

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

MOTERŲ LYTINĖS MIKROFLOROS ĮVAIROVĖS TYRIMAS IR VERTINIMAS

Magistrantė JUSTINA VERTELYTĖ

(parašas)

Darbo vadovė dr. SILVIJA KIVERYTĖ

(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab. dr., prof. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti

(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

Vilnius, 2016

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	3
ĮVADAS.....	4
1. DARBO TISKLAS IR UŽDAVINIAI.....	6
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
2.1. Normali makšties mikroflora.....	7
2.2. Makšties ir gimdos kaklelio infekcijos.....	9
2.2.1. Bakterinės vaginozės etiologija ir paplitimas.....	9
2.2.2. Bakterinės vaginozės nustatymas.....	11
2.2.3. Kandidozė.....	13
2.3. Specifinės infekcijos.....	14
2.3.1. Trichomonozė.....	14
2.3.2. Chlamidinė infekcija.....	16
2.3.3. Gonokokinė infekcija.....	16
3. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI.....	18
3.1. Tyrimų medžiaga.....	18
3.2. Drėgno makšties tepinėlio atlikimas ir vertinimas.....	18
3.3. Mikrobiologinio pasėlio iš gimdos kaklelio atlikimas ir vertinimas.....	21
3.3.1. Ėminio paėmimas mikrobiologiniam pasėliui.....	21
3.3.2. Ėminio pasėjimas į mitybines terpes ir mikroorganizmų augimo gausumo vertinimas.....	22
3.3.3. Mikroorganizmų identifikavimas MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu..	24
3.4. <i>Atopobium Vaginae</i> nustatymas ėminiuose iš gimdos kaklelio atliekant tikro laiko PGR metoda.....	27
3.4.1. Tiriamosios DNR paruošimas.....	27
3.4.2. <i>Atopobium vaginae</i> DNR tyrimas.....	28
3.4.3. Tikro laiko PGR rezultatų interpretavimas.....	29
3.5. Statistinė analizė.....	30
4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	31
4.1. Bendrosios charakteristikos.....	31
4.2. Bakteriologinių duomenų analizė.....	31
4.3. Molekulinių ir mikroskopinių duomenų analizė.....	39
4.4. <i>Atopobium vaginae</i> DNR tyrimo analizė.....	41
4.5. Rezultatų aptarimas.....	44
5. IŠVADOS.....	49
SUMMARY.....	50
PADĖKA.....	51
LITERATŪROS ŠALTINIAI.....	52

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AV – aerobinis vaginitas

BV – bakterinė vaginozė

Ct – amplifikacijos ciklas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

IL – interleukinas

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

LPI – lytiškai plintančios infekcijos

MALDI TOF MS – iš matricos dezorbuota ir jonizuota lėkio trukmės masių spektrometrija

MDU – mažojo dubens uždegiminė liga

STT – selektyvus streptokokinis agaras

RL PGR – realaus laiko polimerazinė grandininė reakcija

RNR – ribonukleorūgštis

NNF – navikų nekrozės faktorius

UV – ultravioletiniai spinduliai

VU MF – Vilniaus universiteto medicinos fakultetas

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

ŽPV – žmogaus papilomos virusas

ĮVADAS

Mikroorganizmai – vieni pagrindinių infekcinių ligų sukėlėjų, tačiau taip pat jie yra neatsiejami nuo žmogaus ir būtini visaverčiam sveikam žmogaus gyvenimui palaikyti. Iš graikų kalbos žodis „mikros“ reiškia mažas. Žmogaus kūnas savotiškas „inkubatorius“ įvairių rūšių mikroorganizmams: bakterijoms, grybams, pirmuonims ir neląsteliniam virusams. Mikroorganizmų žmogaus kūne yra dešimt kartų daugiau lyginant su žmogaus kūno ląstelių kiekiu, tai patvirtino atliktas žmogaus mikrobiomo projekto tyrimas JAV [6]. Skirtingoms žmogaus kūno vietoms būdinga unikali mikroorganizmų įvairovė: ant odos, burnos ertmėje, žarnyne, urogenitalinėje sistemoje. Normalų žmogaus mikrobiomą veikia daugybė faktorių: lytinis brendimas, menstruacinis ciklas, aktyvus lytinis gyvenimas, genetika, rasė, didelis antibiotikų vartojimas ir higiena. Tokie fiziologiniai ir nefiziologiniai procesai turi didelę įtaką moters lytinių takų mikrobiomui. Dėl sutrikusios normalios makšties mikrofloros pusiausvyros gali kilti įvairios infekcijos, uždegimai, kurie dirgina nervinę, imuninę ir endokrininę sistemą, o ilgai negydant sukelia ir organo disfunkciją - tai gali būti viena iš priežasčių moterų nevaisingumui [7]. Minėti normalios makšties mikrofloros pusiausvyros pokyčiai gali sukelti rimtas pasekmes moterų sveikatai, tokias kaip nevaisingumą, padidėjusią riziką užsikrėsti lytiškai plintančiomis infekcijomis (LPI), mažojo dubens uždegiminę ligą (MDU), endometriozę, nėščiosioms priešlaikinius gimdymus, persileidimus [1, 2, 3, 4, 5].

Tiriant mikroorganizmus mikrobiologiniuose pasėliuose, svarbu nustatyti, kokie mikroorganizmai vyrauja ir sudaro makšties, gimdos kaklelio mikroflorą. Norint nustatyti infekcijos sukėlėją, reikia atskirti normalios mikrofloros atstovus nuo patogeninių mikroorganizmų. Aptikus patogeninius infekcijų sukėlėjus, gydytojai pagal pacientei pasireiškusius simptomus ir turimus laboratorinius rezultatus gali nustatyti, kokio tipo infekcija pasireiškusi, o dažnai nuo to priklauso efektyvus gydymas ir greitas išgyjimas. Skirtingi mikroorganizmai ar jų grupės sukelia skirtingas infekcijas: trichomonozę – *Trichomonas vaginalis*, kandidozę – *Candida albicans*, chlamidiozę – *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis* ir *Atopobium vaginae* vieni iš daugelio bakterinės vaginozės sukėlėjų. Norint suprasti, kas lemia patogeninių mikroorganizmų vyravimą, pirmiausia reikia žinoti, kokiems veiksniams jautri normali makšties mikroflora. Makšties mikrofloros disbalansą gali sąlygoti įvairūs išoriniai ir vidiniai veiksniai. Makšties mikroaplinką veikia hormonai, ligos, plataus masto naudojami antibiotikai, kontraceptikai (gimdos spiralė, geriamieji kontraceptikai), lytinis aktyvumas, netinkamai naudojamos higienos priemonės [8, 9].

Kintant aplinkos ir vidiniams faktoriams, normali makšties sudėtis keičiasi. Susidarius palankioms sąlygoms, įsivysto oportunistiniai mikroorganizmai, kurie veikia kaip patogenai ir pažeidžia makroorganizmo ląsteles, audinius. Išsibalansavusi moterų lytinių takų normali

mikroflora sudaro sąlygas kilti makšties, gimdos kaklelio, kiaušintakių infekcijoms, uždegimams, o tai varginanti įvairaus amžiaus moterų problema. Taigi mikroorganizmų tyrimai mikrobiologiniuose pasėliuose ypatingai svarbūs ir reikšmingi. Tikslus ir greitas mikroorganizmo identifikavimas svarbus skiriant tikslų, efektyvų gydymą. Žinojimas apie normalią ar patogeninę makšties, gimdos kaklelio mikroorganizmų bioįvairovę, paplitimą, pasiskirstymą, tarpusavio ryšius su žmogumi leidžia išvengti ilgalaikių ar dažnai pasikartojančių infekcijų, uždegimų, kurie ir yra vieni iš pagrindinių ir dažniausių priežasčių moterims kreipiantis į ginekologą.

1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

DARBO TIKSLAS.

Tirti ir išanalizuoti moterų lytinių takų mikrofloros įvairovę mikrobiologinio pasėlio, drėgno makšties tepinėlio ir PGR metodais.

DARBO UŽDAVINIAI:

1. Įvertinti mikroorganizmų rūšis mikrobiologiniuose pasėliuose iš gimdos kaklelio, nustatant gausumą ir identifikuojant normalios ir patologinės mikrofloros atstovus.
2. Realus laiko PGR metodu nustatyti *Atopobium vaginae* ėminiuose iš gimdos kaklelio.
3. Nustatyti mikroorganizmų ryšį su makšties uždegimu.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Normali makšties mikroflora

Moters vidiniai lytiniai organai yra puiki vieta tarpti įvairiems mikroorganizmams. Skirtingai nei kitos žmogaus organizmo vietos, makštis nėra apsaugota nuo aplinkos veiksnių, todėl į ją nesunkiai gali patekti bakterijos, grybeliai, virusai. Žmogaus mikrobiomas glaudžiai susijęs su šeimininko gera savijauta, būkle, sveikata [10]. Įvairūs vidiniai ir išoriniai veiksniai, kaip lytinis brendimas, menstruacinis ciklas, kontraceptikų, antibiotikų vartojimas, lytinis gyvenimas, prasta higiena ar dieta, gali turėti įtakos makšties mikrobiomo įvairovei. Svarbu suprasti įvairių fiziologinių ir nefiziologinių veiksnių įtaką makšties mikrofloros aplinkai, kurios žinojimas leistų efektyviau nustatyti normą, taip pat greičiau identifikuoti galbūt patogeniškas bakterijas, skirti tikslų gydymą ir užkirsti kelią makšties, gimdos kaklelio infekcijoms, uždegimams ir jų padariniams.

Pirmąsias makšties bakterijas pasėlyje užaugino ir aptiko vokiečių mokslininkas Albertas Doderlainas. Jis nustatė, kad aptiktos bakterijos išskiria pieno rūgštį, dėl kurių *in vivo* ir *in vitro* sustoja augti patogeninės bakterijos. Vėliau, 1928 metais, „Döderlaino bakterijos“ pavadintos *Lactobacillus acidophilus* [11]. Dabar žinome, kad laktobakterijos – tai stambios, tiesios ar lenktais, bukais galais lazdelės. Laktobakterijos – pieno rūgšties bakterijos, kurios naudoja makšties tarpinėse ląstelėse esantį glikogeną, suskaido iki mono- ir disacharidų, o vėliau paverčia pieno rūgštimi, todėl makšties terpė – rūgštinė [12]. Laktobakterijų aptikimas makšties sekrete siejamas su sveikų moterų makštimi ir normalia jos dalimi. Tiriant makšties mikrobiomą bakteriologiniais ir molekuliniais tyrimais, nustatyta, kad subrendusioms moterims dažniausiai aptinkamos tokios *Lactobacillus* genties rūšys: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* [12, 13]. Tiriant Estijos reprodukcinio amžiaus moterų makšties mikrobiomą, nustatyta, kad net 70 proc. aptinkama laktobakterijų genties atstovų, o dažniausiai aptinkamos *Lactobacillus iners* ir *Lactobacillus crispatus* rūšys [10]. Manoma, kad dėl šių bakterijų gebėjimo skirti pieno rūgštį bei palaikyti žemą makšties pH ir neleidžia įsitvirtinti ar kolonizuoti kitų rūšių galbūt patogeninėms bakterijoms [12, 14, 15, 16]. Nustatyta, kad laktobakterijų išskiriama pieno rūgštis kartu su žmogaus imunine sistema yra efektyvi prieš tokius lytiniu keliu plintančių ligų (LPI) sukėlėjus kaip ŽIV ar *Neisseria gonorrhoeae* [17, 18, 19, 20, 21]. Taigi žmogaus kūnas sudaro teigiamas sąlygas mikroorganizmams tarpti, nes šeimininko imuninė sistema savosios floros nenaikina, o pastarieji už suteiktas palankias gyvenimo sąlygas saugo nuo virulentiškų mikrobu. Tokiu būdu tarp žmogaus ir mikroorganizmų egzistuoja abipusis tarpusavio ryšys – simbiozė [12].

Žmogaus organizmui augant ir bręstant, nuolat keičiasi ir mikrobiomas. Pirmąsias bakterijas gauname gimimo metu iš motinos makšties mikrofloros [6, 22]. Pirmais gyvenimo mėnesiais

moteriškosios lyties atstovių makšties aplinkoje vyrauja *Lactobacillus spp.* [23]. Laktobakterijoms reikalingas glikogenas, o už jo gamybą tarpinėse makšties epitelinėse ląstelėse atsakingas estrogenas. Po gimimo naujagimio organizme padidėjęs iš motinos gautas estrogenų kiekis laikui bėgant sumažėja ir visiškai išnyksta, o kartu sumažėja ir glikogeno gamyba makšties epitelinėse tarpinėse ląstelėse iki tol, kol prasideda lytinis brendimas. Sumažėjus laktobakterijų kiekiui, makšties pH padidėja ir yra beveik neutrali [13]. Paauglystėje lytinio brendimo metu, vystantis folikulams, kartu didėja estrogenų kiekis, taip pat keičiasi makšties epitelinės ląstelės, gleivinė ir makšties mikroflora [22]. Vėl gaminamas intraląstelinis glikogenas, didėja *Lactobacillus spp.* kiekis, makšties terpė rūgštėja. Amerikoje, naudojantis molekuliniais tyrimais, buvo tiriama sveikų paauglių nuo 13 iki 18 metų amžiaus mergaičių makšties bakterijų mikroflora. Tyrimai parodė, kad tarp skirtingų etninių grupių juodaodžių ir baltaodžių amerikiečių paauglių daugiau nei 50 proc. aptinkama *Lactobacillus iners* ir *Lactobacillus crispatus* [24].

Suaugusių moterų lytiniuose takuose aptinkamos *Lactobacillus* genties atstovės laikomos normalios ir sveikos floros indikatorėmis [12, 25]. Pastarieji makšties mikrobiomo tyrimai su reprodukciniu amžiaus moterimis parodė, kad makšties bioma sudaro keletas rūšių bakterijų, iš kurių ir dominuoja *Lactobacillus* gentis [26, 27]. Tačiau kitų tyrimų duomenys rodo, kad mikrobiomo įvairovė priklauso nuo genetinių skirtumų, o tai paaiškina faktą, kad makšties mikrobiomas skiriasi skirtingose žmonių populiacijose pagal etnines grupes [28, 29, 78]. Ravel *et al.* atlikti tyrimai rodo, kad *Lactobacillus spp.* labai varijuoja pagal skirtingas moterų rases. Baltaodžių ir Azijos moterų makšties mikrofloroje *lactobacillus spp.* sudaro 89,7 proc. ir 80,2 proc., o juodaodžių ir ispanių moterų sudaro tik 59,6 proc. ir 61,9 proc. laktobakterijų. Tuo pačiu tyrimu buvo nustatyta, kad juodaodžių ir ispanių moterų makšties mikrofloroje dažniau aptinkamos anaerobinės floros bakterijos [25]. Tuo tarpu pagal Zhou *et al.* atliktus tyrimus nustatyta, kad ne visoms sveikoms moterims būdingas *Lactobacillus spp.* dominavimas lytiniuose takuose. Taip pat buvo išaiškinta, kad tokioms moterims dažnai aptinkami *Atopobium*, *Streptococcus* atstovai ir kiti fakultatyviniai anaerobai [30]. Kai kurios rūšys – *L.iners*, *P. bivia* ir *A. vaginae* – buvo aptinkamos tiek sveikų moterų makštyje, tiek sergančių BV [80]. Manoma, kad minėtų rūšių atstovai yra taip evoliucionavę, kad gali prisitaikyti skirtingose sąlygose, tai paaiškintų ir *Lactobacillus iners* sugebėjimą išlikti moterų, sergančių BV, aplinkoje [79]. Taigi aišku, kad mikrobiomo įvairovę lemia daugelis veiksnių, tarp kurių ypatingai svarbią vietą užima žmogaus genetiniai veiksniai, genetinė predispozicija ligai, o tai ir paaiškintų tokį sudėtingą mikrofloros prisitaikymą ir kintamumą lytiniuose moterų takuose tarp skirtingų etninių grupių.

Moters lytinių takų mikrofloros sudėties svyravimus veikia fiziologiniai ir ne fiziologiniai veiksniai. Tai menstruacinis ciklas, higienos laikymasis, įvairių prausiklių naudojimas, didelis antibiotikų vartojimas. Tibaldi *et al.* atlikti tyrimai parodė, kad nepradėjusių lytiškai bręsti

mergaičių makšties mikrofloroje dominuoja gramneigiamos bakterijos, tokios kaip *Escherichia coli*, autorius teigia, kad tokia floros sudėtis gali būti dėl prastos higienos laikymosi [30]. Dažni intymios higienos priemonių naudojimai gali sutrikdyti normalios mikrofloros aplinką [8]. Atlikti tyrimai pagal Klebanoff *et al.* tvirtina, kad būtent makšties praplovimas, o ne naudojamos higieninės priemonės yra stipriai asocijuotos su BV [9].

Menstruacinis ciklas, kaip normalus moterų fiziologinis procesas, gali turėti įtakos makšties bakterijų sudėčiai, augimui ar invazinių bakterijų kolonizavimui. Estrogeno ir progesterono svyravimai menstruacinio ciklo metu turi įtakos laktobacilų aplinkai. Hormonai, veikdami makšties epitelinių ląstelių receptorių ekspresiją, reguliuoja makšties gleivingumą, klampumą, glikogeno kiekį, pH ir turi įtakos makšties imuninės sistemos atsakui [8, 31]. Pastebėta, kad menstruacinio ciklo metu sumažėja *Lactobacillus spp.* ir padidėja *G. vaginalis* koncentracija, o baigiantis mėnesinėms *G. vaginalis* koncentracija sumažėja [32]. Tiriant makšties mikrofloros dinamiką dviejų iš eilės menstruacinių ciklų metu Santiago Santos *et al.* nustatė, kad labiausiai makšties mikrofloros įvairovę sutrikdė vartojami antibiotikai ir pats menstruacinis ciklas [8].

Menopauzės metu sumažėja estrogenų kiekis, o kartu glikogeno kiekis makšties epitelinėse ląstelėse, kuris yra pagrindinis substratas *Lactobacillus spp.* Keičiantis makšties pH, nyksta normalios floros bakterijos, kurios saugo nuo patogeninių organizmų kolonizavimo ir dauginimosi. Tiriant Švedijos moterų mikroflorą tarp vaisingo amžiaus ir menopauzės moterų, nustatyta, kad *Lactobacillus crispatus* dažniau aptinkama reprodukcinio amžiaus moterims lyginant su pomenopauzinio amžiaus moterimis [33].

Normali makšties mikroflora priklauso nuo išorinių ir vidinių veiksnių: moters amžiaus, hormonų svyravimų, lytinio gyvenimo ritmo, rasės. Makšties mikroflorą sudaro įvairūs mikroorganizmai – grybai, aerobinės, anaerobinės bakterijos. Iš bakterijų makšties floroje dominuoja *Lactobacillus spp.*, kurios suteikia makšties gleivinei rūgštinę aplinką ir saugo nuo virulentiškų mikroorganizmų kolonizavimo, gausėjimo.

2.2. Makšties ir gimdos kaklelio infekcijos

2.2.1. Bakterinės vaginozės etiologija ir paplitimas

Bakterinė vaginozė (BV) – tai dažniausiai pasitaikantis ir sunkiausias klinikinius padarinius sukkeliantis makšties normalios mikrofloros sutrikimas. Bakterinę vaginozę dar galime apibūdinti kaip polimikrobinį sutrikimą, t. y. ją sukelia ne viena, o daugelis bakterijų rūšių [85]. Jos metu normalios makšties floros atstovus laktobacilas pakeičia ir kolonizuoja anaerobai: *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus spp* ir *Atopobium vaginae* ir kt. [34].

Gardnerella vaginalis pirmą kartą išskirtas 1953 metais Leopold, o aprašytas 1955 metais mokslininkų Duke ir Gardner [83]. *G. vaginalis* – tai gramteigiamos ar gramneigiamos anaerobinės lazdelės [35]. Šis *Gardnerella* genties atsovas buvo pirmoji bakterija, susieta su bakterine vaginoze. Nustatyta, kad ji aptinkama iki 95 proc. toms pacientėms, kurioms pasireiškia bakterinė vaginozė, ir dažniausiai aptinkama tarp 25–30 metų amžiaus moterų [36]. Taip pat *Gardnerella* genties mikroorganizmai apie 90 proc. išskiriami iš moterų makšties, esant vaginito požymiams (makšties uždegimams), ir 26 proc. – sveikoms moterims [37–38]. *Gardnerella vaginalis* sukelia nespecifinį vaginitą ir, kai kurių autorių nuomone, jis yra reikšmingas, nes vienas iš pirmųjų pakeičia makšties aplinką ir sudaro sąlygas kolonizuoti kitiems patogenams, kartu sukelia BV iniciaciją [82].

Švedijoje 1999 metais iš sveikos moters makšties buvo išskirta bakterija, kuri priskirta *Atopobium* genčiai ir pavadinta *Atopobium vaginae* [103]. *Atopobium vaginae* bakterijos – tai anaerobinės, Gramteigiamos, elipsinės formos kokinės ar lazdelės formos bakterijos, besijungiančios po kelias ar sudarančios trumpas grandinėles Gramo dažytame tepinėlyje. Būtent dėl savo mažo dydžio, polimorfiškumo, gebėjimo keisti formą ši bakterija buvo ilgą laiką nepastebima tarp kitų makšties mikroorganizmų atstovų [39]. Minėtų atstovų skaičius padidėja keliais šimtais ar daugiau kartų, dėl šių anaerobų išskiriamų aminų pasikeičia ir makšties pH, kuri padidėja [40]. Tokiu būdu susidaro palankios sąlygos minėtoms bakterijoms klestėti makšties aplinkoje ir sukelti uždegiminius procesus.

