hay* приказује већу комплексност микроскопског препарата у односу на Нугентове критеријуме и детаљније анализира групу нормалних налаза, указујући на постојање *Bifidobacteria* о

чему ће бити више речи у даљој дискусији. Такође ова категоризација разматра и постојање леукоцита, за разлику од Нугента и *Ison/Hay*-а који их уопште не разматрају.

Нова микроскопска метода која је коришћена у овој студији представља модификацију методе уведене у студији Ненадића и сарадника (87, 88). На основу међусобне процене броја (целуларности) и односа штапићастих, бактеријских форми као и кока (уз присуство ПМН и парабазалних ћелија) испитанице су дељене на три групе (БВ, нормалан налаз и АВ) а свака од њих је даље подељена на три подгрупе (*full, mid, null*). У односу на остале клиничке и микроскопске налазе НММ има најмање слагања у поређењу са Нугентом као златним стандардом. Ако детаљније анализирамо добијене резултате између ове две методе, постоји добра подударна између нормалних налаза и БВ. На графикону 5 може се уочити да је већину интемедијарних налаза добијених Нугентовом методом НММ је сврстала у *null*, без обзира да ли је реч о нормалном налазу, БВ или АВ. Такође, већина налаза АВ добијених НММ, Нугент је препознао као интемедијарне налазе, што говори у прилог несавршености Нугента као златног стандарда.

У оригиналном раду Ненадић и сарадници (88) пореде Нугентову и НММ код 394 асимптоматских трудница. У односу на резултате ове студије где је слагање између ове две методе добро, резултати оригиналног истраживања показују да је подударност Нугентове и НММ одлично (0,98). Свакако треба нагласити да смо у односу на оригиналну НММ у нашем испитивању користили модификовану методу и детектовали АВ као посебну категорију за разлику од оригиналне студије.

Поред наведене три групе аутори НММ методе указују на постојање два засебна морфотипа која се могу уочити на микроскопским препаратима – бифидо и лепто. У нашој студији бифидо морфотип је забележен код 12 (5,1%) испитаница. *Bifidobacterium* је род Грам позитивних, непокретних, често разгранатих анаеробних бактерија које насељавају црева, вагину и уста сисара (123). На микроскопском препарату вагиналног размаза виде се као кратки Грам позитивни штапићи кратког или неправилног облика и због гранања често подсећају на слова кинеског писма. Први који препознају овај род на микроскопском препарату су аутори *Clays* методе коју су ову групу назвали *I-like* (сличан нормалном) и сврставају је у посебну категорију (85). Преклапање *I-like* налаза *Clays*-ом методом и бифидо НММ је добро, јер је од 12 пацијената њих 7 имало исти налаз.

Иако је здрава вагинална флора доминантно настањена врстама рода *Lactobacillus* употребом молекуларних метода показано је да 5–10% жена имају

атипичну здраву флору у којој су доминантне врсте рода *Bifidobacterium*. Ове бактерије су идентификоване у неколико кохортиних студија здравих жена (124–126). Из овог разлога све налазе бифидо форми добијене НММ методом сврстане су у нормалан налаз. Вагиналне *Bifidobacterium* продукују млечну киселину и водоник пероксид и могу да одржавају хомеостазу у вагиналном микробиому. Атипични здрави микробиоми често се сматрају као патолошке (поремећене флоре) или су занемарени и нису довољно истражени у студијама вагиналних микробиома (127).

Поред бифидо забележене су и лепто форме које су детектоване код 2 (0,8%) испитанице. То су издужене штапићасте форме, различите дебљине и бојења по Граму. Ове бактерије су првобитно назване *Leptotrichia*, али су на основу фенотипских и филогенетских доказа 2012. године рекласификоване у род *Sneathia* (128, 129). Употребом молекуларне дијагностике *Fethers* и сарадници су показали је да овај род присутан и код здравих жена, али и код оних са БВ (130). С обзиром да су микроскопским налазима обе испитанице поред присуства лепто форми, присутни и лактобацили оне су сврстане у нормалан налаз.

У литератури нисмо пронашли радове који пореде Нугентову и Дондерсову методу евалуацијом микроскопског препарата, а истраживања која у свом поређењу користе молекуларне методе у поређењу са Дондерсовом методом приказана су у даљој дискусији.

## **2. Недостаци и проблеми у дијагностици вагиналних дисбиоза применом микроскопских и клиничких метода**

Велики број аутора указује на недостатке Нугента као златног стандарда (81–83). Интерпретација резултата Нугентовог скорa захтева искуство, време и вештину у микроскопирању (83). Такође метода препознаје само три бактеријска морфотипа и не дефинише у потпуности разноврсност и сложеност вагиналне флоре. Поред тога, многи аспекти могу утицати на интерпретацију налаза бојених по Граму као што су: различити начина узорковања, размазивања бриса по плочици које директно утиче на хомогеност и дебљину препарата, начин и време фиксације препарата, као и разлике у самој врсти микроскопа и видног поља којим се врши евалуација (131).

Интерпретација налаза Нугентовом методом може правити проблем, јер не постоје јасно одређени критеријуми за разликовање три основна морфотипа у систему бодовања. Највећа неслагања везана су за проблеме: које морфотипове треба сматрати Грам позитивним штапићима (односно бодовати их као лактобациле), које су разлике

између коки и малих штапића и како препознати морфотипове бактерија попут *Gardnerella* и *Prevotella*, јер могу варирати у величини од округлих до издуженијих (у зависности од аспекта бојења) и довести да забуне у категоризацији (131–133). До неслагања приликом евалуације препарата долази и код малог броја лактобацилуса на шта указују *Ison/Hay* и НММ. Ово је од велике важности за систем бодовања, јер су интервали оцењивања веома уски, са разликом од само неколико бактерија.

Такође, приликом евалуације микроскопских препарата јављају се и проблеми око (не)могућности разликовања *G. vaginalis* и *L. iners*. *G. vaginalis* је Грам варијабилан (односно може да се боји као Грам позитиван или негативан). *L. iners* је тешко препознати на препарату бојеном по Граму, јер се боји Грам негативно и морфолошки је чешће кокобациларног него бациларног облика (132, 134). Сојеви *L. iners* се могу погрешно идентификовати као *G. vaginalis* сојеви 1 и 6 (134). Будући да молекуларно-биолошка истраживања показују да се ова два микроорганизма детектују и код здравих жена и код оних са БВ то може довести до појаве погрешних закључака приликом евалуације препарата. Ово практично значи да на микроскопском препарату пацијенткиња које имају нормалан налаз (предоминација лактобацила) готово увек имамо и одређени број *G. vaginalis* и обрнуто, код пацијената са БВ увек постоје и *L. iners*, али се оне најчешће не виде и не разликују.

За преглед микроскопских препарата важан је и одабир микроскопа, односно величине видног поља. Први који указују да постоје разлике у видном пољу у зависности од врсте микроскопа су *Larsson* и сарадници (86). Они у свом испитивању показују да разлике у површинама видног поља могу да достигну и до 300% у зависности од врсте микроскопа. Зато су предложили стандардизацију Нугентовог скорa, како би било могуће међусобно поредити резултате различитих истраживања. У нашем испитивању коришћен је измењен Нугентов скор за површину видног поља од  $0,035 \text{ mm}^2$ .

Приликом евалуације микроскопских препарата бојених по Граму Нугент, *Ison/Hay* и *Clays* методе користи се увеличање  $\times 1000$ . Површина микроскопске плочице износи  $1935 \text{ mm}^2$  ( $25,4 \times 76,2 \text{ mm}^2$ ) а у просеку размаз вагиналног бриса заузима трећину плочице (око  $600 \text{ mm}^2$ ). Пошто је видно поље под увеличањем  $\times 1000$  око  $0,035 \text{ mm}^2$  то значи да укупно на препарату постоји око 17 142 ( $600/0,035 \text{ mm}^2$ ) видних поља. У просеку, приликом гледања евалуације препарата прегледа се око 15–20 видних поља. Када се препарат прегледа под увеличањем  $\times 200$  величина видног поља је око  $0,875 \text{ mm}^2$  и постоји око 686 ( $600/0,875$ ) видних поља (87). На основу изложеног видимо

колика је предност НММ када препарате посматрамо под увеличањем  $\times 200$  јер се за много краћи период времена може стећи увид у целокупни препарат.

Статистичка обрада резултата која се користи за поређење метода за дијагностику БВ такође је један од проблема у дијагностици. Различите методе за дијагностику садрже различити број категорија (група) у својој подели и зато је неопходно припојити ове групе да бисмо статистички уопште могли да их упоредимо са Нугентовим скором. На тај начин смо принуђени да нове групе које нуде одређене микроскопске методе спојимо са већ постојећим (нормалан, интермедијарни налаз и БВ). То доводи до измена у статистичкој обради података приликом коришћења Нугента као златног стандарда, а тиме и немогућности представљања комплексности вагиналне флоре. Сматрамо да је то један од разлога што неке микроскопске методе, коришћене у нашем истраживању, нису заживеле у дијагностици вагиналних дисбиоза.

Нугент, *Ison/Hay* и *Clays* методе баве се само дијагностиком БВ и занемарују постојање друге важне вагиналне дисбиозе, односно АВ. С обзиром на последице које може узроковати овај вагинални поремећај и потпуно другачији приступ лечењу сматрамо да је то највећа мана ових метода. У нашем истраживању АВ смо детектовали уз помоћ две методе – Дондерса и НММ. Дондерсовом методом дијагностиковано је 20 пацијената са АВ, а НММ методом 15. Преклапање између дијагностике АВ међу ове две методе је добро. Четрнаест од двадесет испитаница добијено Дондерсовом методом, сврстано је као АВ Новом микроскопском методом, док је осталих 6 распоређено у групу БВ. Уколико упоредимо налазе Дондерса са Нугентовом методом њих 13 (21,6%) је сврстано у интермедијарни налаз, а 7 (8,9%) групу са БВ, док је у поређењем са НММ чак 11 (18,3%) у интермедијарној групи а 4 (5,1%) је препознато као БВ. Из овога се може закључити да Нугентова метода већина налаза са АВ сврстава у интермедијарни групу што говори у прилог несавршености овог златног стандарда.

Иако дефинисан пре две деценије АВ и даље представља запостављени поремећај вагиналне флоре. Аеробни вагинитис се карактерише абнормалном вагиналном флором која садржи аеробне кокидне бактерије, варијабилни ниво вагиналне инфламације и недовољно сазревање епитела (64, 66). Иако АВ и БВ деле неке карактеристике попут смањења или одсуства лактобацила, повећање рН (углавном веће код АВ), повећан секрет (мирис рибе код БВ, а код тешких облика АВ непријатан, труп мириис) постоје стриктне разлике између ове две дисбиозе. Код БВ не постоји инфламација, док је вагина код жена са АВ често упаљена (црвена) и едематозна. Код

тежих облика АВ присутне су ерозије и улцерације. Боја секрета код БВ је обично бело-сивкаста и воденкасте конзистенције док је код АВ жућкасто зеленкаста и чешће густа и слузава. Жене са БВ немају диспареунију док се она јавља код АВ. Микроскопски налаз се разликује између ових дисбиоза. Код АВ присутни су леукоцити, парабазалне ћелије и незреле епителне ћелије, док је грануларна микрофлора и присуство *clue* ћелија у појединим случајевима карактеристично за БВ. У великом броју студија, и поред значајних разлика, АВ није препознат (135, 136).

*Macklaim* и сарадници истичу у свом раду да се микроскопска евалуација АВ у САД и Канади ретко спроводи у рутинским прегледима, чак и код симптоматских жена (137). Са друге стране у Европи и Азији постоје микроскопске обуке и курсеви, где се унапређује знање дијагностичких вештина међу микробиолозима што доводи до препознавања ове вагиналне дисбиозе у рутинским прегледима (138, 139).

### **3. Процена статуса вагиналне флоре упоредном применом клиничких и микроскопских метода за дијагностику вагиналних дисбиоза**

Будући да смо навели предности и мане микроскопских препарата у дијагностици вагиналне дисбиозе, хтели смо да укажемо и на важност клиничких критеријума као и њихове упоредне примене у правилној процени статуса вагиналне флоре.