Sutrikus organizmo vidinei pusiausvyrai, nusilpus imunitetui ir pakitus normaliai makšties mikroaplinkai, susidaro palankios sąlygos daugintis ir kolonizuoti minėtiesiems organizmams. Bakterinės vaginozės sukėlėjus sudarančios anaerobinės bakterijos išbalansuoja makšties normalią ekosistemą [41], pakeičia moterų makšties, gimdos kaklelio gleivinės aplinką, išskirdamos savo metabolitus, pažeidžia epitelines ląsteles ir išvengia organizmo imuninės sistemos. Tokiu būdu bakterinė vaginozė padidina riziką užsikrėsti lytiniu būdu plintančiomis infekcijomis, kurias sukelia šie sukėlėjai: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* ir ŽIV virusai [42, 43]. Taip pat moterys su BV yra jautresnės ir turi didesnę riziką susirgti kiaušintakių uždegimu, endometritu (gimdos gleivinės uždegimas), endometrioze ar nevaisingumu [43, 13]. Nėščioms moterims ypač pavojinga BV: nėštumo metu tai gali sukelti priešlaikinį gimdymą, ankstyvą placentos plyšimą, persileidimą, pogimdyvines infekcijas [1-5]. Nustatyta, kad bakterinės vaginozės patogenai, išskirdami savo metabolitus, stipriai pažeidžia makšties gleivinę. Žmogaus imuninė sistema, reaguodama į dirgiklius, padidina interleukinų (IL-22, IL-8, IL-10) ir navikų nekrozės faktoriaus (NMF) ekspresiją [44]. Bakterinė vaginozė siejama su kartotinėmis šlapimo takų infekcijomis, mažojo dubens uždegimu (MDU), pooperacinėmis komplikacijomis, gimdos kaklelio displazija kartu su žmogaus papilomos virusu (ŽPV) [45].

Bakterinė vaginozė – dažniausia reprodukcinio amžiaus moterų liga [81]. Bakterinė vaginozė siejama su tokiais veiksniais: didelis partnerių skaičius, prasta mityba, skirtingos etninės grupės, rasė.

Lytiškai aktyvios moterys dažniau siejamos su BV. Moterys, turinčios du ir daugiau partnerių, dažniau serga BV nei moterys, turinčios mažiau ar pastovius partnerius [46].

Prasta mityba gali būti vienas iš veiksnių, leidžiančių atsirasti BV. Kai kurių autorių atliktų tyrimų duomenys rodo, kad bakterinei vaginozei įvykti turi įtakos prasta mityba, dieta, vitaminų A, C, E, D trūkumas, taip pat mažai gaunamos folio rūgšties, kalcio [47-49]. Vitaminas D gali turėti įtakos, kaip šeimininko ląstelės sugeba atpažinti patogenus ir kaip imuninė sistema sugeba kovoti su patogenų kolonizacija [50, 51]. Vitamino D aktyvi forma 1,25 dihidroksikalciferolis svarbus reguliuojant antimikrobinių molekulių gamybą (angl. cathelicidin), kurios yra neutrofilų degranuliacijos produktai, tokiu būdu padedantys apsaugoti nuo invazinių bakterijų sukeltamų infekcijų [52].

Bakterinė vaginozė plačiai paplitusi pasaulyje ir sergamumas ja gali skirtis pagal etnines grupes ar rasę. Manoma, kad juodaodės moterys turi genetinę predispoziciją BV. Juodaodėms moterims bakterinė vaginozė nustatoma tris kartus dažniau negu baltaodėms moterims [49]. BV skirtingai aptinkama Šiaurės Amerikoje, Pietų Amerikoje, Europoje ir Azijoje. Dažniausiai bakterinė vaginozė nustatoma toms moterims, kurios gimusios Azijoje, negu Europoje ar Amerikoje [53]. Moterims iš Šiaurės ir Rytų Afrikos buvo dažniau nustatoma BV (68 proc. Mozambike, 51 proc. Lesote, 44 proc. Kenijoje, 37 proc. Gambijoje) negu moterims iš Vakarų Afrikos (Burkina Faso – 7 proc.) [53, 54]. Norvegijoje nustatoma 24 proc., Turkijoje – 23 proc., Lenkijoje – 19 proc. BV. Duomenys iš JAV gynybos medicinos stebėjimo sistemos parodė, kad nuo 2004 m. iki 2013 m. JAV karinėje tarnyboje BV moterims buvo nustatyta 149 666 tūkst. (15 000 per metus) atvejų [54].

Nors bakterinė vaginozė tiriama daugiau nei 50 metų, tačiau iki šiol jos etiologija nėra iki galo išaiškinta ir daugelis faktų reikalauja platesnių tyrimų. BV sudaranti mišri patogenų mikroflora, naudodama savo virulentiškumo faktorius, sukelia makšties gleivinės uždegimą, padidina riziką užsikrėsti lytiškai plintančiomis ligomis ir sukelia daugybę komplikacijų nėščioms moterims.

2.2.2. Bakterinės vaginozės nustatymas

Bakterinė vaginozė (BV) – tai ne lytiškai plintanti infekcija ir ją galima diagnozuoti daugeliui sveikų moterų [55], taip pat toms moterims, kurios negyvena lytinio gyvenimo. Bakterinė vaginozė yra 40–50 proc. makšties uždegimo priežastis tarp vaisingo amžiaus moterų, t. y. BV

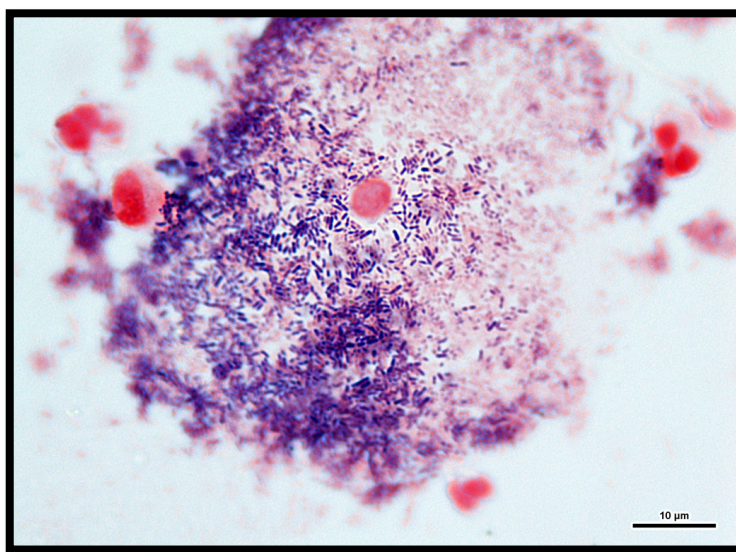
būdinga reprodukcinio amžiaus moterims [38, 6]. Daugiau nei 50 proc. moterų būdinga besimptominei BV [56]. Gydytas suteikiamas tik tomis moterims, kurioms pasireiškia klinikiniai simptomai. Nenustačius klinikinių simptomų, bet ligą diagnozavus laboratoriškai, būtina gydyti šias pacientes: moteris, planuojančias pastoti, rizikos grupėse, nėščiąsias, planuojančias nutraukti nėštumą chirurginiu būdu [55].

Pagrindiniai klinikiniai bakterinės vaginozės simptomai:

4. Išskyros plonu sluoksniu dengia gleivinę, homogeniškos.
5. Makšties išskyros pilkšvai baltos, lipnios, kartais putotos, nemalonaus kvapo.
6. Makšties išskyros turi specifinį „žuvies“ kvapą.
7. Būdingas nemalonus jausmas makštyje, niežėjimas.

Bakterinės vaginozės diagnostika:

1. Tiesioginė mikroskopija:
 - laktobacilų nebuvimas;
 - indikatorinių ląstelių aptikimas (1 pav.).
2. Bakterinė vaginozė nustatoma remiantis Amsel'o kriterijais, diagnozei patvirtinti reikia trijų iš keturių išvardintų kriterijų:
 - pilkšvos, homogeniškos, nemalonaus kvapo išskyros;
 - makšties pH > 4,5;
 - užlašinus 10 procentų kalio šarmo, teigiamas aminų mėginys (juntamas žuvies kvapas);
 - tepinėlyje matyti indikatorinių ląstelių, t. y. makšties plokščiojo epitelio ląstelės aplipusios bakterine vaginoze sukeliančiomis bakterijomis [57, 45, 23, 6, 85].



1 pav. Indikatorinė ląstelė aplipusi BV sukeliančiomis bakterijomis [58].

3. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR, angl. *PCR-Polymerase Chain Reaction*) – tai DNR grandinės fragmento pagausinimo *in vitro* metodas, kuris vykdomas cikliška kaitaliojant temperatūras. PGR metodas labai jautrus ir specifiškas. Jis leidžia aptikti įvairius mikroorganizmus: bakterijas, virusus, pirmuonis. Bakterijų rūšys identifikuojamos pagal jų specifines genetines sritis, pvz., 16S rRNR arba cpn60, todėl bakterinės vaginozės sukėlėjai gali būti tiksliai nustatomi polimerazinės grandininės reakcijos metodu [59, 56, 83, 84]. Kadangi vienas iš BV sukėlėjų yra *Atopobium vaginae*, kuris neturi savo specifinių morfologinių požymių ir sunkiai auga kultūrinėse terpėse, tai jį diagnozuoti padeda realaus laiko PGR molekuliniai tyrimai [60]. Realaus laiko PGR (RL-PGR) privalumai, palyginti su kitais DNR fragmentų gausinimo metodais, yra greitas, labai jautrus, specifiškas ir atliekamas realiu laiku tyrimas. RL-PGR metu greičiau aptinkama tiriamoji analizė medžiagoje nei paprasto PGR metodu. Tikro laiko PGR metu naudojami oligonukleotidiniai zondai su prijungtais fluoroforais. Tokiam zondui susijungus su taikinine DNR, padidėja fluorescencija. Taigi tikro laiko PGR metu galima išmatuoti absoliutų DNR kiekį, nukleorūgščių kiekį tiriamuose mėginiuose stebint ir matuojant fluorescenciją.

PGR galima amplifikuoti turint net labai mažą kiekį DNR iš bet kokios organizmo ląstelės, turinčios branduolį, DNR ar RNR. Kompiuterinėmis programomis tyrimo rezultatas aiškiai matomas, lengvai dokumentuojamas ir gali būti saugomas neribotą laiką. Taigi PGR tyrimai taikomi nustatyti ne tik bakterinės vaginozės sukėlėjus, bet ir tiriant mėginius, kurie nesuteikė norimo atsakymo auginant bakterijas, grybus, t. y. tiriant tokius organizmus, kurie neauga pasėlyje ar sunkiai aptinkami mikroskopuojant, pvz., pirmuonį *Trichomonas vaginalis*, ŽPV virusą, *Atopobium vaginae* ir kt.

2.2.3. Kandidozė

Kandidozė – tai infekcija, kurią 90–95 proc. sukelia *Candida albicans*, rečiau – kitos *Candida* rūšys: *C. glabrata*, *C. tropicalis* [61]. *Candida* spp. – tai vienaląsčiai 4–8 mm dydžio mieliniai grybai [37]. Dažnai prie normalios makšties floros priskiriamas ir grybelis *Candida albicans*, todėl šie mieliniai grybai yra 50 proc. moterų normalioji lytinių takų mikroflora. Tačiau sutrikus gleivinės pusiausvyrai, šių mikroorganizmų skaičius gali labai greitai padidėti ir sukelti vaginitą (makšties uždegimą) arba kandidamikozę [23]. Apie 75 proc. moterų bent kartą gyvenime pasireiškia ši infekcija, apie 40–45 proc. suserga du ir daugiau kartų [61, 38]. Apie 5 proc. moterų serga lėtine, recidyvuojančia kandidoze, kuri per metus pasikartoja keturis ar daugiau kartų [62].

Kandidozė – tai ne lytiškai plintanti infekcija, kuri sukelia makšties uždegimą. Kandida infekcija serga ir lytinio gyvenimo negyvenančios moterys [55]. Riziką susirgti šia infekcija didina:

nėštumas, antibiotikų vartojimas, cukrinis diabetas, imuniteto nusilpimas (pavyzdžiui, dėl ŽIV) ir net sintetinis apatinis trikotažas [63, 55]. Didelėms antibiotikų dozėms labai jautrios normalios makšties floros laktobakterijos, kurių sumažėjimas ir atveria kelią kandida grybelio gausėjimui [64, 43]. Grybui plisti padeda jo patogeniškumo veiksniai: adheziniai ląstelėms, fagocitozę slopinantys ir invaziją skatinančios išskiriamos proteazės [37].

Kandida infekcijos simptomai:

1. Išorinių lyties organų intensyvus niežėjimas, skausmas.
2. Išorinių lytinių organų patinimas, paraudimas, įtrūkimai.
3. Tirštos, baltos, dribsnių pavidalo, negausios išskyros.
4. Perštėjimas, deginimas pasišlapinus ar po lytinių santykių.
5. Makšties sausmė.
6. 10–20 proc atvejų pasireiškia be simptomų [38, 23].

Nustatant kandida infekciją pirmiausia imamas mėginys drėgnam tepinėliui atlikti iš apatinio makšties skliauto ar nuo šoninės makšties sienos, o vėliau – medžiaga pasėliui. Atliekamas mikroskopinis tyrimas. Mikroskopu tiriama paimta klinikinė medžiaga, daromas tepinėlis, vertinama grybelio morfologija, skaičius, nusidažymas. Mikroskopinis tyrimas neleidžia nustatyti *Candida* grybelių rūšies, todėl atliekami detalesni tyrimai. Paimta klinikinė medžiaga siunčiama į laboratoriją ir sėjama į mitybines terpes kartu ir į Sabūro agarą, kuri skirta *Candida spp.* grybams kultivuoti. Vertinami kraujo, Sabūro agare užaugusios kolonijos, spalva, dydis, specifinis kvapas [35]. Kandidozė patvirtinama, kai aptinkama makšties išskyrų tepinėlyje grybų sporų, pseudomicelio, atlikus pasėlį ir nustčius kandidos rūšies atstovus, gausumą bei esant tipiškiems kandidozės simptomams.

2.3. Specifinės infekcijos

2.3.1. Trichomonozė

Trichomonozė – dažna lytiškai plintanti infekcija, kurią sukelia pirmuonis *Trichomonas vaginalis*. *Trichomona vaginalis* yra lytiniu būdu plintantis viduląstelinis parazitas, kuris moterims sukelia ūmų vaginitą. Jungtinėje Karalystėje nustatyta per 3,7 mln. atvejų užsikrėtusių trichomonozė. Sergančiųjų amžius labai įvairus – nuo 15 iki 49 metų amžiaus [65, 66].

Trichomonas – tai judrus, kriaušės formos, 10–20 μm ilgio, blyškiu su ekscentrišku branduoliu ir rausvais grūdeliais citoplazmoje žiuželinis pirmuonis (pav. 2) [57].



2 pav. Trichomonozės sukėlėjas *Trichomonas vaginalis*.

<http://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>.

Moterims, sergančioms trichomonoze, būdingos gausios, nemalonaus kvapo išskyros, taip pat makšties sienelių uždegimas, paraudimas, gali susidaryti mažos opelės [23]. *T. vaginalis* savo adhezinais prisitvirtina ant makšties daugiasluoksnio plokščiojo epitelio ląstelių, išskiria toksines medžiagas ir tokiu būdu sukelia ląstelių citolizę [66]. Laiku negydoma makšties trichomonozė gali sukelti priešlaikinį gimdymą, mažą naujagimio svorį, dubens uždegiminę ligą, nevaisingumą, taip pat didina riziką užsikrėsti ir kitomis LPI infekcijomis (ŽIV) [67, 68].

Moterims sergančioms makšties trichomonoze pasireiškia šie simptomai:

- gausios gelsvai žalsvos putotos išskyros;
- vulvos niežėjimas ir paraudimas;
- vaginito ir cervicito požymiai;
- padažnėjęs ir skausmingas šlapinimasis (dėl uretrito).
- 10–50 proc. būna besimptomė ligos eiga [38].

Pirminis makšties trichomonozės tyrimas atliekamas mikroskopu, tiriant natyvinį makšties tepinėlį. Tiesioginės mikroskopijos metu drėgname tepinėlyje aptinkamos judrios, pulsuojančios trichomonos. Bent vienas šio pirmuonio aptikimas patvirtina diagnozę. Tačiau *T. vaginalis* yra labai jautrus aplinkos, temperatūros sąlygoms ir negali ilgai išgyventi be šeimininko, todėl mikroskopinis tyrimas turi būti atliekamas iškart po tepinėlio paėmimo. Tepinėlio dažymas metileno mėliu išryškina trichomonos ekscentrišką branduolį, tačiau šis metodas mažina tyrimo jautrumą. Taigi mikroskopinio tyrimo specifiškumas gali siekti 100 proc., o jautrumas labai įvairuoja – nuo 60–70 proc. iki 20 proc. [69]. *Trichomona* taip pat galima nustatyti tiriant molekulių metodu – PGR,

imunologiniais tyrimais: imunifermentinės analizės metodu (ELISA), nustatant antigenus ir antikūnius.

2.3.2. Chlamidinė infekcija

Chlamidinė infekcija – tai labiausiai paplitusi lytiškai plintanti infekcija (LPI), kurią sukelia bakterija *Chlamydia trachomatis*. Ši infekcija yra perduodama visų rūšių – vaginalinių, analinių ir oralinių – lytinių santykių metu [70]. Chlamidiozė, kaip ir trichomonozė bei gonokokinė infekcija, priskiriamos varvančioms ligoms.

Chlamidijos – tai smulkios, gramneigiamos lazdelės, kurios neauga mitybinėse terpėse, nes neturi savo energijos gamybos mechanizmų, todėl tai energiniai parazitiniai organizmai [38]. Chlamidinė infekcija žinoma kaip „tyli“ infekcija, nes dažniausiai užsikrėtę asmenys neturi jokių simptomų ar nusiskundimų. Chlamidinė infekcija iš gimdos kaklelio gali giliau prasiskverbti į šlapimo, lyties organus ir sukelti mažojo dubens uždegiminę ligą (MDU). Tuomet pakyla temperatūra, skauda pilvo apačią.

Moterims dažniausiai būdingi simptomai: gleivingos ar pūlingos makšties išskyros, skausmingas šlapinimasis, kraujas po lytinių santykių, skausmai apatinėje pilvo dalyje ar lytinių santykių metu, pagausėjusios menstruacijos.

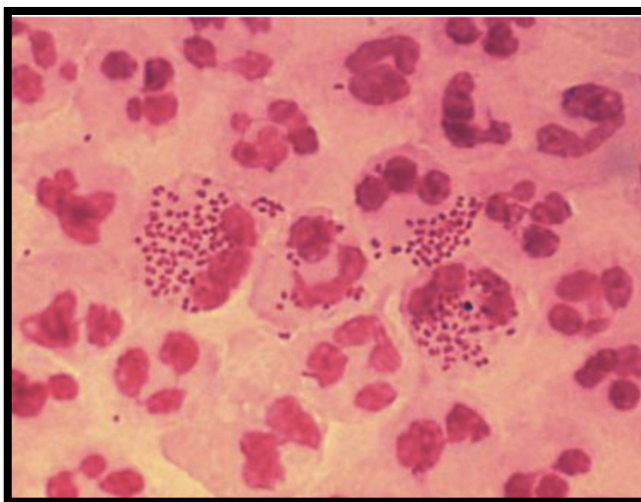
Chlamidijų sukelta infekcija yra viena iš dažniausiai pasitaikančių bakterinių lyties takų infekcijų. Negydoma ji gali sukelti moterims taip vadinamą mažojo dubens organų uždegimą. Ji taip pat yra dažniausia kiaušintakių uždegimo priežastis. Kiaušintakių uždegimas pasireiškia skausmu arba spaudimo jausmu apatinėje pilvo dalyje. Maždaug kas dešimtai chlamidijomis užsikrėtusios moteris išsivysto komplikacijos. Gali užakti kiaušintakiai, todėl moteris tampa nevaisinga arba vaisius vystosi ne gimdoje [70].

Atliekant chlamidiozės tyrimą, pirmiausia paimamas mėginys iš pacientės gimdos kaklelio. Bakterijos auginamos audinių ląstelių kultūrose. Chlamidijų nukleorūgštys nustatomos DNR hibridizacijos tyrimo metodu. Chlamidijų antigenai nustatomi imunofermentiniu ar netiesioginės imunofluorescencijos metodais (ELISA, NIF).

2.3.3. Gonokokinė infekcija

Gonorėja – tai lytiškai plintanti infekcija (LPI). *Neisseria gonorrhoeae*, į organizmą patenkanti per gleivines (lyties organų, burnos, tiesiosios žarnos) lytinių santykių (vaginalinių, oralinių, analinių) metu. Ši infekcija Jungtinėje Karalystėje 2014 metais buvo antra pagal sergamumą [71]. Užsikrėtusi gonorėja nėščioji gimdymo metu gonokokinę infekciją gali perduoti savo naujagimiui ir sukelti oftalmiją (akių uždegimą).

Neisseria genties bakterijos, tai gramneigiami kokai, kurie išsidėsto poromis ir sudaro diplokokus (3 pav.) [72].



3 pav. Gramneigiami diplokokai leukocitų viduje [73].

Adhezijos veiksniai padeda gonokokams prisitvirtinti prie makšties epitelinių ląstelių struktūrų. Tokiu būdu jie greitai dauginasi, plinta ir sukelia uždegimą. Prisitvirtinę gonokokai prie epitelinių ląstelių, patenka į jų vidų, sudaro viduląstelines vakuoles. Tokiu būdu bakterijos išvengia šeimininko imuninės ir fagocitinės sistemos [23].

Dauguma užsikrėtusių moterų nejaučia jokių simptomų arba jie būna labai neryškūs. Gali pasireikšti tokie simptomai kaip skausmingas šlapinimasis, pagausėjusios ir pakitusios makšties išskyros, kraujavimas tarp mėnesinių. Besimptominė gonorėja pavojinga, nes gali tyliai plisti į viršutinius moters lytinius organus ir sukelti komplikacijas. Dažniausia sukeliama komplikacija yra mažojo dubens uždegimas (MDU). MDU – tai ūmus pilvo skausmas ir karščiavimas, lėtiniai pilvo skausmai, gali vystytis vidinis pūlinys. MDU pažeidžia kiaušintakius, padidina negimdinio nėštumo riziką ir sukelia nevaisingumą.

Gonorėjos diagnostika. Gonorėjai diagnozuoti taikoma keletas laboratorinių testų. Gydytojas iš infekuotos vietos paima mėginį ir siunčia į laboratoriją ištyrimui. Sėjama į selektyvią terpę Thayerio Martino ar šokolado agarą [23].

Ligos sukėlėjas gali būti tiriamas mikroskopu tepinėlių dažant Gramo būdu. Gramo dažymas leidžia atskirti gramteigiamas nuo gramneigiamų bakterijų, kurių ląstelių cheminė sudėtis skirtinga. Gramneigiamų bakterijų ląstelės sienelėje kelis kartus mažesnis peptidoglikanų sluoksnis, dėl to Gramo dažai (kristalinis violetas, jodas) nesulaikomi ir etanolio išplaunami. Dažant fuksinu nusidažo raudonos spalvos bakterijos.

Neisseria gonorrhoeae taip pat nustatoma taikant DNR ar molekulinis hibridizacijos metodus.