Резултати студије показују да је позитивне пробе са КОН-ом највећим делом присутна у налазима БВ добијене различитим микроскопским методама (*Нугент, Ison/Hay, Clays*, НММ и Дондерс) (Табела 15). Код једног дела интермедијарних налаза добијених микроскопским методама, проба са КОН је позитивна (Графикон 9). Сматрамо овај податак битним, јер то значи да код ових испитаница постоји довољан број анаеробних бактерија који узрокују непријатан мирис покварене рибе. Због кога је проба са КОН позитивна и, без обзира на интермедијарни микроскопски налаз, ова флора је ближа налазима БВ. У табели 15 можемо уочити да је проба са КОН-ом позитивна и у једном делу налаза АВ добијених НММ и Дондерс методом. Будући да је мирис покварене рибе карактеристичан само за БВ, у овим случајевима ради се највероватније о лажно позитивним налазима. Приликом одређивања мириса испитивач је констатовао непријатан мирис, али то није био мирис покварене рибе, већ мирис секрета АВ који се осећа на буђ/гној.

Као и код пробе са КОН, наше истраживање показује добро слагање патолошких рН вредности и присуства вагиналних дисбиоза добијених различитим

микроскопским методама. У табели 16 видимо да је присуство патолошких рН највеће код жена са БВ и АВ, док су налази здраве вагиналне флоре испитаница највећим делом са нормалним вредностима овог клиничког параметра. У интермедијарним налазима вредност рН преко 4.5 детектована је код 29 (48,3%) испитаница добијених Нугнетовом методом, 26 (52%) детектованих *Ison/Hay* методом, 27 (50,9%) добијених *Clays* критеријумима и 30 (33%) распоређених Дондерсовом методом. Будући да патолошка рН вредности увек указује на неки поремећај у микробиому вагине овај резултат сматрамо изузетно важним у процени статуса вагиналне флоре.

Регулација вагиналне рН вредности жена је јединствена када се пореди са осталим сисарима. Као што је већ споменуто доминатни род бактерија код већине жена је *Lactobacillus spp.*, док је код већине других сисара овај род присутан са мање од 1% (140). Из тог разлога хумана вагина је киселија (3,8–4,5) у односу на све остале нехумане сисаре (5,6–7,8) (141). Физиолошка регулација вагиналног рН има динамичну природу и зависи од периода живота жена, као и од самог менструалног циклуса. Многи фактори утичу на флукуацију овог параметра укључујући хормоне, састав микробиоте и друге метаболичке процесе који се одигравају у вагини. Сазнања о рН вредности вагине и микробиоте су и даље у потпуности неразјашњена. Потребно је више експерименталних и упоредних истраживања да би се разумела његова регулација и утицај на здравље жена (142, 143).

Мерење рН вредности вагине има важну клиничку вредност као иницијални скрининг тест у процени стања вагиналне флоре (143, 144). Пораст овог клиничког параметра, када се искључи одсуство непосредне изложености сперматозоидима, менструацији или егзогеним факторима, указују на промене у вагиналном екосистему. Повећане рН вредности указују на БВ, АВ или присуство неке од СПИ попут *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* или *T. vaginalis*. Супротно томе, присуство вагиналног исцетка, бола или свраба уз нормалну рН вредност указује на инфекцију гљива из рода *Candida* (143).

У неким ситуацијама остаје нејасно да ли је промена рН вредности примарни догађај или секундарна последица измењеног микробиома вагине. Инфекције са *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* или *T. vaginalis* могу довести до крварења грлића материце или губитка воде у трансмукози и на тај начин непосредно могу да подигну овај клинички параметар (143).

Иако модификовани Амселови критеријуми коришћени у студији имају недостатке, њихова предност је што могу да се користе у клиничкој пракси, врло су једноставни за извођење и нису скупи. Међутим, понаособ посматрани клинички

параметри (рН вредности и КОН) могу дати лажно позитивне резултате. Сматрамо да одређивање рН вредности вагине и проба са КОН-ом у комбинацији са евалуацијом микроскопског препарата могу да дају бољи увид у процени статуса вагиналне флоре.

Резултати добијени у студији показују важност упоредне примене клиничких и микроскопских критеријумима, нарочито у случајевима интермедијарних налаза добијених микроскопским методама. У тим случајевима два врло лако мерљива критеријума (рН вредност и проба са КОН) приликом евалуације микроскопског препарата могу разлучити да ли је интермедијарни налаз ближи нормалном или патолошком стању вагиналне флоре.

#### **4. Важност полиморфонуклеарних леукоцита у евалуацији микроскопског препарата**

Сви поменути дијагностички критеријуми подразумевају микроскопски преглед на коме се ПМН могу лако детектовати. Међутим, највећи број микроскопских метода не детектује ПМН и у студијама недостају подаци о њиховом присуству. Сматрамо да би детекција ПМН леукоцита представља важан дијагностички параметар у разликовању вагиноза од вагинитиса, коинфекција и/или мешовитих инфекција. Леукоцити који се већински срећу у вагини су полиморфонуклеарни неутрофили. Регрутовање и активација неутрофила сматра се главним средством урођеног имунолошког одговора вагиналне мукозе против патогена (145–147).

Резултати студије показују да је присуство патолошких ПМН леукоцита заступљено већим делом и код испитаница са БВ и интермедијарним налазима него код жена са здравом флором. (Табела 17). Једна од најважнијих карактеристика БВ је одсуство инфламаторног одговора без обзира што се ради о масовној колонизацији анаеробних бактерија. Из тог разлога ова вагинална дисбиоза је названа вагиноза, а не вагинитис (146). У највећем број истраживања које се баве дијагностиком БВ не постоје подаци о присуству ПМН. Свако ко се у свакодневной пракси бави прегледом микроскопских препарата потврдиће да одређен број пацијената са БВ има повећан број ПМН. То би значило да уколико код пацијената са БВ постоје и ПМН онда је узрок томе присуство неког другог микроорганизма, и у том случају се вероватно ради о мешовитим инфекцијама односно коинфекцијама. Први који указује на значај ПМН на микроскопским препаратима био је Доднерс са сарадницима. Они повезују њихово присуство са АВ (65). Иако Доднерс су свом раду наводи да је слика АВ потпуно различита у односу на грануларну БВ флору морамо да напоменемо да ово није случај



када је у питању препарат са лакшим облицима БВ (парцијална) и АВ (средње тешка). Мишљења смо да ПМН представљају најважнији појединачни микроскопски параметар у диференцијалној дијагностици БВ и АВ. Важно је и напоменути и могуће присуство коинфекција тј мешаних инфекција односно да исти пацијент има истовремено присуство обе вагиналне дисбиозе, као и могуће присуство *C. albicans* или неке од СПИ о чему ће бити више речи у даљој дискусији нашег истраживања. Такође треба истаћи да, уколико се ради од препарату са нормалним налазом вагиналне флоре и присуством великог броја ПМН без присуства *Candida spp.* или *T. vaginalis*, онда је реч у идиопатској леукоореји на коју указују аутори *Clays*-ове методе (85).

## 5. Присуство рода *Candida* у микробиому вагине

*Candida* је део нормалне вагиналне физиолошке флоре и налази се код око 20–50% асимптоматских жена. Осим што је присутна и код здравих жена, врсте рода *Candida* могу бити и опортунистички патогени који доводе до јаког имунолошког одговора и појаве вуловагиналне кандидијазе. Међутим, колонизација овом гљивом често је асимптоматска, а постоје и жене код којих долази до повећаног пораста, али без испољавања кандидијазе (148).

Упркос честој појави гљивица у вагиналном микробиму и даље не постоји потпуно сазнање о односима између *Candida* и бактерија (нарочито лактобацила). Њихов однос је важан за разумевања микробиома вагине и његове везе са репродуктивним здрављем жена (148, 149). Више студија испитивало је односе између вагиналних бактерија и *Candida*. Неколико оваквих студија повезује висок ниво лактобацилуса са гљивицама (149–151), док друга истраживања повезују присуство BVAB са родом *Candida* (152–155).

Наша студија показује да је присуство рода *Candida* приликом евалуације микроскопским препаратима већа у случају интермедијарних налаза и налаза БВ, односно да је повезана са поремећеном вагиналном флором. (Табела 19) *Tortelli* и сарадници (148) у свом истраживању поређењем микроскопског налаза и молекуларне методе детектовали су присуство два најчешћа лактобацила у односу на врсте рода *Candida*. Њихови резултати показују да *L. iners* олакшава колонизацију рода *Candida*, док супротно томе *L. crispatus* умањује вируленцију кандиде и повећава имунски одговор модулацијом цитокина. Сматра се да продукцијом бактериоцидних једињења и снижавањем рН вредности вагине лактобацили спречавају транзицију гљивица у хифалну форму која и представља патогени облик (83, 148).

Иако је већи проценат кандиде у нашем истраживању детектован културом, она се не користи у рутинској процени због тога што је ова гљивица често присутна у здравој физиолошкој флори. Засејавање културе је потребно спроводити међу пацијентима са карактеристичним симптомима кандидијазе који имају нормалну вредност рН налаза, а микроскопским препаратом гљивице нису детектоване, или у случају жена које имају перзистирајуће или рекуретне облике ВВК, јер се у том случају вероватно јављају друге врсте рода *Candida* које су отпорне на лечење (95).

Будући да радови у литератури показују да се приликом присуства гљивица на препаратима може уочити повећан број леукоцита, наша студија потврђује ове резултате. Резултат сматрамо важним за евалуацију микроскопског препарата и процену статуса вагиналне флоре. Уколико се прегледом препарата уочи повећано присуство ПМН леукоцита свакако треба посумњати и на постојање гљивичне инфекције.

## **6. Примена мултиплекс квантитативног RT PCR у дијагностици вагиналне дисбиозе**

Мултиплекс квантитативни RT PCR тест коришћен у овој студији одређује логаритамски однос између *Lactobacillus spp.* и анаеробних микроорганизама (*G. vaginalis* и *A. vaginae*), као и између *Lactobacillus spp.* и укупне концентрације бактерија и на основу тога разврстава испитанице у различите категорије. *Van den Munckhof* и сарадници (156) су у свом истраживању утврдили да PCR тест, који је коришћен и у нашој студији (*AmpliSensFlorocenosis/Bacterial vaginosis – FRT*) у односу на Амсела, Нугента, културу и *BD MAX Vaginal Panel* показује највећу стопу слагања у односу на 16сРНК генско секвенционирање анализом микбиота. Овај тест има сензитивност од 93% и специфичност од 86% када се пореди са Нугентом и Дондерсовом методом а сензитивност 98%–100% и специфичност 91% када се пореди са Амселовом методом и 16с рРНК генским пиросеквенционирањем (156).

Резултати наше студије показују да је најмањи број испитаница са интермедијарним налазом 9 (3,8%) детектован RT PCR у односу на све друге методе. С обзиром да је овај тест квантитативан у табели 21 приказане су просечне вредности бактерија испитаница у зависности од стања вагиналне флоре. Уколико детаљније анализирамо просечне вредности добијених бактерија видимо да су концентрације анаеробних бактерија (*G. vaginalis* и *A. vaginae*) најмање код испитаница са нормалном флором, да њихова вредност расте у интермедијарним налазима, а да је највећа код пацијенткиња са БВ. Просечна вредност *G. vaginalis* је 130 пута већа код испитаница са

БВ у односу на нормални налаз, док је *A. vaginae* ова вредност чак 1030 пута већа. Супротно анаеробним бактеријама просечна вредност *Lactobacillus spp.* је највећа код пацијената са нормалним налазом и износи око  $8,5 \times 10^6$ , док су вредности лактобацила сличне у интермедијарним и налазима БВ и износе око  $3,3 \times 10^6$  и  $3,1 \times 10^6$ , респективно. Као што видимо применом овог теста код испитаница са БВ присутне су и лактобациларне врсте, али ми не можемо да одредимо тачну врсту рода *Lactobacillus*, већ само концентрацију на нивоу рода, што је једна од највећих мана овог теста. Више о разликама између врста рода лактобацил и недоумицама везано за *L. iners* биће изложено у даљој дискусији, али можемо да претпоставимо да релативно високе вредности концентрације у групи БВ у нашој студији потичу управо због присуства ове врсте.