3. TYRIMŲ MEDŽIAGA IR METODAI

3.1. Tyrimų medžiaga

Tyrimai buvo atlikti nuo 2015 metų iki 2016 metų Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje. Tiriamoji medžiaga:

1. ėminiai iš makšties panaudoti atlikti drėgną makšties tepinėlį,
2. tamponėlis iš gimdos kaklelio skirtas mikrobiologiniam pasėliui atlikti bei *Atopobium vaginae* nustatymui.

Tiriamąją medžiagą surinko ir drėgną makšties tepinėlį atliko Santariškių klinikų Akušerijos ginekologijos centro ginekologo konsultacijų kabineto gydytojai. Iš viso tyrime dalyvavo 100 moterų nuo 21 metų iki 65 metų amžiaus. Mikrobiologijos laboratorijoje taikant mikrobiologinio pasėlio tyrimo metodą, buvo išauginti mikroorganizmai iš moterų lytinių takų. Bakterijų ir kai kurių grybo rūšių identifikacija atlikta taikant MALDI-TOF MS metodą. *Atopobium vaginae* nustatymas atliktas taikant realaus laiko PGR metodą (RL-PGR).

3.2. Drėgno makšties tepinėlio atlikimas ir vertinimas

Drėgnas makšties tepinėlis buvo atliekamas gydytojo ginekologo kabinete. Tepinėlių mikroskopija leidžia nustatyti moterų lytinių takų uždegimus: uretritą, cervicitą (gimdos kaklelio) ir vaginitą (makšties uždegimas). Gydytoja, atlikdama šį tyrimą, gali greitai aptikti pakitimus gimdos kaklelio srityje. Pagal turimus ląstelių morfologinius aprašus iš tepinėlio ir klinikinius požymius apžiūros metu galima patvirtinti uždegimo požymius. Taigi po pirmosios paciento apžiūros gydytoja įvertino moterų gimdos kaklelio mikroskopinius radinius ir pagal tai bei turimą anamnezę paskyrė tolesnius specialius laboratorinius tyrimus, kad tiksliau būtų nustatyti infekcijos ar uždegimo sukėlėjai.

Drėgnas tepinėlis atliekamas paėmus klinikinę medžiagą iš moters makšties ir paruošus ją mikroskopavimui. Gydytoja, naudodama vienkartinę bakteriologinę kilpelę, ima medžiagą nuo šoninės makšties sienos arba iš apatinės makšties skliauto. Dedamas šiltas 37 laipsnių lašas fiziologinio 0,9 NaCl tirpalo ant objekcinio stiklelio. Į lašą merkiama kilpelė su klinikine medžiaga ir sukamuoju judesiu paskleidžiama ant objekcinio stiklelio. Paruoštas tepinėlis analizuojamas mikroskopu, pradedant nuo mažiausio objektyvo 4x ar 10x ir baigiant vidutiniu padidinimu 40x objektyvu.

Analizuojant drėgną makšties tepinėlį, atpažįstami tokie morfologiniai elementai:

1. Plokščiojo makšties epitelio ląstelės.
2. Segmentuoti leukocitai.
3. Pseudomiceliai, sporos.
4. Trichomonos.
5. Indikatorinės ląstelės.
6. Laktobacilos.
7. Gleivės.
8. Smulki kokobaciliarinė flora.
9. Spermatozoidai.
10. Eritrocitai.
11. Riebalų ląšeliai.
12. Vatos plaušai.

Drėgno makšties tepinėlio mikroskopavimas pradedamas nuo mažiausio padidavimo 10x. Apžiūrimas visas tepinėlis ir jame išsidėsčiusi tiriamoji medžiaga. Mažuoju padidimu bus matomos epitelio ląstelės, gleivių sancaupos, taip pat ir grybo pseudomiceliai. Išsirenkamos vietos, kurios bus tiriamos didesniu objektyvu. Naudingiausia būtų išsirinkti tokius regimuosius laukus, kuriuose būtų ir sancaupų, ir vienu sluoksniu išsidėsčiusių plokščiojo epitelio ląstelių. Sancaupų vietose galima aptikti grybo pseudomicelių, o vienu sluoksniu išsidėsčiusių ląstelių vietose galima apskaičiuoti, kokį sudaro santykį makšties epitelio ir segmentuotų ląstelių kiekis. Pagal šių ląstelių santykį sprendžiama apie makšties uždegimo buvimą ar nebuvimą. Ląstelių skaičius labai varijuoja tarp skirtingų individų ir priklauso nuo aibės faktorių, tokių kaip menstruacinio ciklo dienos, lytinio gyvenimo aktyvumo ar esančio uždegiminio proceso sunkumo, todėl skaičiuojamas ląstelių santykis, o ne atskirų ląstelių absoliutus skaičius, kuris būtų neinformatyvus ir sunkiai pritaikomas kiekvienai pacientei. Taigi jei santykis tarp segmentuotų leukocitų ir epitelio ląstelių yra didesnis nei 1:1, 2:1 ar 3:1, galima įtarti apie kai kurias makšties infekcijas, kurias sukelia *Trichomonas vaginalis*, *Candida* genties grybai ar kiti mikroorganizmai, taip pat tai gali rodyti gimdos kaklelio ar kiaušintakių uždegimus. Vertinant drėgno tepinėlio sudėtį, svarbu įvertinti makšties mikroflorą. Mikroskopuojant taip pat vertinama ir makšties mikroflora, kurią sudaro įvairios lazdelės ir kokai. Dažniausiai sveikų moterų tepinėliuose dominuoja laktobakterijos. Laktobakterijos pro mikroskopą matomos kaip stambios, tiesios ar šiek tiek lenktos, bukais galais lazdelės. Moterų, sergančių bakterine vaginoze, makšties gleivinėje dominuoja kokinės bakterijos ir neaptinkamos laktobakterijos [1 lentelė]. Taip pat šioms moterims dažniau aptinkama indikatorinių ląstelių [71].

Drėgnas makšties tepinėlis suteikia pakankamai informacijos apie tiriamąją makšties gleivinę. Mikroskopavimo metu pagal atpažįstamus morfologinius elementus, jų kiekį ir

pasiskirstymą gydytoja gali greitai padaryti išvadą ir įvertinti makšties gleivinės būklę ir, jei reikia, skirti tolesnius išsamesnius laboratorinius tyrimus. Drėgnam tepinėliui vertinti buvo naudota metodika – Vagoras A, Hallen A, Domeika M. Lyties takų mikroskopijos pagrindai. 2001 m.

1. lentelė. Drėgno tepinėlio vertinimo išvados [71].

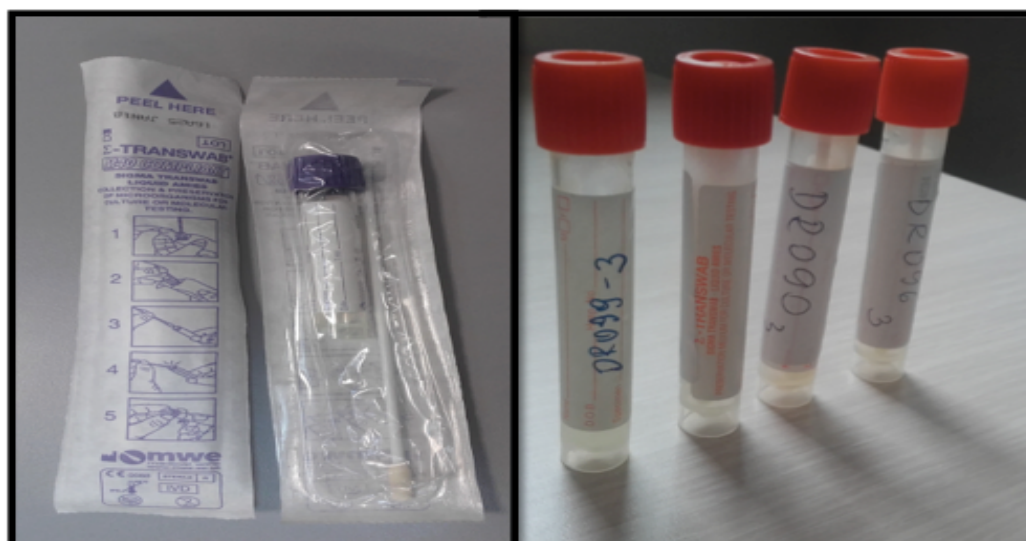
Objektyvas x10	Objektyvas x40	Išvada
<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelės didelės, ribos vingiuotos • smulkių ląstelių nedaug 	<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelių ribos aiškios, „švarios“; • segmentuotų leukocitų ir makšties epitelio ląstelių santykis < 1:1; • mikroflorą sudaro laktobacilos (stambios, tiesios ar šiek tiek lenktos, bukais galais lazdelės); • nėra pseudomicelių, trichomonų. 	Norma
<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelės nėra matomos kaip vingiuota linija • smulkių ląstelių nedaug 	<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelės ribos neaiškios, ląstelės „nešvarios“; • tarp makšties epitelio smulkios kokobaciliarinės floros sankaupos segmentuotų leukocitų ir makšties epitelio santykis <1:1; • mikroflorą sudaro ne laktobacilos; • mikroflorą sudaro kokobaciliarinė flora; • nėra pseudomicelių, trichomonų; 	Bakterinė vaginozė
<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelių ribos nėra matomos kaip vingiuota linija • smulkių ląstelių nedaug 	<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelių ribos neaiškios, pačios ląstelės „nešvarios“; • tarp makšties epitelio smulkios kokcoidinės floros sankaupos; • segmentuotų leukocitų ir makšties epitelio santykis > 1:1; • mikroflorą sudaro ne laktobacilos (jų nėra iš viso); • mikroflorą sudaro kokobaciliarinė flora, nėra pseudomicelių, trichomonų; 	Uždegimas
<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ląstelės didelės, ribos vingiuotos (gali pasitaikyti ir nesubrendusių apvalių) • smulkių ląstelių nedaug 	<ul style="list-style-type: none"> • makšties epitelio ribos aiškios, „švarios“; • segmentuotų leukocitų ir makšties epitelio santykis >1:1; • mikroflorą sudaro laktobacilos • nėra trichomonų; • aptinkami pseudomiceliai ir /ar sporos. 	Kandidozė

3.3. Mikrobiologinio pasėlio iš gimdos kaklelio atlikimas ir vertinimas

3.3.1. Ėminio paėmimas mikrobiologiniam pasėliui.

Mikrobiologinis pasėlis, tai vienas iš rutininių tyrimo metodų naudojamų mikrobiologijos laboratorijoje. Šis tyrimo metodas padeda išskirti gryną mikroorganizmų kultūrą iš tiriamosios medžiagos ir tiksliai identifikuoti sukėlėją.

Norint nustatyti kokia mikroflora aptinkama gimdos kaklelyje, labai svarbu paimti tinkamai tiriamąją medžiagą. Gydytoja įkiša skėtiklį išilgai makšties ir pasuka į skersinę padėtį. Nuvalo nuo gimdos kaklelio žiočių perteklines gleives iš makšties. Naudodama specialų tamponėlį paima klinikinę medžiagą iš gimdos kaklelio kanalo. Į gimdos kanalą tamponėlis įvedamas 1-2 cm gylyje ir keletą kartų pasukamas. Svarbu ištraukiant tamponėlį iš gimdos kaklelio neprisiliesti prie makšties gleivinės, kad neužteršti tiriamosios medžiagos makšties ląstelėmis ir mikroflora. Tiriamoji medžiaga imama į specialų mikrobiologiniams pasėliams, bei molekuliniais tyrimams skirtą mėgintuvėlį su skysta transportine Amies terpe ir siunčiama į laboratoriją (4 pav.).



4 pav. Tiriamoji medžiaga paimama ir siunčiama į laboratoriją naudojant šiuos mėgintuvėlius su skysta Amies transportine terpe (autoriaus nuotrauka).

3.3.2. Ėminio pasėjimas į mitybines terpes ir mikroorganizmų augimo gausumo vertinimas

Mitybinės terpės, tai medžiagų mišinys, reikalingas bakterijų ir grybų kultūroms išgauti. Gauta tiriamoji medžiaga iš mėgintuvėlio su skysta transportine terpe sėjama į standžias Petri lėkštelėje esančias mitybines terpes.

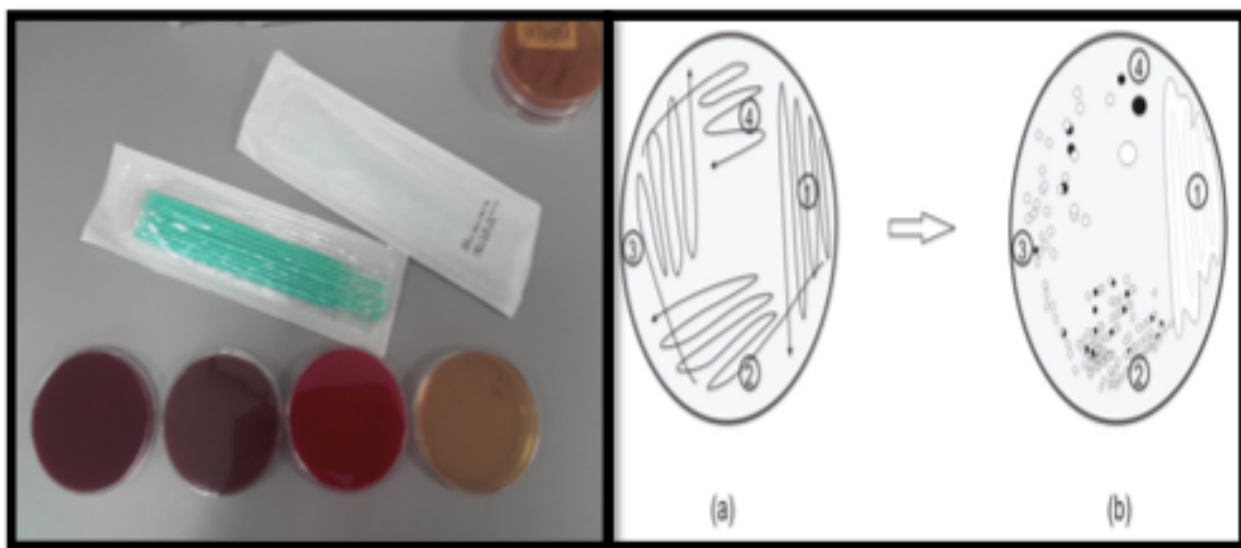
Ėminys buvo sėjamas į kelių rūšių Mikrobiologijos laboratorijoje paruoštas mitybines terpes tokia eilės tvarka:

1. Kraujo agaras.
2. Šokolado agaras.
3. Selektyvus streptokokinis agaras (STT).
4. Grybams selektyvus sabūro dekstrozės agaras (2 lentelė).

2 lentelė. Darbo metu naudotos mitybinės terpės.

Mitybinės terpės pavadinimas	Mitybinės terpės sudėtis, gamintojas ir šalis
Kraujo agaras su 5 proc. arklio krauju pH 7,4 +/- 0,2	<u>Kraujo agaro pagrindas, Oxoid, Didžioji Britanija:</u> 15,0 g/l proteazės peptono 2,5 g/l kepenų ekstrakto 5,0 g/l mielių ekstrakto 1,0 g/l NaCl 12,0 g/l agaro <u>Kraujo agaro priedas, E&O Laboratories Limited, Didžioji Britanija:</u> 50,0 ml/l defibrinuoto arklio kraujo Paruoštą mitybinę terpę po 20 g išpilstoma į 90 mm Petri lėkštes.
Šokoladinis agaras pH 7.3 +/- 0.2	<u>Šokolado agaro pagrindas, HIMedia Laboratories, Indija:</u> 20,0 g/l proteazės peptono 0,5 g/l dekstrozės 5,0 g/l NaCl 5,0 g/l Na ₂ HPO ₄ 15,0 agaro
Streptokokams selektyvus agaras su 5 proc. avies krauju (STT) pH 7.3 +/- 0.2	<u>Streptokokinio agaro pagrindas, Rimed, JAV:</u> 15,0 g kazeino peptono 5,0 g NaCl 5,0 g sojos peptono 5,0 g maltozės 10,0 mg neomicino 10,0 mg polimiksinoB 15,0 g agaro
Sabūro maltozės agaras pH 5.6 +/- 0.2	<u>Sabūro maltozės agaro pagrindas, Oxoid, Anglija:</u> 10,0 g/l mikologinio peptono 40,0 g/l maltozės 15,0 g/l agaro
CHROMagar candida medium pH: 7,1 +/- 0,2	<u>CHROMagar candida medium (Interlux, Vokietija)</u>

Darbo metu tiriamoji medžiaga buvo sėjama į standžias mitybines terpes Petri lėkštelėse. Naudojant vienkartinės bakterologines kilpeles medžiaga brūkšnių, štrichų metodu buvo paskirstoma ant visos mitybinės terpės, tokiu būdu suskirstant Petri lėkštelę į kelias sekcijas (5 pav.).



5 pav. 1 – naudojamos priemonės bakteriologiniam tyrimui, vienkartinės bakteriologinės kilpelės ir mitybinės terpės. 2 – a – Sėjimas brūkšnių, štrichų metodu, b – Petri lėkštelėje užaugintų bakterijų vertinimas ir gausumo nustatymas.

Naudodami brūkšnių (štrichų) sėjimo metodą, galime išauginti ir išskirti mikroorganizmų grynas kultūras. Mikroorganizmo grynoji kultūra – tai ant mitybinės terpės užaugęs ribota akimi matomas mikroorganizmų telkinys. Dažniausiai bakterijų kultūros išauga iš vienos bakterijos ląstelės (rečiau iš kelių) [23].

Užsėta Petri lėkštelė buvo uždengiama, apverčiama ir dedama į elektrinį termostatą MEMMERT BE 500, kuriame 37 °C temperatūroje buvo inkubuota 24–48 valandas. Po paros pasėliai buvo patikrinami, jei mikroorganizmų kolonijų nematyti, tai pasėlis buvo inkubuojamas dar vieną parą ir kitą dieną vertinamas.

Po dviejų parų mikroorganizmų kolonijos buvo vertinamos makroskopiškai. Apžiūrimos kolonijos, jų spalva, blizgumas, forma, įvairumas ir gausumas. Augimo gausumas ant mitybinių terpių buvo vertinamas trijų balų sistemoje:

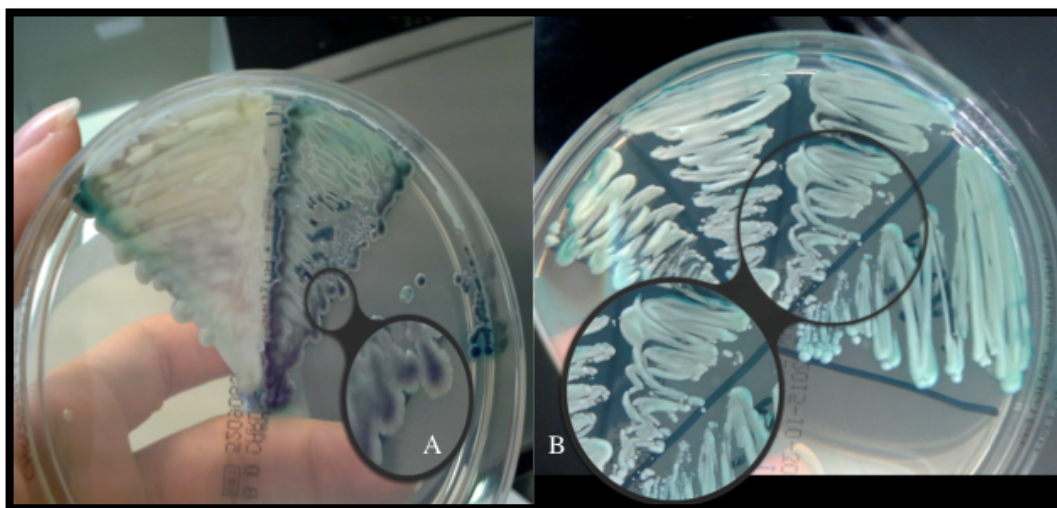
- 1 balas – negausus augimas;
- 2 balai – vidutiniškai gausus augimas;
- 3 balai – gausus augimas (5 pav.).

Mikroorganizmų gausumo nustatymas leidžia įvertinti, kokia mikroflora dominuoja moterų lytiniuose takuose. Tokiu būdu galime įvertinti, ar vyrauja normali, ar patologinė mikroflora.

Užaugintos bakterijų ir grybų kolonijos buvo identifikuojamos naudojantis MALDI-TOF masių spektrometru. *Candida* genties grybų rūšys buvo nustatomos naudojantis selektyvią CHROMagar *Candida* Medium terpę. Šios terpės dėka galima nustatyti šias mielių rūšis: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. Mitybinėje terpėje esantys dirbtiniai substratai (chromogenai) sąveikauja su specifiniais grybų išskiriamais fermentais, dėl šios reakcijos išsiskiria skirtingų spalvų junginiai, pagal kuriuos ir nustatomos mielių rūšys.

Panaudojus CHROMagar terpę, pagal spalvų pokyčius tiesiogiai diferencijuojamos šios *Candida* rūšys:

- šviesiai žalios spalvos kolonijos *Candida albicans* rūšis;
- mėlynai žalsvos, mėlynos kolonijos *Candida tropicalis*;
- šviesiai balkšvos, rausvu kraštu kolonijos *Candida krusei* (6 pav.).



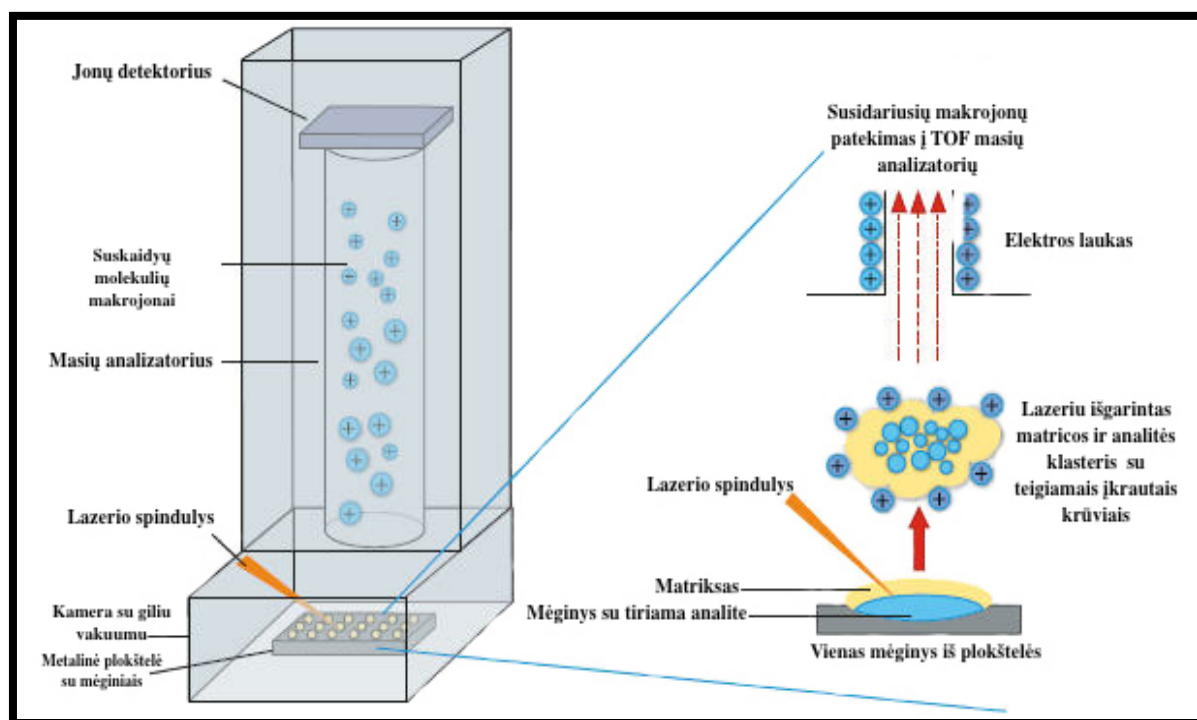
6 pav. CHROMagar *Candida* Medium terpė. A – *Candida tropicalis*. B – *Candida albicans* (autorius nuotrauka).

3.3.3. Mikroorganizmų identifikavimas MALDI-TOF masių spektrometrijos metodu

MALDI TOF MS – tai iš matricos dezorbuota ir jonizuota lėkio trukmės masių spektrometrija (angl. matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry). Lėkio trukmės masių spektrometras padeda identifikuoti tiksliai ir greitai įvairių rūšių ir genčių mikroorganizmus: bakterijas, grybus [74, 75, 76]. Mikroorganizmai nustatomi pagal kiekvienam iš jų būdingus, specifinius molekulinis „pirštų atspaudus“ ir pagal jų gautą masių spektrą surandamas

atitikmuo naudojant mikrobiologinę duomenų bazę. MALDI-TOF masių spektrometras – tai automatizuotas, lengvai naudojamas ir labai tikslus, rutininis metodas, leidžiantis greitai identifikuoti bakterijų, grybų gentis ar rūšis.

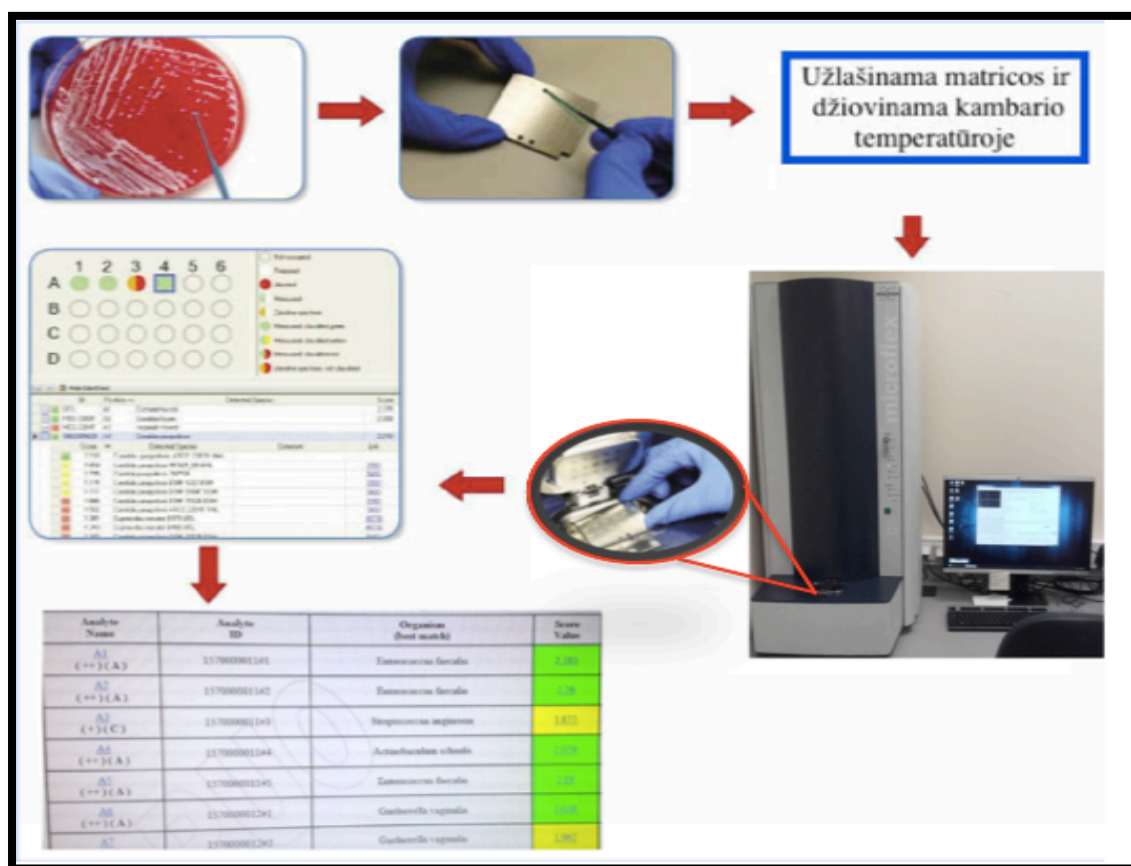
Lėkio trukmės masių spektrometrą sudaro šios pagrindinės dalys: jonizacijos šaltinis, jonų atskyrimo įrenginys ir jonų detektorius (7 pav.).



7 pav. MALDI-TOF masių spektrometro pagrindinės dalys: jonizacijos šaltinis, jonų masių analizatorius ir jonų detektorius.

MALDI-TOF MS tyrimo eiga. (8 pav.). Praėjus 12–48 val. po mikroorganizmų inkubacijos, išaugusios grybų, bakterijų kultūros identifikuojamos MALDI-TOF masių spektrometru. Iš mitybinės terpės pasirenkamos pavienės užaugusios kolonijos. Iš išaugintos kolonijos imamas mėginys naudojant vienkartinę bakteriologinę kilpelę. Labai nedidelė bakterijų ar grybų kolonijos dalis perkeliama ant metalinės plokštelės, užtepama plonu sluoksniu ir tolygiai paskirstoma, užlašinama 1 μl matricos ir paliekama išdžiūti kambario temperatūroje. Matrica stipriai absorbuoja UV lazerio spindulius, todėl tiriamosios molekulės desorbuojasi. Svarbu nesumaišyti kultūrų ir kiekvieną kartą imant kultūrą naudoti vienkartinės priemonės. Taip pat, kad nesumaišytume pacienčių tiriamųjų ėminių, žymime kiekvieną plokštelės duobutę atskirai protokole, nurodant pacientės identifikacinį numerį. Tokia plokštelė su užpildyta tiriamąja medžiaga dedama į MALDI-

TOF MS Bruker analizatorių, uždaro ir atliekama identifikacija naudojantis MALDI Biotyper 3.1 programine įranga bei duomenų baze.



8 pav. Mikroorganizmų tyrimo eiga naudojant MALDI-TOF MS

MALDI-TOF masių spektrometrijos matricos sudėtis:

- SS (angl. standard solvent) tirpalui 1 ml:
 - 475 ul dejonizuotas vanduo;
 - 25 ul trifluoracto rūgštis;
 - 500 ul acetonitrilas.
- 300 ul SS tirpalo įpilti į MATRIX buteliuką ir pavorteksuoti.

Tiriamoji medžiaga padengiama ant metalinės plokštelės, užlašinama matrica ir dedama į analizatorių ant katodo, uždaromas dangtelis, susidaro gilus vakuumas. Mėginys su metaline plokštele apšvitinamas pulsuojančiu UV lazeriu. Dėl matricos šviesa stipriau absorbuojama, o molekulės įgauna didesnę šviesos energiją ir desorbuojasi. Molekulės su teigiamu įgautu krūviu juda link anodo, o jų judėjimas pagreitinamas elektros lauku. Jonai, patekę į masių analizatorių

(TOF MS), yra atskiriami pagal jonų masės ir krūvio santykį (m/z santykį), kuris proporcingas lėkio trukmei. Gautas masių spektras registruojamas detektoriumi. [77].

MALDI-TOF MS – patikimas, greitas, taupus metodas, leidžiantis tiksliai įvardinti patogenų ar grybų rūšis. Būtent dėl savo didelio jautrumo ir specifiškumo aplenkia net tokius rutininius klasikinius biocheminius ar molekulinis metodus.

3.4. *Atopobium Vaginae* nustatymas ėminiuose iš gimdos kaklelio atliekant tikro laiko PGR metoda

Molekuliniai tyrimų metodai pasižymi dideliu greitumu, jautrumu, specifiškumu, padeda nustatyti mikroorganizmų DNR, net kai mikroorganizmas žuvs ar esant nedidelėms jo koncentracijoms tiriamajame mėginyje. Molekuliniai tyrimai padeda tokiose situacijose, kai tam tikri mikroorganizmai neauga arba nenustatomi naudojant mikroskopinį ar pasėlių metodus. Viena iš tokių bakterijų – *Atopobium vaginae*. Tyrimo metu naudota kiekybinė realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (RL-PGR) *Atopobium vaginae* identifikacijai ir kiekiui nustatyti tiriamuosiuose ėminiuose *in vitro*.

3.4.1. Tiriamosios DNR paruošimas

Tyrimo metu DNR išskyrimas atliktas naudojant kolonėlių metoda.

DNR išskyrimo eiga.

1. Lizavimas:
 - į 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlį įpilama 560 µl paruošto buferio AVL ir RNR, 140 µl mėginio, mėgintuvėlis uždaromas ir purtomas 15 s;
 - inkubuotas kambario temperatūroje 10 minučių;
 - įpilama 560 µl etanolio (96–100 proc.), purtoma 15 s;
 - trumpai centrifuguojamas.
2. Lizato filtravimas per kolonėlę:
 - į 2 ml surinkimo mėgintuvėlį tiesiai ant kolonėlės perpilta 630 µl tirpalo, mėgintuvėlis uždaromas ir centrifuguojamas 80 000 aps/min. 1 min.;
 - filtratas išmetamas, kolonėlė įdedama į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį.
3. DNR išgryninimas:
 - įpilama 500 µl plovimo buferio AW1. Uždaromas mėgintuvėlis ir centrifuguojamas 8 000 aps/min. 1 min. Filtratas išmetamas, kolonėlė įdedama į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį;

- įpilama 500 µl plovimo buferio AW2. Uždaromas mėgintuvėlis ir centrifuguojamas 14 000 aps/min. 3 min.;
- filtratas išmetamas, kolonėlė įdedama į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį;
- įdėta kolonėlė į naują 2 ml mėgintuvėlį centrifuguojama 14 000 aps/min. 1 min.

4. DNR išplovimas:

- įpilama 60 µl buferio AVE ant kolonėlės membranos;
- mėgintuvėlis uždaromas ir inkubuojamas 1 min. kambario temperatūroje;
- mėgintuvėlis centrifuguojamas 8 000 aps/min. 1 min.

3.4.2. *Atopobium vaginae* DNR tyrimas

PGR mišinio paruošimas. Pradmenis ir zondus, nustatančius *Atopobium vaginae* 16S ribosominę DNR parinko, bei polimerazinės grandininės reakcijos protokolą parengė VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros mokslo darbuotojas dr. Maksim Bratčikov. Polimerazės grandininė reakcija buvo atliekama 25 µl reakcijos mišinyje.

PGR reakcijos mišinio paruošimo eiga vienam mėginiui:

- 7 µl AV pagrindinio mišinio;
- 3 µl MgCl₂ tirpalo;
- 1,5 µl vidinės kontrolės;
- 10 µl AV standartai (teigiama kontrolė);
- 10 µl vandens (neigiama kontrolė);
- 10 µl mėginio DNR.

PGR programos paleidimas. 0,2 ml talpos mėgintuvėliai su PGR mišiniu ir tiriamojo mėginio DNR kartu su neigiama ir teigiama kontrolėmis sudedami į amplifikatorių. PGR ciklas *Atopobium vaginae* nustatymui pateiktas 3 lentelėje.

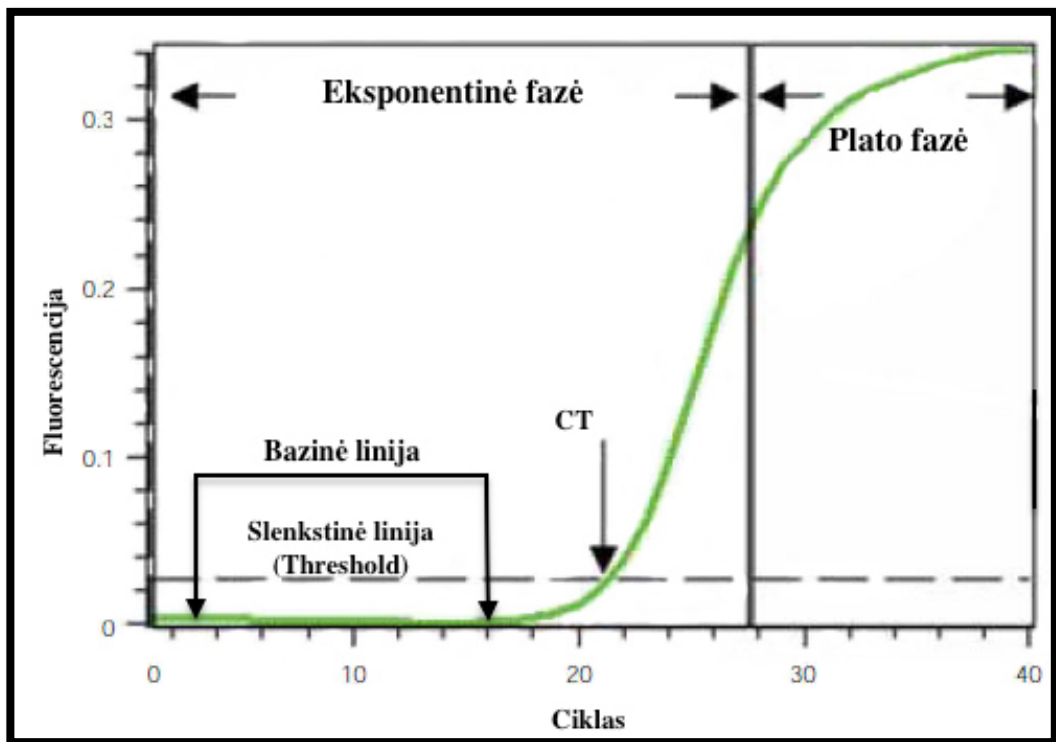
3 lentelė. PGR programos eiga.

Etapas	Temperatūra	Laikas	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	95°C	10 min.	-
Denatūracija	95°C	10 sek.	45 ciklai
Pradmenų prilydymas ir grandinės pratęsimas	60°C	60 sek.	

3.4.3. Tikro laiko PGR rezultatų interpretavimas

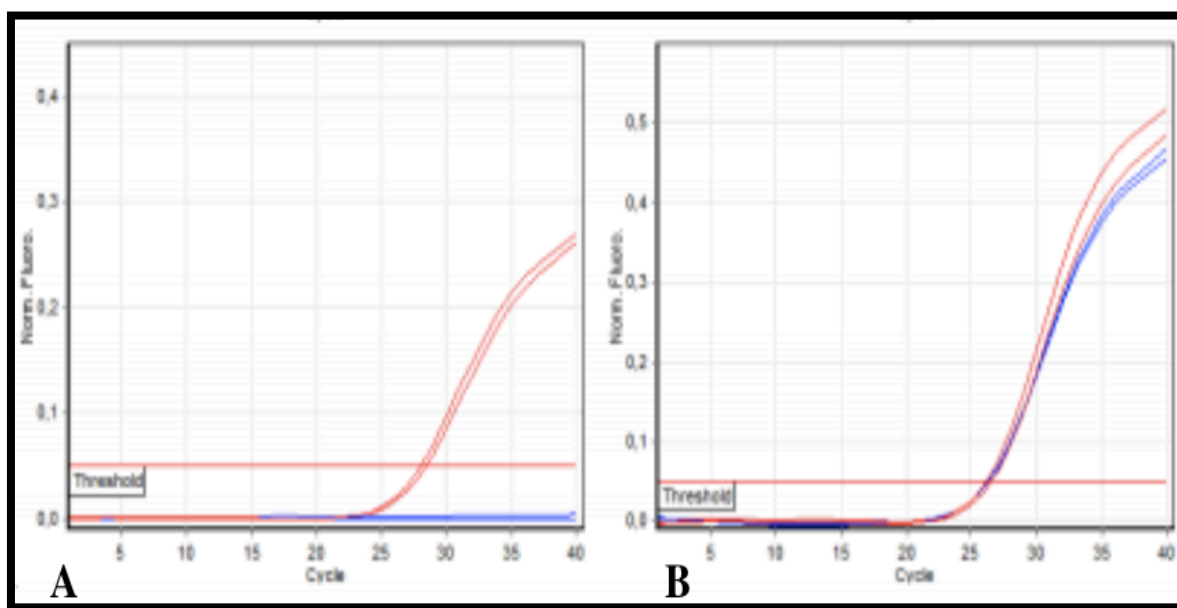
Vykstant PGR, kiekvieno ciklo metu matuojama fluorescencija. Išmatuotas fluorescencijos kiekis proporcingas susintetintos DNR kiekiui. Vykstant PGR reakcijai, detektorius fiksuoja fluorescencijos signalus, pagal kuriuos brėžiamos grafinės kreivės, todėl šiai PGR metodo variacijai nereikia papildomų duomenų analizavimo.

Stebėdami PGR ciklus, matome, kad fluorescencija vyksta nuosekliai ir tik nuo tam tikro ciklo pradeda didėti. Amplifikacijos linija, kuri nekinta per pirmus 15–18 ciklų, vadinama bazine linija. Vėliau daugėjant PGR produktų kiekiui, didėja ir fluorescencija, todėl pasiekama slenkstinė riba, kurią kirtus fluorescencija didėja eksponentiškai. Ciklo numeris, kuriame fluorescencijos linija kerta slenkstinę liniją, vadinamas slenkstiniu ciklu (angl. cycle threshold). Mažėjant PGR efektyvumui ir nebekintant produkto kiekiui, pereinama į vadinamąją „plato“ fazę (9 pav.) [86].



9 pav. Tikro laiko PGR. Žalia linija – fluorescencijos kitimas. CT – ciklo numeris, kurio metu mėginio fluorescencija pasiekia slenkstinę liniją (angl. Threshold).

Fluorescencijos FAM ir ROX kanaluose interpretacija. FAM kanale matomos teigiamos kylančios amplifikuotų taikinių kreivės, o ROX kanale matoma vidinės kontrolės amplifikacija (10 pav.). Svarbu, kad ROX kanale esanti vidinė kontrolė kiltų kartu su amplifikuojamais taikiniiais. FAM ir ROX kanaluose kartu amplifikuojamos ir kylančios kreivės rodo, kad mėginys yra teigiamas ir patikimas. Jei FAM kanale nebūtų fiksuojamo signalo, ROX kanale amplifikacija taip pat nevyktų, galėtume teigti, kad mėginys buvo užterštas, ir tokį tyrimą reiktų kartoti. Neigiamas rezultatas priimtinas tada, kai FAM kanale nefiksuojamas signalas, o ROX kanale vidinės kontrolės signalas fiksuojamas.



10 pav. A – FAM kanalas su amplifikuotais taikiniais mėginiais. B – ROX kanalas su amplifikuota vidine kontrole.

Tikrojo laiko PGR – tai automatizuota sistema, kai PGR ir pagausinto DNR (amplifikuoto) fragmentų nustatymas vyksta tuo pačiu metu. Pasirinkta DNR seka dauginama eksponentiškai (PGR produkto kiekis didėja proporcingai), stebimas tiesioginis ryšys tarp pradinio DNR medžiagos kiekio ir jo kiekio konkrečiame gausinimo cikle.

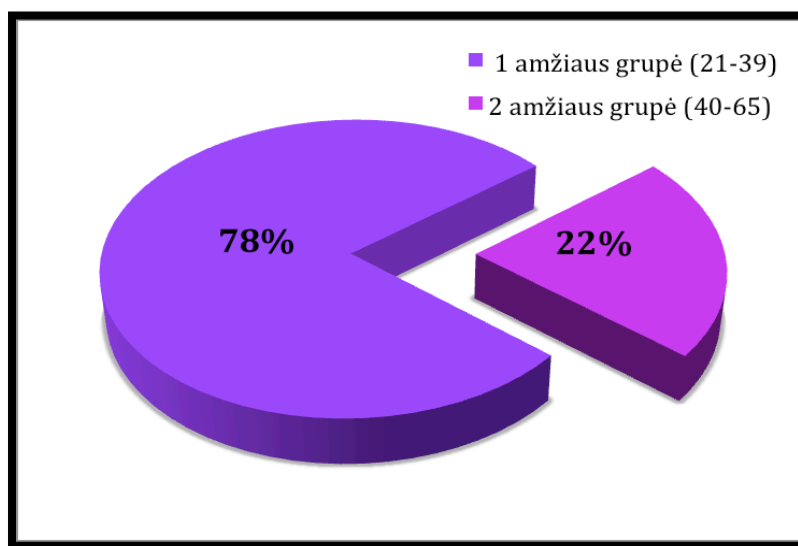
3.5. Statistinė analizė

Duomenys buvo apdorojami naudojantis Microsoft Office Excel 2011 ir SPSS 20 programa. Duomenys įvertinti Chi-kvadrato (χ^2) testu. Statistiškai reikšmingi duomenys buvo laikomi, kai $p < 0,05$.

4. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1 Bendrosios charakteristikos

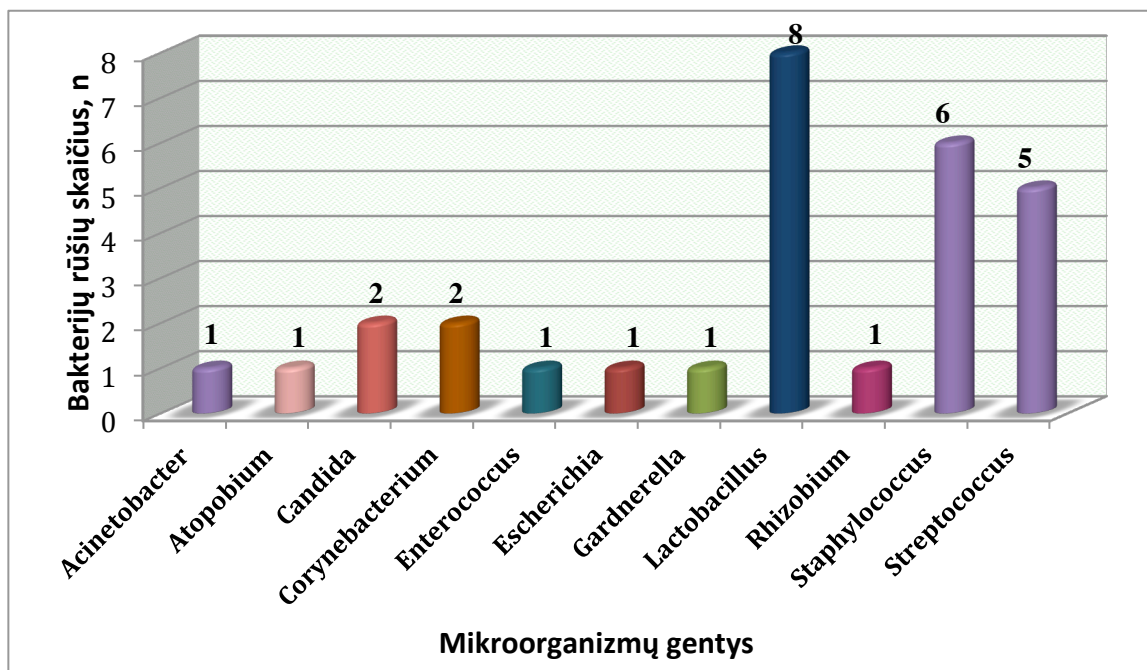
Tyrimai atlikti nuo 2015 metų iki 2016 metų Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje. Tyrimo metu buvo tiriama nesilaukiančių moterų lytinių takų mikroflora. Tyrime dalyvavo šimtas moterų, kurios lankėsi pas ginekologę. Visų pacienčių apsilankymo priežastis pas ginekologę buvo jaučiami vaginito simptomai arba padidėjusios išskyros iš lytinių takų. Moterų amžius buvo nuo 21 iki 65 metų. Vidutinis moterų amžius buvo $33,6 \pm 9,1$ m. Tyrime dalyvavusios moterys buvo suskirstytos į dvi amžiaus grupes (11 pav.). Pirmą grupę sudarė moterys, kurių amžius buvo nuo 21 iki 39 metų. Antrą grupę sudarė vyresnio amžiaus moterys nuo 40 iki 65 metų. Pirmą amžiaus grupę sudarė 78 proc. pacienčių, o antrą grupę 22 proc.



11 pav. Tiriamosios moterys buvo suskirstytos į dvi amžiaus grupes.

4.2. Bakteriologinių duomenų analizė

Naudojant bakteriologinius ir molekulinis tyrimų metodus, identifikuoti mikroorganizmai. Tyrimo metu išaugintos bakterijos pasėlyje ir nustatytos RL-PGR metodu buvo suskirstytos į gentis. Iš viso nustatyta 10 bakterijų genčių: *Acinetobacter*, *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Gardnerella*, *Lactobacillus*, *Rhizobium*, *Staphylococcus* ir *Streptococcus* ir viena grybo *Candida* gentis (12 pav.). Mūsų tyrime didžiausia rūšinė įvairovė pasižymėjo *Lactobacillus* (8 rūšys), *Staphylococcus* (6 rūšys), *Streptococcus* (5 rūšys) gentys.



12 pav. Nustatytos gentys naudojant molekulinis ir bakteriologinius tyrimo metodus.

Gentis *Acinetobacter*. Gramneigiamos, nejudrios, aerobinės, įvairių formų bakterijos. Gali, kaip oportunistiniai patogenai, sukelti infekcijas. Dažniausiai šios genties atstovai sukelia plaučių uždegimą ir šlapimo takų infekcijas [90]. Mūsų tyrime aptikta viena šiai genčiai priklausanti rūšis *Acinetobacter haemolyticus*.

Gentis *Atopobium*. Gramteigiamos, elipsinės, kokinės ar lazdelės formos bakterijos, besijungiančios po kelias ar sudarančios trumpas grandinėles. Šiai genčiai priklausanti *Atopobium vaginae* buvo nustatyta tikro laiko PGR metodu, nes šis fakultatyvinis anaerobas sunkiai auga mitybinėse terpėse. Minėtos rūšies aptikimas moters lytiniuose takuose dažnai siejamas su bakterine vaginoze.

Gentis *Corynebacterium*. Gramteigiamos, aerobinės lazdelės formos, katalazę gaminančios bakterijos. Tai nejudrios, sporų nesudarančios bakterijos. Dauguma šios genties atsovų yra nepatogeniški komensalai, aptinkami ryklėje, nosiaryklėje, distalinėje šlaplės dalyje ir ant odos, išskyrus viena šios genties atsovė *Corynebacterium diphtheriae* išskiria stiprų egzotoksiną ir sukelia difteriją [89]. Mūsų tyrime pasėliuose iš gimdos kaklelio buvo nustatytos dvi šios genties rūšys: *Corynebacterium coyleae*, *Corynebacterium aurimucosum*.

Gentis *Enterococcus*. Gramteigiami kokai. Dažnai būna po vieną ar susijungę po kelis ir sudaro diplokokus ar ilgas grandinėles. Todėl stebint tepinėlyje morfologiškai primena ir streptokokams būdingas formas. Šios genties bakterijos nesudaro sporų, tai fakultatyviniai anaerobai, negamina katalazės ir geba išskirti pieno rūgštį [88]. Tyrimo metu pasėliuose iš gimdos

kaklelio nustatyta viena rūšis *Enterococcus faecalis*. Ši bakterija aptinkama žarnyne kaip normali žarnyno mikrofloros dalis. Minėta rūšis kartu su kitais savo atstovais dažnai sukelia žmonėms infekcijas, pvz.: šlapimo takų, endokarditą, bakteriemiją, kvėpavimo takų, centrinės nervų sistemos infekcijas [87]. Mūsų tyrime *Enterococcus faecalis* buvo antra pagal dažnį aptikta bakterija (16 pav.).

Gentis *Escherichia*. Gramneigiamos, sporų nesudarančios, lazdelės formos, fakultatyviniai anaerobai, priklausantys Enterobacteriaceae šeimai. Dauguma *Escherichia* genties rūšių yra patogeniškos ir dažniausiai sukelia šlapimo takų infekcijas, diarėją, uždegimus. Taip pat siejamos su mikrobiomo išbalansavimu, ypač moterų lytinių takų mikrofloros disbalansu [91]. Nustatinėjant bakterijų rūšis, buvo išskirta *Escherichia coli* rūšis. Tai trečia pagal dažnį mūsų tyrime aptikta rūšis pasėliuose iš gimdos kaklelio (n=13) (16 pav.).

Gentis *Gardnerella*. Nejudrios, sporų neformuojančios bakterijos. Vienintelis šios genties atsovas *Gardnerella vaginalis* buvo užaugintas ir nustatytas mūsų tyrime pasėliuose iš gimdos kaklelio. *G. vaginalis* auginimui mikrobiologiniame pasėlyje naudojama speciali selektyvi mitybinė terpė gardnereloms. Mūsų tyrime ši terpė nebuvo naudota, todėl galimai ne visais atvejais *G. vaginalis* pavyko išauginti tradicinėse mitybinėse terpėse ir galėjo pasitaikyti klaidingai neigiamų tyrimų. *G. vaginalis* pagal dažymąsi yra gramteigiama bakterija. Tačiau dėl labai plonos sienelės gali nusidažyti ir kaip gramteigiama ir kaip gramneigiama. Priskiriama fakultatyviniams anaerobams, kurie gali augti esant anaerobinėmis ir aerobinėmis sąlygomis. Išskiria poras formuojantį toksiną vaginoliziną, kuris sukelia žmogaus ląstelių lizę [92, 93]. *G. vaginalis* vienas iš pagrindinių moterų lytinių takų uždegimų iniciatorių.

Gentis *Lactobacillus*. Gramneigiamos lazdelės, išskiriančios pieno rūgštį. Tai fakultatyviniai anaerobai ar mikroaerofilai, kurie auga, kai aplinkoje mažai deguonies. Tai normalios makšties ir gimdos kaklelio floros atsovai. Mūsų tyrime buvo nustatytos šios laktobakterijų rūšys: *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei* ir viena *Lactobacillus spp.* nenustatyta iki rūšies.

Gentis *Rhizobium*. Pagal dažymąsi tai gramneigiamos, aerobinės bakterijos. Šios genties atstovės plačiai paplitusios pasaulyje, dažnai aptinkamos dirvožemyje, kaip azotą fiksuojančios bakterijos. Dažniausiai tai augalų patogenai, tačiau retais atvejais buvo nustatyta kai kurių rūšių patogeniškumas ir žmonėms. Tyrimo metu aptikta viena rūšis – *Rhizobium radiobacter*. *R. radiobacter* sukelia tokius uždegimus ir infekcijas: peritonitą (pilvaplėvės uždegimas), šlapimo takų infekcijas, miozitą (skeleto raumenų uždegimą) [94, 95].

Gentis *Staphylococcus*. Gramteigiamos, katalazę gaminančios apvalios bakterijos. Gramo būdu dažytame tepinėlyje formuoja į vynuoges panašias kekes. Fakultatyviniai anaerobai, dažnai gyvenantys kaip oportunistiniai patogenai ar komensalai ant žmogaus odos, aptinkami viršutiniuose kvėpavimo takuose kaip normali mikroflora [23]. Dažnai siejami su hospitalinėmis žmonių infekcijomis. Tyrimo metu moterų lytiniuose takuose aptiktos šios bakterijų rūšys: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus* (13 pav.). Iš jų patogeninė rūšis – *Staphylococcus aureus*, o kitos rūšys – oportunistiniai patogenai arba komensalai, normalios makšties floros atstovai.



13 pav. *Staphylococcus aureus* kolonijos ant šokolado agaro (autoriaus nuotrauka).

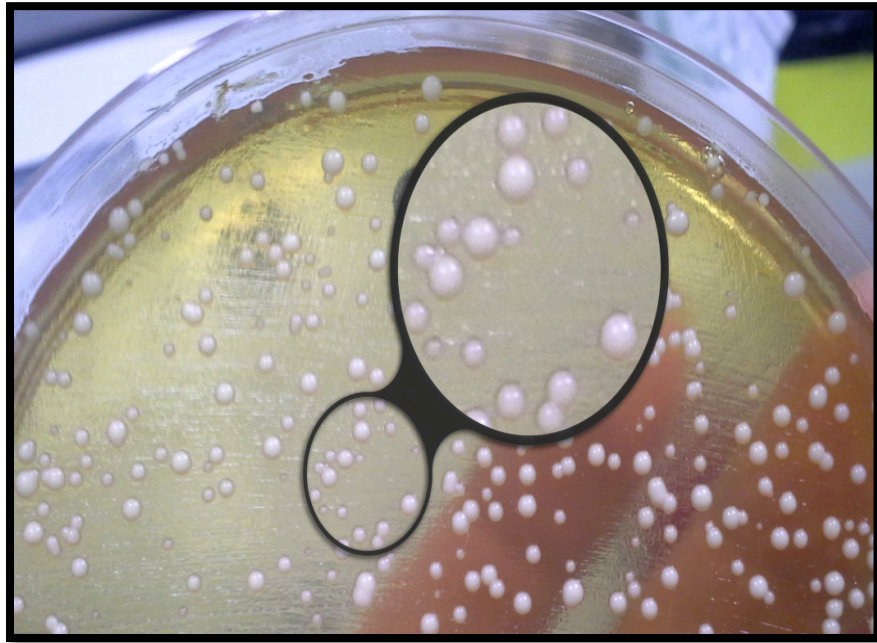
Gentis *Streptococcus*. Gramteigiami, nejudrūs, sporų nesudarantys, fakultatyviniai anaerobai. Dažniausiai sudarantys trumpas grandinėles. Dažnai aptinkami viršutiniuose kvėpavimo takuose kaip normali mikroflora. Tyrimo metu aptiktos šios rūšys: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus anginosus*. Tyrimo metu paaiškėjo, kad *Streptococcus agalactiae* buvo dažniausiai nustatoma bakterija iš pasėlių (14 pav.).



14 pav. *Streptococcus agalactiae* kolonijos ant STT agaro (autorius nuotrauka).

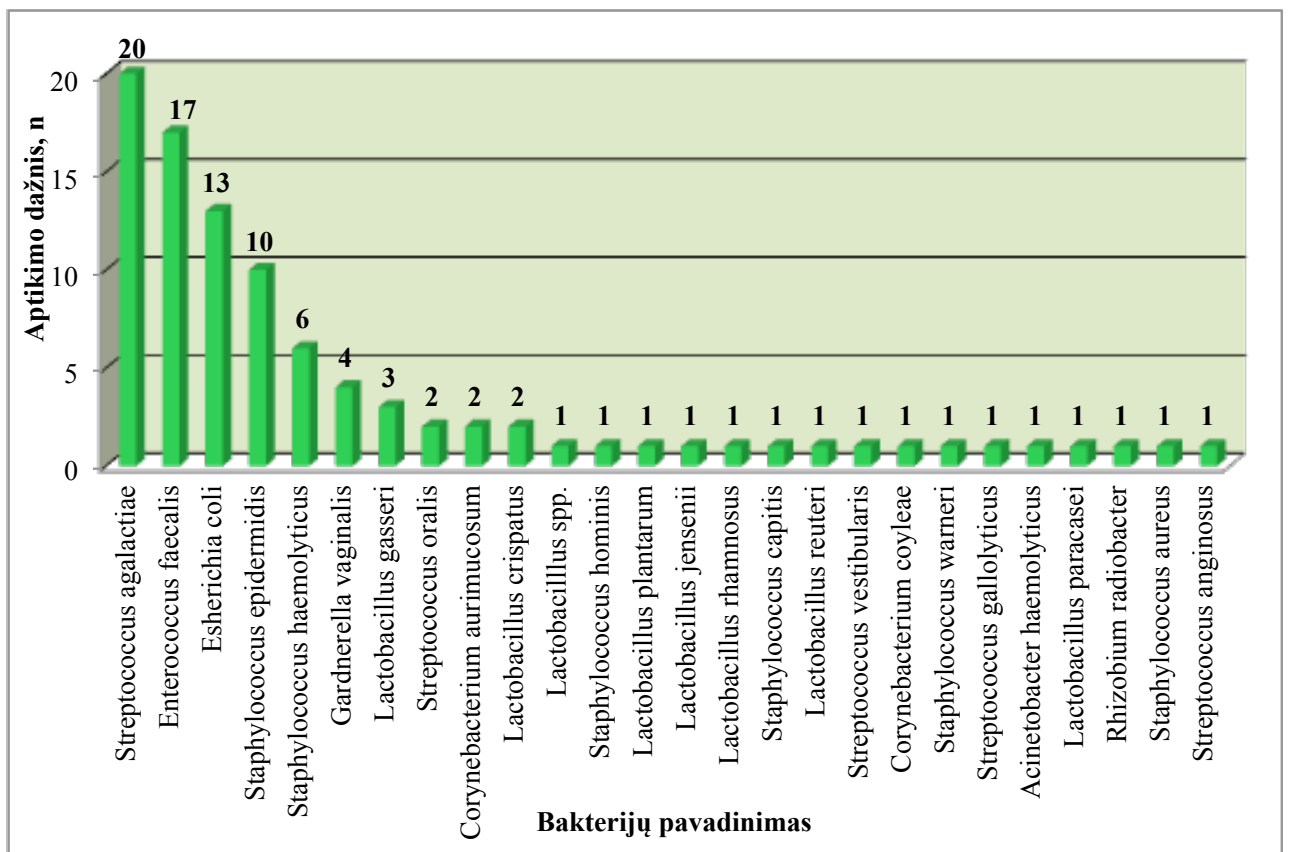
Ši bakterija kaip komensalas siejama su normalia žmogaus mikrobiomo dalimi. Aptinkama virškinimo trakte ir urogenitaliniuose takuose. *S. agalactiae* gali būti virulentiška išskirdama poras formuojantį toksiną beta hemoliziną ir kapsulės polisacharidą, kuris turi daug sialo rūgščių [98, 99]. Nustatyta, kad *S. agalactiae* gali sukelti kai kurias infekcijas moteriai nėštumo metu ar po gimimo naujagimiui. Nėštumo metu moteriai gali sukelti šlapimo takų infekciją, prieššlaikinį gimdymą, pogimdinį sepsį, gimdos uždegimą. Naujagimiui gali sukelti tokias infekcijas kaip meningitą, sepsį ar plaučių uždegimą [99]. Kitų rūšių streptokokai, nustatyti tyrimo metu, gali būti laikomi normalia makšties mikroflora.

Gentis *Candida*. *Candida* grybas formuoja dideles, baltos spalvos kolonijas (15 pav.) *Candida* grybo rūšys, kaip normalios floros atstovai nedideliais kiekiais gali būti aptinkami šiose organizmo srityse: burnoje, ant odos, žarnyne, moters lytiniuose takuose. Sutrikus ar nusilpus žmogaus imuninei sistemai, pasikeitus mikrofloros sudėčiai, *Candida* grybo atstovai kolonizuoja, plinta ir sukelia infekcijas, sukelia burnos, ryklės kandidozę, moterų išorinių ir vidinių lytinių organų kandidozę. Tyrimo metu buvo aptiktos dvi rūšys: *Candida albicans* ir *Candida tropicalis*.



15 pav. *Candida spp.* grybo kolonijos ant sabūro agaro mitybinės terpės (autorius nuotrauka).

Tyrimo metu iš gimdos kaklelio pasėlių buvo išaugintos ir MALDI-TOF MS metodu identifikuotos 26 bakterijų rūšys ir dvi grybo rūšys (16 pav.). Dažniausiai moterų lytiniuose takuose buvo aptinkamos šios bakterijos: *Streptococcus agalactiae* (n=20), *Enterococcus faecalis* (n=17), *Esherichia coli* (n=13) ir *Staphylococcus epidermidis* (n=10).

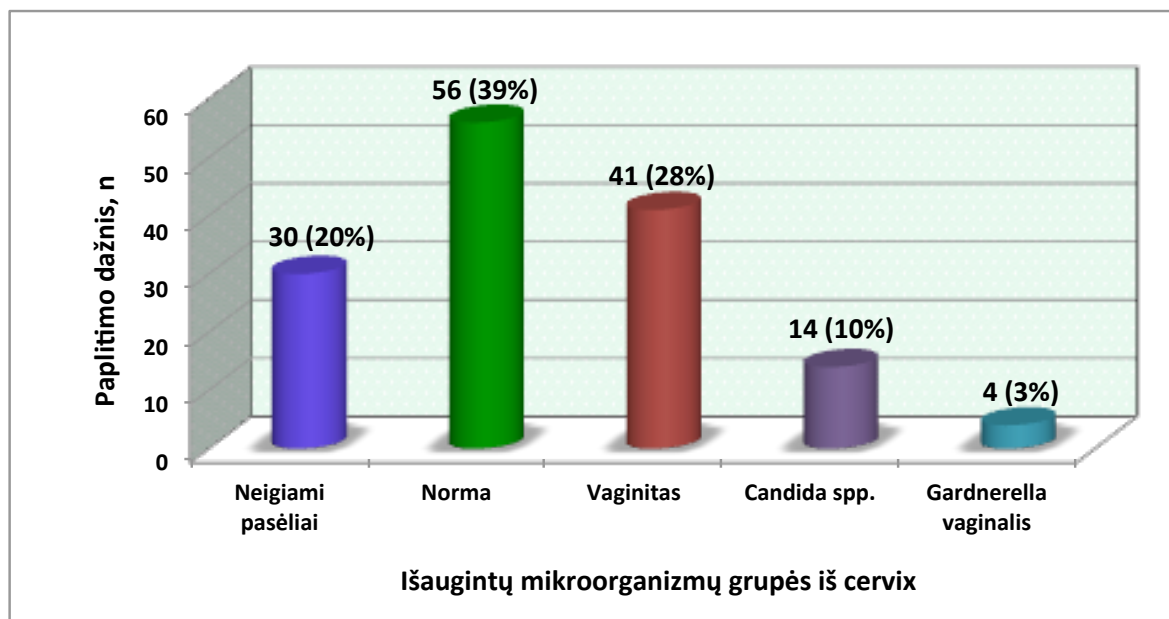


16 pav. Iš pasėlių išaugintos ir MALDI-TOF MS identifikuotos bakterijų rūšys.