Поређењем збирних концентрација свих бактерија (*G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacillus spp.* и укупан број бактеријске ДНК) види се да су вредности у нормалним и интермедијарним налазима сличне и износе око  $1,4 \times 10^7$ , док су код испитаница са БВ око 1,8 пута веће. Наша студија потврђује резултате дате и у другим радовима, где је концентрација бактерија присутна у БВ много већа него концентрација бактерија здравих жена.

## **7. Упоредна анализа и предности RT PCR теста у односу на резултате клиничких и микроскопских критеријума**

На графикону 14 приказани су резултати поређења свих метода у овом истраживању коришћених за дијагностику вагиналних дисбиоза. Слагање клиничких, микроскопских критеријума и молекуларне методе добро је у случају нормалних налаза и БВ, али највећа разлика постоји у интермедијарним налазима. Резултати студије показују да је микроскопским методама (осим НММ) детектовано 21,3%–29,3% интеремедијарних налаза, док је PCR тест сврстао 9 (3,8%) испитаница у ову категорију. Већину интеремедијарних налаза добијених микроскопским методама, PCR тест разврстао је или у нормални налаз или БВ. С обзиром на велики број интеремедијарних налаза добијених микроскопским методама и проблем везан за њихово лечење, овакав резултат показује значај PCR у дијагностици бактеријске вагинозе и говори у прилог несавршености постојећег Нугента као златног стандарда. Још једна битна чињеница јесте да овај тест поред *G. vaginalis* детектује присуство и концентрацију *A. vaginae* која се на микроскопском препарату тешко идентификује. Овај податак је важан будући да је овај анаероб резистентан на метронидазол, који се често користи као третман у терапији БВ.

Тест указује и на постојање других стања вагиналне флоре, односно флоре неспецифичне етиологије и тиме указује на комплексност вагиналне флоре. У тесту је детектовано укупно 5 (2,1%) испитаница са таквом абнормалном флором за разлику од Дондерсове методе и НММ где је детектовано 20 и 15 испитаница респективно. Преклапања у оба случаја између микроскопских метода и резултата АВ добијених Дондерсовом методом и НММ су код 3 пацијенткиње. Ограничење теста је у чињеници да ми на основу тог налаза знамо да је концентрација лактобацила смањена и да је реч о абнормалној флори, али не можемо са сигурношћу да тврдимо да ли је реч о АВ или евентуално о БВ изазваној неким другим анаеробима. Такође, још једна мана теста је што има могућност детекције само рода лактобацилус, а не и одређене врсте.

Наша претпоставка да ћемо употребом PCR теста за дијагнозу БВ, уз комбинацију клиничких и микроскопских критеријума, успешно детектовати и АВ није потврђена. Будући да се вагиналне дисбиозе (БВ и АВ) одликују смањењем лактобацила, ми смо две групе налаза добијене PCR методом са ниском концентрацијом лактобацила (нулта група и флора неспецифичне етиологије) третирали као недефинисане. У покушају процене стања вагиналне флоре недефинисане налазе смо упоредили са микроскопским и клиничким критеријумима уз претпоставку да се ради о АВ. Како је већ речено, клинички параметри који указују на постојање АВ су рН већи од 4, 5 и негативна проба са КОН (уз присуство непријатног мириса буђи или гноја) док су микроскопски присуство кока, парабазалних ћелија или ПМН на препарату. Поређењем клиничких и микроскопских налаза са флором неспецифичне етиологије и нултим налазима не постоји добра подударност, те закључујемо да примењени тест није адекватан за дијагностику АВ. Свакако треба указати да је у студији PCR-ом добијен мали број пацијената са флором неспецифичне етиологије и нултом групом да бисмо могли да добијемо релевантне резултате за поређење са микроскопским и клиничким методама.

Уколико резултате недовољног броја копија добијених PCR-ом упоредимо са нултом групом добијеном *Ison/Hay* методом и *null* групом детектоване НММ методом добија се ниска подударност. Сматрамо да овакве брисеве треба поново узорковати, као што пише у самом упутству теста. Могуће је да се у тим случајевима ради о техничким проблемима који се јављају приликом самог узорковања и да на самом брису нема довољно бактерија које би се детектовале PCR тестом.

Будући да смо због међусобног поређења тестова ради статистичке обраде резултата све методе поделили на 2 и 3 групе у табели 32 приказно је слагање клиничких и микроскопских метода у односу на PCR као златни стандард. Најбоље

слагање са молекуларном методом има НММ у поређењу са две ( $\kappa_{ppa} = 0,81$ , укупно слагање 91,1%) и три групе ( $\kappa_{ppa} = 0,74$ , укупно слагање 85,5%). Пошто је НММ семиквантитативна метода која се базира на процени бактеријских морфотипова, упоредили смо њене резултате са квантитативним налазима добијених *real-time* RT PCR тестом. Резултати показују добро слагање збирне вредности бактерија добијених молекуларном методом када се упореде са *null*, *mid* и *full* проценама целуларности добијене микроскопском методом. (Графикон 13). Збирна просечна вредност бактерија расте од *null* ка *full* односно концентрација *mid* препарата је за 2,8 пута већа од вредности *null* препарата, док је концентрација *full* препарата два пута већа од *mid* налаза и 5,5 од *null*. Такође, уколико понаособ посматрамо концентрације анаеробних бактерија (*G. vaginalis* и *A. vaginae*), рода *Lactobacillus* и укупног број бактеријске ДНК у поређењу са целуларношћу процењеном НММ, просечне концентрације свих бактерија расту посматрано од *null* ка *full*. (Табела 29). Истраживања показују повезаност рекурентних БВ са високом концентрацијом и врстом анаеробних бактерија присутних испитаница код којих је детектована ова вагинална дисбиоза (157, 158). Зато добијене резултате подударности сматрамо веома важним за правилну процену статуса вагиналне флоре и практичну примену НММ, нарочито када се ради о *full* налазима БВ

Резултати наше студије показују добро слагање између модификоване Амселове методе и RT PCR теста ( $\kappa_{ppa} = 0,75$ , укупно слагање 88,1%). (Графикон 1.) *Menard* и сарадници (91) су поредили резултате Амселових, Нугентових критеријума и PCR теста који се базира на квантитативној детекцији *G. vaginalis* и *A. vaginae*. Студија је спроведена на 163 жена у гестацијском периоду. Резултати студије показују слагање између све три методе у 154/163 узорка (95,4%). Слагање између Амселове и молекуларне методе нешто је више него у нашој студији ( $\kappa_{ppa} = 0,81$ ) (91). У табели 23 приказани су клинички параметри (КОН и рН вредност) у зависности од статуса вагиналне флоре детектоване PCR методом. У нормалним налазима добијеним молекуларном методом вредност нормалне рН вредности и негативне пробе са КОН детектоване су код 111 (90,9%) и 107 (88,4%) испитаница, респективно. Са друге стране, у налазима БВ добијене RT PCR методом идентификовано је 72 (80%) испитаница са позитивном КОН пробом и 80 (88,9%) са патолошком рН вредности вагине. Као и код налаза добијеним микроскопском методом постоји добро подударање клиничких критеријума са PCR тестом. Већа вредност патолошке рН вредности код испитаница са интермедијарном флором (55%) добијена је са PCR у односу на микроскопске методе где је у опсегу од 16–24%, али ово поређење није у потпуности меродавно будући на мали број таквих пацијената добијених молекуларном методом.

Када су методе подељене у три групе слагање Нугентове, *Ison Hay* и *Clays* критеријума са RT PCR као златним стандардом је добро ( $\kappa$  = 0,71, 0,71 и 0,72, укупно слагање 74%, 74,5% и 76,2% респективно). Резултати поређења све три микроскопске методе у односу на молекуларну методу је веома добро ( $\kappa$  = 0,74, укупно слагање 88,1% за све три методе). У литератури постоји велики број радова који се баве поређењем Нугентове методе и PCR. Један од таквих истраживања је *Dhiman* и сарадници (159) који користе исти тест као наша студија. У својој студији они су поредили Нугентов скор и PCR-ом код 125 жена у репродуктивном добу и добили резултате укупног слагања који су слични са нашим резултатима (81,8%). Они су Нугентовим скором детектовали 36,6% жена са БВ и 15,45% са интермедијарном флором, док су молекуларном методом детектовали 48,8% испитаница са БВ и 12,72% са интермедијарном флором (159). Као и у нашем истраживању резултати показују већи проценат испитаница са БВ детектованих PCR-ом, али наша студија показује значајно већу разлику између ове две методе у случају интермедијарних налаза. *Breeding* и сарадници (160) су поредили резултате добијене PCR тестом који се базира на односу 6 различитих анаероба у односу на концентрацију лактобацила, са *Ison/Hay* методом код 300 трудница. Због поређења метода и статистичке анализе резултата они су користили модификовану *Ison/Hay* методу и не БВ налазима су припојили граде 0,2 и 4 као што је учињено и у нашем испитивању (160). Њихови резултати показују да је слагање између молекуларне и микроскопске методе ( $\kappa$  вредност 0,87) веће у односу на резултат добијен у нашем испитивању, где поређење ове две методе са две групе износи 0,74.

Оно на шта смо већ указали је проблематика статистичке обраде података у поређењу ових метода. Већина радова присутна у литератури пореди методе за дијагностику смањивањем односно припајањем група на три или две категорије да би било могуће поређење са златним стандардом који је најчешће Нугентова метода. Наши резултати поређења између RT PCR и Дондерсове методе показују колико те разлике могу бити велики у зависности од броја категорија (група) које се пореде. Уколико посматрамо резултате са три групе тада је слагање између ове две методе умерено и  $\kappa$  вредност износи 0,47 а укупно подударане између метода 63,8%. Поремењем истих метода када су подељене у две групе БВ и не БВ  $\kappa$  вредност износи 0,78, а укупно слагање је боље у односу на све остале микроскопске методе осим НММ.

Будући да АВ и даље представља често непрепознат и запостављен поремећај вагиналне флоре у литератури је присутан мали број радова који се бави поређењем Дондерсове методе са осталим методама. *Rumyantseva* и сарадници (161) у свом

истраживању пореде слагање између RT PCR, Нугентове и Дондерсове методе на узорку од 100 жена у репродуктивном периоду. PCR који је коришћен у њиховој студији исти је као тест коришћен у овом истраживању. Резултати њихове студије показују да је слагање између три методе код 72 (73,5%) испитаница. Слагање између Нугентове методе и PCR је 77 (78,6%), између PCR и Дондерсове методе 81(82,6%) и између Нугентове и Дондерсове методе 84(85,7%). Сензитивност и специфичност Нугентове методе је 75% и 97,1%, Дондерсове методе 96,4% и 94,3% а PCR 92,8% и 85,7% (161). За разлику од нашег испитивања где је PCR тест показао прецизније резултате у поређењу са Дондерсовим критеријумима, нарочито у случају интермедијарног налаза, истраживање показује да ова метода даје најбоље резултате у дијагностици вагиналних дисбиоза.

Поређење просечних вредности бактерија добијених RT PCR тестом у односу на налазе добијене клиничким и микроскопским методама приказано је у табели 33. Просечне вредности анаеробних бактерија (*G. vaginalis* и *A. vaginae*) у нормалним налазима износе  $10^4$ – $10^5$ . Концентрација тих бактерија градијски расте у интермедијарним налазима, док је највећа код БВ ( $3\text{--}4 \times 10^6$  за *G. vaginalis* и  $2 \times 10^6$  за *A. vaginae*). Супротно томе, концентрација лактобацила највећа је у нормалним налазима добијеним свим клиничким и микроскопским методама и износи од  $7\text{--}8 \times 10^7$ . У табели 33 видимо да се концентрација лактобацила у налазима БВ добијене микроскопским методама креће у опсегу  $3\text{--}4 \times 10^6$ , док је у интермедијарним налазима просечна концентрација између ове две вредности. Одступање постоји код интермедијарних налаза добијених Дондерсовом методом, где је просечна вредност лактобацила добијена у нормалним и интермедијарним налазима идентична. Будући да смо већ указали да Дондерсова метода препознаје 2 типа интермедијарних налаза односно присуство лактобацила са благом измењеном флором (IIa) и више измењеном флором (IIb) јасно је због чега је присутан овако велики број лактобацила у интермедијарном налазу. Свако поређење концентрација бактерија добијених PCR-ом и интермедијарне флоре добијене микроскопским методама треба посматрати са резервом, с обзиром да је молекуларном методом већина интермедијарних налаза добијених микроскопским методама сврстана као нормалан налаз или БВ. У случају налаза АВ који су добијени НММ и Дондерсовом методом концентрација анаеробних бактерија и лактобацила је нижа у односу на БВ и нормални налаз. Овакав резултат је очекиван с обзиром да је приликом вагиналне дисбиозе смањен ниво лактобацила, а повећана концентрација аероба.

Иако је БВ полимикробни синдром употребом молекуларних метода показано је да су одређене врсте бактерија добри маркери за његову дијагностику. Мада су *G. vaginalis* и *A. vaginae* често присутне у нормалној флори, висока концентрација ових бактерија у односу на концентрацију лактобацила је високо специфична за дијагностику БВ (59, 91, 159, 162). Велики број студија показује да се истовремена коегзистенција ова два анаероба у случају БВ креће се од 78%–96%, док је код жена са нормалном флором око 5%–10% (85, 163, 164). *Bradshaw* и сарадници (164) у свом истраживању показују да је *A. vaginae* специфичнија у односу на *G. vaginalis*. Концентрација ДНК *A. vaginae* са  $10^8$  копија/мл и ДНК *G. vaginalis* са  $10^9$  копија/мл представља најбољу дијагностичку дефиницију. Наше истраживање потврђује да су ова два анаероба добри маркери за детекцију БВ, само што су концентрације нешто ниже у односу на споменути студији и за обе бактерије се крећу у концентрацијама око  $10^6$ .

Мада резултати наше студије показују већу просечну вредност *Lactobacillus spp.* у налазима жена са нормалном вагиналном флором, концентрације овог рода су такође високе у налазима испитаница са БВ код свих микроскопским методама. Ово практично значи да без обзира што смо на препарату идентификовали велики број анаеробних бактерија и налаз сврстали као БВ на њему се налази и велики број лактобацила које ми не препознајемо. Као што смо већ споменули један од проблема везаних за евалуацију микроскопских препарата по Граму јесте немогућност разликовања *G. vaginalis* и *L. iner*. Иако ми не знамо са сигурношћу о којој се тачно врсти лактобацила ради јер се нашим PCR тестом детектују на нивоу рода, можемо само да претпоставимо да је висока концентрација у налазима БВ управо због присуства *L. iner*.

*L. iner* је најчешће идентификована врста ВМБ, али се ретко изолује, јер не може да расте на МРС, већ само на крвном агару (23). Откривен је тек 1999. године у микробиому здравих жена у Шведској од стране *Falsena* и сарадника (165). Истраживања показују да је *L. iner* изолован из микробиома и здравих жена, али и оних са БВ, за разлику од *L. crispatus* који је углавном предоминантна врста нормалне флоре (166). Као што показују и наши резултати, различита истраживања потврђују присуство *L. iner* код жена са БВ (120, 167–169). *L. iner* се такође изолује често у интермедијарним налазима одређеним микроскопским методама. У нашем испитивању концентрације лактобацила у интермедијарном налазу углавном су између просечних вредности здраве и нормалне флоре (осим у случају Доднерсове методе). Овај лактобацил идентификован је као доминантан у ВМБ и након примене метронидазола (166, 170) као и код жена са менструацијом, где се смањује ниво *L. crispatus*-а. (171–173).



## 8. Сексуално преносиве инфекције – битан фактор у анализи вагиналног микробиома

Детекција девет најчешћих узрочника СПИ у нашем истраживању извршена је са четири различита мултиплекс квантитативна RT PCR теста. Резултати учесталости СПИ међу испитаницама у нашој студији приказани су у табели 34. Најчешће детектовани узрочници су *Ureaplsama spp* 143 (60,9%), високо ризични HPV 70 (29,8%) и *M. hominis* 66 (28,1%). Наши резултати показују да је од 235 испитаница код 179 (76,2%) присутан неки од узрочника – њих 56 (23,8%) је неактивно на све узрочнике. Поред моноинфекција код 86 (36,6%) испитаница, код 93 (39,6%) детектоване су коинфекције. Њихова дистрибуција приказана је на графикону 15.

## 9. Корелација вагиналних дисбиоза, СПИ и *Candida spp.*

У нашем истраживању поред дијагностике вагиналних дисбиоза и девет најчешћих узрочника сексуално преносивих инфекција испитали смо и њихову међусобну повезаност. Пошто смо првобитно утврдили да је RT PCR најпоузданији тест у дијагностици БВ, у даљем истраживању користили смо добијене резултате и упоредили са резултатима детекције СПИ. На графикону 16 приказано је међусобно поређење између укупног присуства СПИ и статуса вагиналне флоре. Резултати истраживања потврђују да БВ повећава могућност инфекције са неком од СПИ. Сексуално преносиве инфекције детектоване су код 80 (89,9%) жена са БВ и код 7 (77,7%) са интермедијарном флором.

Резултати студије показују да жене са БВ имају повећану учесталост инфекција са *Ureplasma spp* и *M. hominis*. Пошто се *M. hominis* и *Ureaplasma spp* могу наћи и код здравих жена, али и код жена са БВ, и даље постоји дебата и неслагање везано за њихову детекцију. С обзиром на ову чињеницу, њихово присуство у урогениталном тракту није дефинитивни доказ инфекције и због тога може представљати велики клинички проблем. Сматра се да идентификација ова два узрочника без процене статуса вагиналне флоре није адекватна (174). Будући да су ова два узрочника повезана са различитим репродуктивним проблемима попут ендометритиса, хориоамнионитиса, ниске тежине новорођенчета и превременог порођаја, сматрамо да би требало обратити више пажње на њихову идентификацију, нарочито уколико је код жена присутна БВ (174, 175).

Род *Mycoplasma* и *Ureaplasma* припадају реду *Mollicutes*. Одликују се малим геномом, не поседују ћелијски зид, због чега ове бактерије не могу бити идентификоване на препаратима по Граму. Постоји 9 врста рода *Mycoplasma*, али само су *M. hominis* и *M. genitalium* идентификоване у гениталном тракту жена. *M. genitalium* изазива симптоме

уретритиса и цервитиса, док истраживања показују да је *M. hominis* повезан са присуством БВ. (176) Истраживања такође показују да је изолацијом у култури и коришћењем молекуларних тестова *M. hominis* детектован код 24% до 75% жена са БВ, и 13% до 22% жена са нормалном флором (177). *Keane* и сарадници (178) су изоловали *M. hominis* код 53% жена са БВ, док су све испитанице са нормалном флором биле негативне на ову бактерију. У нашој студији добијени су слични резултати и учесталост *M. hominis* 50 (44,4%) код жена са БВ. За разлику од наведене студије, наши резултати показују да је и код 20 (16,5%) жена са здравом флором идентификована ова бактерија.

Резултати повезаности између *Ureaplasma spp* и БВ у литератури су веома контрадикторни. *Hillier* и сарадници (179) су у својој студији добили резултате да је код 78% трудних жена са нормалном флором присутна *Ureaplasma spp*, док је код оних са БВ проценат ових бактерија 92%. *Keane* и сарадници (178) су у свом истраживању детектовали *Ureaplasma spp* код 65% жена са здравом флором и 48% са БВ, али између ових група не постоји статистичка значајност. Такође, *Patel* и *Nyirjesy* (176) су детектовали овај род у обе групе жена (са здравом флором и БВ), али нису пронашли асоцијацију бактерије са најчешћом вагиналном дисбиозом. Наши резултати показују да је преваленца *Ureaplasma spp* 71 (78,9%) код испитаница са БВ и 63 (52,1%) код оних са здравом флором. Без обзира на контрадикторне резултате важно је истаћи да *U. Urealyticum* експримира хемолитичку активност и секрецију ензима, укључујући еластазу и IgA протеазу који смањују мукозну имуност. Поред тога, ова бактерија синтетише фосфолипазу С и уреазу која хидролизира уреу до токсичног амонијака. Све наведено може да убрза симптоме и патогенезу БВ (180). Истраживања показују да *U. urealyticum* може да индукује синтезу проинфламаторних цитокина у цервикалним и епителним вагиналним ћелијама и макрофагима, што указује на могућност ове бактерије да утиче у патогенези имунолошке регулације повезане са БВ. (181, 182).

Иако код осталих узрочника (*C. trachomatis*, високоризнични HPV вирус, *M. genitalium*, *T. vaginalis*, HSV-1/HSV-2) не постоји разлика у дистрибуцији у зависности од стања вагиналне флоре може се уочити да је највећи проценат позитивних СПИ узрочника код испитаница са абнормалном флором (Табела 35).

Радови у литератури углавном повезују асоцијацију *C. trachomatis* са БВ (174, 183, 184). У истраживању *Garcia* и сарадници (174) показују да жене са БВ имају повећан ризик од инфекције са овом бактеријом. Формирања биофилма који се састоји најчешће од (*G. vaginalis* and *A. vaginae*) олакшава перзистенцију *C. trachomatis*. Такође мала концентрација *L. crispatus* повезана је са клиничким симптомима ове бактерије

Иако велики број истраживања говори у прилог повећане учесталости HPV вируса код жена са БВ, у литератури су присутне и студије пресека које имају супротне резултате (185, 186). Лонгитудална испитивања показују повећану инциденцу ових вируса код испитаница које су Нугентовом методом сврстане у интермедијарни налаз и БВ (187). У две студије које користе молекуларне методе HPV позитивне испитанице су имале мању концентрацију лактобацила у односу на HPV негативне жене (188, 189). Такође, у овим студијама показано је да жене које имају вагиналну флору у којој доминира *L. gasseri* имају мању преваленцу ових вируса (189). Поред тога, истраживања показују да је ниво интраепителне дисплазије повезан са повећаним микробним диверзитетом и присуством HPV вируса и да су жене са CST IV подложније инфекцијом са овим вирусом (190). У ретроспективној студији која је обављена између 2012. и 2017. године на 7081 позитивних HPV испитаница резултати показују да постоји значајна асоцијација између БВ, HPV позитивних испитаница и сквамозних интраепителних лезија (191).

*T. vaginalis* је према подацима WHO широко распрострањена протозоа са преваленцом од 156 милиона нових случајева само 2020. године (96). У нашој студији PCR методом идентификовали смо *T. vaginalis* само код 3 испитанице, док смо на нативном микроскопском препарату овај патоген детектовали само код једне жене. Све три испитанице имале су различита стања вагиналне флоре односно једна је у групи здравих, друга у групи са БВ, а трећа са флором неспецифичне етиологије. У литератури је присутан велики број радова који се бави асоцијацијом овог патогена са БВ (192–194). У неким студијама асоцијација између *T. vaginalis* и БВ је од 60–80% (195). Лонгитудиналне студије показују да Нугентов скор изнад три даје већи ризик за инфекцијом са *T. vaginalis* (196). Применом секвенционирања показано је да је CST-IV вагинална флора код жена подложнија инфекцији са овим патогеном (193).

Докази о повезаности *M. genitalium* са БВ су контраверзни. У три студије (197–199) није повезана асоцијација ове бактерије са БВ, док постоје истраживања која их доводе у везу. (200) У нашем испитивању само 2 испитанице су биле позитивне на *M. genitalium* обе су PCR-ом сврстане у групу са БВ, али због овако ниске преваленце у популацији испитиваних жена не можемо да доносимо закључке о њиховој повезаности.

Епидемиолошка истраживања повезују БВ са присуством HSV вируса (201). *Cherpes* и колеге (202) који у својој проспективној студији прате 670 жена, добили су резултате да су жене са БВ у душло већем ризику од сероконверзије HSV-2 вирусом.

Испитивања показују да Нугентов скор изнад 4 код испитаница даје 32% већу шансу за инфекцијом HSV-2 и 8% за инфекцијом HSV-1. (202) Наши резултати показују да су оба типа вируса (HSV-1/HSV-2) присутна само код две испитанице и то са различитим вагиналним статусом. (Табела 35)

Значајан резултат који смо добили у нашој студији јесте да жене са нормалном флором имају најчешће моноинфекције 5 (42,1%), док жене са интермедијарном флором 6 (66%) и БВ имају чешће коинфекције. (Табела 36). Велики број студија бави се асоцијацијом појединих узрочника СПИ и БВ, (201, 204–206), али студије ретко укључују истовремено велики број узрочника, као што је то урађено у нашој студији. Такође, у тим студијама није утврђивана веза између АВ и СПИ.