Bakteriologinių tyrimų metu iš gimdos kaklelio ėminių buvo išauginti ir identifikuoti mikroorganizmai iki rūšies ir genties. Pagal pasėlių rezultatus buvo išskirtos penkios lytinių takų mikrobiomo grupės (17 pav.):

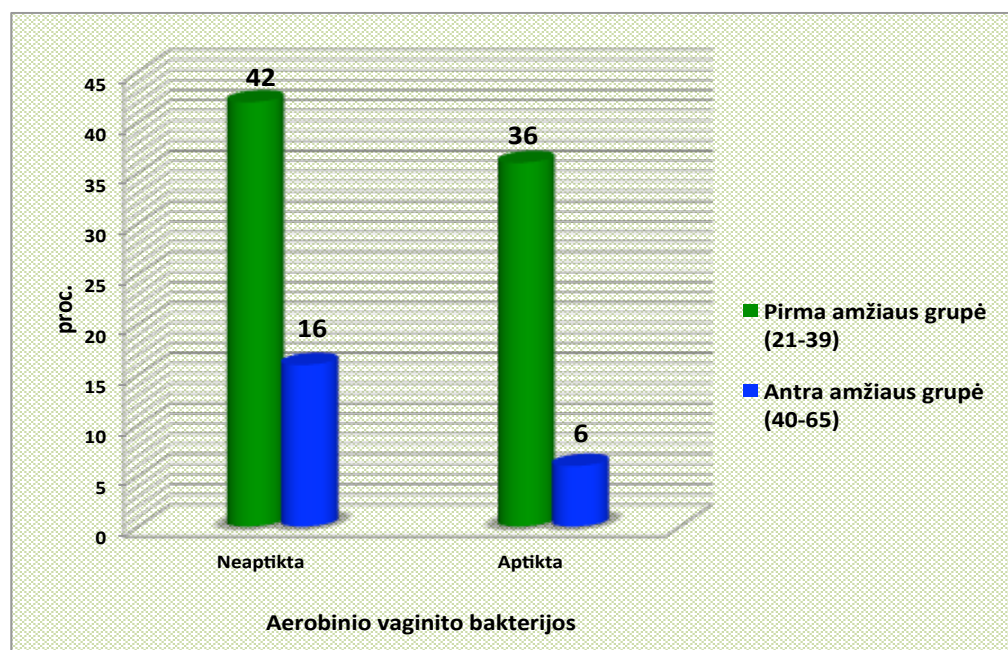
- 1. Neigiamų pasėlių grupė.** Neigiami pasėliai nustatyti 30-čiai (20 proc.) pacienčių t.y. po dviejų parų inkubacijos termostate 37°C temperatūroje bakterijų augimas ant mitybinių terpių neužfiksuotas.
- 2. Normalios lytinių takų floros grupė.** Iš šimto pacienčių daugiau nei pusei buvo nustatytas normalios floros atstovų augimas (n=56) (39 proc.).
- 3. Aerobinio vaginito grupė.** Makšties uždegimą ir mikrofloros disbalansą galimai sukeliančios bakterijos buvo priskirtos aerobinio vaginito (AV) grupei kaip patologinė makšties mikroflora. Aerobinio vaginito grupę sudarė: *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* ir *Escherichia coli*. Bent po vieną šios grupės atsovą buvo aptikta 41 (28 proc.) pacientei.
- 4. Candida grupė.** Iš viso *Candida spp.* atstovų buvo nustatyta 14 pacienčių (10 proc.).
- 5. Gardnerella vaginalis grupė.** Pasėlio metodu tik keturioms pacientėms (3 proc.) išauginta *Gardnerella vaginalis*, kaip anksčiau minėta, toks nedidelis *G.vaginalis* išauginimo procentas

galimai buvo nulemtas tos priežasties, kad tyrime nebuvo naudota speciali selektyvi mitybinė terpė, skirta *G.vaginalis* auginimui.



17 pav. Bakteriologinių tyrimu metu nustatytos penkios būklės (grupės).

Nustatyta, kad aerobinio vaginito grupės bakterijos nustatomos dažniau jaunesnio amžiaus moterims (nuo 21 iki 39 m.) (18 pav.).

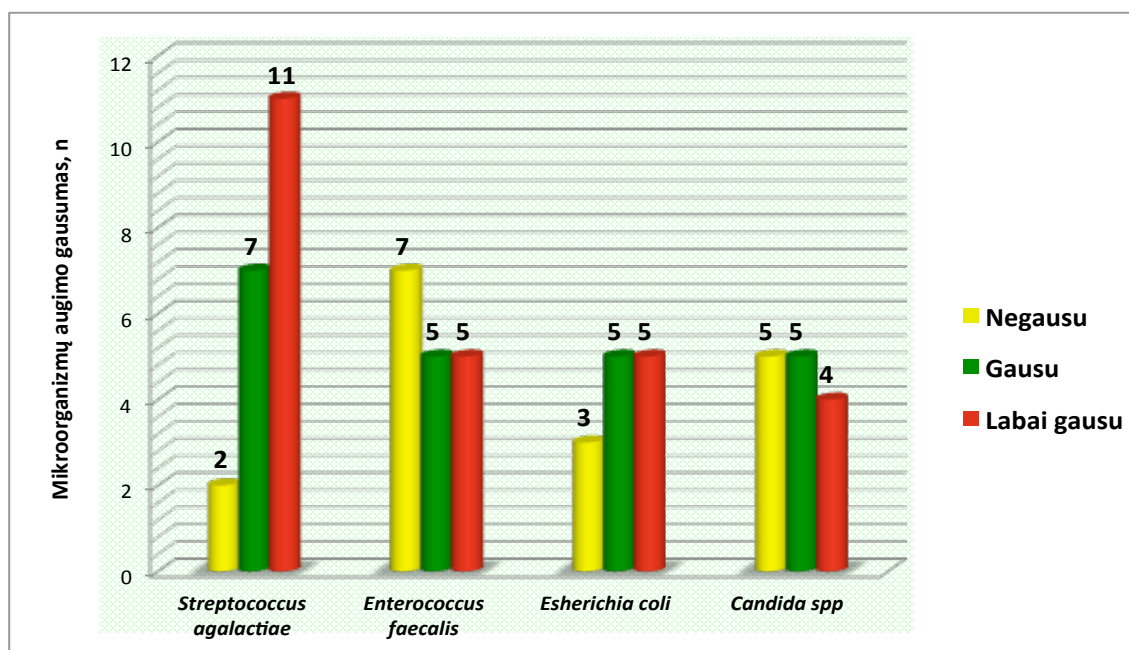


18 pav. Aerobinio vaginito bakterijų nustatymas amžiaus grupėse.

Mūsų tyrimo metu buvo nustatyti mikroorganizmų augimo gausumai. Gausumas buvo vertinamas pusiau kiekybiškai pagal augimą ant štrichų agare (4 lentelė). Gausiausiai augo aerobinio vaginito grupės mikroorganizmai: *Streptococcus agalactiae* (n=20), *Enterococcus faecalis* (n=17), *Esherichia coli* (n=13) ir *Candida* genties grybų augimas (n=14) (19 pav.).

4 lentelė. Bakterijų augimo gausumo vertinimas.

Bakterijų augimo vertinamas pusiau kiekybiškai	
Negausus augimas	1 (+)
Vidutiniškai gausus augimas	2 (++)
Gausus augimas	3 (+++)



19 pav. Mikroorganizmų augimo gausumas.

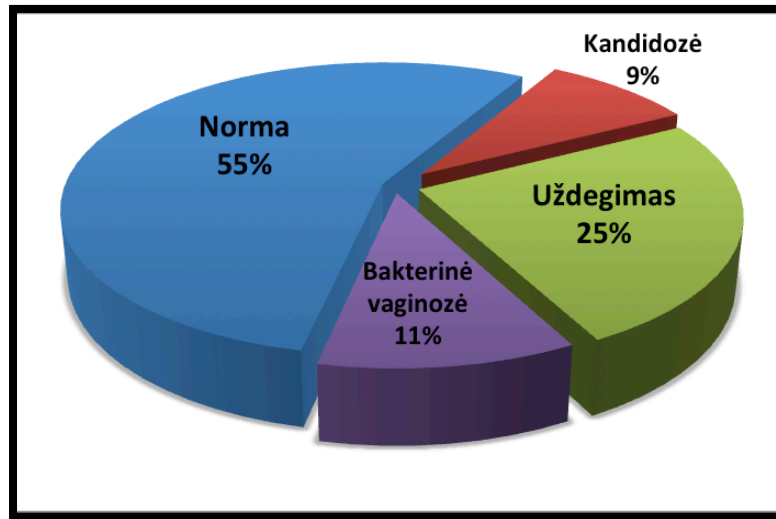
4.3. Molekulinių ir mikroskopinių duomenų analizė

Pagal gydytojos identifikuotas drėgname makšties tepinėlyje vyraujančias ląsteles, mikroorganizmus ir jų kiekio santykį tepinėlis suskirstytas į tokias grupes:

- norma;
- bakterinė vaginozė;
- kandidozė;

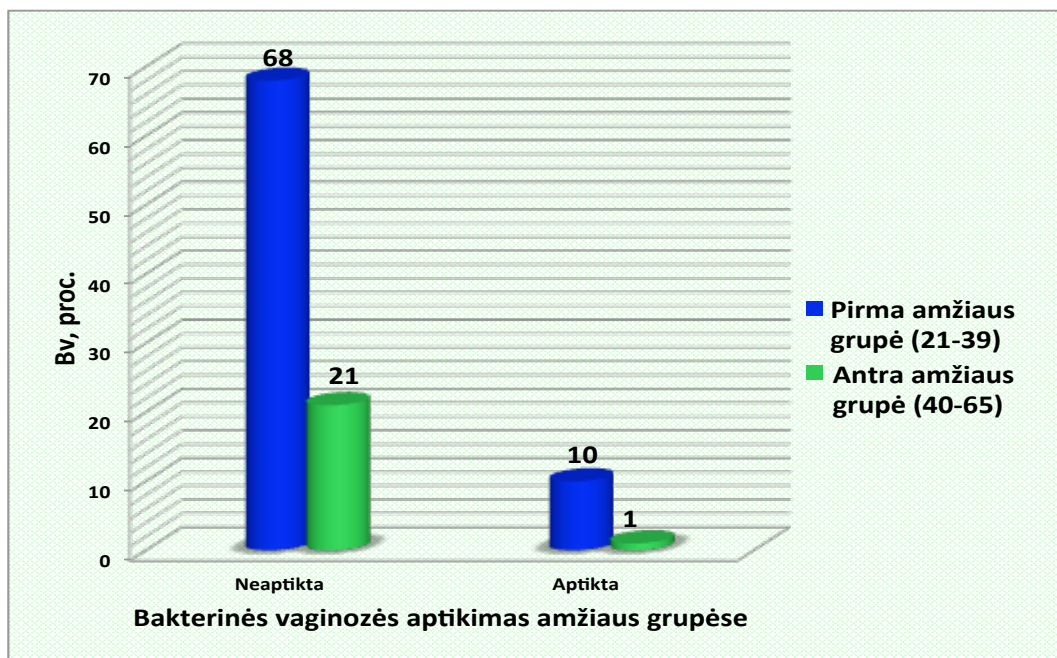
- uždegimas.

Bakterinė vaginozė nustatyta 11 proc. pacienčių, kandidozė – 9 proc., o uždegimų – 25 proc. moterų (20 pav.).



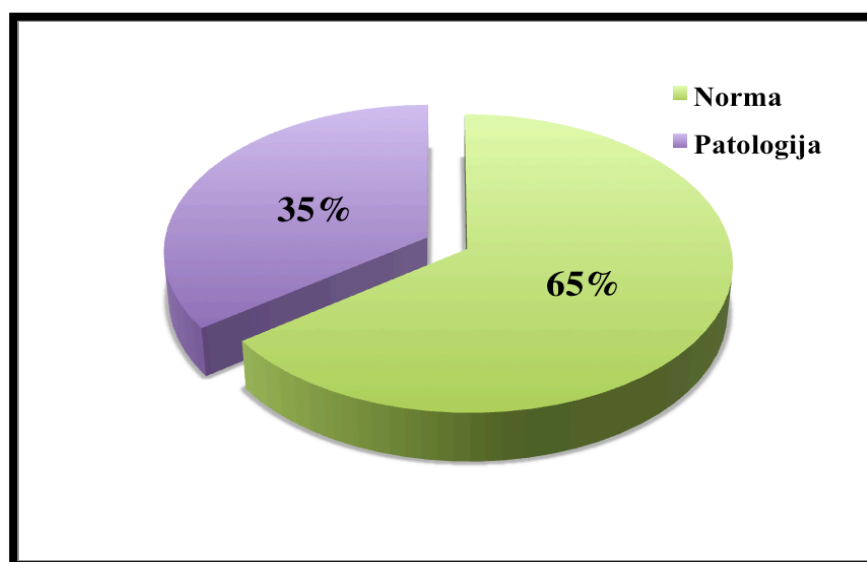
20 pav. Drėgno makšties tepinėlio grupės

Bakterinė vaginozė dažniau buvo nustatoma jaunesnio amžiaus pacientėms iki 39 metų (21 pav.).



21 pav. Bakterinės vaginozės nustatymas amžiaus grupėse.

Moterų gimdos kaklelio išskyros buvo suskirstytos į dvi grupes: normalios ir pataloginės (22 pav.). Normalios išskyros – tai baltos, gausios ar negausios išskyros. Pataloginėms išskyroms buvo priskiriamos tokios išskyros: gausios ar negausios, gelsvos, mukopurulentinės, putotos, nemalonaus kvapo ir KOH teigiamos išskyros, taip pat paraudęs ar kraujuojantis gimdos kaklelis. Pagal išskyrų pobūdį norma buvo nustatyta daugiau nei pusei pacienčių (65 proc.), o patalogiškų išskyrų nustatyta 35 pacientėms (35 proc.).



22 pav. Gimdos kaklelio išskyrų grupės – normalios ir pataloginės.

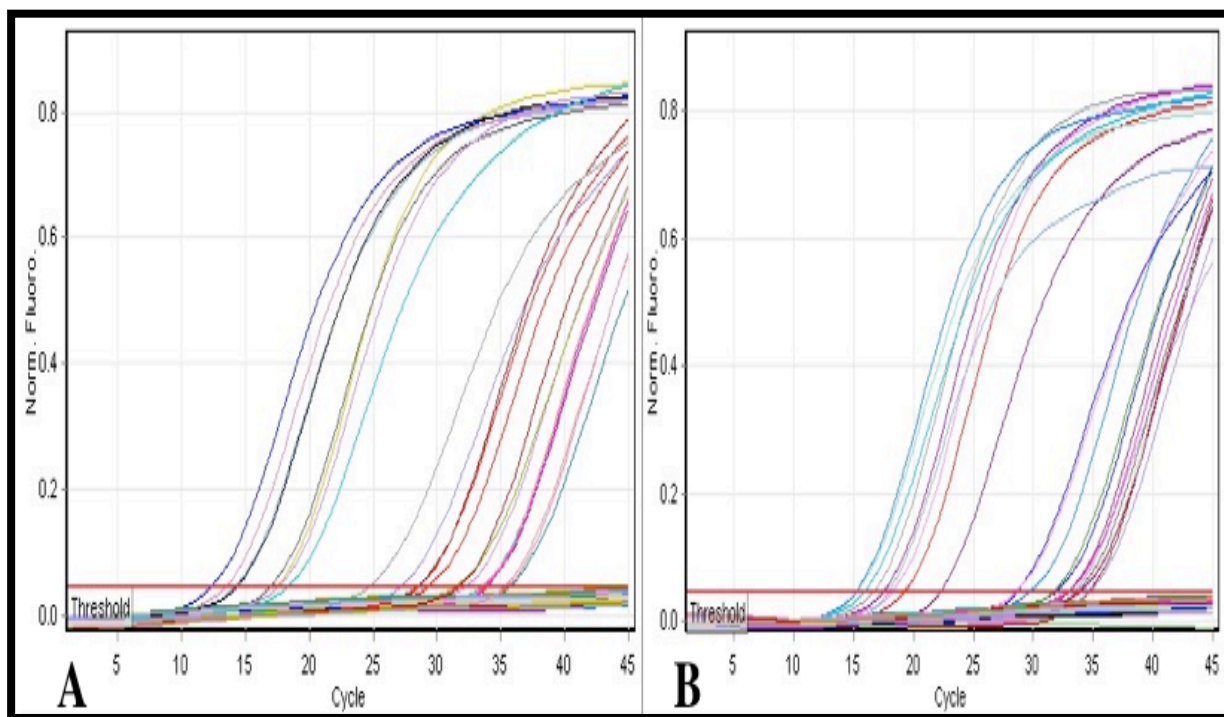
4.4. *Atopobium vaginae* DNR tyrimo analizė

Atliekant tikro laiko PGR iš pacienčių gimdos kaklelio ėminių buvo identifikuotas ir nustatytas *Atopobium vaginae* (23 pav.). Nustatytas *Atopobium vaginae* kiekis buvo įvertintas pusiau kiekybiškai, pliusų sistema pagal Ct vertes, gautas PGR amplifikacijos metu (5 lentelė).

5 lentelė. Pagal Ct vertes išskirtas *Atopobium vaginae* gausumas.

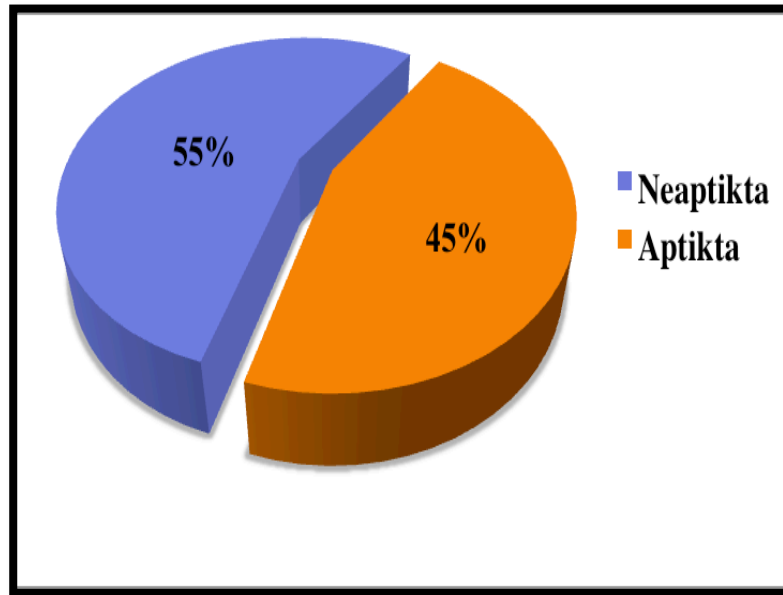
Atopobium vaginae gausumas	Ct vertė
Neaptikta	0
Mažas kiekis (+)	28.08-35.86
Vidutiniškas kiekis (++)	20.29-28.07
Didelis kiekis (+++)	12.50-20.28

(C_T) skaičius yra amplifikacijos ciklas, per kurį amplifikacijos kreivė kirta slenkstinę liniją (angl. Threshold). Kuo didesnis *Atopobium vaginae* DNR kiekis mėginyje, tuo ankščiau slenkstinė linija kertama ir tuo mažesnis ciklo numeris. Mažiausią *Atopobium vaginae* DNR kiekį rodo paskutinės amplifikacijos kreivės kertančios slenkstinę liniją nuo 28.08-35.86 (C_T).

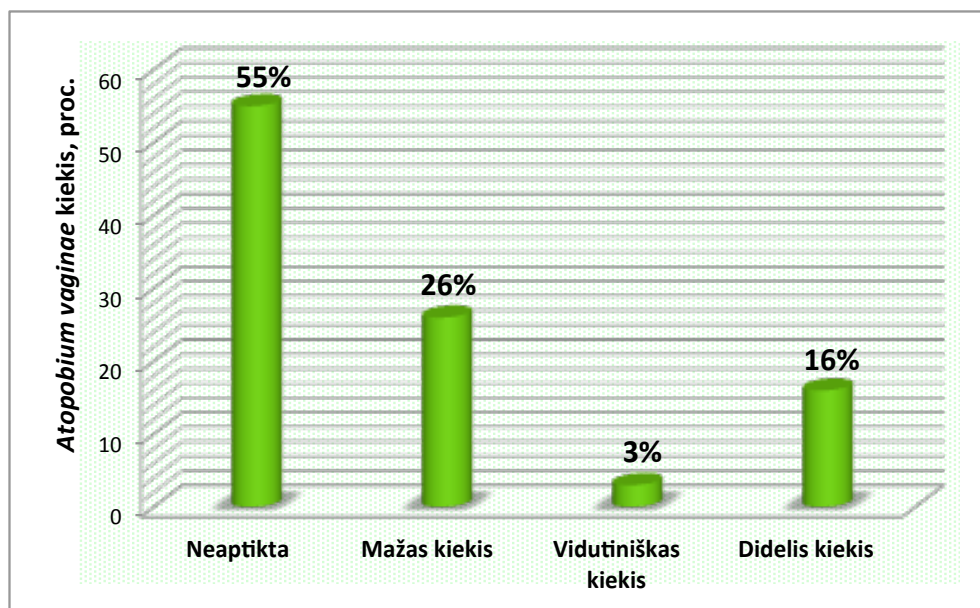


23 pav. Teigiamos *Atopobium vaginae* amplifikacijos kreivės FAM kanale. A- pacientų ėminiai nuo 1 iki 50 numerio, B- pacientų ėminiai nuo 51 iki 100 (autorius nuotrauka).

Nustatyta, kad daugiau nei pusei moterų *Atopobium vaginae* nebuvo aptiktas iš paimtų gimdos kaklelio mėginių (55 proc.) (24 pav.). Likusiai daliai moterų (45 proc.) buvo nustatyta *Atopobium vaginae* bakterija. Pagal *Atopobium vaginae* nustatytą kiekį pirmą grupę sudarė 26 proc., antrą – 3 proc., o trečią grupę pagal didžiausią *Atopobium vaginae* aptiktą kiekį sudarė 16 proc. (25 pav.).

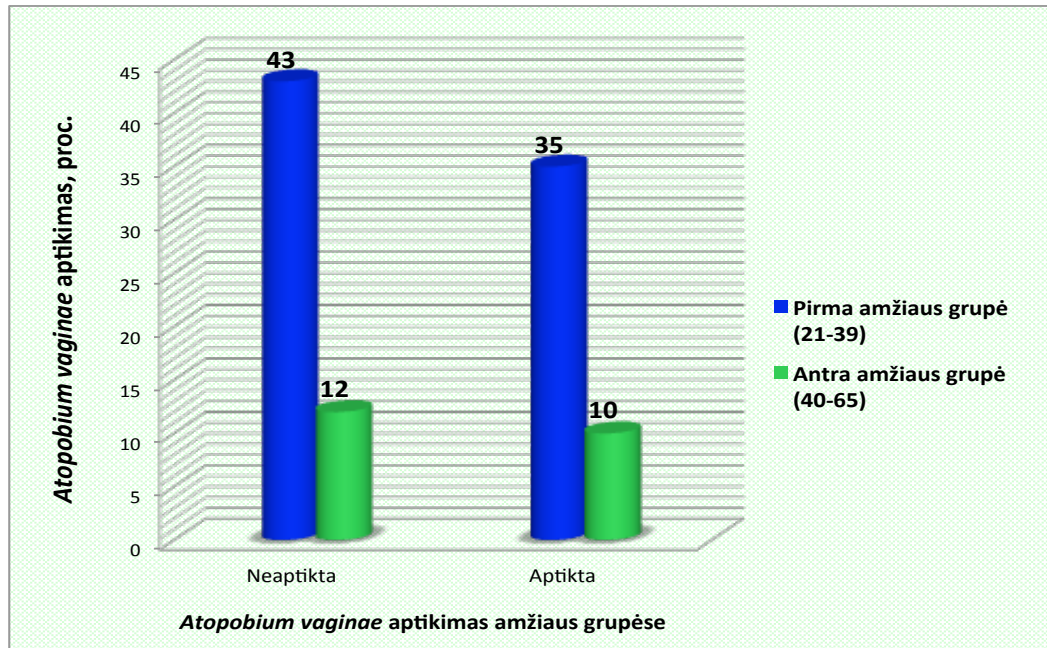


24 pav. *Atopobium vaginae* aptikimas RL-PGR metodu.