Велике непознанице постоје у етиологији СПИ, укључујући и коинфекције и њихови везу са клиничким манифестацијама. Сматра се да коинфекције у односу на моноинфекције значајно утичу на процес патогенезе и појаву клиничких манифестација (194, 207). Удружене инфекције у односу на инфекцију јединим узрочником мењају ток запаљенског процеса на неколико начина. Могу се створити услови за размножавање опортунистичких *Mycoplasma spp.* и њихово патогено деловање. Ослобођени медијатори у запаљенском процесу могу да узоркују стагнацију у развојном циклусу *C. trachomatis* и преведу је у инактивну, перзистентну форму. Урогениталне *Mycoplasma spp* могу продужити инфламацију и после елиминације *C. trachomatis* у случају резистентности на антибиотску терапију. Поред тога, већи број микроорганизама смањује биорасположивост примењеног лека у терапији инфекције. Због тога је важно да даља истраживања буду усмерена на коинфекцију СПИ, њихову патогенезу, ерадикацију и ефикасност терапије (194).

Као што смо већ указали, иако постоји велики број лонгитудиналних и проспективних студија које се баве асоцијацијом између вагиналних дисбиоза и СПИ, резултати њихових истраживања су контрадикторни. Проблем произилази из чињенице да је БВ полимикробни синдром чија дијагностика није прецизна, јер велики број ових истраживања користи Амсела или Нугента као златни стандард, и највећи број истраживања не узима у обзир постојање АВ. С друге стране, идентификација узрочника СПИ зависи од великог броја фактора укључујући различите карактеристике и популације испитиваних група, географског региона као и лабораторијских тестова који се користе за идентификацију узрочника.

Резултати истраживања показују да не постоји повезаност (асоцијација) између присуства рода *Candida spp.* (детектована евалуацијом микроскопског препарата и Сабуро агаром) и присуства неког од узрочника СПИ, без обзира да ли се ради о

моноинфекцији или коинфекцији. У литератури је мали број студија који се упоредо бави истовременим присуством вагиналних дисбиоза, СПИ и *Candida spp.* Једна од ретких истраживања које смо пронашли је урадио *Van Der Pol* са сарадницима (204). Они су испитивали повезаности између СПИ (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* и *T. vaginalis*), БВ и *Candida* детектоване *BD MAX Vaginal Panel* на 581 испитаница. Као и у нашој студији показана је повезаност СПИ са БВ, али за разлику од наших резултата у овој студији показана је и асоцијација гљивица са СПИ.

Резултати наше студије нису показали повезаност између патолошких ПМН леукоцита и укупног броја СПИ. Такође, уколико појединачно посматрамо присуство испитиваних узрочника СПИ, дистрибуција патолошких ПМН леукоцита детектованих евалуацијом микроскопског препарата је подједнака без обзира на присуство односно одсуство инфекције. (Табела 37)

## **10. Укупна процена стања вагиналног микробиома – мултидисциплинарни приступ**

Вагинални микробиом жена је веома сложена и динамична средина на чији састав и стање утичу различити спољашњи и унутрашњи фактори. Будући да су поремећаји вагиналне флоре веома чести и да могу да доведу до различитих последица по здравље жена потребно је још једном указати на значај дијагностичких метода и правилну процену стања ВМБ.

Сматрамо да за анализу вагиналне флоре треба развити мултидисциплинарни приступ који подразумева сарадњу гинеколога, микробиолога и молекуларних биолога која ће омогућити правилну процену стања вагиналне флоре и тиме унапредити дијагностику и терапијски приступ. За правилно постављање дијагноза вагиналних дисбиоза треба употребити комбинацију клиничких, микроскопских и молекуларних метода.

Наши резултати показују да је *RT PCR* најпоузданија метода у процени статуса вагиналне флоре. Поређењем клиничких, микроскопских и молекуларних метода резултати показују добро слагање у налазима здраве флоре и БВ, али највеће разлике јесу у интермедијарним налазима. *RT PCR* је већину интермедијарних налаза (*Нугент*, *Ison/Hay*, *Clays*, *Доднерс*) сврстао у БВ и нормалне налазе што је најзначајнији резултат истраживања. Још једна од предности теста је што указује и на постојање других стања вагиналне флоре као што је флора неспецифичне етиологије, али и могућност идентификације бактерије *A. vaginae* која је резистентна на метронидазол, често коришћен у терапији БВ. Предност је такође што *PCR* може да квантификује количину бактерија у

одређеном узорку и тиме укаже на потенцијално могуће рекурентне БВ. У литератури постоји велики број радова који се бави поређењем RT PCR са другим методама за детекцију вагиналних дисбиоза, али према нашим сазнањима не постоји ни једна студија која се бави поређењем шест метода за дијагностику вагиналних дисбиоза.

Иако се RT PCR показала као најпоузданија метода у дијагностици вагиналних дисбиоза, његово коришћење у рутинској дијагностици није увек могуће. Ограничавајући фактори за то јесу цене тестова, капацитети и дуже време за анализу узорка.

Сматрамо да би најбољи алгоритам за процену статуса вагиналне флоре био комбинација клиничких и микроскопских критеријума и употреба PCR теста у случајевима када је потребна диверзификација одређених препарата попут интермедијарних налаза, препарата са малим бројем ћелија или у случајевима честих рекурентних БВ.

Резултати истраживања су показали да су клинички параметри (рН вредност и проба са КОН) добри показатељи у процени статуса вагиналне флоре заједно са евалуацијом микроскопских препарата. Понаособ посматрани рН вредност и проба са КОН могу дати лажно позитивне резултате али у комбинацији са евалуацијом микроскопског препарата могу да дају адекватан увид у процени статуса вагиналне флоре. Клинички критеријуми су брзе и јефтине методе, за које не треба специјална обука. Они би требало да се користе у гинеколошким ординацијама као почетни скрининг у процени статуса вагиналне флоре.

Наша искуства у евалуацији микроскопских препарата показују да су препарати по Граму поузданији у односу на нативне у процени стања вагиналне флоре. Предност нативних препарата је првенствено у визуализацији рода *Candida spp.* након додавања КОН-а на препарат. Оригинална Дондерсова метода се спроводи на нативним препаратима под увељичањем  $\times 400$ . У својим радовима аутори методе указују да се парабазалне ћелије, као и токсични леукоцити тешко распознају на препаратима бојених по Граму. Ми се не слажемо са тим тврдњама, јер сматрамо да је визуелизација јаснија на Грам препаратима. Поред тога, прављењем трајних препарата по Граму, могуће је реанализирати узорке, што није могуће на нативним препаратима.

Будући да смо поредили различите микроскопске и клиничке методе за дијагностику вагиналних дисбиоза наше истраживање показује да нова микроскопска метода има најбоље слагање са RT PCR-ом. Посматрање препарата под увељичањем  $\times 200$  под имерзијом и процена целуларности (*null, mid, full*) даје добар увид у стање вагиналне флоре, јер се за кратко време може прегледати много већи број видних поља у односу на увељичање  $\times 1000$ . НММ захтева да се у појединим случајевима ради

прецизне процене морфологије бактерија поред увећања x 200, препарат погледа и са већим увећањем (x 400, x 1000).

Дондерсова и НММ су једине методе које препознају АВ који је у највећем броју других истраживања и у рутинској дијагностици нису препознати или су занемарени. Приликом евалуације микроскопског препарата потребно је бележити и присуство ПМН, који представљају најважнији појединачни микроскопски параметар у диференцијалној дијагностици БВ и АВ. Наши резултати показују присуство патолошких ПМН у налазима БВ што може да указује и на постојање коинфекција или мешаних инфекција. Потврђено је да је присуство патолошких ПМН повезано са детекцијом *Candida spp.* али није утврђена повезаност ПМН и присуства СПИ.

Детекција *Candida spp.* на микроскопском препарату и Сабуро агару показује исту дистрибуцију без обзира на стање вагиналне флоре. Такође, није утврђена веза између идентификованих СПИ и *Candida spp.*

Приликом укупне процене вагиналне флоре посебан значај има и дијагностиковање присуства СПИ, које су у нашем истраживању детектоване са четири различита RT PCR теста. Доступна истраживања показују да вагиналне дисбиозе повећавају ризик за присуство неке од најчешћих узročника СПИ. Наша студија потврдила је повезаност између укупног броја детектованих СПИ узročника и БВ као и да су моноинфекције најчешће код жена са нормалном флором а коинфекције код жена са БВ. Два узročника СПИ – *Ureaplasma spp.* и *M. hominis*, међу девет анализираних у нашој студији, показали су статистички значајну повезаност са БВ. Остали узročници, иако без статистичке значајности у односу на стање вагиналне флоре, у највећем проценту су детектовани код жена са поремећеном вагиналном флором. Иако је у литератури присутан велики број радова о вези између вагиналних дисбиоза и СПИ, често су резултати ових студија контрадикторни. Разумевање везе између СПИ и вагиналне микробиоте је од велике важности како би се успоставио свеобухватни приступ сексуалном и репродуктивном здрављу жена.

С обзиром да су вагиналне дисбиозе полимикробни поремећаји вагине који утичу на здравље жена и новорођенчади од изузетног је значаја њихов правилна дијагностика. Наша студија је потврдила да најчешћи коришћени Нугентов скор у научноистраживачком раду није поуздан и да RT PCR надомешћује недостатке овог златног стандарда. Мултидисциплинарни приступ и сарадња медицинског особља (гинеколога, микробиолога и молекуларних биолога) даје најбоље резултате анализе вагиналног микробиома. Мишљења смо да би овакав приступ значајно унапредио репродуктивно здравље жена и адекватан терапијски приступ.

## VI ЗАКЉУЧАК

На основу постављених хипотеза и циљева, након спроведеног истраживања, могу се формулисати следећи закључци.

1. Преваленца БВ креће се од 33 до 41,3% у зависности од микроскопског/клиничког критеријума. Клиничким и микроскопским методама за дијагностику вагиналних дисбиоза највећи број испитаница са БВ детектовано је Новом микроскопском методом 94 (41,3%) док је Амселова метода идентификовала највећи број нормалних налаза 141 (60%). Нугентом је добијено 60 (25.5%), *Ison/Нау* 50 (21.3%), *Clays* 53 (22.6%) а Дондердовом методом 69 (29.3%) интермедијарних налаза. Дондерсова (8,5%) и Нова микроскопска метода (6,5%) једине детектују АВ у евалуацији микроскопског препарата. Клинички параметри (рН вредност и проба са КОН) су добри показатељи у процени статуса вагиналне флоре и у комбинацији са евалуацијом микроскопског препарата могу да дају адекватан увид у процени статуса вагиналне флоре.

2. Применом мултиплекс квантитативног RT PCR теста испитанице су разврстане у следеће категорије: нормални налаз 121 (51,4%), интермедијарни налаз 9 (3,8%), БВ 90 (38%), флора неспецифичне етиологије 5 (2,1%), низак ниво копија 10 (4,2%). Поређењем збирних концентрација свих бактерија (*G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Lactobacillus spp.* и укупан број бактеријске ДНК) добијене вредности код испитаница са БВ око 1,8 пута веће него код нормалних или интермедијарних налаза. Истраживање потврђује резултате других радова да је концентрација бактерија присутна у БВ много већа него концентрација бактерија здравих жена.

3. RT PCR је најпоузданија метода за детекцију БВ. Слагање клиничких, микроскопских критеријума и молекуларне методе добро је у случају нормалних налаза и БВ, док највећа разлика постоји у интермедијарним налазима. Микроскопским методама детектовано је 21,3%–29,3% интеремедијарних налаза, док је PCR тест сврстао 9 (3.8%) испитаница у ову категорију. Примењени RT PCR тест примарно намењен за дијагностику БВ не може се адекватно користити за детекцију АВ.

4. Најбоље слагање са молекуларном методом има НММ у поређењу са две (*каппа* = 0,81, укупно слагање 91,1%) и три групе (*каппа* = 0,74, укупно слагање 85,5%). Процена степена целуларности евалуацијом препарата НММ корелира са квантитативним резултатима збирног присуства бактерија добијених PCR тестом. Евалуацијом препарата под увеличањем x 200 у односу на друге микроскопске методе стиче се бољи увид у микроскопски препарат за краће време и постиже се адекватнији увид у стање вагиналне флоре.



5. RT PCR тестовима детектовано је да је најчешћи узročник СПИ *Ureaplasma spp.* код 143 (60,9%) а затим следе високоризични HPV 70 (29,8%), *M. hominis* 66 (28,1%), *C. trachomatis* 16 (6,8%), *T. vaginalis* 3 (1,3%), HSV-1, HSV-2, *M. genitalium* код 2 (0,9%) док *N. gonorrhoeae* није детектован ни код једне испитанице. Узročници СПИ детектовани су код 179 (76,2%) испитанице док је 56 (23,8%) негативних на све узročнике. Код 86 (36,6%) жена детектована је моноинфекција са неким од узročника, док је код 93 (39,6%) испитаница детектовано истовремено присуство више узročника. Најчешће идентификована *Candida spp.* је детектована код 33 (14%) испитаница микроскопским прегледом препарата, а код 48 (20,4%) у култури.

6. Утврђена је повезаност између укупног броја детектованих СПИ узročника и БВ. Истраживање је показало асоцијацију *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* са БВ као и повезаност коинфекција са овом дисбиозом. Присуство рода *Candida* није зависно од стања вагиналне флоре. Такође, резултати показују да не постоји асоцијација између присуства гљивица и неког од узročника СПИ, без обзира да ли се ради о моноинфекцијама или коинфекцијама.

## VII ЛИТЕРАТУРА

1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0
2. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev*. 2012;70 Suppl 1(Suppl 1):S38-S44. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
3. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015;3:31. Published 2015 Jul 30. doi:10.1186/s40168-015-0094-5
4. Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1230:48e58
5. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012;343(1):2-9. doi:10.1097/MAJ.0b013e31823ea228
6. van de Wijgert JHHM, Jaspers V. The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol*. 2017 Nov-Dec;168(9-10):859-864. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.003
7. Saraf VS, Sheikh SA, Ahmad A, Gillevet PM, Bokhari H, Javed S. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Arch Microbiol*. 2021 Sep;203(7):3793-3802. doi: 10.1007/s00203-021-02414-3
8. Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 2019;569(7758):641-648. doi:10.1038/s41586-019-1238-8
9. Crucitti T. Eve's garden: myths, legends and secrets unmasked. *Research in Microbiology*. 2017;198(9-10):773-781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.07.004>
10. Witkin SS, Ledger WJ. Complexities of the uniquely human vagina. *Science Translational Medicine*. 2012 May;4(132):132fs11. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003944
11. Gupta S, Kakkar V, Bhushan I. Crosstalk between Vaginal Microbiome and Female Health: A review. *Microb Pathog*. 2019 Nov;136:103696. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103696
12. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2014 Dec;34(4):747-761. doi: 10.1016/j.cll.2014.08.006
13. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv Exp Med Biol*. 2016;902:83-93. doi: 10.1007/978-3-319-31248-4\_6
14. Diop K, Dufour JC, Levasseur A, Fenollar F. Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. *Human Microbiome Journal*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.11.002>
15. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11971-5. doi: 10.1073/pnas.1002601107.
16. Kalbermatter C, Fernandez Trigo N, Christensen S, Ganai-Vonarburg SC. Maternal Microbiota, Early Life Colonization and Breast Milk Drive Immune Development in the Newborn. *Front Immunol*. 2021;12:683022. Published Doi :10.3389/fimmu.2021.683022
17. Alvarez-Olmos MI, Barousse MM, Rajan L, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, et al. Vaginal lactobacilli in adolescents: presence and relationship to local and systemic immunity, and to bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*. 2004 Jul;31(7):393-400. doi: 10.1097/01.olq.0000130454.83883.e9
18. Farage M, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet*. 2006 Jan;273(4):195-202. doi: 10.1007/s00404-005-0079-x
19. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod*. 2001 Sep;16(9):1809-13. doi: 10.1093/humrep/16.9.1809
20. Cauci S, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Iannicelli T, Lanzafame P, et al. Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2147-52. doi: 10.1128/JCM.40.6.2147-2152.2002

21. Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of *Lactobacilli*. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Jun 13;5:181. doi: 10.3389/fmed.2018.00181
22. 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 Mar 25;6:81. doi: 10.3389/fphys.2015.00081
23. Ieven G, Miller MB, Persing DH, Nolte FS, Tang Y, Tenover FC et al. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2016. 3rd Edition.
24. Green KA, Zarek SM, Catherino WH. Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract. *Fertil Steril*. 2015 Dec;104(6):1351-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.10.010
25. Cruickshank R. Döderlein's Vaginal Bacillus: A Contribution to the Study of the Lacto-Bacilli. *J Hyg (Lond)*. 1931 Jul;31(3):375-81. doi: 10.1017/s0022172400010901
26. van de Wijkert JH, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8):e105998. doi: 10.1371/journal.pone.0105998
27. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*. 2012; 13(1):47–58. doi: 10.1038/nrg3129
28. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1(Suppl 1): 4680-7. doi: 10.1073/pnas.1002611107
29. Kalia N, Singh J, Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020 Jan 28;19(1):5. doi: 10.1186/s12941-020-0347-4
30. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when *Lactobacilli* dominate the microbiota. *PLoS ONE*. 2013; 8(11):e80074
31. 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 [published correction appears in *MBio*. 2014;5(2):e00874-14. doi:10.1128/mBio.00460-13
32. Cadieux PA, Burton J, Devillard E, Reid G. *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 6:13-8.
33. Thoma ME, Gray RH, Kiwanuka N, et al. 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
34. Hickey RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J, Forney LJ. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl Res*. 2012 Oct;160(4):267-82. doi: 10.1016/j.trsl.2012.02.008.
35. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, et al. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Mar;58(2):169-81. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00618.x.
36. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*. 2007 Jun;1(2):121-33. doi: 10.1038/ismej.2007.12.
37. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol*. 2004;4:16. doi:10.1186/1471-2180-4-16
38. 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; 150:2565–2573.
39. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012;343(1):2-9. doi:10.1097/MAJ.0b013e31823ea228

40. Curtis AH. On the etiology and bacteriology of leucorrhoea. *Surg Gynecol Obstet.* 1914;18
41. Gardner HL, Dukes CD. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Amer J Obstet and Gyn.* 1955;69:962–976
42. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis.* 2002; 186: 1770-1780.
43. Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008; 2008: 750479.
44. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1899-1911.
45. Abou Chacra L, Fenollar F, Diop K. Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know?. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;11:672429. doi:10.3389/fcimb.2021.672429
46. Bagnall P, Rizzolo D. Bacterial vaginosis: A practical review. *JAAPA.* 2017 Dec; 30(12):15-21. doi: 10.1097/01.JAA.0000526770.60197.fa.
47. Coudray MS, Madhivanan P. Bacterial vaginosis-A brief synopsis of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020 Feb;245:143-148. doi: 10.1016/j.ejogrb.2019.12.035.
48. Sycuro LK, Fredricks DN. Microbiota of the genitourinary tract. In: Fredricks DN, editor. *The human microbiota. How microbial communities affect health and disease.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2013. p168-199.
49. 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
50. Giacomini G, Calcinai A, Moretti D, Cristofani R. Accuracy of cervical/vaginal cytology in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis.* 1998 Jan;25(1):24-7. doi: 10.1097/00007435-199801000-00006
51. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, et al. Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *mBio.* 2015;6(2):e00204-15. doi:10.1128/mBio.00204-15
52. Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med.* 2000;51:349-56. doi: 10.1146/annurev.me.51.1.349
53. Chee WJY, Chew SY, Than LTL. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact.* 2020;19(1):203. Doi: 10.1186/s12934-020-01464-4
54. Morrill S, Gilbert NM, Lewis AL. *Gardnerella vaginalis* as a Cause of Bacterial Vaginosis: Appraisal of the Evidence From *in vivo* Models. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Apr 24;10:168. doi: 10.3389/fcimb.2020.00168
55. Harwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, Strauss JF 3rd, Patterson JL, Oki AT, et al. Drawing the line between commensal and pathogenic Gardnerella vaginalis through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics.* 2010 Jun 11;11:375. doi: 10.1186/1471-2164-11-375
56. Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE. Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. *J Infect Dis.* 2014 Aug 1;210(3):338-43. doi: 10.1093/infdis/jiu089.
57. Machado A, Cerca N. Influence of Biofilm Formation by Gardnerella vaginalis and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis.* 2015 Dec 15;212(12):1856-61. doi: 10.1093/infdis/jiv338.
58. Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytolysin from Gardnerella vaginalis. *J Bacteriol.* 2008; 190: 3896-3903
59. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis.* 2008 Jul 1; 47(1):33-43. doi: 10.1086/588661
60. 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 May; 48(5):1812-9. doi: 10.1128/JCM.00851-09.

61. Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, Hammond JA, Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004 Apr;42(4):1829-1831. doi: 10.1128/jcm.42.4.1829-1831.2004
62. Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjöden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999 Oct;49 Pt 4:1573-1576. doi: 10.1099/00207713-49-4-1573
63. Mendling W, Palmeira-de-Oliveira A, Biber S, Prasauskas V. An update on the role of *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini review. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;300(1):1-6. doi:10.1007/s00404-019-05142-8
64. Donders GGG, Bellen G, Grinceviciene S, Ruban K, Vieira-Baptista P. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Res Microbiol*. 2017 Nov-Dec;168(9-10):845-858. doi: 10.1016/j.resmic.2017.04.004.
65. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG*. 2002 Jan;109(1):34-43. doi: 10.1111/j.1471-0528.2002.00432.x
66. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin ObstetGynaecol* 2007;21:355-73.
67. Tansarli GS, Kostaras EK, Athanasiou S, Falagas ME. Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:977-84.
68. Donders GG, Gonzaga A, Marconi C, Donders F, Michiels T, Eggermont N, et al. Increased vaginal pH in Ugandan women: what does it indicate? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35:1297-303.
69. Sobel JD. Desquamative inflammatory vaginitis: A new subgroup of purulent vaginitis responsive to topical 2% clindamycin therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1215-20.
70. Deka N, Hassan S, Seghal Kiran G, Selvin J. Insights into the role of vaginal microbiome in women's health. *J Basic Microbiol*. 2021 Dec;61(12):1071-1084. doi: 10.1002/jobm.202100421.
71. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2018 Aug;110(3):327-336. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.036
72. Waters TP, Denney JM, Mathew L, Goldenberg RL, Culhane JF. Longitudinal trajectory of bacterial vaginosis during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, vol. 199, no. 4, pp. 431 e431–e435, 2008
73. Duff P, Lee ML, Hillier SL, Herd LM, Krohn MA, Eschenbach DA. Amoxicillin treatment of bacterial vaginosis during pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, vol. 77, no. 3, pp. 431–435, 1991
74. Zheng N, Guo R, Yao Y, Jin M, Cheng Y, Ling Z. *Lactobacillus iners* Is Associated with Vaginal Dysbiosis in Healthy Pregnant Women: A Preliminary Study. *Biomed Res Int*. 2019 Oct 23;2019:6079734. doi: 10.1155/2019/6079734
75. Redelinghuys MJ, Geldenhuys J, Jung H, Kock MM. Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:354. doi: 10.3389/fcimb.2020.00354
76. Verstraelen H, Verhelst R. Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Nov;7(9):1109-24. doi: 10.1586/eri.09.87
77. 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 Jan; 74(1):14-22. doi: 10.1016/0002-9343(83)91112-9
78. 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. doi:10.1128/jcm.29.2.297-301.1991
79. Nenadić D, Pavlović MD. Value of bacterial culture of vaginal swabs in diagnosis of vaginal infections. *Vojnosanit Pregl*. 2015 Jun;72(6):523-8.
80. Bhujel R, Mishra SK, Yadav SK, Bista KD, Parajuli K. Comparative study of Amsel's criteria and Nugent scoring for diagnosis of bacterial vaginosis in a tertiary care hospital, Nepal. *BMC Infect Dis*. 2021 Aug 17;21(1):825. doi: 10.1186/s12879-021-06562-1