25 pav. *Atopobium vaginae* gausumas.

Dažniausiai *Atopobium vaginae* aptikta jaunesnio amžiaus moterims (n=35) lyginant su vyresnio amžiaus pacientėmis (n=10) (26 pav.), nors statistiškai patikimas ryšys nenustatytas.



26 pav. *Atopobium vaginae* aptikimas amžiaus grupėse.

4.5. Rezultatų aptarimas

Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Mikrobiologijos laboratorijoje atliktas moterų lytinės mikrofloros įvairovės tyrimas ir vertinimas. Ištirta tyrime dalyvavusių pacienčių (n=100) lytinių takų mikroflora. Nustatyti normalios (n=56) ir patologinės mikrofloros atstovai (n=41) (17 pav.).

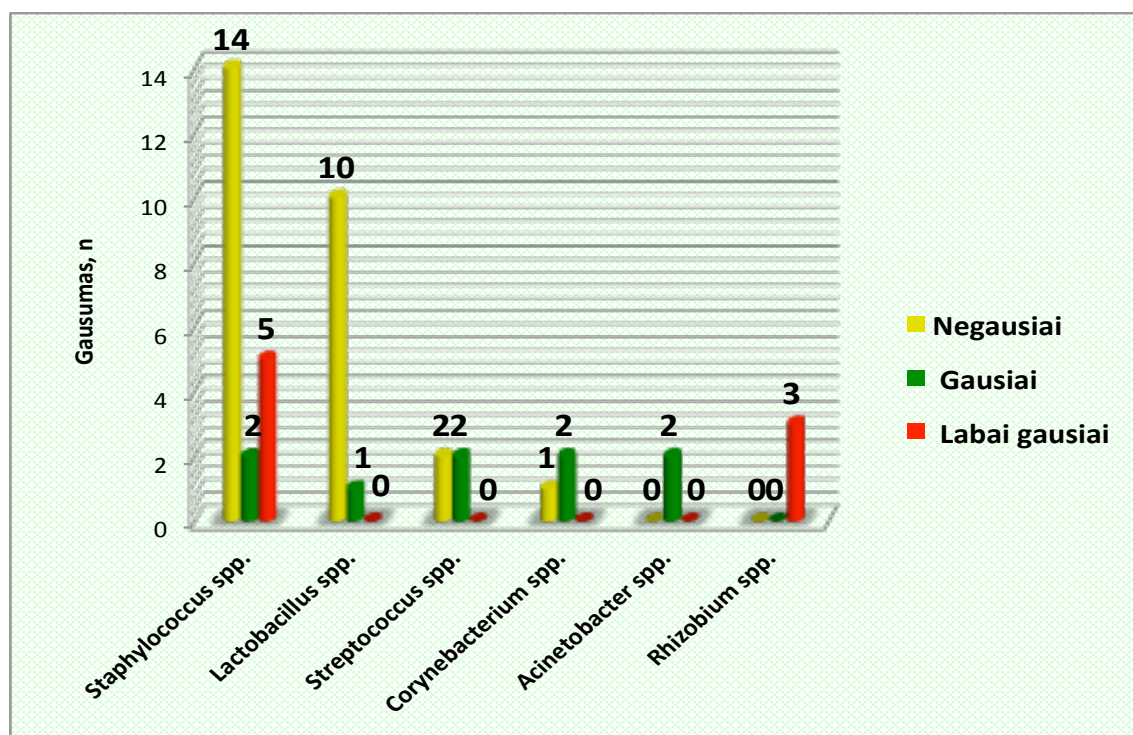
Naudojantis bakteriologiniais tyrimo metodais, iš pasėlio išaugintos ir identifikuotos 26 bakterijų rūšys, gentys. Patologinei makšties florai (aerobinio vaginito grupei) priskirtos šios vidutiniškai gausiai arba gausiai aptiktos bakterijos: *Streptococcus agalactiae* (n=20), *Enterococcus faecalis* (n=17) ir *Escherichia coli* (n=13) (19 pav.). Mūsų tyrimų duomenys rodo, kad aerobinio vaginito grupė buvo dažniau nustatoma jaunesnio amžiaus moterims (nuo 21 iki 39 metų) (n=36) (18 pav.), tačiau statistiškai reikšmingo ryšio su amžiumi neaptikta (p=0,180). Taip pat lyginant aerobinio vaginito grupę su drėgnu makšties uždegimo tepinėliu nustatyta, kad statistiškai patikimo ryšio neaptikta (p>0,05).

Kai kurių autorių, pvz., Donders G. ir jo kolegų, atlikti tyrimai patvirtina, kad aerobinį vaginitą dažniausiai sukelia tokie mikroorganizmai kaip B grupės streptokokai ir *E. coli* [96].

Atlikti tyrimai Aiping Fan et al. rodo, kad aerobinį vaginitą dažniausiai sudaro aerobinės bakterijos *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli* ir *Staphylococcus*

epidermidis [97]. Jahic M. et al. su kolegomis, tirdami aerobinio vaginito ryšį su kitomis infekcijomis, nustatė, kad iš 100 tiriamų moterų dažniausiai buvo aptinkamos šios su aerobiniu vaginitu siejamos bakterijos: *Escherichia coli* (n=55) ir *Enterococcus faecalis* (n=52) [102].

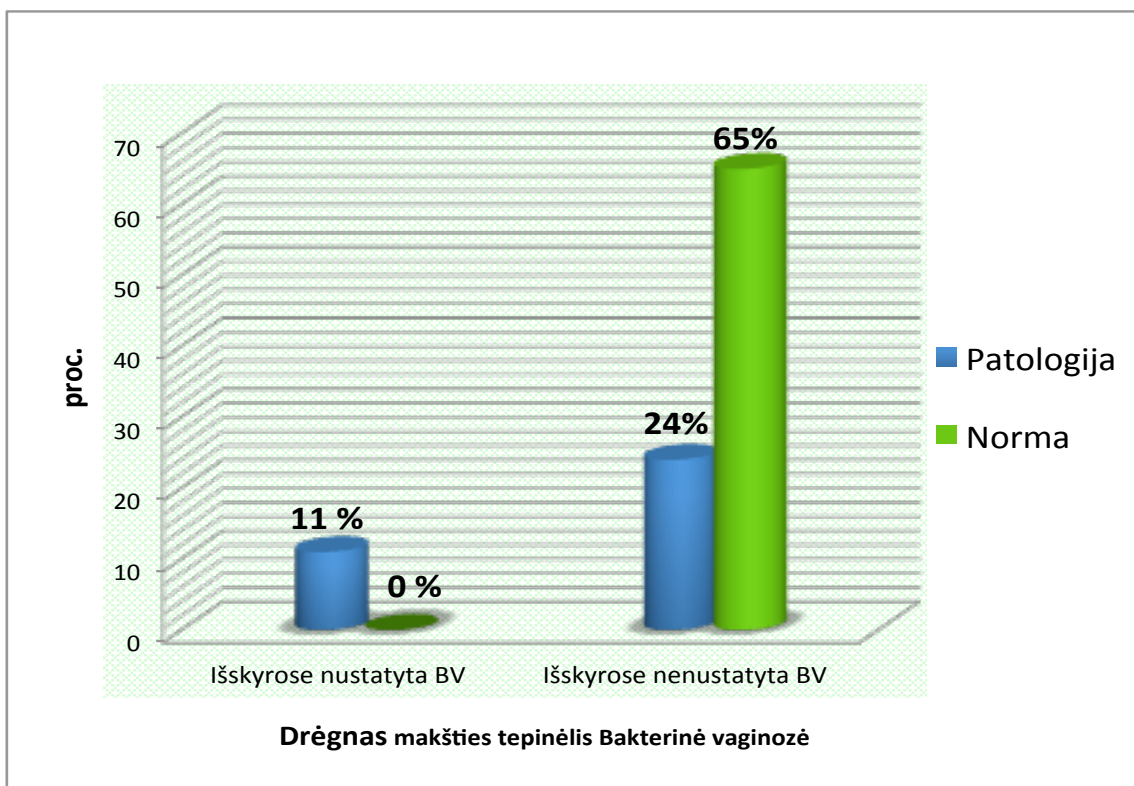
Mūsų atlikto tyrimo metu nustatėme, kad normalų gimdos kaklelio mikrobiomą sudaro negausiai ar vidutiniškai gausiai auganti vienos ar kelių rūšių mikroflora (27 pav.). Mūsų tyrimo metu ginekologiniuose ėminiuose kaip normali gimdos kaklelio mikroflora, nustatytos tokios gentys: *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ir kitų genčių atstovai.



27 pav. Normalios lytinių takų floros mikroorganizmų augimo gausumas.

Atliekant bakteriologinius tyrimus, buvo gauti statistiškai reikšmingi duomenys tarp pasėlio *Candida spp.* rūšių ir drėgno makšties tepinėlio kandidozės ($p=0,01$). Pacientėms, kurioms buvo išauginti *Candida* genties grybai (n=14), devynioms moterims taip pat buvo nustatyta kandidozė drėgname makšties tepinėlyje. Tiriamų moterų lytinių takų mikrofloroje vyravo *Candida albicans* (n=13) rūšis, o *Candida tropicalis* nustatyta tik vienai pacientei. Mūsų tyrime gauti duomenys sutampa su kitų tyrėjų duomenimis. Vermitsky John P. et al. ir jo kolegų atliktuose tyrimuose nustatyta, kad *Candida albicans* yra vienas iš pagrindinių savo genties atstovų, sukeliančių moterų lytinių takų kandidozę [101]. Mahmoudi Rad M. et al. ir kitų autorių atlikti tyrimai taip pat parodė, kad pagrindinė kandidozės sukėlėja iš makšties identifikuojamų grybų rūšių ir dažniausiai aptinkamų yra *Candida albicans* [100].

Bakterinė vaginozė (BV) viena iš dažniausių vaginito grupių. Pacientėms, kurioms buvo nustatyta BV, nustatyti ir tokie simptomai: nemalonus jausmas makštyje, gausios, kartais putotos, nemalonaus kvapo išskyros ir teigiamas aminų testas su KOH (n=11). Statistiškai reikšmingi duomenys gauti tarp drėgno makšties tepinėlio BV ir pataloginių makšties išskyrų (p=0,0001). Patologinės išskyros nustatytos 35 proc. pacienčių (n=35), iš jų BV aptikta 11 proc. (n=11) pacienčių (28 pav.). Taigi visoms pacientėms, kurioms nustatyta BV drėgname makšties tepinėlyje, buvo nustatytos teigiamos pagal Amsel kriterijus išskyros. Mūsų tyrime gauti duomenys sutampa su kitų tyrėjų duomenimis. Taj et al., išnagrinėjęs Amselo ir kitus greitus mikrobiologinius metodus, padedančius nustatyti bakterinę vaginozę, teigia, kad Amselo metodas yra pakankamas ir priimtinas BV nustatymui, bet jo jautrumas, lyginant su kitais naudojamais mikrobiologiniais tyrimais, yra mažesnis. Tyrime dalyvavo 373 moterys, teigiamos pagal BV. Nustatyta, kad Amsel metodo jautrumas buvo 77 proc., o specifiškumas siekė 91 proc. su teigiama prognostine verte – 97 proc. ir neigiama prognostine verte – 53 proc. [104]. Mohammadzadeh F. et al. kartu su kolegomis tyrė 133 ištekėjusias pagal BV teigiamas moteris ir teigia, kad iš naudojamų testų, padedančių patvirtinti BV, Amselo metodas yra patikimas [105].



28 pav. Bakterinės vaginozės ryšys su normaliomis ir pataloginėmis gimdos kaklelio išskyromis.

Mūsų atliktų tyrimų duomenys rodo, kad bakterinė vaginozė dažniausiai buvo nustatoma jaunesnio amžiaus moterims (nuo 21 iki 39 metų) (21 pav.), tačiau statistiškai patikimo ryšio neaptikta ($p > 0,05$). Daugelio autorių atliktų tyrimų duomenys rodo, kad BV nustatoma jaunoms, vaisingo amžiaus moterims [53, 105, 108, 112, 113].

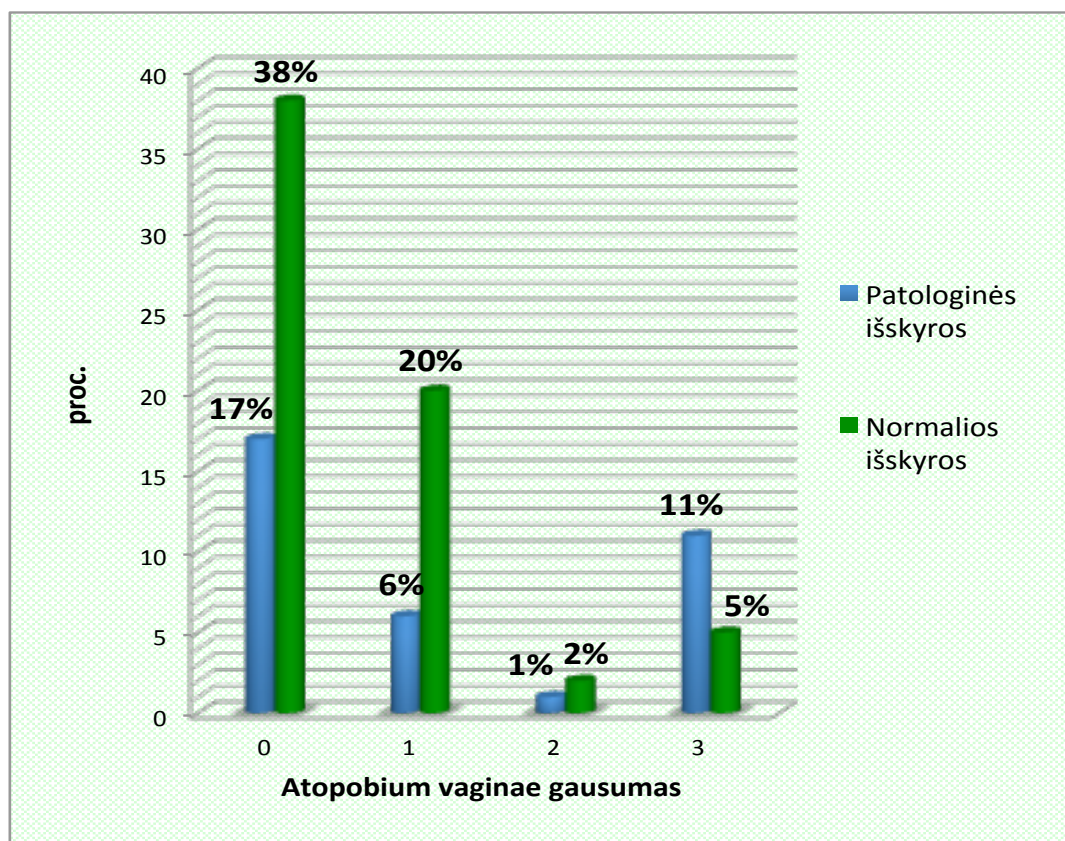
Tiriant bakterinei vaginozei priklausančią mikroflorą, nustatyta, kad gauti duomenys statistiškai nereikšmingi tarp *Gardnerella vaginalis* išaugintų bakterijų ir bakterinės vaginozės ($p = 0,922$). Taip pat statistiškai nereikšmingi duomenys gauti tarp grupių *A. vaginae*, *G. vaginalis* ir BV ($p = 0,282$). *Gardnerella vaginalis* kartu su *Atopobium vaginae* nustatytas tik 2 pacientėms.

Literatūroje *Gardnerella vaginalis* siejama ne tik su bakterine vaginoze, bet kaip teigia Harwich Michael et al. ir jo kolegos, *Gardnerella vaginalis* mažais kiekiais aptinkama ir sveikų moterų lytiniuose takuose [106]. Tačiau daugelio autorių duomenys rodo, kad minėti mikroorganizmai yra siejami su BV [107, 109, 110]. Manoma, kad *G. vaginalis* yra vienas iš pagrindinių mikroorganizmų, atsakingų už infekcinio proceso pradėjimą, kuris padeda sudaryti geresnes sąlygas kolonizuoti kitoms anaerobinėms bakterijoms ir tokiu būdu sukelti polimikrobinę BV [82]. Mūsų tyrimo metu *Gardnerella vaginalis* pasėliuose išaugo tik keturioms pacientėms, todėl tokie mūsų tyrimo gauti rezultatai gali būti nepatikimi. Kaip jau minėta, *G. vaginalis* organizmas buvo auginamas tik paprastose, nespecifinėse mitybinėse terpėse. Jeigu gydytoja drėgname makšties tepinėlyje aptinka BV vaizdą, tai tam, kad nustatyti *Gardnerella vaginalis* rekomenduotina atlikti jos auginimą specifinėse mitybinėse terpėse (nes paprastose mitybinėse terpėse ją sunku užauginti) arba tyrimą atlikti PGR metodu. Apibendrinant galima teigti, kad norint patvirtinti kitų autorių tyrimų duomenis mūsų tyrimas reikalauja nuodugnesnių molekulinų ar mikrobiologinių tyrimų tarp *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* ir BV.

Molekulinų tyrimų metu iš gimdos kaklelio ėminių *Atopobium vaginae* PGR metodu aptiktas 45 proc. moterų (24 pav.). Nustatyta, kad tarp *Atopobium vaginae* DNR aptikimo gimdos kaklelyje ir drėgno makšties tepinėlio metu nustatytos bakterinės vaginozės yra statistiškai reikšmingas ryšys ($p = 0,0001$). Didžiajai daliai moterų kurioms nustatyta BV drėgname makšties tepinėlyje ($n = 11$) buvo aptikta ir *Atopobium vaginae* ($n = 9$). *Atopobium vaginae* negausiai aptikta vienai pacientei, vidutiniškai gausiai nei vienai, o pagal trijų plusų vertinimą (labai gausiai) nustatyta aštuonioms pacientėms. Mūsų atliktų tyrimų duomenys sutampa ir su kitų autorių tyrimais, kurie rodo, kad *Atopobium vaginae* susijusi su BV. Literatūroje aprašoma, kad nustačius bakterinę vaginozė iki 80 proc. atvejų aptinkama *Atopobium vaginae* [109]. Smith William ir jo kolegos tyrė makšties ir gimdos kaklelyje esančią mikroflorą ir jos ryšį su BV. Jie nustatė, kad iš 96 ištirtų ėminių 92 proc. nustatytų bakterijų buvo aptinkamos ir makštyje ir gimdos kaklelyje, taigi tokiu tyrimu įrodė, kad šių dviejų sričių mikroflora yra labai panaši [111].

Mūsų tyrimų duomenys rodo, kad dažniausiai *Atopobium vaginae* nustatoma jaunesnio amžiaus moterims (n=35) iki 39 metų (26 pav.), tačiau statistiškai patikimo ryšio nenustatyta ($p>0,05$).

Statistiškai reikšmingi duomenys gauti tarp *Atopobium vaginae* ir makšties išskyrių ($p=0,018$). Patologinėse išskyrose *Atopobium vaginae* aptiktas labai gausiai 11-kai pacienčių (11 proc.), o normaliose išskyrose *Atopobium vaginae* daugiausiai nustatytas kaip negausus t.y. mažas kiekis (n=20, 20 proc.) (29 pav.).



29 pav. *Atopobium vaginae* gausumas gimdos kaklelio išskyrose.

5. IŠVADOS

1. Taikant mikrobiologinius ir molekulinis tyrimo metodus iš ginekologinių ėminių, buvo nustatytos 29 mikroorganizmų rūšys: 2 grybų rūšys ir 27 bakterijų rūšys. Normali lytinių takų mikroflora aptikta 56 pacientėms, patologinė mikroflora –41 pacientei, *Candida* grybo atstovų nustatyta 14, o *Gardnerella vaginalis* – 4 pacientėms. Patologinėje mikrofloroje dažniausiai aptikti aerobinio vaginito sukėlėjai: *Streptococcus agalactiae* (n=20), *Enterococcus faecalis* (n=17) ir *Escherichia coli* (n=13).
2. Molekulinių tyrimų metu nustatyta, kad *Atopobium vaginae* aptikta 45 proc. tyrime dalyvavusių moterų. Dažniau *Atopobium vaginae* aptikta jaunesnio amžiaus moterims nuo 21 iki 39 metų.
3. Nustatytas ryšys tarp mikroorganizmų ir makšties uždegimo:
 - statistiškai reikšmingi duomenys gauti tarp *Candida spp.* rūšių ir drėgno makšties tepinėlio kandidozė (p=0,01);
 - statistiškai reikšmingi duomenys gauti tarp *Atopobium vaginae* ir drėgno makšties tepinėlio bakterinė vaginozė (p=0,0001);
 - *Atopobium vaginae* gausiau buvo aptinkama patologinių makšties išskyrų atveju, negu normalių;
 - tarp *Gardnerella vaginalis* ir bakterinės vaginozės bei tarp *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* ir bakterinės vaginozės statistiškai patikimo ryšio nenustatyta.

SUMMARY

Study of female genital tract microflora diversity

Authors of Master's degree scientific research work: **Justina Vertelytė**

Head of Master's degree scientific research work: **dr Silvija Kiverytė**

Vilnius, 2016

The aim of research work was to investigate and analyze the composition of the microflora of the female genital tract using the methods of microbiological smear, vaginal wet mount and PCR. **The objectives of the work were** to evaluate the species of microorganisms in microbiological smears from the cervix by their abundance and by identifying the members of genital tract microflora in normal and pathological cases.

Materials and methods. The study was carried out in 2015 – 2016 in the Microbiology laboratory of the Santariškės hospital Laboratory medicine center. Vaginal samples from vaginal wet mounts and cervical swabs for microbiological smears and identification of *Atopobium vaginae* were studied. Microorganisms from female genital tracts were cultivated in the microbiology laboratory using microbiological smear analysis methods. MALDI-TOF MS was used to identify fungi and bacteria and real-time PCR was used to identify *Atopobium vaginae*.

Results and conclusions. We have analyzed 100 cervical samples, with the subjects being 21 to 65 years old. Normal vaginal microflora was found in 56 cases and there were 41 pathological cases. Using microbiological and molecular methods, we found 29 different species of microorganisms in gynecological smears with 2 species of fungi and 27 species of bacteria. 14 patients were diagnosed with *Candida spp.* fungi and 4 patients were diagnosed with *Gardnerella vaginalis*. Most common in the pathological cases were the aerobic vaginitis-causing bacterial species of *Streptococcus agalactiae* (n=20), *Enterococcus faecalis* (n=17) and *Esherichia coli* (n=13). 46% of the subjects were diagnosed with *Atopobium vaginae* with it being more common among younger women (21 – 39 years old (n=35)) compared to older ones (n=10). A relation between microorganisms and vaginitis was found. There was statistical significance between *Candida spp.* and candidosis in vaginal wet mounts (p=0,01) and between *Atopobium vaginae* and bacterial vaginosis in vaginal wet mounts (p=0,0001). No relations of statistical significance between *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis or between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis were found.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; *Atopobium vaginae*; *Gardnerella vaginalis*; bacterial vaginosis; vaginal discharge; cervix; swab; smear; microbiological culture; PCR; MALDI-TOF MS

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos centro direktorei prof. habil. dr. Z. Kučinskienei už galimybę atlikti mokslo tiriamąjį darbą Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų laboratorinės diagnostikos centro Mikrobiologijos laboratorijoje.

Didžiausią padėką reiškiu darbo vadovei Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros lektorei dr. Silvijai Kiverytei už didelę, visapusišką pagalbą ir vertingus patarimus ruošiant baigiamąjį darbą.

Taip pat esu dėkinga Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros darbuotojams ir mikrobiologijos laboratorijos laborantėms už pagalbą, įsisavinant tyrimui reikalingus metodus, nuoširdumą, geranoriškumą.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

1. Schwebke J, R, Lee j, Y. *et al.* Home Screening for Bacterial Vaginosis to Prevent Sexually Transmitted Diseases. *Clin Infect Dis.* (2015) doi: 10.1093/cid/civ975.
2. Haggerty L, C, Totten A, P, Tang G. *et al.* Identification of novel microbes associated with pelvic inflammatory disease and infertility. *Sex Transm Infect* doi:10.1136/sextrans-2015-052285
3. Faure E, Faure K, Figeac M, et al. Vaginal Mucosal Homeostatic Response May Determine Pregnancy Outcome in Women With Bacterial Vaginosis: A Pilot Study. Snowden. J, ed. *Medicine.* 2016;95(5):e2668. doi:10.1097/MD.0000000000002668.
4. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. 2016. The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 29:223–238. doi:10.1128/CMR.00075-15.
5. Krauss-Silva L, Almada-Horta A. et al. Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low socioeconomic and multiethnic South American population. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2014 doi: 10.1186/1471-2393-14-107
6. Brooks F.G., Carroll K. C., Butel J. S., Melnick J. et al. *Medical Microbiology* 26e. p. 172, 297-298. 2013. ISBN: 978-0-07-181578-9
7. Nelson D, B, HanlonL, A, Wu G, Liu C, Fredricks N, D. First Trimester Levels of BV-Associated Bacteria and Risk of Miscarriage Among Women Early in Pregnancy. *Maternal and Child Health Journal* December 2015, Volume 19, Issue 12, pp 2682-2687
8. Lopes dos Santos Santiago G, Cools P, Verstraelen H, Trog M, Missine G, et al. Longitudinal Study of the Dynamics of Vaginal Microflora during Two Consecutive Menstrual Cycles. *PLoS ONE* 6(11): e28180. 2011; doi:10.1371/journal.pone.0028180
9. Klebanoff ma, nansel tr, brotman rm, et al. Personal hygienic behaviors and bacterial vaginosis. *Sexually transmitted diseases.* 2010; 37(2):94-99. doi:10.1097/olq.0b013e3181bc063c.
10. Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A, et al. Characterization of the Vaginal Micro- and Mycobiome in Asymptomatic Reproductive-Age Estonian Women. *PLoS ONE* 8(1): e54379. 2013; doi:10.1371/journal.pone.0054379
11. Thomas S. Doderlein's bacillus: *Lactobacillus acidophilus.* *J Infect Dis* 1928; doi: 10.1093/infdis/43.3.218

12. Bing Ma, Forney L, J, Ravel J. Vaginal Microbiome: Rethinking health and disease. Baltimore, 2012; doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150157
13. Hickey J, R, Zhou X. et. al Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. 2012, Moscow. doi:10.1016/j.trsl.2012.02.008
14. Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol*
15. 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.
16. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infectious Diseases.* 2011;11:200. doi:10.1186/1471-2334-11-200.
17. Graver MA, Wade JJ. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2011.
18. Fichorova R, N, Yamamoto H, S, Delaney M, L, Onderdonk A, B, Doncel G, F. Novel vaginal microflora colonization model providing new insight into microbicide mechanism of action. *mBio* 2:e00168–11. 2011 doi: 10.1128/mBio.00168-11
19. Lai S, K, Hida K, Shukair S, Wang Y, Y, Figueiredo A, et al. Human immunodeficiency virus type 1 is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J. Virol.* 2009; doi: 10.1128/JVI.01899-08
20. Aldunate M, Tyssen D, Johnson A, et al. Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2013;68(9):2015-2025. doi:10.1093/jac/dkt156.
21. O'Hanlon D, E, Moench TR, Cone R, A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.008007
22. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(26):11971-11975. doi:10.1073/pnas.1002601107.
23. Pavilionis A. Klinikinė mikrobiologija. Kaunas; 2006. p.31, 127,129, 272, 712.
24. Yamamoto T, Zhou X, Williams C, J, Hochwalt A, Forney L, J. Bacterial populations

- in the vaginas of healthy adolescent womens. *Pediatr Adolesc Gynecol*. 2009 Feb;22(1):11-8. doi: 10.1016/j.jpag.2008.01.073
25. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, et al. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(Suppl. 1):4680–87 doi: 10.1073/pnas.1002611107
 26. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(Suppl 1):4680-4687. doi:10.1073/pnas.1002611107.
 27. Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Science translational medicine*. 2012;4(132):132ra52. doi:10.1126/scitranslmed.3003605.
 28. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, et al. 2007. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. doi:10.1038/ismej.2007.12
 29. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, et al. 2010. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2009.00618.x
 30. Tibaldi, C., Cappello, N., Latino, M. A., Masuelli, G., Marini, S. and Benedetto, C. (2009), Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic nonpregnant females: risk factors and rates of occurrence. *Clinical Microbiology and Infection*, 15: 670–679. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02842.x
 31. Wira CR, Fahey JV, Ghosh M, Patel MV, Hickey DK, Ochiel DO. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *American journal of reproductive immunology (New York, NY: 1989)*. 2010;63(6):10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x.
 32. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, et al. Temporal Variability of Human Vaginal Bacteria and Relationship with Bacterial Vaginosis. Ratner AJ, ed. *PLoS ONE*. 2010;5(4):e10197. doi:10.1371/journal.pone.0010197.
 33. Gustafsson RJ, Ahrne S. et al. The Lactobacillus flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC Women's Health*. 2011 doi: 10.1186/1472-6874-11-17

34. Gillet E, Meys J, Verstraelen H, Bosire C, Sutter P, et al., Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*; 2011. doi:10.1186/1471-2334-11-10
35. Pavilionis A., Čerkašina-Lasinskaitė A., Vaičiuvėnas V., Akramas L. *Medicinos mikrobiologijos pagrindai*. Kaunas, 2000. p. 197
36. Caixeta R, C, A, Ribeiro A, A, Segatti D, K, et al. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women. *Diagnostic Cytopathology*. Vol 43:10 p. 780-785. 2015. DOI: 10.1002/dc.23301
37. Pavilionis A., Čerkašina-Lasinskaitė A., Vaičiuvėnas V. *Diagnostinė mikrobiologija*. Kaunas 2007. p. 175; 237-238.
38. Aukštuolienė E., Butrimienė I., Čaplinskas S., Griškevičius A., Jasaitienė D., Kučinskienė V., Nadišauskienė R., Samitovas D. ir kt. *Lytiškai plintančių infekcijų diagnostika ir gydymas*. Kaunas; 2007. p. 18-101.
39. Amsel, R., Totten, P. A., Spiegel, C. A., Chen, K., Eschenbach, D., & Holmes, K. K. (1983). Nonspecific vaginitis: Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *The American Journal of Medicine*, 74(1), 14-22. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)91112-9](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(83)91112-9).
40. White B, A, Creedon J, D. *et al.* *The vaginal microbiome in health and disease*. 2011, USA.
41. Caroline C. King, Denise J. Jamieson, Jeffrey Wiener, et al., Bacterial Vaginosis and the Natural History of Human Papillomavirus. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, vol. 2011, Article ID 319460, 8 pages, 2011. doi:10.1155/2011/319460
42. Watts H,D, Fazarri M, Minkoff H, Glesby M, et al. Effects of bacterial vaginosis and other genital infections on the natural history of human papillomavirus infection in HIV-1–Infected and High-Risk HIV-1–Uninfected Women. 2005. doi:10.1086/427777.
43. Bennett E, J, Dolin R, Blaser J, M. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th Edition. p. 1360-1366
44. Faure E, Faure K, Figeac M, et al. Vaginal Mucosal Homeostatic Response May Determine Pregnancy Outcome in Women With Bacterial Vaginosis: A Pilot Study. Snowden. J, ed. *Medicine*. 2016;95(5):e2668. doi:10.1097/MD.0000000000002668.
45. Gilbert N, M, Lewis W, G, Lewis A, L. Clinical Features of Bacterial Vaginosis in a Murine Model of Vaginal Infection with *Gardnerella vaginalis*. Ratner AJ, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59539. doi:10.1371/journal.pone.0059539

46. Smart S, Singal A, Mindel A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect* 2004;80:58-62 doi:10.1136/sti.2003.004978
47. Thoma ME, Klebanoff MA, Rovner AJ, et al. Bacterial Vaginosis Is Associated with Variation in Dietary Indices. *J Nutr.* 2011;141:1698-1704.
48. Ahluwalia N, Grandjean H. Bacterial Vaginosis Is Associated with Variation in Dietary Indices. *J. Nutr.* 2011 141: 1698-1704
49. Bodnar LM, Krohn MA, Simhan HN. Maternal vitamin D deficiency is associated with bacterial vaginosis in the first trimester of pregnancy. *J Nutr.* 2009;139:1157–61.
50. Schaubert J, Dorschner RA, Coda AB, et al. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D–dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation.* 2007;117(3):803-811. doi:10.1172/JCI30142.
51. Dunlop AL, Taylor RN, Tangpricha V, Fortunato S, Menon R. Maternal Vitamin D, Folate, and Polyunsaturated Fatty Acid Status and Bacterial Vaginosis during Pregnancy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology.* 2011;2011:216217. doi:10.1155/2011/216217.
52. Liu TP, Stenger S. et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science*:Vol. 311, Issue 5768, pp.1770-1773. 2006 doi: 10.1126/science.1123933
53. Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2013. doi: 10.1016/j.ajog.2013.05.006
54. Bautista TC, Wurapa E. et al. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. *Military Medical Research* 2016. doi: 10.1186/s40779-016-0074-5
55. Nadišauskienė R., Vaitkienė D., Kajėnas S., Kliučinskas M. ir kt. *Ginekologija. Vitae Litera Kaunas*, 2008. p. 32-54.
56. Mackay G. Chapter 43. Sexually Transmitted Diseases and Pelvic Infections. In: DeCherney AH, Nathan L, Laufer N, Roman AS. eds. *CURRENT Diagnosis & Treatment: Obstetrics & Gynecology*, 11e. New York, NY: McGraw-Hill; 2013.
57. Magnus Unemo et al. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. World Health Organization 2013. ISBN 978 92 4 150584 0.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85343/1/9789241505840_eng.pdf.

58. Gardnerella vaginalis infection – cervix. Internetinė nuoroda: http://hit-microscopewb.hc.msu.edu/Microbiology/Lab/S2-Geni_Image_24.html#a.
59. Kusters G, J. A multiplex real-time PCR assay for routine diagnosis of bacterial vaginosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Springer. 2015. doi:10.1007/s10096-015-2412-z.
60. Dhiman N, Yourshaw C, Chintalapudi MR, Turner C, Murphy E (2016) Diagnostic Evaluation of a Multiplex Quantitative Real-Time PCR Assay for Bacterial Vaginosis. *J Women's Health Care* 5: 293. doi:10.4172/2167-0420.1000293
61. Nyirjesy P. Vaginal discharge. In: *Oxford Textbook of Medicine*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2010. Internetinė prieiga: <http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199204854.001.1/med-9780199204854-chapter-0804>.
62. Emeribe AU, Nasir IA, Onyia J, Ifunanya AL. Prevalence of vulvovaginal candidiasis among nonpregnant women attending a tertiary health care facility in Abuja, Nigeria. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/RRTM.S82984>
63. Sharland M. Candidiasis. In: *OSH Manual of Childhood Infections: The Blue Book*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2011. <http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199573585.001.0001/med-9780199573585-chapter-055>.
64. Lasinskaitė-Čerkašina A., Pavilionis A., Vaičiuvėnas V. *Medicinos mikrobiologija ir virusologijos pagrindai*. Kaunas, 2003. p. 282-283
65. Frieden T, R, Jaffe W, H, Cono J. et al. *Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines*. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention 2015. p. 72
66. Lin W-C, Chang W-T, Chang T-Y, Shin J-W. The Pathogenesis of Human Cervical Epithelium Cells Induced by Interacting with *Trichomonas vaginalis*. Liu X, ed. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0124087. doi:10.1371/journal.pone.0124087.
67. Javanbakht M, Stirland A, Stahlman S, et al. Prevalence and Factors Associated with *Trichomonas vaginalis* Infection among High-risk Women in Los Angeles. *Sexually transmitted diseases*. 2013;40(10):804-807. doi:10.1097/OLQ.000000000000026.
68. R. Scott McClelland, Laura Sangaré, Wisal M. Hassan, et al. Infection with *Trichomonas vaginalis* Increases the Risk of HIV-1 Acquisition *The Journal of Infectious Disease* 2007 195: 698-702.

69. Bachmann LH, Hobbs MM, Seña AC, et al. *Trichomonas vaginalis* Genital Infections: Progress and Challenges. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(Suppl 3):S160-S172. doi:10.1093/cid/cir705.
70. Chlamidiozė. Užkrečiamų ligų ir AIDS centras. Internetinė nuoroda: <http://www.ulac.lt/ligos/C/chlamidine-infekcija-chlamidioze>
71. Vagoras A., Hallen A., Domeika M. Lyties takų mikroskopijos pagrindai. 2001 m. Vilnius. p. 26 -38
72. Pattman R, Sankar KN, Elawad B, Handy MBE P, Price DA, eds. Gonorrhoea. In: *Oxford Handbook of Genitourinary Medicine, HIV, and Sexual Health*. Oxford, UK: Oxford University Press; 2010:133-147.
<http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199571666.001.1/med-9780199571666-chapter-07>.
73. Estridge H, B, Reynolds P, A. Basic clinical laboratory techniques. 2012 p. 779
74. Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bournoux, M.-E., Beretti, J.-L., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., Grall, N., Mory, F., Dubreuil, L., Berche, P., Nassif, X. and Ferroni, A. (2012), MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 1117–1125. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03688.x
75. Andreas Wieser, Lukas Schneider, Jette Jung, Sören Schubert. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 February; 93(3): 965–974. Published online 2011 December 25. doi: 10.1007/s00253-011-3783-4
76. Lacroix C, Gicquel A. et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clinical Microbiology and Infection* Volume 20, Issue 2, pages 153–158, February 2014. DOI: 10.1111/1469-0691.12210
77. Makuška R. Polimerų tyrimo metodai. VU 2011. p.157
78. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology*. 2015;16(1):191. doi:10.1186/s13059-015-0759-1.
79. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus* iners in health and dysbiosis. *Microbiome*. 2013 Apr 12; 1(1):12.

80. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clinics in laboratory medicine*. 2014;34(4):747-761. doi:10.1016/j.cll.2014.08.006.
81. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2013;1:29. doi:10.1186/2049-2618-1-29.
82. Jane R. Schwebke, Christina A. Muzny, and William E. Josey. Role of *Gardnerella vaginalis* in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: A Conceptual Model. *The Journal of Infectious Disease* 2014 210: 338-343.
83. Paramel Jayaprakash T, Schellenberg JJ, Hill JE (2012) Resolution and Characterization of Distinct *cpn60*-Based Subgroups of *Gardnerella vaginalis* in the Vaginal Microbiota. *PLoS ONE* 7(8): e43009. doi:10.1371/journal.pone.0043009
84. Menard P, J, Fenollar F, et. al Molecular Quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Loads to Predict Bacterial Vaginosis *Clin Infect Dis*. (2008) 47 (1): 33-43 doi:10.1086/588661
85. Sujatha Srinivasan and David N. Fredricks, „The Human Vaginal Bacterial Biota and Bacterial Vaginosis“, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2008, Article ID 750479, 22 pages, 2008. doi:10.1155/2008/750479
86. Tevfik Dorak. Real-time PCR. Newcastle University Newcastle-upon-Tyne, UK. 2007 p.46-50
87. Lúcia Martins Teixeira, Vânia Lúcia Carreira Merquior. Molecular typing in bacterial infections. Chapter: Enterococcus. DOI 10.1007/978-1-62703-185-1_2. 2013 p. 17
88. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Boston 2014
89. Ryan KJ, Ray C. *Corynebacterium*, *Listeria*, and *Bacillus*. In: Ryan KJ, Ray C. eds. *Sherris Medical Microbiology*, 6e. New York, NY: McGraw-Hill; 2014.
90. Levinson W. Gram-Negative Rods Related to the Respiratory Tract. In: Levinson W. eds. *Review of Medical Microbiology and Immunology*, 14e. New York, NY: McGraw-Hill; 2016.
91. Ryan KJ, Ray C. Enterobacteriaceae. In: Ryan KJ, Ray C. eds. *Sherris Medical Microbiology*, 6e. New York, NY: McGraw-Hill; 2014.
92. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th Edition. 2015 p.

93. Shari E. Gelber, Jorge L. Aguilar et al. Functional and Phylogenetic Characterization of Vaginolysin, the Human-Specific Cytolysin from *Gardnerella vaginalis*. 10.1128/JB.01965-07J. *Bacteriol.* June 2008 vol. 190 no. 11 3896-3903
94. Romanoa L, Spanub T, Calistac F. et al. *Tsukamurella tyrosinosolvens* and *Rhizobium radiobacter* sepsis presenting with septic pulmonary emboli. *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 17, 2011, Pages 1049–1052. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03396.x.
95. Matros L, Pandrea L, S. et al. Uncommon species of non – fermentative Gram – negative bacilli in the infectious diseases pathology. *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society*. 2015
96. Donders G., Vereecken, A., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Salembier, G. and Spitz, B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2002 109: 34–43. doi:10.1111/j.1471-0528.2002.00432.x
97. Aiping Fan, Yingli Yue, Nv Geng, Huiying Zhang et al. Aerobic vaginitis and mixed infections: comparison of clinical and laboratory findings. *General Gynecology Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2013, Volume 287, Issue 2, pp 329-335.
98. Whidbey C, Vornhagen J, Gendrin C. et al. A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury. *EMBO Mol Med* 2015. 7: 488–505. DOI 10.15252/emmm.201404883
99. Lawrence C Madoff, Daniel J Sexton. *Group B streptococcus: Virulence factors and pathogenic mechanisms*. UpToDate, 2015.
100. Mahnaz Mahmoudi Rad, Ameneh Sh Zafarghandi, Maryam Amel Zabihi, Mahkam Tavallae, and Yasaman Mirdamadi, “Identification of *Candida* Species Associated with Vulvovaginal Candidiasis by Multiplex PCR,” *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Article ID 872169, 5 pages, 2012. doi:10.1155/2012/872169
101. Vermitsky J-P, Self MJ, Chadwick SG, et al. Survey of Vaginal-Flora *Candida* Species Isolates from Women of Different Age Groups by Use of Species-Specific PCR Detection . *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(4):1501-1503. doi:10.1128/JCM.02485-07.
102. Jahic M, Mulavdic M, Nurkic J, Jahic E, Nurkic M. Clinical Characteristics of Aerobic Vaginitis and Its Association to Vaginal Candidiasis, *Trichomonas* Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Medical Archives*. 2013;67(6):428-430. doi:10.5455/medarh.2013.67.428-430.

103. Rodriguez M, J, Collins D, M, Sjoden 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.
104. Taj Y., Nasir D., Kahkashan N., Anjum A. Sensitivity and specificity of rapid clinical diagnostic test for BV and its analytical value. J Dow Uni Health Sci, 6(3), 91-94. 2012.
105. Mohammadzadeh F, Dolatian M, Jorjani M, Alavi Majd H. Diagnostic Value of Amsel's Clinical Criteria for Diagnosis of Bacterial Vaginosis. Global Journal of Health Science; Vol. 7, No. 3; 2015; ISSN 1916-9736.
106. Harwich MD, Alves JM, Buck GA, et al. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. BMC Genomics. 2010;11:375. doi:10.1186/1471-2164-11-375.
107. 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 Microbiology. 2004;4:16. doi:10.1186/1471-2180-4-16.
108. Turovskiy Y, Noll KS, Chikindas ML. The etiology of bacterial vaginosis. Journal of applied microbiology. 2011;110(5):1105-1128. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04977.x.
109. Polatti F. Bacterial Vaginosis, *Atopobium vaginae* and Nifuratel. Current Clinical Pharmacology. 2012;7(1):36-40. doi:10.2174/157488412799218824.
110. Hardy L, Jespers V, Dahchour N, Mwambarangwe L, Musengamana V, Vaneechoutte M, et al. Unravelling the Bacterial Vaginosis-Associated Biofilm: A Multiplex *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* Fluorescence In Situ Hybridization Assay Using Peptide Nucleic Acid Probes. PLoS ONE 10(8): e0136658. 2015 doi:10.1371/journal.pone.0136658
111. Smith WL, Hedges SR, Mordechai E, et al. Cervical and Vaginal Flora Specimens Are Highly Concordant with Respect to Bacterial Vaginosis-Associated Organisms and Commensal *Lactobacillus* Species in Women of Reproductive Age. Forbes BA, ed. Journal of Clinical Microbiology. 2014;52(8):3078-3081. doi:10.1128/JCM.00795-14.
112. Nzomo J, Waiyaki P, Waihenya R. Bacterial Vaginosis and Correlates in Women of Reproductive Age in Thika, Kenya. Advances in Microbiology, 2013, 3, 249-254 <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.33036>.
113. Madhivanan P, Krupp K, Chandrasekaran V, et al. PREVALENCE AND CORRELATES OF BACTERIAL VAGINOSIS AMONG YOUNG WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE IN MYSORE, INDIA. Indian journal of medical microbiology. 2008;26(2):132-137.