81. Donders GGG, Ravel J, Vitali B, Netea MG, Salumets A, Unemo M. Role of Molecular Biology in Diagnosis and Characterization of Vulvo-Vaginitis in Clinical Practice. *Gynecol Obstet Invest.* 2017;82(6):607-616.
82. Srinivasan S, Morgan MT, Liu C, Matsen FA, Hoffman NG, Fiedler TL, et al. More than meets the eye: associations of vaginal bacteria with gram stain morphotypes using molecular phylogenetic analysis. *PLoS One.* 2013 Oct 24;8(10):e78633. doi: 10.1371/journal.pone.0078633
83. Nasioudis D, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Bacterial vaginosis: a critical analysis of current knowledge. *BJOG.* 2017 Jan;124(1):61-69. doi: 10.1111/1471-0528.14209.
84. 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. Doi: 10.1136/sti.78.6.413
85. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol.* 2005; 5:61
86. Larsson PG, Carlsson B, Fåhraeus L, Jakobsson T, Forsum U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. *Sex Transm Infect.* 2004 Feb;80(1):63-7. doi: 10.1136/sti.2003.006106
87. Nenadić D. Broj i vijabilnost vaginalnih polimorfonukleara kao pokazatelj rizika za prevremeni porođaj [Doktorska disertacija]. Beograd: Medicinski fakultet VMA, Univerzitet odbrane; 2014
88. Nenadić DB, Pavlović MD, Motrenko T. A novel microscopic method for analyzing Gram-stained vaginal smears in the diagnosis of disorders of vaginal microflora. *Vojnosanit Pregl.* 2015 Aug;72(8):670-6
89. Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, et al. Development and Validation of a Highly Accurate Quantitative Real-time RT PCR Assay for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2016 Apr;54(4):1017-24. doi: 10.1128/JCM.03104-15.
90. Romyantseva TA, Bellen G, Romanuk TN, Shipulina OIu, Guschin AE, Shipulin GA, et al. Utility of microscopic techniques and quantitative Real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of vaginal microflora alterations. *J Low Genit Tract Dis.* 2015 Apr;19(2):124-8.
91. Menard JP, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative Real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Dec;29(12):1547-52. doi: 10.1007/s10096-010-1039-3
92. De Seta F, Lonnee-Hoffmann R, Campisciano G, et al. The Vaginal Microbiome: III. The Vaginal Microbiome in Various Urogenital Disorders. *J Low Genit Tract Dis.* 2022;26(1):85-92. doi:10.1097/LGT.0000000000000645
93. Yano J, Sobel JD, Nyirjesy P, et al. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. *BMC Womens Health.* 2019;19(1):48. doi: 10.1186/s12905-019-0748-8
94. Kalia N, Singh J, Kaur M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2020 Jan 28;19(1):5. doi: 10.1186/s12941-020-0347-4
95. Safavieh M, Coarsey C, Esiobu N, et al. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2017;37(4):441-458. Doi :10.3109/07388551.2016.1167667
96. World Health Organization. Sexually transmitted infections (STIs); 2019. Available from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
97. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021
98. Ceccarani C, Foschi C, Parolin C, Antuono A, Gaspari V, Consolandi C, et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. *Scientific Reports.* 2019; 9(1):14095. doi: 10.1038/s41598-019-50410-x

99. Sanchez G, Contreras P, Martinez A, Garcia C, Lizano M, de la Cruz E. Molecular epidemiology of bacterial vaginosis and its association with genital micro-organisms in asymptomatic women. *J Med Microbiol.* 2019;68(9):1373-1382. doi: 10.1099/jmm.0.001044.
100. Ravel J, Moreno I, Simón C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2021; 224(3):251-257. doi: 10.1016/j.ajog.2020.10.019
101. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus* iners in health and dysbiosis. *Microbiome.* 2013;1(1):12. doi:10.1186/2049-2618-1-12
102. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011 Jan 11;11:10. doi: 10.1186/1471-2334-11-10
103. Nardis C, Mosca L, Mastromarino P. Vaginal microbiota and viral sexually transmitted diseases. *Ann Ig.* 2013 Sep-Oct;25(5):443-56. doi: 10.7416/ai.2013.1946.
104. Tuddenham S, Hamill MM, Ghanem KG. Diagnosis and Treatment of Sexually Transmitted Infections: A Review. *JAMA.* 2022 Jan 11;327(2):161-172. doi: 10.1001/jama.2021.23487
105. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research.* Chapman and Hall. 1991.
106. Cardoso JR, Pereira LM, Iversen MD, Ramos AL. What is gold standard and what is ground truth?. *Dental Press J Orthod.* 2014;19(5):27-30. doi:10.1590/2176-9451.19.5.027-030.ebo
107. Gad GF, Eladawy A, Mohammed MA, Ahmed AB, Mohamed HA. Evaluation of different diagnostic methods of bacterial vaginosis. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences.* 2014; 13, 15-23
108. Rao SR, Pindi KG, Rani U, Sasikala G, Kawle V. *Diagnosis of Bacterial Vaginosis: Amsel's Criteria vs Nugent's scoring.* 2016.
109. Brotman RM, Ravel J, Cone RA, Zenilman JM. Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sexually Transmitted Infections.* 2010; 86,297-302
110. Bump RC, Zuspan FP, Buesching WJ 3rd, Ayers LW, Stephens TJ. The prevalence, six-month persistence, and predictive values of laboratory indicators of bacterial vaginosis (nonspecific vaginitis) in asymptomatic women. *Am J Obstet Gynecol.* 1984 Dec 15;150(8):917-24. doi: 10.1016/0002-9378(84)90381-8
111. Hillier SL, Kiviat NB, Hawes SE, Hasselquist MB, Hanssen PW, Eschenbach DA, et al. Role of bacterial vaginosis-associated microorganisms in endometritis. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Aug;175(2):435-41. doi: 10.1016/s0002-9378(96)70158-8
112. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP, Gibbs RS. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by gram stain among pregnant women. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group.* *Am J Obstet Gynecol.* 1992 Mar;166(3):938-44. doi: 10.1016/0002-9378(92)91368-k
113. Chaijareenont K, Sirimai K, Boriboonhirunsarn D, Kiriwat O. Accuracy of Nugent's score and each Amsel's criteria in the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Med Assoc Thai.* 2004 Nov; 87(11):1270-4
114. Hellberg D, Nilsson S, Mårdh PA. The diagnosis of bacterial vaginosis and vaginal flora changes. *Arch Gynecol Obstet.* 2001 Mar; 265(1):11-5. doi: 10.1007/s004040000109
115. Gratacos E., Figueras F., Barranco M. et al. Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram stain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur J Epidemiol* 15. 1999; 913–916. <https://doi.org/10.1023/A:1007673531595>
116. Tam MT, Yungbluth M, Myles T. Gram stain method shows better sensitivity than clinical criteria for detection of bacterial vaginosis in surveillance of pregnant, low-income women in a clinical setting. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 1998;6(5):204-8. doi: 10.1002/(SICI)1098-0997(1998)6:5
117. 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 Sep;43(9):4607-12. doi: 10.1128/JCM.43.9.4607-4612.2005

118. Mohammadzadeh F, Dolatian M, Jorjani M, Alavi Majd H. Diagnostic value of Amsel's clinical criteria for diagnosis of bacterial vaginosis. *Glob J Health Sci.* 2014;7(3): 8-14.  
doi: 10.5539/gjhs.v7n3p8
119. Mahajan G, Mahajan A, Chopra S, Chand K. Comparison of Different Diagnostic Methods of Bacterial Vaginosis – Amsel's vs Nugent. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 2017;6(5): 1442-1448
120. Santiago GL, Cools P, Verstraelen H, et al. Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles. *Plos one.* 2011; 6(11):e28180.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0028180
121. Chawla R, Bhalla P, Chadha S, Grover S, Garg S. Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:365194
122. Martinez-Martinez W, Calderon-Badia B and Cruz-Lage L. Comparison of diagnostic methods for bacterial diagnosis. *African Journal of Microbiology Research* 2014; 8(12):1360-1367
123. Biavati B, Mattarelli P. Genus *Bifidobacterium*. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, et al. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 148 2nd, volume 5. Springer: New York. 2012; p 171–205
124. Chaban B, Links MG, Jayaprakash TP, et al. Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome.* 2014;2:23.  
Doi: 10.1186/2049-2618-2-23
125. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 31;102(22):7952-7.  
doi: 10.1073/pnas.0503236102
126. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One.* 2013 Apr 9;8(4):e60670. doi: 10.1371/journal.pone.0060670
127. Freitas AC, Hill JE. Quantification, isolation and characterization of *Bifidobacterium* from the vaginal microbiomes of reproductive aged women. *Anaerobe.* 2017 Oct;47:145-156.  
doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.05.012
128. Harwich MD Jr, Serrano MG, Fettweis JM, et al. Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp. nov. *BMC Genomics.* 2012;13 Suppl 8(Suppl 8):S4.  
doi:10.1186/1471-2164-13-S8-S4
129. Collins MD, Hoyles L, Tornqvist E, von Essen R, Falsen E. Characterization of some strains from human clinical sources which resemble "*Leptotrichia sanguinegens*": description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. *Syst Appl Microbiol.* 2001 Nov;24(3):358-61.  
doi: 10.1078/0723-2020-00047
130. Fethers K, Twin J, Fairley CK, Fowkes FJ, Garland SM, Fehler G, et al. 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. Epub 2012 Feb 17
131. Forsum U, Jakobsson T, Larsson PG, et al. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica.* 2002 Nov;110(11):811-818.  
doi: 10.1034/j.1600-0463.2002.1101107.x
132. Verstraelen H, Verhelst R. Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009 Nov;7(9):1109-24. doi: 10.1586/eri.09.87
133. Forsum U, Larsson PG, Spiegel C. Scoring vaginal fluid smears for diagnosis of bacterial vaginosis: need for quality specifications. *APMIS.* 2008 Feb;116(2):156-9.  
doi: 10.1111/j.1600-0463.2008.00984.x
134. *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*, ed. Dongiou L. CRC Press, 2011, ISBN 9781439812389



135. Sonthalia S, Aggarwal P, Das S, Sharma P, Sharma R, Singh S. Aerobic vaginitis - An underdiagnosed cause of vaginal discharge - Narrative review. *Int J STD AIDS*. 2020 Oct; 31(11):1018-1027. doi: 10.1177/0956462420913435
136. Kaambo E, Africa C, Chambuso R, Passmore JS. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Front Public Health*. 2018 Mar 26;6:78. doi: 10.3389/fpubh.2018.00078
137. Macklaim JM, Cohen CR, Donders G, Gloor GB, Hill JE, Parham GP, et al. Exploring a road map to counter misconceptions about the cervicovaginal microbiome and disease. *Reprod Sci* 2012;19:1154.
138. Liang Q, Li N, Song S, Zhang A, Li N, Duan Y. High-dose nifuratel for simple and mixed aerobic vaginitis: A single-center prospective open-label cohort study. *J Obstet Gynaecol Res* 2016;42:1354-60.
139. Han C, Wu W, Fan A, et al. Diagnostic and therapeutic advancements for aerobic vaginitis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2015 Feb;291(2):251-257. doi: 10.1007/s00404-014-3525-9
140. Yildirim S, Yeoman CJ, Janga SC, et al. Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal *Lactobacillus* dominance. *ISME J* 2014;8:2431-44.
141. Miller EA, Beasley DAnna. E, Dunn RR, et al. Lactobacilli dominance and vaginal pH: why is the human vaginal microbiome unique? *Front Microbiol* 2016;7:1936.
142. Godha K, Tucker KM, Biehl C, Archer DF, Mirkin S. Human vaginal pH and microbiota: an update. *Gynecol Endocrinol*. 2018 Jun;34(6):451-455. doi: 10.1080/09513590.2017.1407753.
143. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Feb;204(2):120.e1-5. doi: 10.1016/j.ajog.2010.07.010
144. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS One*. 2013 Nov 6;8(11):e80074. doi: 10.1371/journal.pone.0080074
145. Russell MW, Sparling FP, Morrison RP, *et al.*: Mucosal immunology of sexually transmitted diseases. In *Mucosal Immunology*, edn 3. Edited by Mestecky J, Bienenstock J, Lamm ME, et al. Oxford, UK: Elsevier; 2004
146. Cauci S. Vaginal Immunity in Bacterial Vaginosis. *Curr Infect Dis Rep*. 2004 Dec; 6(6):450-456. doi: 10.1007/s11908-004-0064-8
147. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary reviews. Systems Biology and Medicine*. 2009 Nov-Dec; 1(3):309-333. doi: 10.1002/wsbm.32
148. Tortelli BA, Lewis WG, Allsworth JE, Member-Meneh N, Foster LR, Reno HE, Peipert JF, Fay JC, Lewis AL. Associations between the vaginal microbiome and *Candida* colonization in women of reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 May;222(5):471.e1-471.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2019.10.008
149. Beigi RH, Meyn LA, Moore DM, Krohn MA, Hillier SL. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. *Obstet Gynecol*. 2004;104(5 Pt 1):926-930
150. Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, Eschenbach DA. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(2):374-380
151. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, et al. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis*. 2009;199(12):1883-1890.
152. Gonzalez-Fernandez D, Koski KG, Sinisterra OT, Del Carmen Pons E, Murillo E, Scott ME. Interactions among urogenital, intestinal, skin, and oral infections in pregnant and lactating Panamanian Ngabe women: a neglected public health challenge. *Am J Trop Med Hyg*. 2015; 92(6):1100-1110.
153. Liu MB, Xu SR, He Y, et al. Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PLoS One*. 2013;8(11):e79812.

154. Vahidnia A, Tuin H, Blikendaal H, Spaargaren J. Association of sexually transmitted infections, *Candida* species, Gram-positive flora and perianal flora with bacterial vaginosis. *New Microbiol.* 2015; 38(4):559–563
155. Rathod SD, Klausner JD, Krupp K, Reingold AL, Madhivanan P. Epidemiologic features of Vulvovaginal Candidiasis among reproductive-age women in India. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012;2012:859071
156. van den Munckhof EHA, van Sitter RL, Boers KE, Lamont RF, Te Witt R, le Cessie S, et al. Comparison of Amsel criteria, Nugent score, culture and two CE-IVD marked quantitative Real-timePCRs with microbiota analysis for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 May;38(5):959-966. doi: 10.1007/s10096-019-03538-7
157. Hilbert DW, Schuyler JA, Adelson ME, Mordechai E, Sobel JD, Gyax SE. *Gardnerella vaginalis* population dynamics in bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017 Jul; 36(7):1269-1278. doi: 10.1007/s10096-017-2933-8
158. Turner E, Sobel JD, Akins RA. Prognosis of recurrent bacterial vaginosis based on longitudinal changes in abundance of *Lactobacillus* and specific species of *Gardnerella*. *PLoS One.* 2021; 16(8):e0256445. Published 2021 Aug 23. doi:10.1371/journal.pone.0256445
159. Dhiman N, Yourshaw CJ, Chintalapudi MR, Turner C, Murphy E. Diagnostic Evaluation of a Multiplex Quantitative Real-timePCR Assay for Bacterial Vaginosis. *Journal of Womens Health Care.* 2016; 5:1-3.
160. Karin Breeding. Diagnosis of Bacterial Vaginosis Using a Novel Molecular Real-time PCRTest. *J Womens Health Gyn.* 2020; 7: 1-7.
161. Rumyantseva TA, Bellen G, Savochkina YA, Guschin AE, Donders GG. Diagnosis of aerobic vaginitis by quantitative Real-time PCR. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Jul;294(1):109-14. doi: 10.1007/s00404-015-4007-4
162. Plummer EL, Garland SM, Bradshaw CS, Law MG, Vodstrcil LA, Hocking JS, et al. Molecular diagnosis of bacterial vaginosis: Does adjustment for total bacterial load or human cellular content improve diagnostic performance? *J Microbiol Methods.* 2017 Feb;133:66-68. doi: 10.1016/j.mimet.2016.12.024
163. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol.* 2004 Apr 21;4:16. doi: 10.1186/1471-2180-4-16
164. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 2006 Sep 15;194(6):828-36. doi: 10.1086/506621
165. Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen 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; 49,217–221. doi:10.1099/00207713-49-1-217
166. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One.* 2012;7(6):e37818. doi: 10.1371/journal.pone.0037818
167. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis.* 2002 Dec 15;186(12):1770-80. doi: 10.1086/345761
168. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL, et al. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infect Dis.* 2009 Oct 14;9:167. doi: 10.1186/1471-2334-9-167
169. Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, Dickson RJ, Changalucha J, Gloor GB, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. *PLoS One.* 2010 Aug 12;5(8):e12078. doi: 10.1371/journal.pone.0012078

170. Nilsen T, Swedek I, Lagenaur LA, Parks TP. Novel Selective Inhibition of *Lactobacillus* iners by *Lactobacillus*-Derived Bacteriocins. *Appl Environ Microbiol*. 2020 Oct 1; 86 (20) :e 0 1594-20. doi: 10.1128/AEM.01594-20
171. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *Plos one*. 2010 Apr;5(4):e10197. doi: 10.1371/journal.pone.0010197
172. 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 May 2;4(132):132ra52. doi: 10.1126/scitranslmed.3003605
173. Santiago GL, Tency I, Verstraelen H, Verhelst R, Trog M, Temmerman M, Vancoillie L, Decat E, Cools P, Vaneechoutte M. Longitudinal qPCR study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina. *PLoS One*. 2012; 7(9):e45281. doi: 10.1371/journal.pone.0045281.
174. Sanchez-Garcia EK, Contreras-Paredes A, Martinez-Abundis E, Garcia-Chan D, Lizano M, de la Cruz-Hernandez E. Molecular epidemiology of bacterial vaginosis and its association with genital micro-organisms in asymptomatic women. *J Med Microbiol*. 2019; 68(9):1373-1382. doi:10.1099/jmm.0.001044
175. Leli C, Mencacci A, Latino MA, Clerici P, Rassu M, Perito S, et al. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex Real-timePCR: An Italian observational multicentre study. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018; 51 (2) :220-225. doi: 10.1016/j.jmii.2017.05.004
176. Patel MA, Nyirjesy P. Role of *Mycoplasma* and *ureaplasma* species in female lower genital tract infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2010 Nov;12(6):417-22. doi: 10.1007/s11908-010-0136-x
177. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev*. 1991 Oct;4(4):485-502. doi: 10.1128/CMR.4.4.485
178. 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 Jun;11(6):356-60. doi: 10.1258/0956462001916056
179. 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 Jun;16 Suppl 4:S273-81. doi: 10.1093/clinids/16.supplement\_4.s273
180. 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 Jul 10; 11(7):6979-7000. doi: 10.3390/ijerph110706979
181. 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(4):328-33. doi: 10.1515/JPM.2009.064
182. Li YH, Brauner A, Jonsson B, van der Ploeg I, Söder O, Holst M, et al. *Ureaplasma urealyticum*-induced production of proinflammatory cytokines by macrophages. *Pediatric Res*. 2000 Jul; 48(1):114-9. doi: 10.1203/00006450-200007000-00020.
183. Parolin C, Foschi C, Laghi L, Zhu C, Banzola N et al. Insights into vaginal bacterial communities and metabolic profiles of *Chlamydia trachomatis* infection: positioning between eubiosis and dysbiosis. *Front Microbiol* 2018;9:600.
184. Bautista CT, Wurapa E, Sateren WB, Morris S, Hollingsworth B et al. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with *Chlamydia* and gonorrhea infections. *Mil Med Res* 2016;3:4
185. Brusselaers N, Shrestha S, van de Wijgert J, Verstraelen H. Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2018.

186. Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2011;11:10.
187. Wessman M, Thorsteinsson K, Jensen JS, Storgaard M, Rönsholt FF et al. Bacterial vaginosis, human papilloma virus and herpes viridae do not predict vaginal HIV RNA shedding in women living with HIV in Denmark. *BMC Infect Dis* 2017;17:376
188. Lee JE, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han MJ, et al. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS ONE* 2013, 8, e63514.
189. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J. Infect. Dis.* 2014, 210, 1723–1733.
190. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci. Rep.* 2015, 5, 16865.
191. Dahoud W, Michael CW, Gokozan H, Nakanishi AK, Harbhajanka A. Association of bacterial vaginosis and human papilloma virus infection with cervical squamous intraepithelial lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* 2019, 152, 185–189.
192. Berghella V, Klebanoff M, McPherson C, Carey JC, Hauth JC, Ernest JM et al. National Institute for Child Health and Development Maternal Fetal Medicine Units Network. Sexual intercourse association with asymptomatic bacterial vaginosis and *Trichomonas vaginalis* treatment in relationship to preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Nov;187(5):1277-82. doi: 10.1067/mob.2002.127134.
193. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, et al. Association between *Trichomonas vaginalis* and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis.* 2012;39(10):807-812. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3182631c79
194. Shipitsyna E, Khusnutdinova T, Budilovskaya O, Krysanova A, Shalepo K, Savicheva A, et al. Bacterial vaginosis-associated vaginal microbiota is an age-independent risk factor for *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis* infections in low-risk women, St. Petersburg, Russia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Jul;39(7):1221-1230. doi: 10.1007/s10096-020-03831-w.
195. Sobel JD, Subramanian C, Foxman B, Fairfax M, Gyax SE. Mixed vaginitis-more than coinfection and with therapeutic implications. *Curr Infect Dis Rep.* 2013;15:104–8.
196. Balkus JE, Richardson BA, Rabe LK, Taha TE, Mgodhi N, Kasaro MP, et al. Bacterial vaginosis and the risk of *trichomonas vaginalis* acquisition among HIV-1-negative women. *Sex. Transm. Dis.* 2014, 41, 123–128.
197. Lu GC, Schwebke JR, Duffy LB, Cassell GH, Hauth JC, Andrews WW, et al. Midtrimester vaginal *Mycoplasma genitalium* in women with subsequent spontaneous preterm birth. *Amer J Obstet Gynecol* 2001;185:163-5.
198. Labbé AC, Frost E, Deslandes S, Mendonça AP, Alves AC, Pépin J. *Mycoplasma genitalium* is not associated with adverse outcomes of pregnancy in Guinea-Bissau. *Sex Transm Infect* 2002; 78:289-91.
199. Oakeshott P, Hay P, Taylor-Robinson D, Hay S, Dohn B, Kerry S, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in early pregnancy and the relationship between its presence and pregnancy outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 2004; 111:464-7.
200. Edwards RK, Ferguson RJ, Reyes L, Brown M, Theriaque DW, Duff P. Assessing the relationship between preterm delivery and various microorganisms recovered from the lower genital tract. *J Maternal Fetal Neonat Med* 2006;19:357-63.
201. Barrientos-Durán A, Fuentes-López A, de Salazar A, Plaza-Díaz J, García F. Reviewing the Composition of Vaginal Microbiota: Inclusion of Nutrition and Probiotic Factors in the Maintenance of Eubiosis. *Nutrients.* 2020;12(2):419. doi: 10.3390/nu12020419.

202. Chernes 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 Aug 1;37(3):319-25. doi: 10.1086/375819.

203. Allsworth JE, Lewis VA, Peipert JF. Viral sexually transmitted infections and bacterial vaginosis: 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Survey data. *Sex Transm Dis*. 2008 Sep;35(9):791-6. doi: 10.1097/OLQ.0b013e3181788301.

204. Van Der Pol B, Daniel G, Kodsí S, Paradis S, Cooper CK. Molecular-based Testing for Sexually Transmitted Infections Using Samples Previously Collected for Vaginitis Diagnosis. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019; 68(3):375-381 doi:10.1093/cid/ciy504.

205. Vesić S, Vukićević J, Gvozdenović E, Skiljević D, Janosević S, Medenica L. Chlamydia trachomatis and urogenital mycoplasmas in nongonococcal urethritis in men. [In Serbian] *Med Pregl*. 2010; 63(1-2):47-50.

206. Denks K , Spaeth EL , Jõers K , Randoja R , Talpsep T, Ustav M , et al . Coinfection of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and human papillomavirus among patients attending STD clinics in Estonia. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(8):714-8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654349>. doi: 10.1080/00365540701199824.

207. Wang L, Yang B, Tso LS, Zhao P, Ke W, Zhang X, et al. Prevalence of co-infections with other sexually transmitted infections in patients newly diagnosed with anogenital warts in Guangzhou, China. *Int J STD AIDS*. 2020; 31(11):1073-1081. doi: 10.1177/0956462419890496.